



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”**



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS DE *Foeniculum vulgare***

Trabajo de grado presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para
optar al título de Licenciados en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Rosa Elena Angarita Zerpa

C.I: V- 23.442.376

Beitsay Coromoto Torres Garcia

C.I: V- 26.198.306

Tutor (a):

Prof. Alida Alejandra Pérez Colmenares

Mérida, Noviembre de 2023

DEDICATORIA

Agradezco profundamente a Dios por darme la perseverancia, entendimiento, sabiduría, constancia y por fortalecerme y llenarme de ánimos para continuar y culminar mi tesis. Gracias señor Gracias.

A mi querida madre, cuya presencia en mi vida ha sido una fuente de amor y apoyo, gracias por siempre estar y creer en mí, tus enseñanzas y valores han guiado mi camino y hoy me permiten lograr una meta más. Gracias mamita de mi corazón. Y a mi padre que sé que me cuida desde el cielo y esta tan feliz como yo de verme cumplir mis sueños.

A mis hermanas, gracias por su apoyo incondicional y motivación por nunca dudar de mis capacidades, sin ustedes esto no fuera posible, gracias por siempre estar para mí, las adoro.

Y al regalo más hermoso de mi vida mi mayor inspiración y motivación, mi princesa Danna Sophia gracias por llegar a mi vida Te Amo mi niña.

A mis amigas que me dejo este largo recorrido, porque siempre me apoyaron y animaron, y a mi compañera de tesis por enseñarme el verdadero significado del trabajo en equipo y la colaboración, por su dedicación y compromiso, gracias por todo, lo logramos.

Rosa

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza, sabiduría y entendimiento necesario, para poder llegar hasta aquí y alcanzar la meta anhelada, porque en los instantes que más necesité nunca me desamparo. Gracias, gracias, gracias.

A mi hijo amado Mateo, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

A mi madre Omaira, por ser mi apoyo incondicional, quien con sus palabras de aliento no me dejaba decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpla con mis ideales.

A mi compañero de vida Anthony, infinitas gracias por la espera, ayudarme, apoyarme, por ser mi compañía en este camino, por creer siempre en mí y en mis capacidades, por las risas en los momentos más difíciles, por seguir siempre junto a mí en las buenas y en las malas.

A mis hermanos Marcos y Francisco, aunque no se encuentren en este plano terrenal me han enseñado lo valioso de la vida y en vivirla haciendo lo que más amas.

A mi compañera de tesis, quien me hacía reaccionar cuando pensaba que no podía continuar, gracias por su paciencia, por entenderme y por el apoyo en todo momento. Gracias infinitas.

Beitsay

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución, por su compromiso con la excelencia académica y por brindarnos las herramientas necesarias para llevar a cabo dicho investigación.

A nuestra tutora, Profesora Alida Pérez por su guía y apoyo durante todo el proceso de la investigación, gracias por la orientación, dedicación y paciencia para culminar con éxito nuestra tesis.

A las profesoras, Ysbelia Obregón y Rosa Aparicio por su orientación, asesoramiento y colaboración para lograr los objetivos planteados, gracias por su dedicación a la formación académica que fue fundamental para tal investigación.

Al profesor Pablo Meléndez, por su colaboración en la identificación taxonómica de la planta para dicha investigación y compromiso con el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Tabla de Contenido

	Pág.
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras.....	x
Índice de Gráficos.....	xii
Índice de Esquemas.....	xiii
Índice de Anexos.....	xiv
Resumen.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación</i>	8
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	12
Bases Teóricas.....	14
<i>Familia Apiaceace</i>	14
<i>Género Foeniculum</i>	17
<i>Especie Foeniculum vulgare</i>	20
<i>Productos Naturales</i>	25
<i>Extractos Vegetales</i>	35
<i>Análisis Fitoquímico Preliminar</i>	42

Tabla de Contenido (Continuación)

	Pág.
<i>Radicales Libres</i>	49
<i>Antioxidantes</i>	55
<i>Actividad Antioxidante</i>	58
Definición Operacional de Términos.....	65
Operacionalización de las Variables.....	66
Hipótesis.....	69
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	70
Tipo de Investigación.....	70
Diseño de Investigación.....	70
Población y Muestra.....	71
<i>Unidad de Investigación</i>	71
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	71
Sistema de Variables.....	71
Instrumentos de Recolección de Datos.....	72
Procedimiento de la Investigación.....	72
<i>Recolección de la planta</i>	72
<i>Preparación del material vegetal</i>	72
<i>Preparación de los extractos</i>	73
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	77
<i>Actividad Antioxidante</i>	83
Diseño de Análisis.....	87
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	88
Tamizaje Fitoquímico.....	89
Actividad Antioxidante.....	96

**Tabla de Contenido
(Continuación)**

	Pág.
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	105
Conclusiones.....	105
Recomendaciones.....	107
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	108
ANEXOS.....	117

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág
Tabla		
1	Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza.....	57
2	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	67
3	Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	68
4	Características físicas de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	88
5	Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	90
6	Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	91
7	Resultados obtenidos de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	97
8	Datos para curva de calibración con ácido ascórbico.....	98
9	Valores obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto etanólico de los tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	99
10	Valores obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto etanólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i>	100

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág
Figura		
1	Algunos compuestos aislados de la familia Apiaceae.....	15
2	Algunos compuestos aislados del género <i>Foeniculum</i>	18
3	Especie <i>Foeniculum vulgare</i>	21
4	Algunos compuestos aislados de <i>Foeniculum vulgare</i>	23
5	Estructura química general de las cumarinas.....	28
6	Estructura química del núcleo de flavano.....	28
7	Estructuras básicas de las principales clases de flavonoides...	29
8	Estructura química de las saponinas esteroides.....	30
9	Estructura química de un alcaloide.....	31
10	Equipo de reflujo.....	37
11	Columna para lixiviación.....	38
12	Sistema de extracción Soxhlet.....	39
13	Equipo para realizar destilación por arrastre con vapor de agua.....	40
14	Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.....	44
15	Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.....	45
16	Sistema benzopirona.....	46
17	Reacción química de ensayo de Shinoda para detección de flavonoides.....	46
18	Reacción de Liebermann-Burchard para identificación de terpenoides y esteroides.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

N° Figura		Pág
19	Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).....	60
20	Extracción continua en caliente bajo reflujo.....	73
21	Filtración de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	74
22	Concentración de los extractos en el rotavapor.....	74
23	Extractos etanólicos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	75

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICOS

N°		Pág
Gráfico		
1	Curva de calibración con ácido ascórbico.....	99
2	Determinación de la CI_{50} del extracto etanólico de los tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	100
3	Determinación de la CI_{50} del extracto etanólico de las hojas de <i>Foeniculum vulgare</i>	101

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

N°		Pág
	Esquema	
1	Metabolitos secundarios vegetales y sus rutas metabólicas.....	32
2	Procedimiento empleado para la obtención de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	76
3	Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	80
4	Procedimiento para determinar la actividad antioxidante y la CI_{50} de los extractos de las hojas y tallos de <i>Foeniculum vulgare</i>	86

ÍNDICE DE ANEXOS

N°		Pág
Anexo		
1	Voucher A R y T B 01.....	117
2	Certificado de identificación taxonómica de <i>Foeniculum vulgare</i>	118

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS DE *Foeniculum vulgare*

Autores:

Rosa Elena Angarita Zerpa

C.I: V- 23.442.376

Beitsay Coromoto Torres Garcia

C.I: V- 26.198.306

Tutor (a):

Alida Alejandra Pérez Colmenares

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química y la actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* frente al radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo (DPPH). La especie se adquirió en el Mercado Principal del estado Mérida y fue identificada en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Se procesó en el Laboratorio de Productos Naturales A, para lo cual se seleccionaron y separaron las partes aéreas (hojas, tallos) y se secaron en estufa a 40 °C y luego se molieron. Posteriormente, se obtuvieron los extractos etanólicos de las hojas y tallos por la técnica de reflujo. El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en ambos extractos, adicionalmente se detectaron glicósidos cardiotónicos en el extracto de las hojas. La actividad antioxidante frente al radical DPPH tuvo un porcentaje de inhibición de 92,17 % para el extracto etanólico de los tallos y 86,44 % para el extracto etanólico de las hojas, mientras que la concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue de 37,95 µg/mL y 106,73 µg/mL, respectivamente. En este estudio se confirmó que la composición química de los extractos de *Foeniculum vulgare* está estrechamente relacionada con la actividad antioxidante, constituyendo una fuente de metabolitos secundarios con potencial para inhibir los radicales libres y evitar el estrés oxidativo. De modo que, este es el primer reporte de actividad antioxidante de *Foeniculum vulgare* de Mérida-Venezuela.

Palabras claves: *Foeniculum vulgare*, Tamizaje fitoquímico, Actividad antioxidante, DPPH, Radicales libres.

INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante se define como la capacidad de una sustancia para inhibir la oxidación de diferentes biomoléculas. Así un antioxidante es un mecanismo de defensa que actúa principalmente gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres, ya que la producción de estos genera un desequilibrio conocido como estrés oxidativo, produciendo alteraciones en el ADN y cambios diversos que aceleran el envejecimiento del cuerpo y pueden ser responsables de un gran número de enfermedades. Por lo tanto, varios estudios se han centrado en el uso de antioxidantes sintéticos y naturales como potentes eliminadores de radicales libres y efectos beneficiosos sobre la salud humana y prevención de enfermedades; sugiriendo antioxidantes naturales ya que los sintéticos han mostrado efectos tóxicos y/o mutagénicos (Londoño, 2012).

De tal manera, que una de las fuentes naturales de las que se puede conseguir estos compuestos y consumirlos en la dieta son las plantas. Debido a que se ha demostrado que sus metabolitos secundarios como los flavonoides, ayudan a equilibrar los radicales libres del organismo, ganando mucho reconocimiento por su potencial anticancerígeno y efectos de promoción de la salud debido a sus atributos antioxidantes (Rodrigues, Soszynski, Martins, Rauter, Neng, Nogueira, Varela, Barreira y Custódio, 2015).

En tal sentido, en la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de las hojas y tallos de la planta *Foeniculum vulgare* frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

De este modo, el presente trabajo esta sistematizado en correspondencia con las normas de la Asociación Americana de Psicología (siglas en Ingles APA) de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, consta de los siguientes subtítulos: Planteamiento del problema, Justificación, Objetivos de la investigación, tanto general como específicos, Alcances y Limitaciones de la investigación. El Capítulo II, denominado Marco Teórico, contiene los siguientes elementos: Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas, Definición operacional de términos, Operacionalización de las variables e Hipótesis. El Capítulo III, denominado Marco Metodológico, comprende: Tipo de investigación, Diseño de la investigación, Población y muestra, Sistema de variables, Metodología de la investigación y Diseño de análisis. El Capítulo IV, se refiere a Resultados y Discusiones. El Capítulo V, encontramos Conclusiones y Recomendaciones obtenidas con el desarrollo de la investigación en relación al logro de los objetivos planteados. Posteriormente se reflejan las Referencias Bibliohemerográficas y anexos.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En los últimos años ha tomado gran interés el estudio del estrés oxidativo en el campo de la medicina. Así, la oxidación es un proceso electroquímico por el cual un ion o átomo pierde uno o varios electrones; como resultado, se producen moléculas muy inestables, denominadas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que tienen electrones capaces de reaccionar con varios sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ADN. La oxidación de esas biomoléculas genera daño, compromete las funciones celulares normales y puede contribuir a estados patológicos. Entonces, aunque estas reacciones de oxidación son necesarias para obtener energía para un adecuado funcionamiento celular, un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, genera estrés oxidativo y conlleva a disfunción y muerte celular (Lozada y García, 2009).

De esta manera, la mayoría de las reacciones de oxidación utilizan el oxígeno siendo una molécula imprescindible para la vida, pero por su alta reactividad es un elemento tóxico que al existir una perturbación del equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, genera estrés oxidativo, formándose radicales libres con impredecibles daños a nivel celular por lo que se encuentran implicados en múltiples enfermedades (Corrales y Muños, 2012).

De modo que, estos procesos oxidativos alteran la homeostasis celular, ocasionando daño a la célula, a su ADN y junto con la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, generan más daño celular. Cabe mencionar, que la radiación ultravioleta induce daño directo al ADN y además, por medio de la exposición de cromóforos, activa la producción de especies reactivas de oxígeno que inducen estrés oxidativo. El daño en el ADN produce mutaciones y genotipos celulares alterados (Lozada y García, 2009).

Así pues, desde los tiempos remotos hasta la actualidad, la humanidad ha dependido de las plantas, utilizándolas no sólo como alimento, sino que también contaban con grandes propiedades curativas, ya que de ellas obtenían productos para satisfacer necesidades, como de alimento y salud; así, se ha extendido su consumo puesto que aportan un gran potencial para prevenir, tratar y curar muchas enfermedades de acuerdo a su actividad biológica que les confiere propiedades gracias a los compuestos que poseen (Pamplona, 2006).

En tal sentido, se está impulsando el uso de antioxidantes de origen natural, ya que los de origen sintético tienden a tener una mayor toxicidad y a producir mayor cantidad de efectos secundarios. Estos antioxidantes de origen natural se encuentran en los metabolitos secundarios de las plantas como los compuestos fenólicos (Rodrigues y cols., 2015). Una de las fuentes naturales en las que pudieran conseguirse estos metabolitos secundarios son los extractos del *F. vulgare* por lo cual se plantea el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre la composición química y la actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* frente al radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo?

Justificación de la Investigación

Desde hace miles de años, el hombre fue encontrando curas para las enfermedades que le aquejaban a través de las hojas, raíces, cortezas, semillas de las plantas silvestres, estableciendo una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, conociendo los beneficios del uso de las plantas para fines terapéuticos. Así, la utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención de salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente el 60-80 % de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos. Asimismo, la población de escasos recursos económicos que tiene dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, también se recurre a la medicina tradicional (Carrillo y Moreno, 2006).

Sin embargo, fue solo hasta los años 60 cuando algunos estudios revelaron la importancia de los antioxidantes en la salud, con publicaciones acerca del efecto de los flavonoides, el ácido ascórbico y el estrés oxidativo en el cáncer. La expansión en la investigación de los antioxidantes se vería en las décadas subsiguientes, en donde varios investigadores se dedicaron a estudiar el efecto protector de los antioxidantes en diferentes patologías, como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento. Todas estas condiciones patológicas están asociadas a un estado conocido como “estrés oxidativo”, es decir, un aumento en las especies oxidantes (principalmente Especies Reactivas del Oxígeno–EROs) y/o una disminución en los mecanismos de detoxificación de ellas (Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010).

De este modo, algunos reportes muestran a la terapia antioxidante como una alternativa para prevenir y contrarrestar a las diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, manteniendo el balance entre la formación y neutralización de los radicales libres y neutralizando sus efectos dañinos, sobre la salud humana, los cuales pueden ser reducidos a través de la ingesta de antioxidantes presentes en las plantas (Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010). De acuerdo a lo anterior, es de gran relevancia confirmar la relación entre la composición química y la actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*, logrando además un aumento en la esperanza y calidad de vida de las personas.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química y la actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* frente al radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *F. vulgare* mediante la técnica de reflujo.
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las hojas y tallos de *F. vulgare* a través de pruebas químicas de coloración y/o precipitación.
- Determinar la actividad antioxidante y la concentración inhibitoria media de los extractos de las hojas y tallos obtenidos previamente frente al radical 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo (DPPH).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

En este sentido, el logro de esta investigación es validar el uso etnobotánico de *Foeniculum vulgare* como antioxidante, puesto que se verificó que sus partes contienen metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, constituyendo así esta planta una alternativa terapéutica natural frente al estrés oxidativo.

Limitaciones de la Investigación

Aunque la investigación tenga un alcance concreto, la misma presentó limitaciones en el transcurso de su desarrollo como: el alto costo de los reactivos, los recursos personales y de los proyectos del Laboratorio A de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, así como el deterioro de esta infraestructura.

Por otro lado, los constantes cortes de electricidad, agua, gas y de internet, así como los problemas con el escaso transporte tanto público como privado y la paralización de las actividades de la universidad; fueron limitantes que conllevaron a un proceso lento de la investigación. Sin embargo, estos obstáculos fueron superados dando cumplimiento a los objetivos planteados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Crescenzi, D'Urso, Piacente y Montoro (2023), publicaron un trabajo titulado: Análisis metabolómico y actividad antioxidante de los extractos de hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*. El objetivo del estudio fue cuantificar algunos metabolitos de tres variedades de diferente estacionalidad de *F. vulgare*, Tiziano (cultivo de invierno), Pegaso (cultivo de primavera) y Preludio (cultivo de verano). El material vegetal se clasificó en tallos (FVLS-T) y hojas (FVLE-T) de *F. vulgare* de Tiziano, tallos (FVLS-PE) y hojas (FVLE-PE) de *F. vulgare* de Pegaso y por último en tallos (FVLS-PR) y hojas (FVLE-PR) de *F. vulgare* de Preludio. Posteriormente, los extractos hidroalcohólicos de los tallos y hojas se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido con etanol/agua (80:20). La metodología aplicada fue la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) asociada a espectrometría de masas Q-trap utilizando el método monitoreo de reacciones múltiples (MRM), en la cual se cuantificaron diez compuestos polifenólicos en los tallos y hojas, donde se logró evidenciar un mayor contenido de flavonoides en las hojas que en los tallos de todas las variedades analizadas. Por otro lado, la actividad antioxidante fue determinada mediante los métodos de captación de radicales 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), donde cada extracto mostró una buena actividad antioxidante, así los resultados obtenidos comparados con los dos controles positivos (quercetina-3-O-glucósido y vitamina C), fueron

que las hojas en general fueron más activas que los tallos. Los datos del análisis cuantitativo mostraron que las variedades Pegaso y Preludio ejercieron la mayor actividad antioxidante, alcanzando valores de TEAC expresada en mg/mL de 1,501 para FVLE-PR y 1,676 para FVLE-PE respectivamente, con un CI_{50} para DPPH expresada en mg/mL de 0,010 para FVLE-PR y 0,634 para FVLE-PE. De acuerdo a lo anterior, este trabajo tiene relación con la investigación realizada ya que el estudio reveló que los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de hinojo presentan una importante actividad antioxidante asociada a su alto contenido de compuestos fenólicos.

Falana y Nurudeen (2023), publicaron un trabajo titulado: Componentes fitoquímicos, propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las semillas fermentadas de *Foeniculum vulgare*. El objetivo del estudio fue determinar los componentes fitoquímicos y evaluar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las semillas fermentadas de *Foeniculum vulgare*. El extracto acuoso fermentado se obtuvo por maceración con salmuera durante 14 días a temperatura ambiente, la muestra se filtró el día 7 y luego el día 14, preparando una serie de diluciones para generar diferentes concentraciones (100 %, 50 % y 25 %) de la muestra. La metodología aplicada para determinar la composición química fue el tamizaje fitoquímico, el cual mostró la presencia de taninos, terpenoides, fenoles, fitoesteroles, alcaloides y flavonoides. Por otro lado, la actividad antioxidante fue determinada mediante los métodos de captación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el ensayo de ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) a diferentes concentraciones (10-100 mg/mL). El estudio reveló que el extracto de las semillas de *F. vulgare* a una concentración de 100 mg/mL presentó un porcentaje de inhibición de 90,01 % para el DPPH y 89,64 % para el ABTS; la CI_{50} no fue determinada por los autores pero se puede

apreciar en las gráficas de porcentaje de inhibición que se encuentra por debajo de 10 mg/mL. Por otra parte, la actividad antimicrobiana se determinó mediante ensayos *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, utilizando el método de difusión en pozos de agar, arrojando que las zonas de inhibición obtenidas dependieron de las concentraciones probadas (100 %, 50 % y 25 %) y oscilaron entre 5 mm y 18 mm las muestras del día 7 y entre 6 mm y 20 mm las muestras del día 14 contra los patógenos de prueba. Por lo tanto, este trabajo tiene relación con la investigación realizada ya que el estudio reveló que el extracto de semilla de hinojo presenta una importante actividad antioxidante asociada a sus componentes fitoquímicos.

Khammassi, Habiba, Mighri, Mouna, Oumayma, Seçer y Yassine (2023), publicaron un trabajo titulado: Detección fitoquímica de aceites esenciales y componentes de extractos metanólicos de *Foeniculum vulgare* Mill. El objetivo del estudio fue determinar la composición química del aceite esencial (AE) y del extracto metanólico (EM) de las semillas de *Foeniculum vulgare* Mill, además de evaluar su actividad fitotóxica y antifúngica. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger y el extracto fue obtenido mediante la técnica de maceración con metanol y se concentró en un evaporador rotatorio al vacío a presión reducida con una temperatura de 40 °C. La metodología aplicada fue el análisis Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) para el estudio de la composición química del aceite esencial detectando elevadas cantidades de monoterpenos, compuestos principalmente de estragol (76,2 %), α -tujona (9,6 %) y limoneno (8,6 %). Por otra parte, se empleó el análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL/EM) que permitió la identificación de 18 compuestos fenólicos distribuidos en ocho ácidos fenólicos, un ácido no fenólico y nueve flavonoides en el extracto metanólico.

En un segundo paso, se evaluó su actividad fitotóxica mediante bioensayos en placas de petri a diferentes dosis con referencia a un control negativo (agua destilada) y un control positivo (glifosato) donde se evidencio que el aceite esencial y el extracto metanólico de las semillas de *F. vulgare* inhibieron completamente la germinación y el crecimiento de las plántulas de los cultivos y malezas. Por último, en cuanto a la actividad antifúngica, el aceite esencial y el extracto de las semillas de *F. vulgare* mostraron actividades variables interesantes según la dosis y la cepa probada. Por tal motivo, este trabajo respalda la investigación porque presenta información valiosa sobre la composición química del extracto metanólico de las semillas de *Foeniculum vulgare*.

Antecedentes Históricos

Antiguas civilizaciones lograron utilizar las plantas para la sanación de la salud humana, lo cual constituye hoy en día un conocimiento ancestral que sigue siendo aplicado. Sin embargo, lejos de este uso directo, la ciencia farmacológica no es más que una evolución tecnológica que a pesar de utilizar sustancias sintéticas, usa como gran base los extractos naturales de algunas plantas, de las cuales se extrae el compuesto medicinal necesario (Bravo, 2003).

Por lo que, se emplean productos de origen vegetal para la prevención, la curación o el alivio de una amplia variedad de síntomas y enfermedades. Pero, como cualquier otro medicamento, las plantas pueden provocar reacciones adversas, intoxicación por sobredosis o interacciones perniciosas con otras sustancias. De este modo, el conocimiento de las ventajas y desventajas del consumo de las plantas medicinales ha contribuido a

desarrollar nuevas estrategias y métodos adecuados para evaluar sus posibles efectos beneficiosos y perjudiciales (Blanco y García, 2019).

Las últimas décadas son testigos de un renovado interés por los productos naturales, a pesar de la gran cantidad de fármacos y otros recursos terapéuticos disponibles en el mercado. Tanto los países en desarrollo como los desarrollados se interesan en aprovechar sus recursos tradicionales para aplicarlos en los programas nacionales de salud. Así mismo, diferentes experimentos farmacológicos han demostrado de manera convincente la capacidad de ciertas plantas para exhibir actividades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes (Morales, García, Acosta, Vega, Céspedes y Perdomo, 2020).

Entre las plantas con amplio uso se destaca el *Foeniculum vulgare*, es el nombre válido más antiguo dentro del género *Foeniculum* para la planta designada por Karsten como *Foeniculum Foeniculutn*, por razones que no adoptó sistemáticamente el sistema binomial de nomenclatura. El nombre *Foeniculum vulgare* está acreditado a Philip Miller, quien lo publicó por primera vez en la octava edición de su "Diccionario de Jardineros" en 1768. Es una planta medicinal perteneciente a la familia de las Umbelíferas (Apiaceae), conocida y utilizada por los humanos desde la antigüedad, debido a su sabor (Muckensturm, Foechterlen, Reduron, Danton y Hildenbrand, 1997).

Bases Teóricas

Familia Apiaceae

La familia Apiaceae anteriormente clasificada como Umbelliferae debido a la forma similar a la sombrilla, es una familia de plantas herbáceas y algunos arbustos fanerógamos pertenecientes al orden de las Apiales. A nivel mundial se han reportado 418 géneros y alrededor de 3100 especies. Esta familia presenta numerosas plantas aromáticas que se dividen en tres subfamilias: Apioideae, Saniculoideae y la Hydrocotiloideae (Downie, Katz y Watson, 2000).

Así, esta familia se caracteriza por flores dispuestas en umbela, tallos fistulosos, hojas alternas sin estipulas generalmente muy divididas con vainas ancha. Inflorescencia en umbela simple o compuesta. Flores generalmente hermafroditas situadas en el exterior de la umbela y frutos tipo esquizocarpo que se dividen a lo largo en 2 fracciones (mericarpos), cada una con una semilla (Heywood, 1985; Downie, Katz y Watson, 2000). Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Koppula y Kumar, 2013):

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Apiales
- Familia: Apiaceae

La familia Apiaceae presenta una amplia distribución en el mundo, es cosmopolita. Incluso alcanzando el ártico de Eurasia y Norte América y las Islas Antárticas al sur del Estrecho de Magallanes y Nueva Zelanda. Se encuentran prácticamente en todos los hábitats y frecuentemente son dominantes en zonas cálidas o de altas altitudes, evitando así las tierras bajas de zonas tropicales (Robineau, 2005).

Composición química

La familia Apiaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas. Muchos estudios han reportado diversos compuestos como los mono y poliacetilénos, tales como el falcarinol **(1)** (*Daucus*), la cicutoxina **(2)** (*Cicuta*), la enantotoxina **(3)** (*Oenanthe*). Asimismo, presenta alcaloides como la coniina o cicutina **(4)**. Los flavonoides más comunes en las plantas de esta familia son el kaempferol **(5)**, quercetina **(6)** y luteolina **(7)**. Adicionalmente, se han aislado saponinas en algunas especies como *Physospermum verticillatum* y cumarinas como la umbeliferina **(8)** (Figura 1) (Christensen y Brandt, 2006).

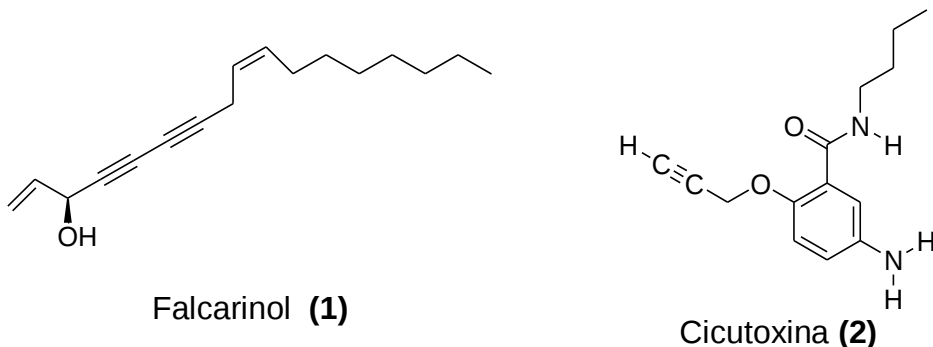


Figura 1. Algunos compuestos aislados de la familia Apiaceae.

Tomado y modificado de Christensen y Brandt, 2006; Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Villa y Bravo, 2014.

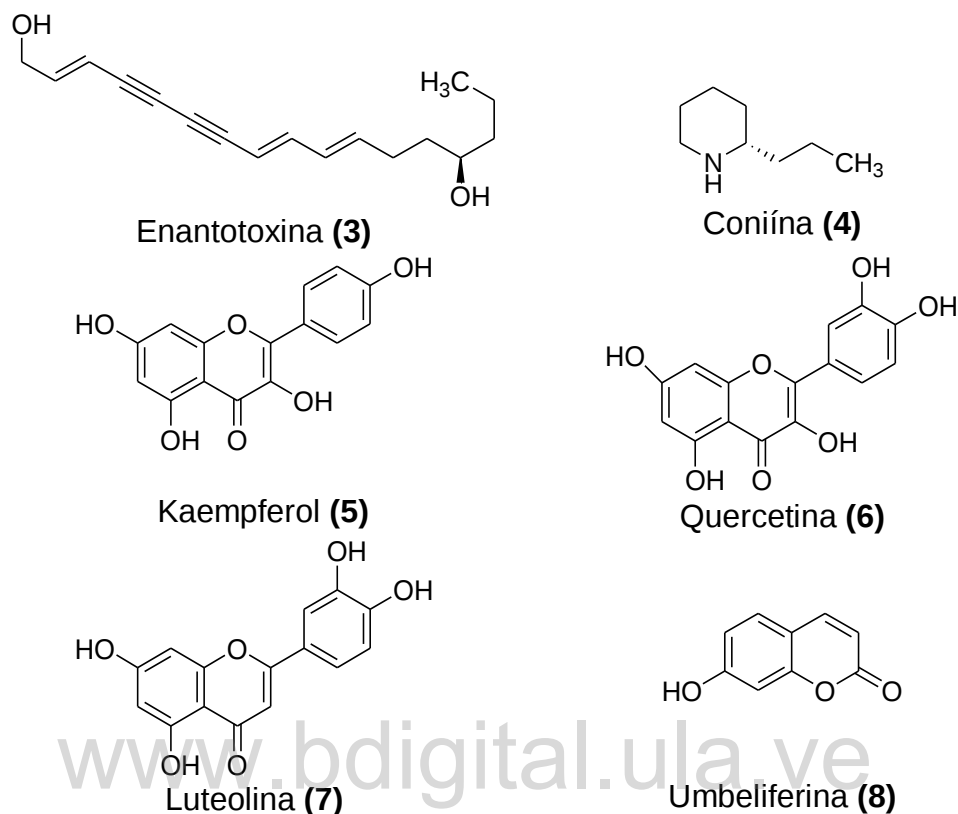


Figura 1. Algunos compuestos aislados de la familia Apiaceae
(Continuación).

Tomado y modificado de Christensen y Brandt, 2006; Peñarrieta y cols., 2014.

Usos etnobotánicos y actividades biológicas

La importancia de la familia Apiaceae desde el punto de vista económico es notable, puesto que cuenta con gran cantidad de especies, empleándose como legumbre para consumo humano entre ellas tenemos: zanahoria (*Daucus carota*), Apio (*Apium graveolens*) y condimentos como perejil (*Petroselinum crispum*); eneldo (*Anethum graveolens*) o medicinales como es el caso de *Foeniculum vulgare* por sus propiedades carminativas en el

tratamiento sintomático de desórdenes digestivos, además de usarse en la elaboración de bebidas alcohólicas como licores aromatizados. Algunas especies de esta familia son venenosas por su contenido de alcaloides, como el caso de la cicuta (*Conium maculatum*) y el nabo del diablo (*Oenanthe crocata*) cuya venta está regulada por las normativas españolas (Downie, Katz y Watson, 2000; Christensen y Brandt, 2006).

Género *Foeniculum*

Se ubica dentro de la familia de Apiaceae, que comprende unos 418 géneros y alrededor de 3100 especies. A pesar de los informes de varias especies de *Foeniculum* en todo el mundo, muchas de estas especies se han convertido en sinónimos entre sí. Actualmente, las especies aceptadas son *Foeniculum scoparium* Quézel, *Foeniculum subinodorum* Maire, Weiller & Wilczek y *Foeniculum vulgare* Mill. Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Koppula y Kumar, 2013; Kocer, 2023):

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Apiales
- Familia: Apiaceae
- Subfamilia: Apioideae
- Género: *Foeniculum*

Desde el punto de vista botánico, este género se caracteriza por especies que típicamente poseen una altura media de 2 metros, hojas de

aproximadamente 40 cm de longitud, de forma filiforme y flores que comúnmente son de un color amarillo dorado brillante matiz (Khan y Musharaf, 2014; Mehra, Tamta y Nand, 2021). El género *Foeniculum* presenta una amplia distribución, inicialmente se limitaron a los países mediterráneos y europeos, pero en los últimos años, el cultivo se ha expandido a regiones como China, África, India y el Norte de América. (Krishnamurthy, 2011; Khan y Musharaf, 2014; Mehra y cols., 2021).

Composición química

Estudios previos sobre los metabolitos secundarios presente en este género reportan la presencia de compuestos fenólicos como ácido clorogénico **(9)**, ácido caféico **(10)**, ácido *trans* ferulíco **(11)**, ácido rosmarínico **(12)** y ácido *p*-cumárico **(13)**; al igual se encontró que contenían flavonoides como kaempferol **(5)**, quercetina **(6)**, apigenina **(14)** y cinarosido **(15)**. Además de cumarinas como psoraleno **(16)**, xantotoxina **(17)** y escoparona **(18)** (Figura 2) (Roby, Sarhan, Selim y Khalel, 2012; Khan y Musharaf, 2014; Mehra y cols., 2021).

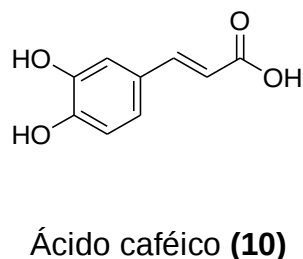
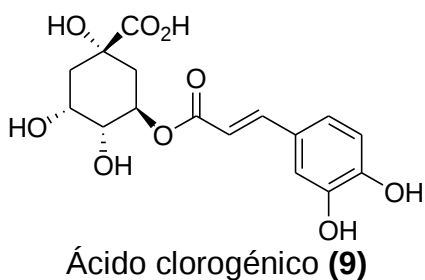
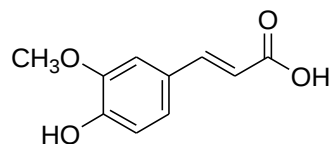
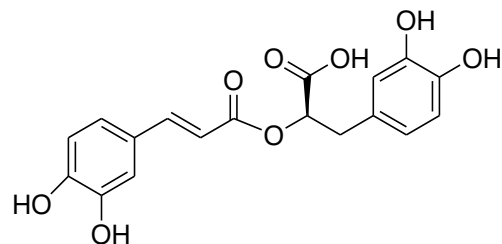


Figura 2. Algunos compuestos aislados del género *Foeniculum*.

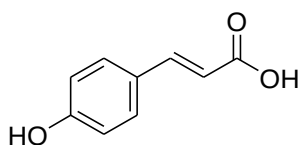
Tomado y modificado de Mehra y cols., 2021; Khammassi y cols., 2023.



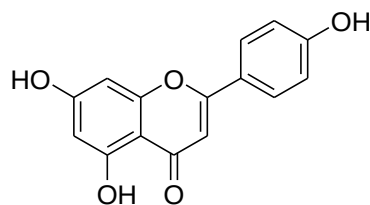
Ácido *trans* ferulico (11)



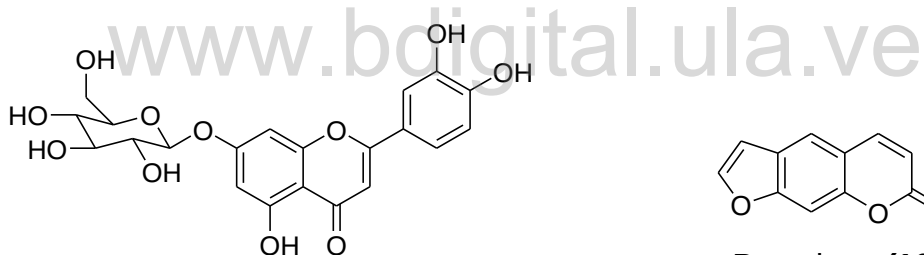
Ácido rosmarínico (12)



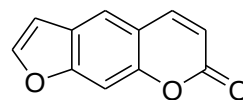
Ácido *p*-cumárico (13)



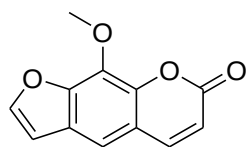
Apigenina (14)



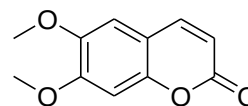
Cinarosido (15)



Psoraleno (16)



Xantotoxina (17)



Escoparona (18)

Figura 2. Algunos compuestos aislados del género *Foeniculum*
(Continuación).

Tomado y modificado de Mehra y cols., 2021; Khammassi y cols., 2023.

Usos etnobotánicos y actividades biológicas

Se puede observar, que entre las especies del género *Foeniculum*, *F. vulgare* destaca como la especie con más investigaciones sobre la composición química, siendo esta la más utilizada en cuanto a su rango de aplicaciones. Al examinar la distribución de áreas de aplicación, se pueden clasificar en tres grupos principales: salud, nutrición y la industria de pinturas. En el ámbito de la salud, se utiliza como tratamiento contra la conjuntivitis, gastritis, resfriado común, hinchazón, antiemético, diarrea hipnótica, trastornos renales, cólicos en niños, síndrome del intestino irritable, laxante, estimulación de la lactancia en mujeres embarazadas (galactagogo), visión borrosa, dolor de encías y tos. En el campo de fabricación, el tinte verde claro natural obtenido de las hojas se utiliza en cosméticos, colorantes de madera y como colorante alimentario (Kocer, 2023).

Especie *Foeniculum vulgare*

El *Foeniculum vulgare* es una de las especies del género *Foeniculum* (Figura 3), originaria de la Europa del Mediterráneo se introdujo en España en la década 1970 en áreas del litoral mediterráneo se encuentra en casi todas las provincias y en algunas de ellas su recolección está regulada. Existe una gran variedad de nombres vernáculos, tanto en castellano como en las distintas lenguas oficiales; algunos de estos nombres son: cañiguera, perejilón, cenoyo, fenojo, caramuda, fleiteiro y anado (Badgujar, Patel y Bandiudekar, 2014).



Figura 3. Especie *Foeniculum vulgare*.

Tomado y modificado de Badgujar, Patel y Bandiudekar, 2014.

En cuanto a la descripción botánica, el hinojo, *Foeniculum vulgare* es una planta perenne que puede llegar a medir hasta 250 cm. Su tallo es erecto, estriado, glauco, glabro, sin restos fibrosos en la base y ramificado en su mitad superior. Las hojas 3-4 pinnatisectas poseen un contorno triangular y son pecioladas y glabras; las caulinares son alternas y progresivamente menos divididas y más cortas, mientras que las superiores se reducen a un pequeño apéndice más corto que la vaina (Beyazen, Dessalegn y Mamo, 2017). Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Crespo y Mora, 1997):

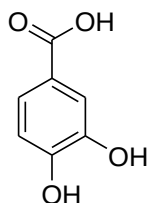
- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Apiales
- Familia: Apiaceace

- Subfamilia: Apioideae
- Género: *Foeniculum*
- Especie: *Foeniculum vulgare*

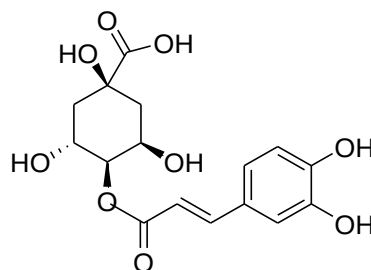
Actualmente se encuentra distribuida prácticamente por todo el mundo y en algunas zonas actúa como especie invasiva, desplazando a la flora autóctona. Esta planta crece en los márgenes de los caminos, en campos de cultivo y matorrales, está presente a nivel del mar y hasta los 1200 metros de altitud (Badgujar y cols., 2014).

Composición química

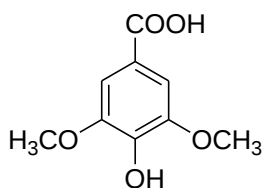
Estudios previos sobre los metabolitos secundarios que se han reportado de esta especie (Figura 4), señala una presencia significativa de compuestos fenólicos donde destacan ocho ácidos fenólicos como el ácido protocatéquico **(19)**, ácido clorogénico **(9)**, ácido 4-*O*-cafeoilquínico **(20)**, ácido cafeíco **(10)**, ácido siríngico **(21)**, ácido *p*-cumárico **(13)**, ácido *trans* ferulico **(11)**, ácido salvianólico **(22)** y un compuesto de ácido no fenólico como el ácido quínico **(23)**. Por otro lado, indica la presencia de nueve flavonoides siendo el principal por su abundancia el cirsilol **(24)**, sin embargo, hay niveles notables de epicatequina **(25)**, rutina **(26)**, quercetina 3-*O*-ramnosido **(27)**, naringenina **(28)**, apigenina **(14)**, apigenina-7-*O*-glucosido **(29)**, quercitina **(6)** y naringina **(30)** (Khammassi y cols., 2023).



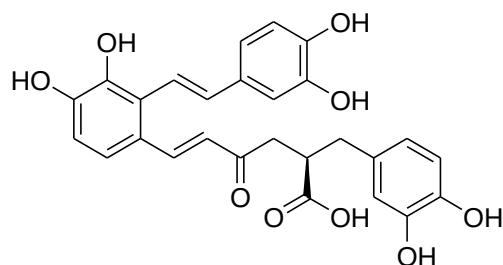
Ácido protocatéquico (19)



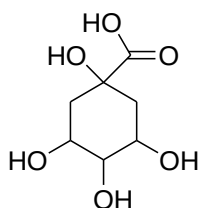
Ácido 4-O-cafeoilquínico (20)



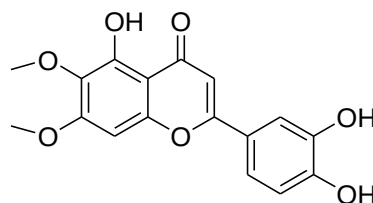
Ácido siríngico (21)



Ácido salvianólico (22)



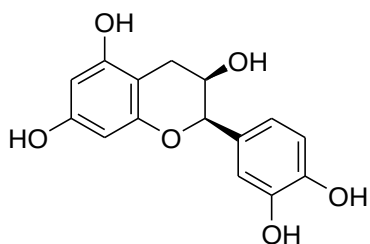
Ácido quínico (23)



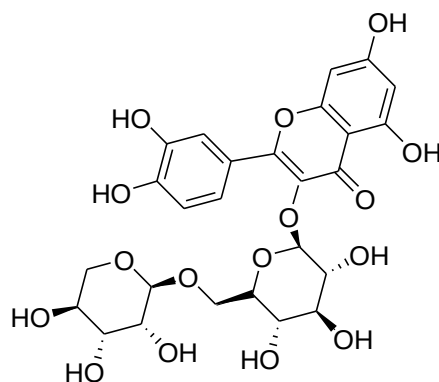
Cirsiliol (24)

Figura 4. Algunos compuestos aislados de *Foeniculum vulgare*.

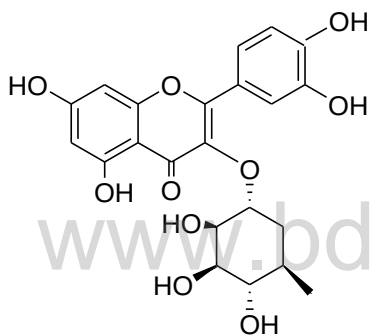
Tomado y modificado de Khammassi y cols., 2023.



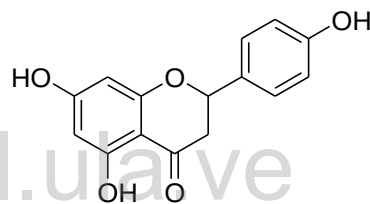
Epicatequina (25)



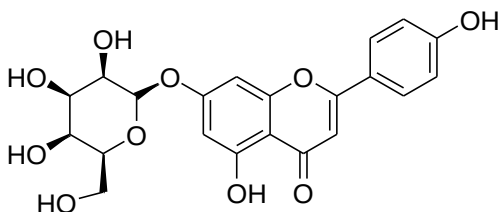
Rutina (26)



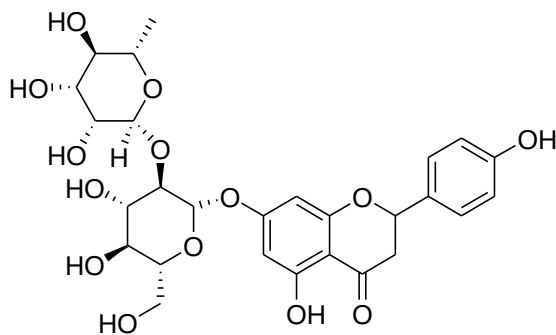
Quercetina 3-O-ramnoside (27)



Naringenina (28)



Apigenina-7-O-glucosido (29)



Naringina (30)

Figura 4. Algunos compuestos aislados de *Foeniculum vulgare* (Continuación).

Tomado y modificado de Khammassi y cols., 2023.

Usos etnobotánicos y actividades biológicas

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para determinar las propiedades farmacológicas de *Foeniculum vulgare* que demuestran que el hinojo posee las más variadas actividades; de ellas destacamos carminativa, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, ansiolítica, potenciadora de la memoria, estrogénica, galactógena, expectorante, diurética, antihipertensiva, antitrombótica, antitumoral, hipolipemiante, hipoglucemiante, antiespasmódica, antienvjecimiento, broncodilatadora y antioxidante (Muckensturm y cols., 1997).

Según Bruneton (2001), indica que las semillas se emplean de forma tradicional por sus propiedades carminativas en el tratamiento sintomático de desórdenes digestivos, tales como flatulencia, digestiones lentas, así como en procesos dolorosos por trastornos digestivos. Además se recomienda para limpiar la sangre, aumentar la secreción láctea y reminalizar el organismo.

Productos Naturales

Las plantas son fuente de innumerables recursos útiles para el desarrollo de la ciencia. A toda esa diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos productos naturales vegetales o metabolitos secundarios. Estos no son esenciales para el funcionamiento de las células vegetales y no participan en las transformaciones bioquímicas comunes. Su presencia puede llegar a ser tan específica que solo ciertas especies de una familia pueden producirlos,

proporcionando así una forma de caracterizar quimiotaxonómicamente a las plantas. También son conocidos como productos químicos, en su mayoría son utilizados para aliviar, fortalecer las defensas del cuerpo, controlar la fisiología y hasta las emociones de quien las consume (Albornoz, 1992; Marcano y Hasegawa, 2018).

Así, los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, son compuestos que no se asocian directamente a los procesos de crecimiento y desarrollo, si no que le confieren a las plantas propiedades biológicas. Por lo que, se diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos, que son sustancias esenciales que la célula vegetal necesita para su funcionamiento, por lo que su variación es mínima dentro de las plantas, como son los lípidos, aminoácidos, azúcares, entre otros (Albornoz, 1992; Marcano y Hasegawa, 2018).

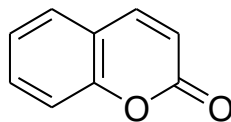
Clasificación de los productos naturales

Estos se pueden clasificar de varias formas, así se pueden agrupar de acuerdo a sus características estructurales, según el género de su fuente vegetal, por sus efectos fisiológicos, las similitudes en la ruta por la que son sintetizados (biosíntesis), su acción biológica o según su fuente de producción, pero es inevitable la superposición ya que al ser por ejemplo, moléculas polifuncionales se hace difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o pueden tener la misma acción y ser compuestos diferentes, o generar compuestos distintos y tener la misma fuente de producción. Por lo tanto, las clasificaciones estructurales y biosintéticas son el criterio más apropiado, involucrando la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 2018). De tal manera, estos se agrupan en:

Terpenos: estos incluyen un gran grupo de sustancias con un número de átomos de carbono que generalmente es múltiplo de cinco, inicialmente llamadas isoprenoides, y actualmente denominadas terpenoides, no contienen anillos aromáticos y van de sustancias de bajo peso molecular como los monoterpenos presentes en diferentes aceites esenciales hasta polímeros de más de 4.000 átomos de carbono, como el caucho. Además de las notables variaciones estructurales, presentan propiedades que las hacen útiles como materias primas fundamentales para muchos productos y procesos industriales, alimentarios y farmacéuticos (Martínez, 2020).

Por lo tanto, son los más numerosos de los metabolitos secundarios como: hormonas, pigmentos o aceites esenciales. Son insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) y se clasifican según el número de estas unidades en monoterpenos (2 unidades, 10 C), sesquiterpenos (3 unidades, 15 C), diterpenos (4 unidades, 20 C), triterpenos (6 unidades, 30 C), tetraterpenos (8 unidades, 40 C) y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Martínez, 2020).

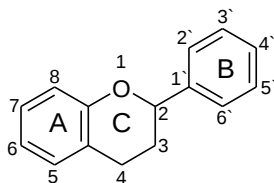
Compuestos fenólicos: derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Entre estos tenemos: el núcleo de las cumarinas **(31)** (Figura 5), son una amplia familia de lactonas, altamente fluorescentes bajo luz UV y aún en la región del visible. Las ligninas son una clase de compuestos fenilpropanoides ampliamente distribuidos en la naturaleza cuyas estructuras sustentan la visión de que se forman por dimerización oxidativa o polimerización de unidades C₆C₃ (Marcano y Hasegawa, 2018; Martínez, 2020).



Cumarina **(31)**.

Figura 5. Estructura química general de las cumarinas
Tomado y modificado de Castillo, Zavala y Carrillo, 2017.

También se encuentran los flavonoides que tienen una estructura química muy definida, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C6-C3-C6 y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano **(32)** (Figura 6). Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal. Para su estudio sistemático los más de 9000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. Así, se clasifican en varios grupos, siendo los principales (Figura 7): flavonas **(33)**, flavonoles **(34)**, flavanonas **(35)**, isoflavonoides **(36)**, antocianidinas **(37)**. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación. Uno de los flavonoides más comunes es la quercetina **(6)** (Martínez, 2020).



Núcleo de flavano **(32)**.

Figura 6. Estructura química del núcleo de flavano
Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2018.

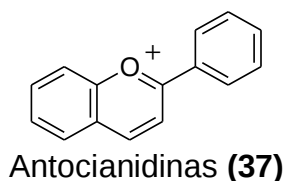
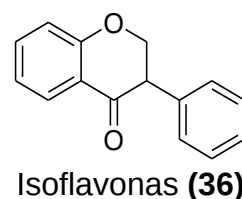
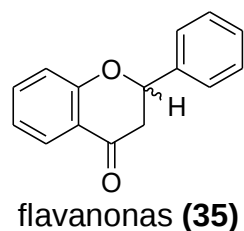
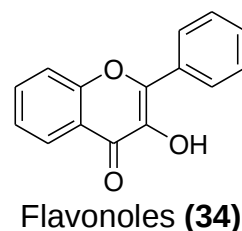
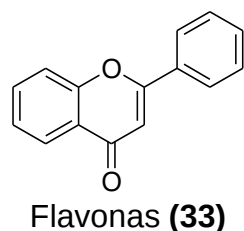


Figura 7. Estructuras básicas de las principales clases de flavonoides.

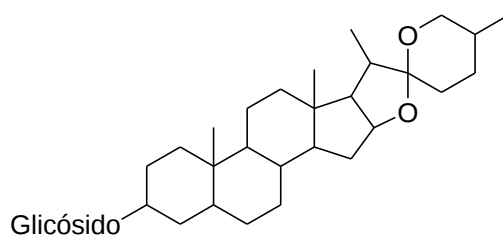
Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Y por último, los taninos son polímeros de alto peso molecular que se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores y por ello se los considera productos universales; junto con las ligninas están dentro de las células en asociación íntima con la celulosa formando el tejido de sostén de los vegetales superiores. Su función en las plantas no está clara se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los árboles pobres en taninos se pudren rápidamente) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Glicósidos: su nombre hace referencia al enlace glicosídico. Así, existen cuatro grupos de interés: saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos. De esta manera, las saponinas son glicósidos terpenoides, que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial de las

soluciones acuosas. Así se han estudiado dos grandes grupos como son las saponinas triterpenoides y las saponinas esteroides. Las primeras, son ampliamente distribuidas en las plantas, con propiedades hemolíticas, membranolíticas y tóxicas contra hongos; se están estudiando por sus propiedades benéficas para la salud, como potencial protección contra el riesgo de cáncer, la disminución de los niveles de colesterol y azúcar en la sangre, además de propiedades antiinflamatorias (Martínez, 2020).

Por otro lado, las saponinas esteroides **(38)** (Figura 8), constituyen desde hace muchos años, una materia prima importante para la producción de medicamentos esteroides, presentan actividades biológicas como: citotóxica, anticáncer, antiinflamatoria, antihongos, hemostática, etc. Tienen la propiedad de formar espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas (Martínez, 2020). De esta manera, las saponinas contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura; también se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Marcano y Hasegawa, 2018).



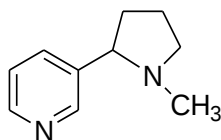
Saponina esteroide **(38)**

Figura 8. Estructura química de las saponinas esteroidales

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Por otro lado, los glicósidos **cardiacos o cardenólidos** son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Mientras los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, sintetizados por algunas plantas y que por hidrólisis ácida, liberan cianuro de hidrógeno, capacidad, conocida como ciano génesis. Y los glucosinolatos (conocidos con la sigla GS) son metabolitos secundarios azufrados, que desempeñan papeles importantes en los vegetales, por ejemplo, como anti herbívoros, y que además presentan actividades como la prevención contra el cáncer y actividad antibiótica (Ávalos y Pérez, 2009; Martínez, 2020).

Alcaloides: los alcaloides, como la nicotina **(39)**, son sustancias de origen biológico que además de carbono, hidrógeno y oxígeno; contienen nitrógeno (Figura 9). Son de carácter alcalino, con por lo menos un átomo de N en un heterociclo, que presentan actividad biológica y se encuentran especialmente en las plantas superiores. Son derivados de aminoácidos, insolubles en agua y forman sales con ácidos minerales (Martínez, 2020).



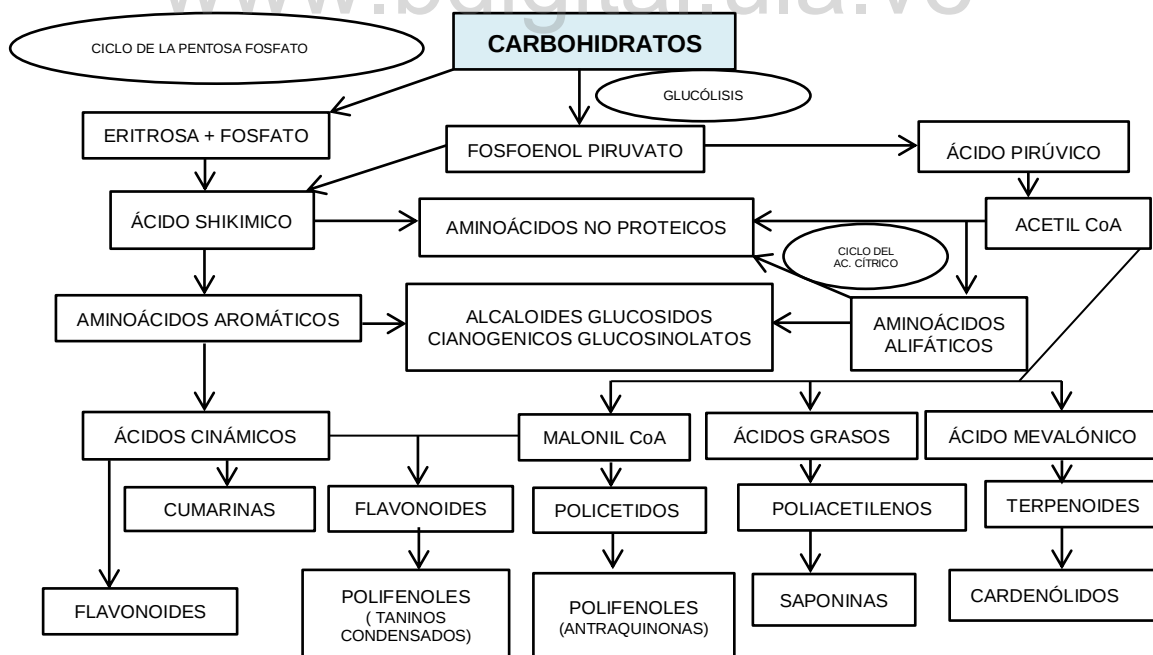
Nicotina **(39)**

Figura 9. Estructura química de un alcaloide
Tomado y modificado de Castillo y cols., 2017.

Biosíntesis de los productos naturales

Esta se lleva a cabo a través de la fotosíntesis en las plantas superiores y algas, siendo un proceso endotérmico que necesita de la luz solar y los que no absorben la luz obtienen energía para la biosíntesis de los carbohidratos (Esquema 1). De esta manera, los compuestos simples se modifican, se recombinan y forman grandes moléculas, donde los metabolitos secundarios se forman por distintas vías. Así, los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, algunos contienen oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y halógenos, aunque estos últimos son menos frecuentes. Por lo que, las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Marcano y Hasegawa, 2018).

Esquema 1. Metabolitos secundarios vegetales y sus rutas metabólicas.



Tomado y modificado de Camacho, Ramos, Ávila, Sanchez y López, 2020.

De manera que, la biosíntesis de los terpenos o terpenoides se lleva a cabo a partir de metabolitos primarios. Por lo que, hasta hace algunos años se pensaba que todos los compuestos terpenoides naturales se biosintetizaban por la ruta de la acetilcoenzima a través de un intermedio común que es el ácido mevalónico (sigla inglesa MVA). Sin embargo, recientemente se tienen evidencias que algunos terpenoides no se originan solo por esta ruta, sino también por dos rutas alternas, una ruta que se denomina la ruta modificada del ácido mevalónico y una ruta alterna que puede involucrar piruvato, gliceraldehído-3-fosfato y un intermedio de 5 átomos de carbono: el metileritritolfosfato (sigla inglesa MEP). Así, la ruta clásica del ácido mevalónico ocurre en el citosol de las células vegetales y da origen a terpenoides C_{15n} (n = impar), mientras que la ruta del metileritritol fosfato ocurre en los plastidios y da origen especialmente a terpenoides C_{10n} (Martínez, 2020).

Por lo que, en el proceso de biogénesis del ácido mevalónico inicialmente se condensan dos moléculas de acetilCoA, con la participación hipotética de una β -cetotilasa y una enzima condensante. Enseguida esta unidad es atacada por otra unidad de acetilCoA que ha perdido un H- α . La hidrólisis de una de las dos funciones tioéster da lugar a la β -hidroxi- β -metilglutarilcoenzima-A. Una segunda hidrólisis del otro grupo tioéster seguida de dos reducciones sucesivas con una reductasa NADPH-dependiente se llega al ácido mevalónico. El ácido mevalónico es el precursor de las dos unidades básicas que dan origen a los terpenoides: Isopentenilpirofosfato (IPP) y γ,γ -dimetilalilpirofosfato (DMAPP), estos dos intermedios también son generados a través de las rutas alternas del ácido mevalónico modificado y del metileritritol fosfato (Martínez, 2020).

Por otra parte, la biosíntesis de compuestos fenólicos en las plantas superiores se da por la ruta del ácido shikímico, siendo responsable de la

biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos, a partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico, se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. De modo que, el proceso enzimático en la planta comienza con la producción de fenilalanina y tirosina. La fenilalanina es el sustrato de la fenilalanina amonio liasa, una enzima clave que conduce a la formación de los compuestos fenólicos (Ávalos y Pérez, 2009; Peñarrieta y cols., 2014).

Otros compuestos fenólicos como el ácido gálico y sus derivados se forman a partir de la 3-dehidroshikimato vía dehidroshikimato deshidrogenasa. El metabolismo central de la vía fenil propanoide comienza cuando la fenilalanina amonio liasa convierte la fenilalanina en ácido cinámico y es hidroxilado por el ácido cinámico 4-hidroxilasa. Por último, el ácido 4-cumárico es esterificado por la coenzima A por el ácido 4-cumárico: ligasa CoA. La biosíntesis de flavonoides continúa por la vía de los fenilpropanoides, comenzando con la formación de chalconas mediante una reacción catalizada por chalcona sintetasa con ácido 4-cumárico: CoA y malonil-CoA como sustrato. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos y Pérez, 2009; Peñarrieta y cols., 2014).

En cambio, los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, que se forman del enlace glicosídico cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este

grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Mientras que los alcaloides naturales derivan principalmente de aminoácidos como ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido antranílico, ácido nicotínico y en menos proporción asparagina, prolina y ácido glutámico. Así, Fenilalanina, tirosina y ácido antranílico, derivan del ácido shikímico; mientras que el triptófano deriva del ácido antranílico, es decir, también de ácido shikímico. Por otro lado, a partir de los aminoácidos no aromáticos ornitina y lisina se originan diversos alcaloides que tienen los anillos N-metilpirrolidina (anillo de 5) y piperidina (anillo de 6), como son los alcaloides tipo pirrolidina, pirrolozidina, del tropano, esparteína y lupina, del licopodio, entre otros (Martínez, 2020).

www.bdigital.ula.ve **Extractos Vegetales**

Los extractos vegetales se han definido como preparaciones líquidas o en polvos obtenidos por la retirada de los principios activos de los vegetales por diversas metodologías de extracción, con la finalidad de concentrar las sustancias (Nascimento, Diniz, De Mesquita, De Oliveira y Costa, 2008).

Se puede definir entonces a la extracción como la separación de una sustancia del seno de una mezcla, por la acción de un disolvente que la disuelve selectivamente (Lamarque, Zygodlo, Labuckas, López, Torres y Maestri, 2008).

Métodos de Obtención de Extractos

De tal manera, que para aprovechar los principios activos de los vegetales se debe extraer secuencialmente los componentes de un tejido vegetal, generalmente se parte de material molido y deshidratado, para evitar la posible formación de emulsiones entre el agua contenida en el material y los disolventes orgánicos a utilizar. El tipo de compuestos orgánicos a extraer dependerá fundamentalmente de la polaridad del disolvente elegido. Normalmente, para realizar una extracción secuencial, se comienza con un disolvente poco polar (hexano, éter de petróleo, cloroformo). Luego de la extracción, el residuo se separa del disolvente y se somete a una nueva extracción empleando un disolvente de mayor polaridad éter etílico, metanol, etc (Lamarque y cols., 2008).

Extracción por Reflujo: en el proceso de reflujo, el material previamente disuelto en el solvente elegido, se somete a ebullición. Para evitar que un calentamiento excesivo evapore el solvente se utiliza un sistema de reflujo (Figura 10) que consiste en enfriar el vapor del solvente con un refrigerante y devolverlo al balón que contiene el material para continuar el proceso, esto además garantiza que no haya pérdidas ni de material ni de solvente durante el proceso de extracción. La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados, ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque y cols., 2008).

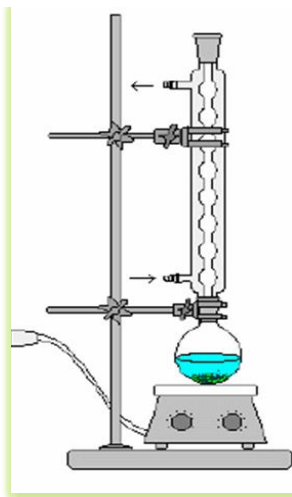


Figura 10. Equipo de reflujo.

Tomado y modificado de Lamarque y cols., 2008.

Extracción por Maceración: la maceración es una técnica de extracción que consiste en remojar el material a extraer, debidamente fragmentado, con un disolvente apropiado, hasta que éste penetre los tejidos ablandando y disolviendo las porciones solubles. Debe realizarse en un recipiente que no interfiera ni reaccione con el disolvente, preferiblemente de vidrio. Se coloca el material a extraer y se cubre con el disolvente. Se tapa y se deja en reposo, con 19 agitaciones ocasionales. Finalmente se filtra el líquido y si la extracción no está completa se repite el procedimiento (Lamarque y cols., 2008).

Extracción por Lixiviación o Percolación: es un proceso ampliamente difundido que consiste en colocar el material fragmentado en un recipiente cónico o cilíndrico (Figura 11), haciendo pasar un disolvente apropiado a través del mismo. El tamaño de las partículas del material a extraer no debe ser menor a los 3 mm aproximadamente, dado que el disolvente no percolará. Sin embargo, el material debe estar debidamente compactado de modo que el disolvente eluya con cierta lentitud dando tiempo al mismo a

tomar contacto con los tejidos y extraer los componentes deseados. De otra manera, el residuo deshechado contendrá gran parte del componente de interés. Este método no difiere significativamente de la maceración, aunque requiere el agregado de solvente en forma constante (Lamarque y cols., 2008).



Figura 11. Columna para Lixiviación.

Tomado y modificado de Lamarque y cols., 2008.

Extracción en Soxhlet: utiliza un sistema de evaporación y condensación continua sobre una muestra generalmente seca y molida previamente (Figura 12). Se utilizan solventes orgánicos de mediana o baja polaridad como hexano, diclorometano, entre otros. Es muy utilizada para la extracción de sustancias de mediana y baja polaridad, particularmente lípidos tales como triglicéridos, terpenoides, etc. Presenta como ventaja que al ser un proceso continuo se pueden realizar extracciones exhaustivas de las sustancias de interés, a las temperaturas de ebullición de los solventes usados (Martínez, 2020).

La extracción en Soxhlet permite el trabajo con muestras de 10 a 30 g, no requiere de filtración después de la extracción, y no requiere generalmente que esté presente el analista todo el tiempo durante el proceso de extracción. Las desventajas incluyen los tiempos largos de extracción (dependiendo del

tamaño de la muestra hasta 24-48 horas), los volúmenes grandes de solventes orgánicos necesarios y la necesidad de concentrar (evaporar) grandes volúmenes de solventes (Martínez, 2020).

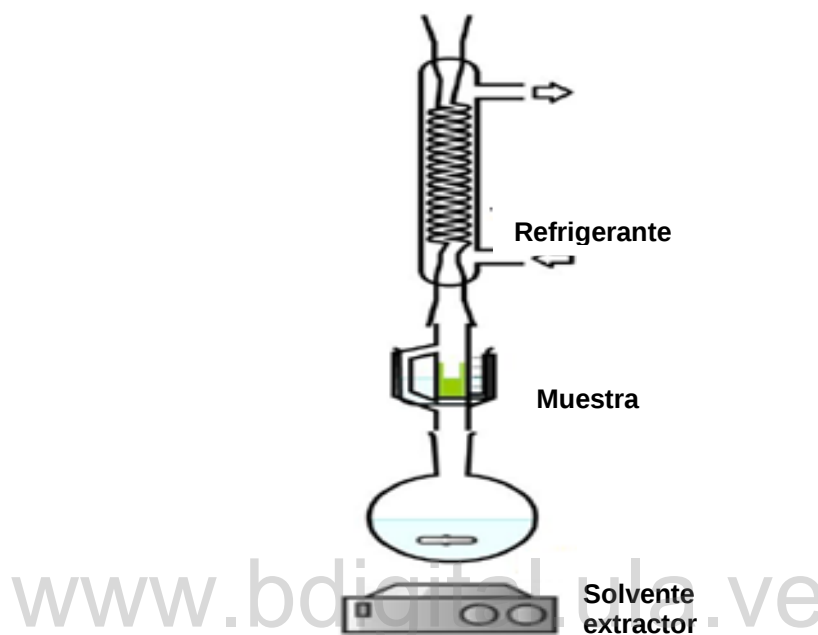


Figura 12. Sistema de extracción Soxhlet.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Extracción por arrastre con vapor: el más antiguo y sencillo método para obtener aceites esenciales es la destilación por arrastre con vapor, a partir del material vegetal, lo más fresco posible. Si un líquido orgánico es insoluble en agua y tiene una presión de vapor apreciable a la temperatura de ebullición de aquella, puede destilarse arrastrándolo con vapor de agua. Este método permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídas por otros métodos. Los aceites esenciales o simplemente esencias son sustancias volátiles e insolubles en agua por lo que pueden ser arrastradas por una corriente de vapor de agua. El equipo para realizar esta operación consta de un recipiente con agua, una cámara de extracción y un

brazo lateral colector, unido por un lado a un refrigerante y por otro al destilador propiamente dicho (Figura 13) (Lamarque y cols., 2008).

Para dicha extracción, el material vegetal se corta en trozos pequeños y se coloca en la cámara de extracción. Se calienta el agua hasta ebullición y se mantiene el hervor durante una hora, observándose la condensación de dos fases líquidas que posteriormente son retiradas y separadas. En las destilaciones por arrastre con vapor más comunes, la fase acuosa lleva disueltas sustancias de bajo peso molecular y cantidades variables de los principales componentes de la esencia. Para recuperarlas, se coloca esta fase acuosa en una ampolla de decantación y se extrae con hexano u otro disolvente orgánico de bajo punto de ebullición (éter etílico, diclorometano, etc) (Lamarque y cols., 2008).

www.bdigital.ula.ve

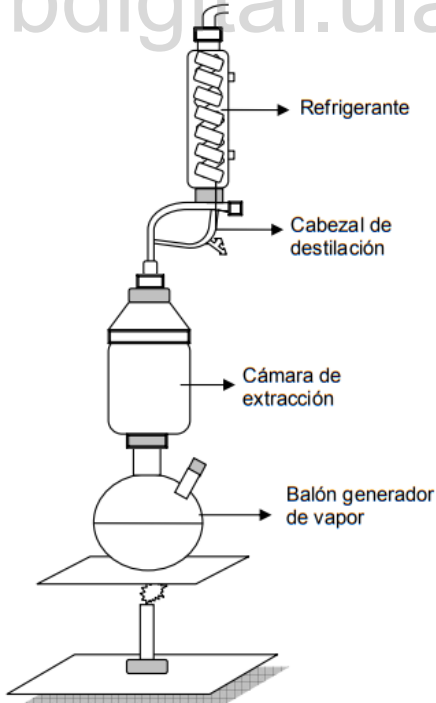


Figura 13. Equipo para realizar destilación por arrastre con vapor de agua.

Tomado y modificado de Lamarque y cols., 2008.

Decocción o cocimiento: este método de extracción de los principios activos de una planta consiste en hacerla hervir, colocando una parte de material vegetal fresco con 16 partes de agua y llevarlo a ebullición hasta reducir el volumen a $\frac{1}{4}$ parte del original. Se deja enfriar hasta unos 40 °C, se exprime y se cuela o filtra (Valcarcel y Gómez, 1988).

Infusión: este es el método de extracción más antiguo que se conoce, donde en un recipiente de porcelana, vidrio o barro (evitar los de aluminio u otro metal) se coloca la cantidad recomendada (cuando no hay instrucciones específicas, se usan 50 g para 1 litro) cortada o troceada, del material vegetal, y encima de él se vierte la cantidad de agua hirviente adecuada. Cubra y permita la acción extractiva por 10 a 15 minutos. Filtre y repose (Valcarcel y Gómez, 1988).

Extracción con fluidos supercríticos y subcríticos: un **fluido supercrítico** podemos definirlo simplemente como una sustancia que, en condiciones normales de presión atmosférica y temperatura, es un gas, pero que al comprimirlo se convierte en un líquido. Este estado líquido se mantiene en recipientes de acero inoxidable resistentes a altas presiones y bajas temperaturas. Este líquido al hacerlo pasar a través de una muestra biológica, puede utilizarse como cualquier solvente orgánico para extraer los metabolitos de las muestras biológicas (Martínez, 2020).

La sustancia más utilizada para este propósito es el dióxido de carbono, el cual es una sustancia abundante en la naturaleza, es relativamente poco costoso y se puede comprimir adecuadamente a altas presiones (73 atm) y bajas temperaturas (31 °C). El proceso de extracción con CO₂ supercrítico, requiere de un montaje que incluye un cilindro con CO₂ gaseoso, conectado

a un compresor de alta potencia y con control de la temperatura (Martínez, 2020).

Una vez sometido el material vegetal al contacto con el fluido supercrítico, se solubilizan las sustancias, se transportan a una interfase con una matriz sólida sobre la cual se absorben las sustancias extraídas y se libera la presión para eliminar el CO₂ en forma gaseosa. Esta técnica de extracción ya está disponible comercialmente no solo para fines de investigación sino también para fines de producción a nivel comercial no solo de extractos sino también para extraer los diferentes metabolitos de interés farmacéutico o alimentario como esencias, fragancias, colorantes, antioxidantes, drogas vegetales (Martínez, 2020).

Por otro lado, los fluidos supercríticos utilizan solventes como agua o etanol, que se calientan y comprimen a temperaturas y presiones por debajo del punto crítico. Nuevamente, se considera un método no solo novedoso sino menos contaminante (Martínez, 2020).

Análisis Fitoquímico Preliminar o Tamizaje Fitoquímico

Los análisis fitoquímicos preliminares o también conocidos como marchas fitoquímicas son procedimientos analíticos que se han usado durante muchos años, para identificar en un solo proceso experimental y de manera preliminar en muestras vegetales, la presencia o no de diferentes metabolitos de interés farmacéutico como los alcaloides, los esteroides, los compuestos fenólicos, los flavonoides, las quinonas. Así, los más usados utilizan una secuencia de procedimientos experimentales relativamente simples, que incluyen técnicas como los ensayos de coloración con diferentes reactivos

químicos, los cuales permiten el reconocimiento preliminar de diferentes sustancias naturales, y se fundamentan en las propiedades ácido-base, la solubilidad y la polaridad de los principales compuestos (Martínez, 2020). A continuación, se describen algunos de estos ensayos:

Ensayos de reconocimiento de alcaloides

Los alcaloides propiamente dichos, son de carácter alcalino y pueden formar sales con ácidos diluidos. Estas sales de alcaloides son solubles en medio acuoso ácido, pero cuando reaccionan con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados. Los ensayos de precipitación se basan en la capacidad de los átomos de nitrógeno de muchos alcaloides, para unirse a metales pesados, formando sólidos insolubles en agua acidificada. Por esto, se les denomina **ensayos de precipitación** (Figura 14) (Martínez, 2020).

Por lo que, los ensayos químicos usados para el reconocimiento incluyen varios ensayos de precipitación, con diferentes reactivos como son el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Mayer, el reactivo de Valser, el reactivo Reineckato de amonio, el reactivo de Wagner, entre otros. Teniendo en cuenta la toxicidad de muchos de estos reactivos, que utilizan sales de metales pesados como el mercurio, deben usarse de manera racional y adecuadamente por los efectos tóxicos para la salud y el medio ambiente de estos metales pesados; por esto es recomendable el uso del reactivo de Wagner (solución de yodo y yoduro de potasio), de acuerdo a las necesidades de análisis (Martínez, 2020).

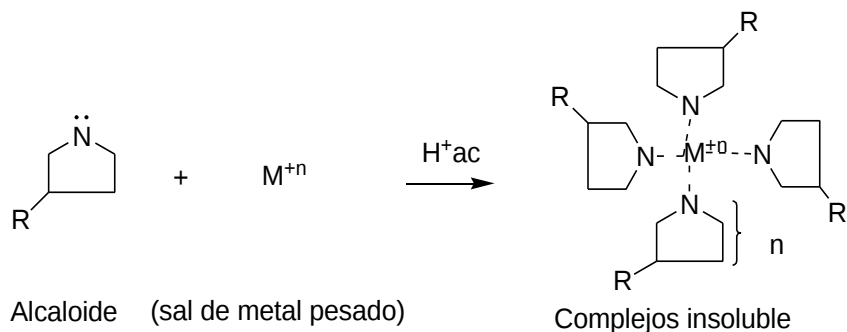


Figura 14. Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Ensayos de reconocimiento para compuestos fenólicos

Debido a la gran cantidad y variedad estructural de las diferentes clases de compuestos fenólicos naturales, se utilizan diferentes ensayos de coloración para su reconocimiento preliminar en muestras biológicas. El ensayo más utilizado es el del **cloruro férrico** (Figura 15). En este ensayo una solución acuosa o alcohólica de una muestra vegetal, se hace reaccionar con una solución de cloruro férrico acuoso o alcohólico, en concentración del 1 %. Los compuestos fenólicos tienden a formar complejos de diferentes colores con el catión Fe^{+3} , la formación de color o precipitados oscuros es aceptada como un resultado positivo sobre la presencia de compuestos fenólicos. No obstante, hay compuestos fenólicos de baja polaridad que no dan resultado positivo con este ensayo, por lo que se requiere otro tipo de análisis diferente (Martínez, 2020).

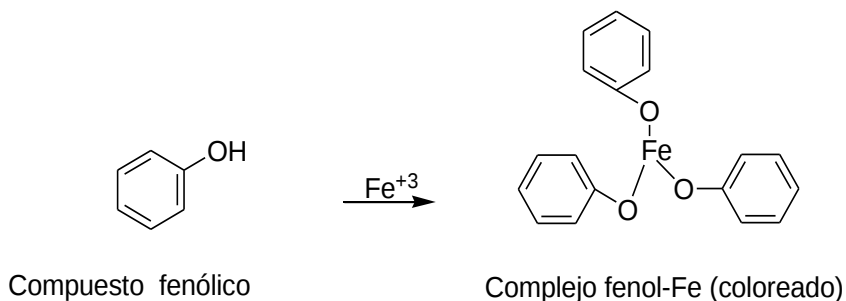


Figura 15. Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.
Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Ensayos de reconocimiento de flavonoides

Los flavonoides con el núcleo benzopirona o 4-cromenona (Figura 16) (p. ej. flavonas **(33)**, flavonoles **(34)**, flavanonas **(35)**) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Por tanto, la formación de coloraciones rojo o violeta, es considerada un resultado positivo que permite inferir la presencia de flavonoides en la muestra analizada. A este ensayo se le conoce como **ensayo de Shinoda** (Figura 17) (Martínez, 2020). Se basa en la reacción del magnesio en medio ácido, que reduce el flavonoide, esto se debe, a que el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico (HCl) concentrado, dando como productos al hidrogeno molecular (H_2), que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio (MgCl_2), que es el que forma complejos con los flavonoides (Delporte, 2010).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que varias clases de flavonoides como las auronas y las chalconas, no dan resultados positivos con esta prueba, debido a que no contienen el sistema anular benzopirona o 4-cromenona y que otras sustancias diferentes a los flavonoides en cambio

dan la prueba positiva, debido a que contienen el sistema benzopirona o 4-cromenona (Martínez, 2020).

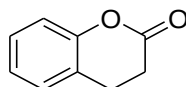


Figura 16. Sistema benzopirona.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

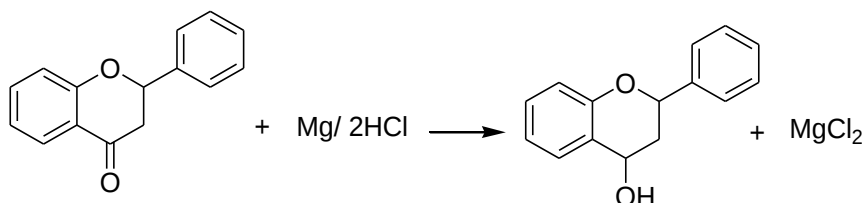


Figura 17. Reacción química de ensayo de Shinoda para detección de flavonoides.

Tomado y modificado de Clavijo y Cruz, 2017.

Ensayos de reconocimiento de cumarinas

Por el contrario, las cumarinas son compuestos derivados de la α -benzopirona dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección mediante el **ensayo de hidróxido de amonio**. Se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoníaco, utilizando el reactivo de Erlich (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Ensayos de reconocimiento para terpenoides

Se debe tener en cuenta que los terpenoides comprenden una gran cantidad de sustancias naturales con estructuras desde las más simples (monoterpenos y sesquiterpenos) hasta otras de gran complejidad estructural (esteroides, triterpenoides). De esta manera, los terpenoides que contienen en su estructura enlaces dobles carbono-carbono conjugados, se pueden reconocer mediante el **ensayo de Liebermann-Burchard** (Figura 18), que consiste en una reacción donde el esteroide se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial de esta prueba ocurre la protonación del grupo OH del esteroide habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ión carbonio 3,5 colestadieno que constituye la primera parte para la formación de color (Clavijo y Cruz, 2017; Martínez, 2020).

En este ensayo, a una solución anhidra obtenida de la muestra vegetal, se le agrega en su orden anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se considera positiva, si se forman coloraciones verdes, azules, rojas, violetas, entre otras. Por otra parte, algunos terpenoides como el colesterol que no poseen en su estructura estos enlaces dobles conjugados dan resultado positivo debido a que pueden formar estos dienos conjugados durante la reacción, por deshidratación. Los terpenoides que contienen en su estructura sistemas cíclicos tipo lactona α,β -insaturada, producen coloraciones violáceas con varios reactivos nitroaromáticos en medio alcalino (Martínez, 2020).

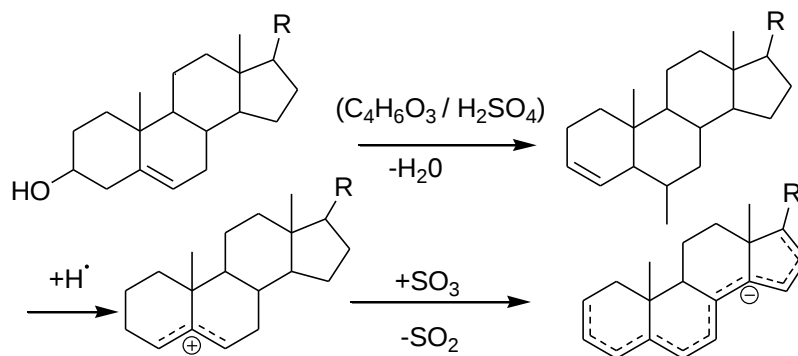


Figura 18. Reacción de Liebermann-Burchard para identificación de terpenoides y esteroides.

Tomado y modificado de Clavijo y Cruz, 2017.

De otra manera, las saponinas terpenoides, se pueden reconocer mediante el **ensayo de la espuma**, ya que tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de sus soluciones acuosas. Así al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides (Martínez, 2020).

Ensayos de reconocimiento de quinonas

Se denominan quinonas a las sustancias naturales que contienen un anillo de seis carbonos con dos grupos carbonilos vecinales u opuestos, estas últimas se denominan *para*-quinonas e incluyen a las antraquinonas. Así, las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas. Y las **antraquinonas** y sus formas reducidas pueden reconocerse en muestras vegetales a través del denominado **Ensayo de Bornträger**. En este ensayo,

una porción del material vegetal se pone en ebullición con una solución de KOH acuoso diluido, durante varios minutos. Este tratamiento no solo hidroliza los glicósidos antracénicos, sino que también oxida las antronas y antranoles hasta antraquinonas. La solución alcalina se deja enfriar, se acidifica y se extrae con acetato de etilo (Rivas, Oranday y Verde, 2016; Martínez, 2020).

Como resultado, cuando la fase orgánica se separa y se pone en contacto con una solución acuosa diluida de un álcali, la fase orgánica pierde su color amarillo y la fase acuosa se torna de color rojo si la muestra contiene antraquinonas. El ensayo no es específico para las antraquinonas ya que las naftoquinonas también dan coloraciones rojas. Si la muestra contiene antraquinonas parcialmente reducidas, la solución original no se torna roja inmediatamente después de hacerla alcalina, pero se torna de color amarillo con una fluorescencia verdosa y poco a poco se va tornando roja, a medida que ocurra la oxidación. Si se desea, la oxidación puede acelerarse añadiendo un poco de peróxido de hidrógeno al 3 % acuoso (Martínez, 2020).

Radicales Libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicaloria, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio

en que se forman y son difíciles de dosificar (Basaga, 1989; Cheesman y Slater, 1998).

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal, en los cloroplastos y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicáticas, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS) (Naqui, Britton y Cadenas, 1996). Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido ($\text{O}_2^\bullet$)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Oxígeno nítrico ($\text{ON}^\bullet$)
- Peróxido ($\text{ROO}^\bullet$)
- Semiquinona (Q)
- Ozono (Naqui y cols., 1996).

Clasificación o tipos de radicales libres

Diplock (1991) clasifica a los radicales libres del oxígeno de la forma siguiente:

- 1. Radicales libres inorgánicos o primarios:** Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos

estados en la reducción de este y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.

2. Radicales libres orgánicos o secundarios: Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.

3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno: aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, el hidroperóxidos orgánicos.

De modo que, los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Así, entre las 129 células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno tenemos los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolamindioxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (Expósito, Kokoszka y Waymire, 2000). Por otro lado, no se puede olvidar agentes como el humo de cigarrillos, las radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico y las sustancias que oxidan el glutatión (GSH) como fuentes de radicales libres (Sun y Oberly, 1996). Además, existen algunas circunstancias en que también se producen radicales libres como son (Sun y Oberly, 1996):

- Dieta hipercalórica.
- Dieta insuficiente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia y reperusión.
- Ejercicio extenuante

Efectos al organismo de los radicales libres

Cabe resaltar, que su efecto es nocivo, al formarse los radicales libres pueden interactuar rápidamente con moléculas orgánicas tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, e incluso con el ADN, provocando en ellas diversas alteraciones estructurales, que conducen a alteraciones de tipo funcional, y de esta manera la fisiología de las células y por consecuencia la de los organismos, se ve afectada. Por lo que, el daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas de la siguiente manera (Left, Parson y Day, 1992):

Lípidos: es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno (Reylli y Burkley, 1990; Jerlick, Pitt, Schaur y Spickett, 2000). Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son:

- La naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador.
- Los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad.
- La tensión de oxígeno.
- La presencia de hierro.
- El contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles y glutatión).
- La activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx).

Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Rangon y Bulkley, 1993).

Proteínas: los radicales libres pueden inducir fragmentación con la pérdida de la función de estas moléculas. Se caracteriza porque hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos. Así, las proteínas oxidadas son fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas debido a la formación de grupos carbonilo, a la creación de nuevos grupos N-terminales y cambios conformacionales de la molécula juegan un papel crítico en la alteración de las funciones celulares y en la muerte celular (Left y cols., 1992).

Ácido desoxirribonucleico (ADN): ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases,

delecciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (Left y cols., 1992).

Al mismo tiempo, los daños a niveles moleculares, ocasionado por los radicales libres, implica la génesis o exacerbación de numerosos procesos patológicos:

- **Aparato cardiovascular:** aterosclerosis, infarto del miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, cardiopatía alcohólica.
- **Sistema neurológico:** enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, traumatismos craneales.
- **Aparato ocular:** cataratas, daño degenerativo de la retina, fibroplasia retrolental.
- **Aparato respiratorio:** distrés respiratorio (síndrome de dificultad respiratoria del adulto), cáncer de pulmón, enfisema.
- **Sistema Osteomioarticular (SOMA):** artritis reumatoidea.
- **Riñón:** síndrome autoinmune, nefrotoxicidad por metales (Rodríguez, Méndez y Trujillo, 2001).

Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones quitando intermedios del radical libre e inhiben otras reacciones de oxidación oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes son a menudo agentes reductores tales como tioles o polifenoles (Carocho y Ferreira, 2013).

De este modo, en el organismo hacen el papel de elemento protector en contra de los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales reaccionan químicamente con otros componentes de las células (oxidándolos) alterando su estabilidad y funcionalidad, generando reacciones en cadena que pueden dañar las células, es ahí, donde los antioxidantes ejercen su principal función ya que neutralizan a los radicales libres e inhiben otras reacciones de oxidación (Carocho y Ferreira, 2013).

Clasificación de los antioxidantes

La primera línea de defensa del organismo contra los radicales libres es la prevención, esto implica la acción de procedimientos que bloquean su formación, como sería la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre) lo que controla eficientemente la lipoperoxidación y la fragmentación del ADN, ya que de esta manera se evita la participación de estos metales en las reacciones donde se producen las diferentes especies reactivas de oxígeno (González, Betancourt y Ortiz, 2000).

En un segundo nivel de protección está la acción de los antioxidantes, que eliminan a los radicales para suprimir su actividad nociva en la célula. Así, los antioxidantes se pueden producir en las células (antioxidante endógeno) y/o suministrados externamente a través de los alimentos/suplementos, (antioxidantes exógenos). De esta manera, los sistemas de defensa frente a los radicales libres los podemos clasificar según su mecanismo de acción, o según su naturaleza. Según el mecanismo de acción: A su vez los podemos clasificar en primarios, secundarios y terciarios (Venereo, 2002).

Antioxidantes primarios: los llamados antioxidantes primarios corresponden a las enzimas antioxidantes o endógenas. Así, se basan en un complejo enzimático de defensa que puede incluir a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peróxidasa (GTx), las cuales, son enzimas antioxidantes intracelulares que convierten sustancias reactivas ($O_2 \cdot^-$ y H_2O_2) a formas menos reactivas, ya que soportan procesos cruciales para la función y proliferación celular, defensa antioxidante y regulación redox en el organismo (Venereo, 2002).

Antioxidantes secundarios: estos son un sistema de antioxidantes exógenos, paralelos al primero y especialmente útil cuando el endógeno se satura, estando determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres; los cuales logran retrasar la producción de los radicales libres. Ejemplos de ellos son la vitamina E, C y el β -caroteno (Venereo, 2002; Londoño, 2012).

Antioxidantes terciarios: se caracterizan por ser los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas, en este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurinica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Venereo, 2002).

Según la naturaleza: se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 1) (Venereo, 2002):

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza

ANTIOXIDANTES	PROPIEDADES
ENZIMÁTICOS	
Superóxido Dismutasa (SOD)	-Elimina los radicales superóxidos - Primera línea de defensa
Glutación peroxidasa	- Remueve H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos -Cada una de las subunidades contiene un átomo de selenio que es esencial para su actividad
Catalasa	-Cataliza la descomposición del H_2O_2 para formar agua y oxígeno -Junto con la peroxidasa actúa como protector de la hemoglobina y otras proteínas ricas en grupos tiolicos frente a la oxidación
NO ENZIMÁTICOS	
Vitamina C (ácido ascórbico)	-Neutraliza directamente al ion superóxido, radical oxidrilo, oxígeno singlete
Glutación	-Principal sistema de defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidantes -Actúa como protector frente a la radiación y al estrés oxidativo

Tomado y modificado de Venereo, 2002.

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza.

Continuación

Vitamina E	-Neutraliza el radical superóxido -Protege las membranas biológicas por ser liposoluble -Inhibe la fase de propagación de la cadena de la lipoperoxidación
Carotenoides	-β- caroteno: posee actividad antioxidante -Se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza

Tomado y modificado de Venereo, 2002.

www.bdigital.ula.ve

Actividad Antioxidante

De este modo, la actividad antioxidante es la función que posee cualquier sustancia que a muy bajas concentraciones, comparado con la especie oxidable, sea capaz de prevenir o retardar su oxidación (Halliwell, 1995). Los antioxidantes son compuestos que pueden donar electrones fácilmente o un átomo de hidrógeno a un radical hidróxido o alcóxido para terminar una reacción peroxilípida en cadena o para generar un compuesto fenólico, que puede quelar metales prooxidantes (Han y Baik, 2008).

Métodos para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

Según Clarkson (1995), la actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede estimarse mediante la determinación de los efectos de las sustancias antioxidantes en un proceso de oxidación controlado. La mayoría de los análisis realizados presentan procesos oxidativos, los cuales involucran la adición de un agente iniciador para acelerar el proceso (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald y Robards, 2002). Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías:

- Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (TAH).
- Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (TE) (Huang, Ou y Prior, 2005).

Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (TAH)

Ensayo DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo): este ensayo DPPH (Figura 19), permite evaluar la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) en una solución metanólica. Este método se basa en la reducción del radical DPPH• por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto para atrapar radicales (Brand, Cuvelier y Berset, 1995).

De esta manera, el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que no requiere un equipamiento sofisticado, sencillamente un espectrofotómetro. En este ensayo no es necesario preparar radical previamente puesto que el DPPH se comercializa ya en la forma de radical y sencillamente requiere su disolución en metanol para el desarrollo del método. Por esta razón se trata de un método ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total (Sánchez, 2002).

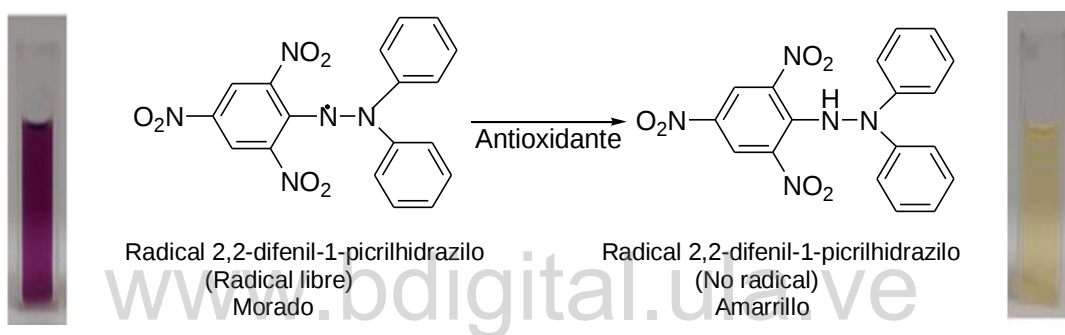


Figura 19. Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Tomado y modificado de Alam, Bristi y Rafiquzzaman, 2013.

Ensayo ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico): este método determina la actividad antioxidante total por la captura del radical ABTS•+. El cual implica la producción directa del cromóforo ABTS•+ a través de la reacción entre ABTS•+ y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) la cual ocurre en ausencia de luz, durante 12 a 16 horas. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm dependiendo de la variante del método TEAC utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm (Prior, Wu y Schaich, 2005).

Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS $\cdot$ + y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS $\cdot$ + se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este (Sánchez, 2002).

Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante (Ensayo FRAP): esta técnica fue desarrollada por Benzie y Strain (1996), como método de medida de la capacidad antioxidante plasmática, aunque posteriormente ha sido aplicado a muestras de alimentos. El método determina la capacidad de la muestra para reducir un complejo por hierro férrico con la molécula tripiridil-s-triazina (TPTZ) a su forma ferrosa. De este modo, se genera una coloración de intensidad proporcional a la actividad reductora de la muestra, puede cuantificarse por colorimetría en base a un patrón de hierro ferroso. La capacidad para reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra (Prior y cols., 2005).

De modo que, este ensayo es sencillo y fácilmente automatizable. Es rápido, generalmente la reacción se completa entre 4 y 8 minutos. Sin embargo, en el caso de algunos polifenoles se han descrito reacciones más lentas, llegando incluso a requerir 30 minutos hasta completar la reducción del complejo. El poder reductor de los compuestos fenólicos se asocia con el número de grupos -OH y en grado de conjugación de la molécula. Debido al potencial redox del complejo Fe $^{3+}$ -TPTZ (0,7 V), el ensayo FRAP es capaz de detectar compuestos con un menor potencial redox y por lo tanto, se

considera un método adecuado para evaluar la capacidad de los antioxidantes para modular el tono redox de células y tejidos (Prior y cols., 2005).

Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (TE)

Método de decoloración del β -caroteno: el ensayo de blanqueamiento del β -caroteno es uno de los métodos más antiguo y continuamente aplicado para estimar la actividad antioxidante de los compuestos lipófilos (Dawidowicz y Olszowy, 2010). Por lo que, mide la habilidad de un antioxidante para inhibir la peroxidación lipídica (Lai y Lim, 2011). Este ensayo se basa en un sistema (emulsión) agua, β -caroteno y ácido linoleico que promueve la formación de radicales libres peroxilos, debido a la oxidación del ácido linoleico inducida por el calor que blanquea el β -caroteno en la emulsión (Ndhlala, Moyo y Van Staden, 2010).

De modo que, el mecanismo de reacción implica que los radicales libres del ácido graso formados por la sustracción de un átomo de hidrógeno de uno de sus grupos metilenos atacan las moléculas de β -caroteno las cuales pierden sus dobles enlaces que les da la característica de su color anaranjado en estado reducido (Lai y Lim, 2011); por tanto, el blanqueo de carotenoides vía oxidación inducida por calor y la decoloración resultante puede ser inhibida o disminuida por los antioxidantes que donan átomos de hidrógeno para neutralizar radicales (Dawidowicz y Olszowy, 2010).

Métodos para la determinación de la actividad antioxidante *in vivo*

Es necesario resaltar, que los modelos animales y estudios en humanos son costosos y por tanto no son apropiados en principio para la caracterización inicial de alimentos ricos en antioxidantes. Por esta razón, es

interesante realizar una evaluación previa de estos alimentos mediante ensayos *in vitro* para posteriormente proceder a su evaluación *in vivo*. Por lo que, la valoración del efecto protector proporcionado por la muestra se realiza mediante la evaluación de diferentes biomarcadores o parámetros indicadores de la extensión del daño causado por el oxidante (Liu y Finley, 2005). Así, se evaluarán cambios en la:

- Tasa de muerte celular.
- Formación de productos de peroxidación lipídica (malondialdehído, isoprostanos).
- Generación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS).
- Oxidación del ADN (formación de 8-oxo-7,8-dihidroguanosina, rotura de las hebras).
- Oxidación proteica (formación de grupos carbonilo).
- Actividad de los sistemas enzimáticos antioxidantes y/o niveles de GSH y GSSG (Liu y Finley, 2005; Alía, Ramos, Mateos, Bravo y Goya, 2005).

Por otra parte, en este tipo de estudios lo ideal es poder detectar presencia de determinados compuestos fenólicos o sus metabolitos en plasma/suero y orina como indicadores de su biodisponibilidad. Aunque los datos existentes sobre biodisponibilidad de compuestos fenólicos en humanos se considera aún escasa y controvertida, diversos estudios evidencian la absorción y excreción urinaria de estos compuestos e incluso su incorporación a las lipoproteínas de baja densidad (Prior y cols., 2005). No obstante, el análisis de compuestos fenólicos en los fluidos biológicos es complicado debido a las amplias diferencias estructurales de los compuestos fenólicos y a la gran variedad de metabolitos generados en los procesos

digestivos. Además, estos estudios requieren técnicas analíticas específicas como cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (siglas en inglés HPLC-MS) para obtener datos consistentes (O'Brien, Woods, Aherne y O'Callaghan, 2000; Prior y cols., 2005).

Biomarcadores del daño oxidativo a lípidos: la peroxidación lipídica es un proceso complejo que genera un gran número de productos finales de oxidación en cantidades variables, se puede medir de diferentes maneras. Así, el método más rápido y sencillo es la determinación colorimétrica de las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), donde se mide un cromógeno formado por el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), que es un producto final de la peroxidación lipídica. Actualmente, es frecuente el empleo de una modificación de este método en la cual el cromóforo TBA-MDA se separa por cromatografía líquida de alta resolución (siglas en inglés HPLC), reduciendo las interferencias de otras sustancias reactivas con el TBA, aumentando la sensibilidad y especificidad (Halliwell y Whiteman, 2004).

Sin embargo, el mejor indicador de la peroxidación lipídica *in vivo* parece ser la determinación de isoprostanos, que son productos específicos de la oxidación mediada por radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Entre ellos se distinguen los isoprostanos F2, derivados de la oxidación del ácido araquidónico, y los isoprostanos F4, procedentes de la oxidación del ácido docohexanoico. La determinación de isoprostanos se hace mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (siglas en inglés GC-MS) o inmunoensayo. Otros indicadores de la peroxidación lipídica *in vivo* son los hidrocarburos exhalados, tales como pentano, que deriva de la oxidación de ácidos grasos n-6, y etano, que resulta de la oxidación de ácidos grasos n-3 (Halliwell y Whiteman, 2004).

Biomarcadores del daño oxidativo a proteínas: el proceso de oxidación proteica frecuentemente introduce nuevos grupos funcionales, como hidroxilos y carbonilos, que contribuyen a la alteración de la función de la proteína y a su posterior catabolismo. El indicador más frecuentemente usado para la evaluación del daño oxidativo a proteínas es la determinación de la formación de grupos carbonilo mediante el ensayo colorimétrico de la dinitrofenilhidracina o mediante pruebas inmunoquímicas (ELISA). Aunque ambos métodos proporcionan valores absolutos diferentes, estos han mostrado una buena correlación cuando se han empleado en determinaciones plasmáticas. Como alternativa esta medida global de la oxidación proteica están las determinaciones mediante ELISA de los semialdehídos aminoadípico (AAS) y glutámico (GGS), principales contribuidores a la medida total de grupos carbonilo (Halliwell y Whiteman 2004).

www.bdigital.ula.ve

Definición Operacional de Términos

Planta medicinal

Es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigual, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Metabolitos primarios

Son esenciales para las necesidades metabólicas de las plantas, en los cuales encontramos los azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos

nucleicos, y otros compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las mismas (Gil, Villa, Ayala, Heredia, Sepulveda, Yahai y Gonzalez, 2013).

Fitoquímica

Comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios (Marcano y Hasewaga, 2018).

Metabolismo

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Estrés oxidativo

Es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Venereo, 2002).

Operacionalización de las variables

En una investigación las variables son características o cualidades; magnitudes o cantidades, que pueden sufrir cambios, y que son objeto de análisis, medición, manipulación o control. Estas según su naturaleza pueden ser cuantitativas o cualitativas. De esta manera, las variables deben

transformarse de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores y es lo que se conoce como operacionalización de variables representada en un cuadro (Arias, 2012). Por lo que, en esta investigación se describen dos variables la variable dependiente: actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Tabla 2); y la variable independiente: composición química de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Tabla 3).

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos <i>Foeniculum vulgare</i>	Dependiente Cuantitativa	Es la capacidad que poseen los extractos de las hojas y tallos para inhibir la degradación oxidativa reaccionando con radicales libres (Londoño, 2012)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
<i>In vitro</i> por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	- Actividad antioxidante presente. - Actividad antioxidante ausente	% de radicales de DPPH inhibidores >50 %

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas y tallos <i>Foeniculum vulgare</i>	Independiente Cualitativa	Los metabolitos secundarios de las hojas y tallos son compuestos producidos por las plantas y que no son esenciales para su funcionamiento (Albornoz, 1980)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Screening o tamizaje fitoquímico	• Terpenos y esteroides • Flavonoides • Alcaloides • Compuestos fenólicos • Taninos • Cumarinas • Quinonas • Saponinas	• Colores de las pruebas químicas • Precipitados. • Presencia de turbidez • Formación de espuma • Fluorescencia

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Hipótesis

Estudios previos indican que *Foeniculum vulgare* es una especie que produce metabolitos secundarios con importantes propiedades farmacológicas, por lo cual es de esperar que los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *F. vulgare* presenten una composición química similar y actividad antioxidante *in vitro* frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El nivel de investigación “se refiere al grado de profundidad con que se aborda un fenómeno u objeto de estudio” (Arias, 2012) (p.23). Así la investigación planteada, según el tipo de investigación se clasifica en explicativa o confirmatoria, que se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto y sus resultados y conclusiones constituyen el nivel más profundo de conocimientos (Arias, 2012). De este modo, permite confirmar la relación entre la composición química y la actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

Diseño de Investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado y de acuerdo a la manipulación de las condiciones en las cuales se realiza el estudio se clasifica en experimental (Arias, 2012). Por lo tanto, dicha investigación es de diseño experimental, se somete a la variable independiente composición química de los extractos de las hojas y tallos de *F. vulgare* a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos, para observar los efectos o reacciones que se producen en la variable dependiente actividad antioxidante, es decir, se caracteriza por la manipulación y control de las variables.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación de este estudio está representada por la especie *Foeniculum vulgare*, planta conocida como hinojo, la cual fue procesada en el Laboratorio de Productos Naturales A del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y procedente del Estado Mérida - Venezuela.

Selección del Tamaño de la Muestra

La "n" muestral de este estudio está representada por las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* seleccionados de manera aleatoria, según la disponibilidad de la especie vegetal ubicada en la ciudad de Mérida.

Sistema de Variables

Las variables que guardan relación con el propósito de esta investigación son las siguientes: variable dependiente (VD): actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*, variable independiente (VI): composición química de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*. Estas variables corresponden a los núcleos semánticos del problema de investigación y a la vez, permiten la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

Instrumentos de Recolección de Datos

Con relación, a las técnicas de recolección de datos son las distintas formas o maneras de obtener la información siendo la observación directa estructurada la técnica empleada en esta investigación, así como la tabla de resultados el instrumentos de recolección de datos, siendo estos los medios materiales que se emplean para recoger y almacenar la información; así como esquemas y fotos de las reacciones observadas de la composición química y actividad antioxidante de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

Procedimientos de la Investigación

Recolección de la planta

La planta se adquirió en el Mercado Principal del estado Mérida, fue procesada e identificada taxonómicamente en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por el Director- Curador Herbario MERF Dr. Pablo Méndez González, con el número de Voucher AR y TB 01 (Anexo 1 y 2).

Preparación del material vegetal

Para la preparación del material vegetal se obtuvo la planta fresca la cual tuvo un peso de 301,5 gramos, luego se procedió a separarla en las hojas y tallos y se secó en una estufa a 40 °C. Posteriormente se molió obteniéndose un peso de 20,81 gramos para las hojas y de 27,07 gramos para los tallos.

Preparación de los extractos

Para la obtención de los extractos se utilizó la técnica de extracción continua en caliente bajo reflujo y etanol como solvente. Así se colocó el material vegetal pulverizado y previamente separado (20,81 gramos de las hojas y 27,07 gramos de los tallos) en balones de destilación separadamente con etanol (Figura 20), conectándolos al sistema de reflujo durante una hora obteniéndose la primera extracción, la cual se filtró (Figura 21) y se traspasó a balones de destilación para llevar al rotavapor y así recuperar el solvente y concentrar el extracto (Figura 22).

Seguidamente, con el material que fue filtrado se le adicionó más solvente y se repitió la extracción, donde de igual manera se filtró y llevo al rotavapor. Los extractos obtenidos de ambas extracciones de las hojas y tallos se almacenaron en envases (Figura 23) y se llevaron a estufa, obteniéndose un extracto etanólico de hojas de 1,54 gramos y de tallo con un peso de 2,26 gramos (Esquema 2).



Figura 20. Extracción continua en caliente bajo reflujo.



Figura 21. Filtración de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.



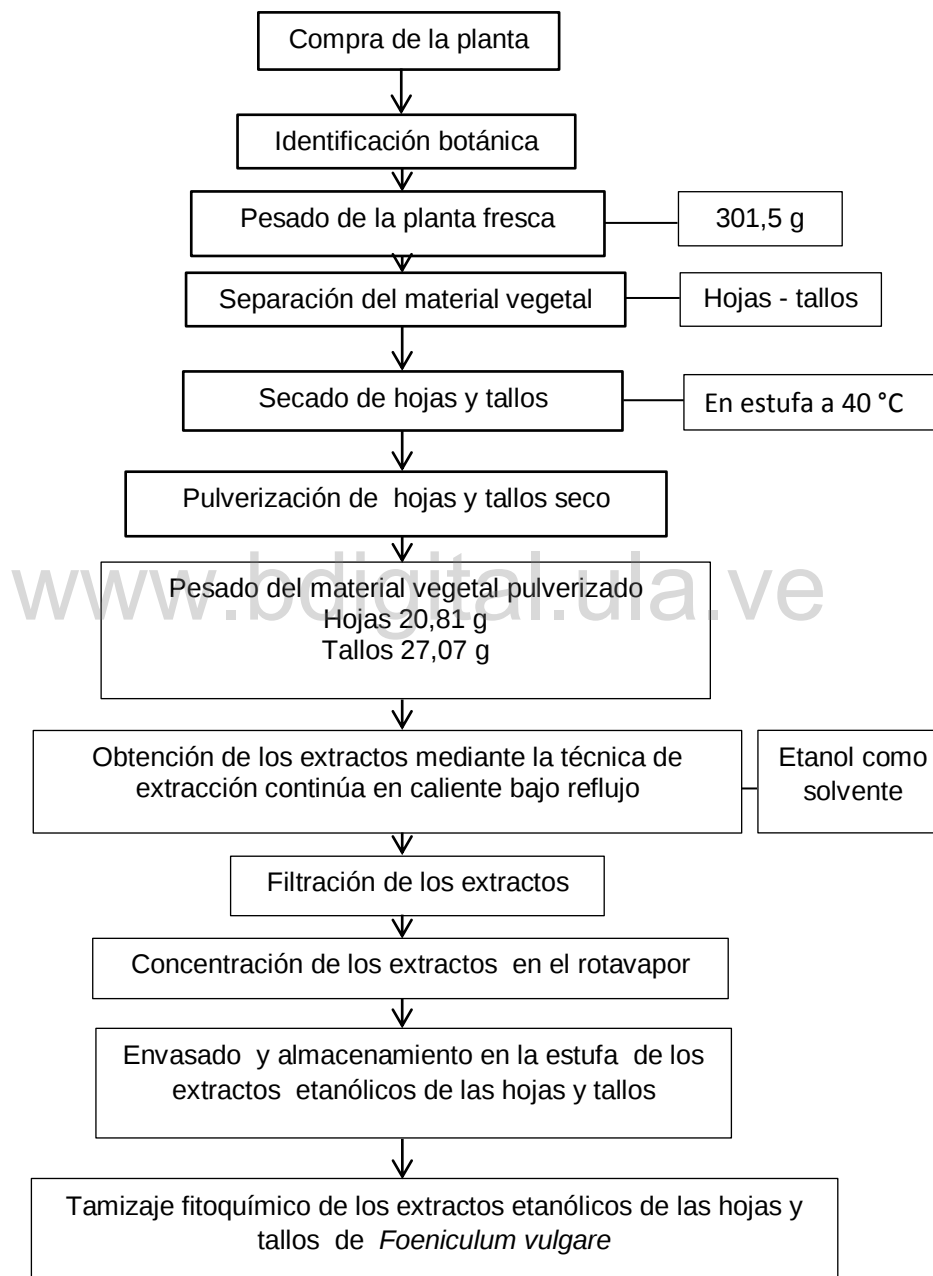
Figura 22. Concentración de los extractos en el rotavapor.



Figura 23. Extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

www.bdigital.ula.ve

Esquema 2. Procedimiento empleado para la obtención de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.



Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos secos de *Foeniculum vulgare*, se llevó a cabo el screening fitoquímico (Esquema 3), para la identificación de metabolitos secundarios por pruebas químicas cualitativas, evaluados de la siguiente forma:

Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (Alcaloides): generalmente la presencia de alcaloides se determina mediante pruebas químicas sobre los extractos ácidos de las plantas. De modo que, si la alícuota del extracto y/o tintura está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en un baño de agua y el residuo redisolverse en 1,0 mL de HCl al 10 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade una gota de HCl concentrado. Con la solución acuosa ácida se realizó el ensayo, se dividió en tres tubos y luego se añadió 0,5 mL del reactivo correspondiente (Dragendorff, Mayer y Wagner). Con los reactivos Dragendorff o Wagner la presencia de alcaloides se detecta al producirse una coloración naranja rojiza. Cuando se usan como reactivos de precipitación las bases precipitan como sólidos marrones. Con el reactivo Mayer los alcaloides se detectan como un precipitado blanco (Marcano y Hasewaga, 2018).

Ensayo de Liebermann-Burchard (Terpenos y/o Esteroides): los terpenoides que contienen en su estructura enlaces dobles carbono-carbono conjugados se pueden reconocer mediante este ensayo. En el cual es necesario disponer de dos tubos de ensayo limpios, secos e identificados y pequeñas cantidades de los extractos y se adicionó 0,5 mL de solución clorofórmica anhidra, luego 0,5 mL de anhídrido acético y cuidadosamente por la pared del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se

considera positiva, si se forman coloraciones verdes, azules, rojas y violetas (Martínez, 2020).

Ensayo de FeCl_3 (Compuestos fenólicos): la prueba específica y universal para fenoles es la producción de una intensa coloración verde, marrón o azul con soluciones recién preparadas de cloruro férrico 1-2 %. Así, la muestra se disolvió en agua y se agregaron unas gotas de solución de cloruro de hierro (III) diluido, la formación de coloración de verde a negro o azul a negro indica la presencia de fenoles (Marcano y Hasewaga, 2018).

Prueba de altura y estabilidad de espuma (Saponinas): al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable. De modo que, en cada tubo de ensayo se colocó 1,0 mL de cada extracto, se agito vigorosamente y se observó la altura de la espuma. Se considera positivo si la espuma alcanza una altura de 8 a 10 mm y se mantiene por 30 minutos (Martínez, 2020).

Ensayo de gelatina al 1 % (Taninos, compuestos fenólicos): se disolvió la muestra en agua y se adicionaron 2 gotas de reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica presencia de taninos (Martínez, 2020).

Ensayo de Shinoda (Flavonoides): los flavonoides con el núcleo benzopirona o 4-cromenona produce coloración rojiza o violeta cuando a sus diluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio (Mg) seguido de HCl concentrado. Por lo que, se tomó 1,0 mL del extracto, se añadió algunas limaduras de magnesio, se sujetó el tubo con una pinza y se adiciono cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. Por tanto, la formación de coloraciones rojo o violeta, es considerada un resultado positivo, así una coloración naranja a roja indica la presencia de

flavonas **(33)**; si es rojo flavonoles **(34)** y si es magenta flavononas (Martínez, 2020).

Ensayo de hidróxido de sodio al 10 % (Flavonoides): al adicionar 0,5 mL gotas de hidróxido de sodio sobre una solución del extracto se observan diversas coloraciones en caso de ser positiva la prueba, una coloración de amarillo a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas **(33)**; la coloración de café a naranja indica flavonoles **(34)**; de púrpura a rojizo indica chalconas y azul indica antocianinas (Rivas y cols., 2016).

Ensayo con hidróxido de amonio concentrado (Cumarinas): se concentró una porción del extracto y se le adiciono 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta (Martínez, 2020).

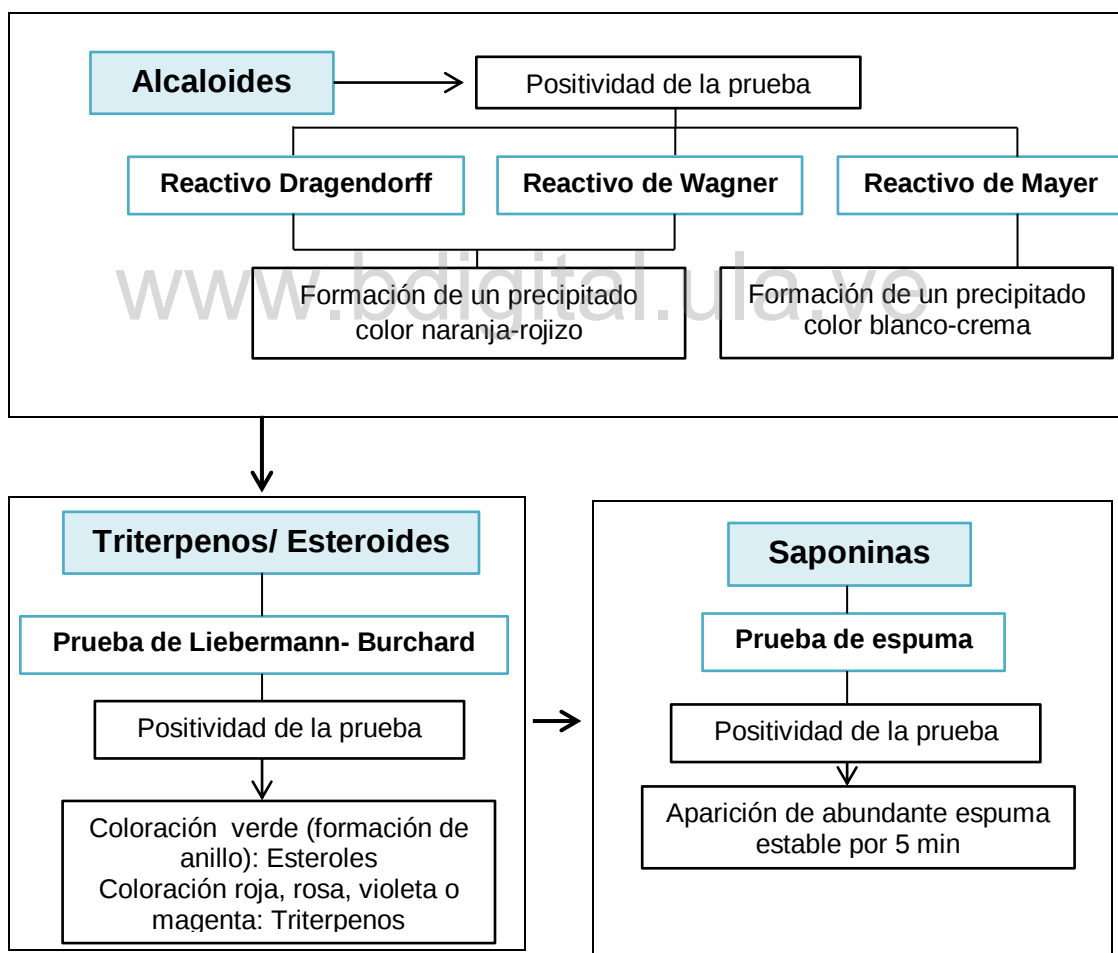
Reacción de hidróxido de amonio (Antraquinonas): para esta prueba se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas con la presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos (Rivas y cols., 2016).

Reacción con ácido sulfúrico (Quinonas): se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a una porción del extracto en una cápsula de porcelana y la formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas (Rivas y cols., 2016).

Prueba de hidróxido de sodio al 10 % con HCl (Sesquiterpenlactonas): se colocaron 2 mg del extracto con solución de hidróxido de sodio al 10 %, observándose si un color amarillo o naranja se pierde al agregar una gota de HCl, indica la positividad de la prueba (Rivas y cols., 2016).

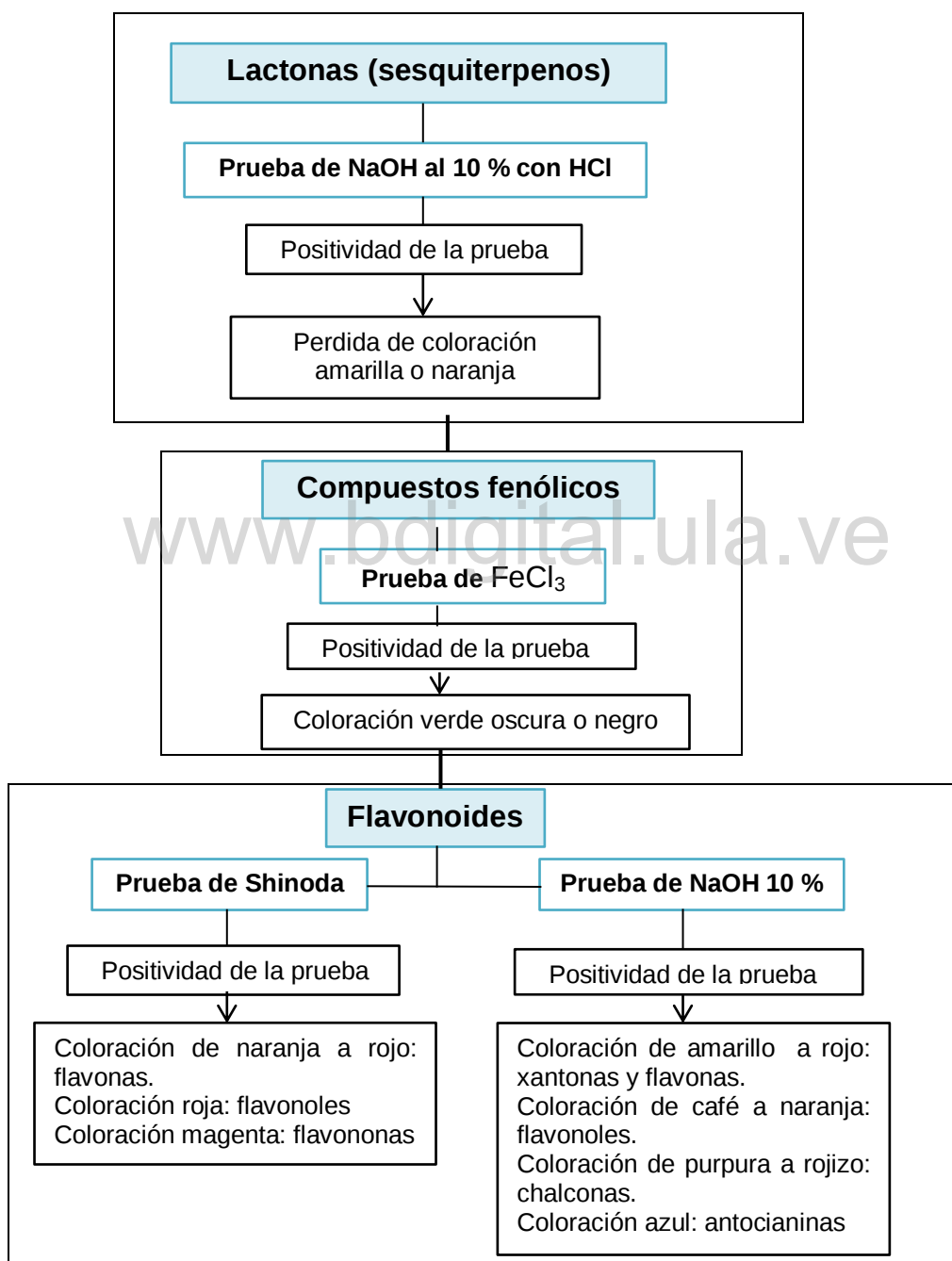
Prueba para glicósidos cardiotónicos (Glicósidos cardiotónicos): para esta prueba se dispuso de un tubo con 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y otro tubo al cual se le agregó el extracto con 2,5 mL de agua y 1 mL de ácido acético glacial más una gota de FeCl_3 , así, esta mezcla se adiciono al tubo que contiene ácido sulfúrico concentrado evidenciando la presencia de un anillo marrón que indica la positividad de la prueba (Rivas y cols., 2016).

Esquema 3. Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.



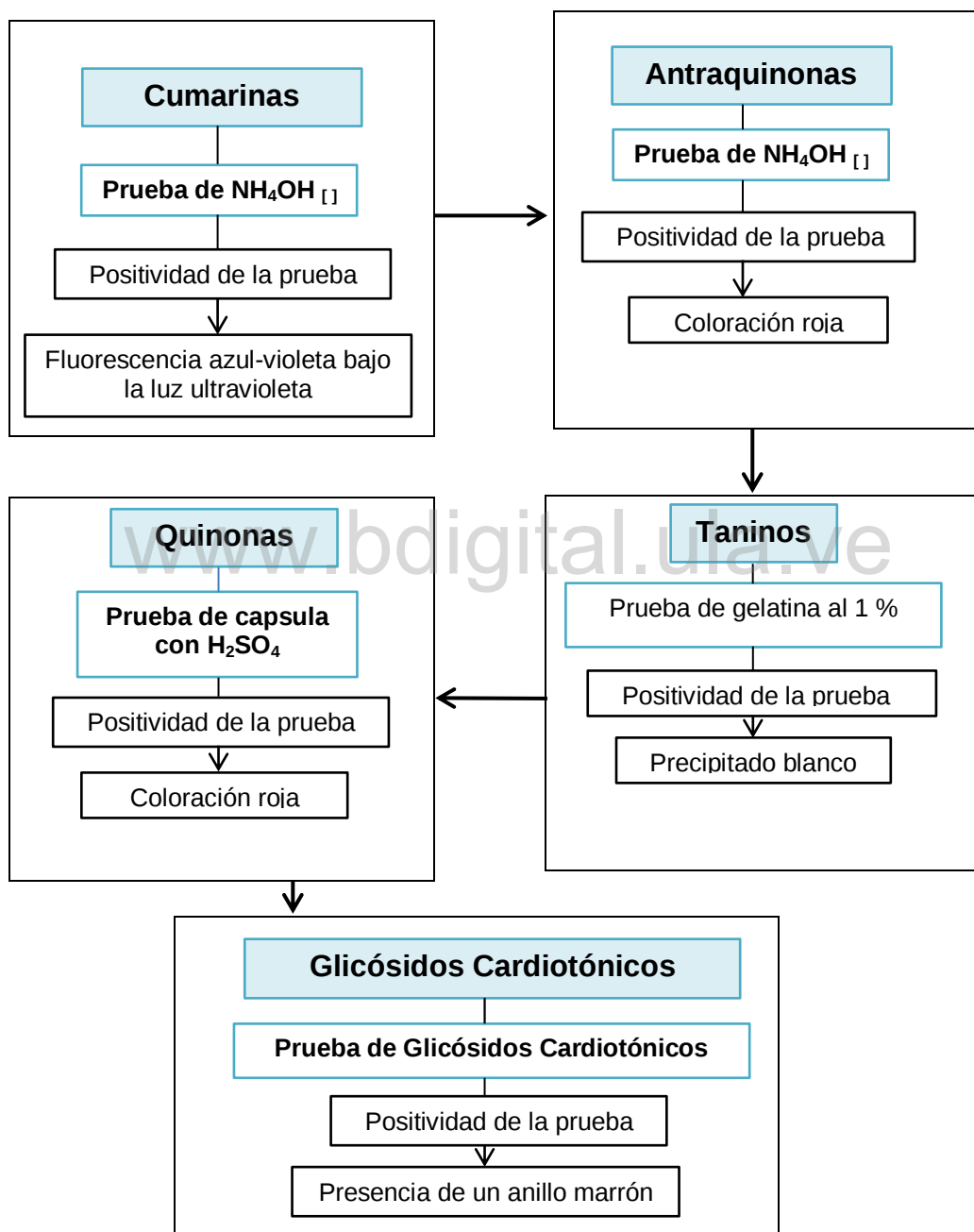
Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Esquema 3. Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación).



Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Esquema 3. Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación).



Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Actividad antioxidante

Existen varios métodos para medir la actividad antioxidante. Según Brand, Cuvelier y Berset (1995), deducen que el ensayo más popular para el estudio de antioxidantes naturales, debido a su simplicidad y alta sensibilidad, es el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Se basa en la teoría de que todo donador de hidrógenos es un antioxidante, el DPPH acepta un hidrógeno del antioxidante. Existen varios métodos para su monitorización, pero el más común es mediante espectrofotometría UV, por su facilidad y precisión. Siendo este el método utilizado en dicha investigación.

Actividad inhibitoria del DPPH

El efecto de los extractos sobre el radical DPPH•, fue estimado usando el método experimental descrito por Díaz, De Monjito, Medina, Meléndez, Laurence y Marti-Mestres (2011); por lo que, se tomó 3 mL de solución metanólica de DPPH• a 6×10^{-2} mM, se mezcló con 1 mL de la muestra a ensayar (1000 µg/mL). Esta solución se dejó en reposo en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente (Esquema 4). Luego se realizaron las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic Genesystem 10 Bio) a 517 nm. Una solución de 3 mL de DPPH• a 6×10^{-2} mM y 1 mL de metanol fue usada como control negativo, mientras que el control positivo fue ácido ascórbico a la concentración de 1 mM. La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición (% In) lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH• neutralizado por el extracto a una determinada concentración y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ In} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{M}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100$$

ADPPH: absorbancia del DPPH

AM: absorbancia de la muestra (Díaz y cols., 2011).

Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Aquellas muestras que alcanzan un % In ≥ al 50% se les determina la concentración inhibitoria media (CI₅₀), que indica la mínima concentración necesaria de un antioxidante capaz de reducir en un 50 % la cantidad de radicales libres presentes en el medio (Esquema 4). Para ello, se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico y una serie de diluciones de las muestras y se calcula el CI₅₀ de la siguiente manera (Montoya, Lemeshko, López, Pareja, Urrego y Torres, 2003):

a. Cálculo del CI₅₀:

Con las absorbancias obtenidas y la concentración de cada solución ensayada, se obtiene por regresión lineal una ecuación que nos permitirá obtener el CI₅₀.

Por ejemplo, $y=mx+b$; $y=50$, $x=CI_{50}$ = expresado en µg/mL.

De esta forma, se comparó la capacidad antioxidante entre el ácido ascórbico y el extracto de la especie vegetal, todos los análisis se hicieron por triplicado (Montoya y cols., 2003).

b. Cálculo del % de DPPH inhibido:

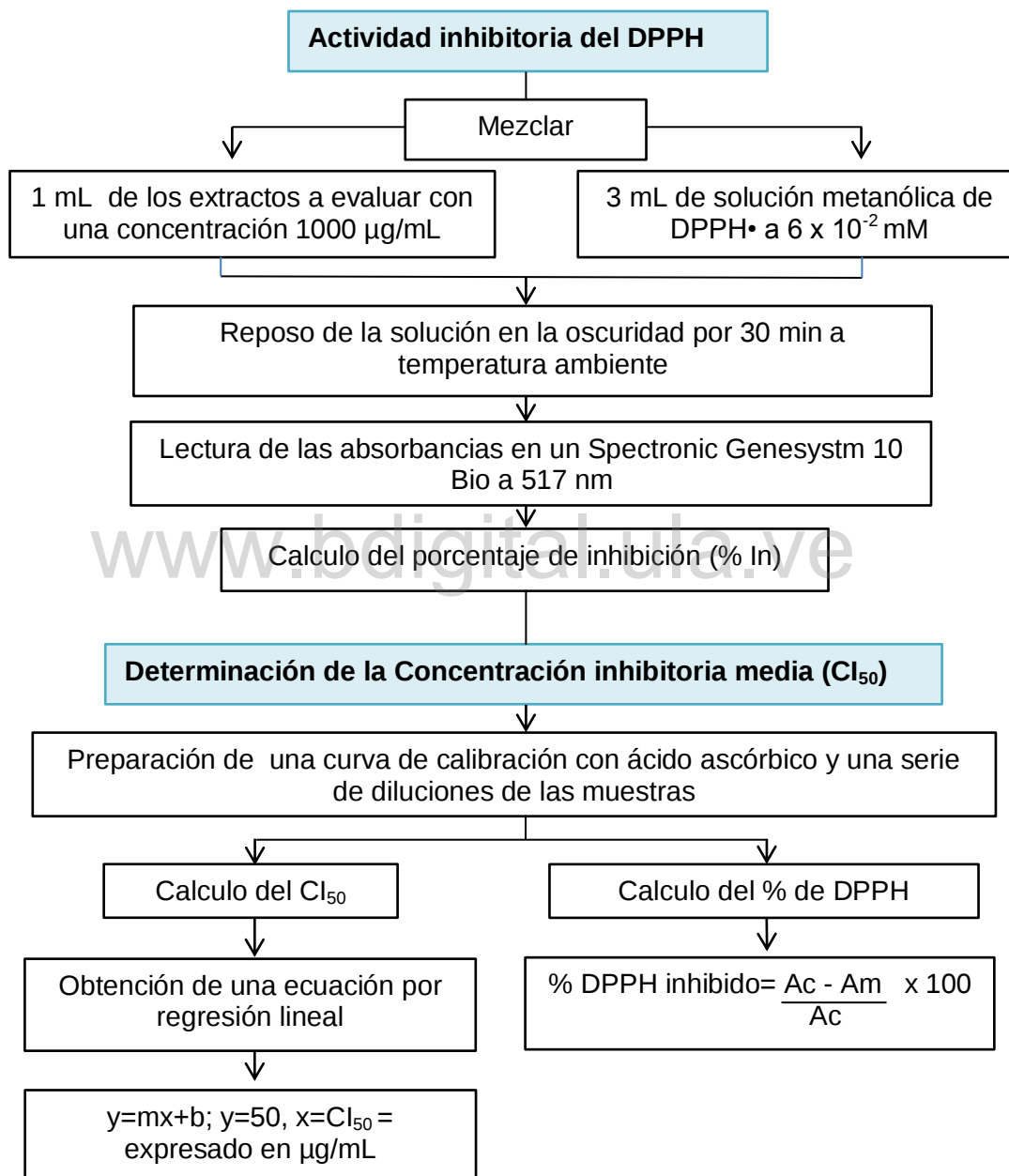
El % de DPPH inhibido se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DPPH inhibido} = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

Donde A_c es la absorbancia del patrón de referencia y A_m la absorbancia de cada una de las soluciones diluidas del extracto de la especie vegetal y las diluciones del ácido ascórbico (Montoya y cols., 2003).

www.bdigital.ula.ve

Esquema 4. Procedimiento para determinar la actividad antioxidante y la CI_{50} de los extractos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.



Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Diseño de análisis

Los datos recolectados fueron analizados a través del enfoque cualitativo y cuantitativo. De esta manera, las variables cualitativas son medidas bajo una escala nominal y ordinal; mientras para las variables cuantitativas se clasifican en discretas y continuas y su escala de medida numéricamente son de intervalo y de razón, con el fin de que se puedan analizar a través de operaciones matemáticas (Arias, 2012).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* fueron sometidas a la técnica de extracción continua en caliente bajo reflujo utilizando etanol como solvente y obteniendo 1,54 g y 2,26 g de los extractos etanólicos de las hojas y tallos, respectivamente. Donde el mayor porcentaje de rendimiento se evidencio en para el extracto etanólico de los tallos siendo de 8,35 %, mientras que para el extracto etanólico de las hojas fue de 7,4 % y presentaron las siguientes características físicas (Tabla 4):

Tabla 4. Características físicas de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

CARACTERÍSTICAS	Extractos etanólicos	
	Hojas	Tallos
Aspecto	Viscoso	Viscoso
Color	Verde intenso	Verde intenso
Olor	Característico	Característico
Peso del extracto	1,54 g	2,26 g
% de rendimiento	7,40 %	8,35 %

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Tamizaje fitoquímico

Los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* se le realizaron las pruebas cualitativas (Tabla 5), evaluadas a partir de formación de precipitados, turbidez del medio, viraje de color, formación de espuma por agitación, fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV) (Tabla 6), determinando así la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides y glicósidos cardiotónicos, este último, positivo solo en el extracto etanólico de las hojas.

De tal manera, es necesario resaltar que el extracto etanólico del tallo presentó mayor proporción de compuestos fenólicos en comparación con el extracto etanólico de las hojas, que al contrario presenta una mayor proporción de triterpenos y esteroides.

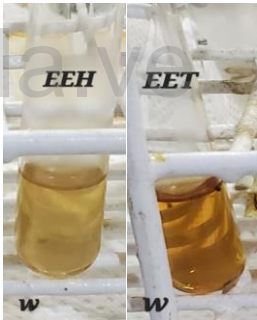
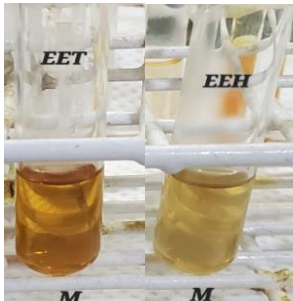
Por otra parte, el extracto etanólico de los tallos evidenció mayor proporción de flavonoides indicando positividad para flavonoles **(34)** en la prueba de Shinoda mientras que el extracto etanólico de las hojas que indicó la presencia de flavonas **(33)** en menor proporción; así, en la prueba de NaOH al 10 % mostró igual proporción para ambos extractos.

Tabla 5. Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

Metabolitos	Pruebas Químicas	Extracto etanólico Hojas	Extracto etanólico Tallos
Alcaloides	Dragendorff Wagner Mayer	+++ + +++	+++ + +++
Triterpenos/ Esteroides	Liebermann- Burchard	+++	+
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+	++
Saponinas	Espuma	-	-
Taninos	Gelatina al 1 %	-	-
Flavonoides	Shinoda NaOH 10 %	+ ++	++ ++
Cumarinas	NH ₄ OH [1]	-	-
Antraquinonas	NH ₄ OH [1]	-	-
Quinonas	Cápsula con H ₂ SO ₄ [1]	-	-
Lactonas (sesquiterpenos)	NaOH al 10 % con HCl	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Prueba para glicósidos cardiotónicos	+	-
Presente: + Abundante: ++ Ausente: -			

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

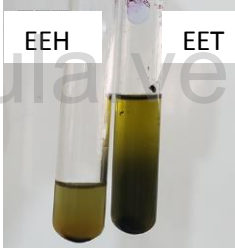
Tabla 6. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*.

Metabolitos y Pruebas Químicas	Resultados
Alcaloides Dragendorff	EEH: +++ EET: +++  Precipitado naranja – rojizo
Wagner	EEH: + EET: +  Precipitado blanco
Mayer	EEH: +++ EET: +++  Precipitado crema

EEH: extracto etanólico de las hojas **EET:** extracto etanólico de los tallos

Presente: + Abundante: ++ Ausente: -

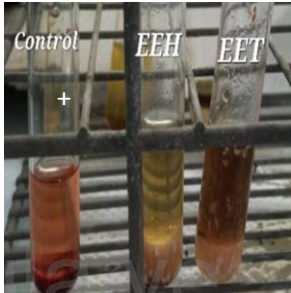
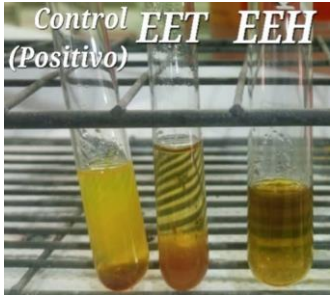
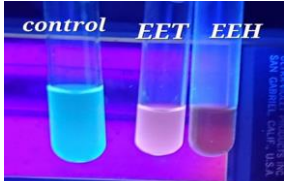
Tabla 6. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación)

Metabolitos y Pruebas Químicas	Resultados
Triterpenos/ Esteroides Liebermann- Burchard	EEH: +++ EET: +  Anillo Verde
Compuestos fenólicos FeCl_3	EEH: + EET: ++  Coloración verde a negro
Saponinas Espuma	EEH: - EET: -  Ausencia de espuma

EEH: extracto etanólico de las hojas **EET:** extracto etanólico de los tallos

Presente: + Abundante: ++ Ausente: -

Tabla 6. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación)

Taninos Gelatina al 1 %	EEH: - EET: -  Ausencia de precipitado blanco
Flavonoides Shinoda NaOH 10 %	EEH: + Color naranja Flavonas EET: ++ Color rojo Flavonoles  EEH: ++ Color amarillo Xantonas y flavonas EET: ++ Coloración naranja café Flavonoles 
Cumarinas NH₄OH []	EEH: - EET: -  Ausencia de Fluorescencia azul-violeta

EEH: extracto etanólico de las hojas **EET:** extracto etanólico de los tallos

Presente: + Abundante: ++ Ausente: -

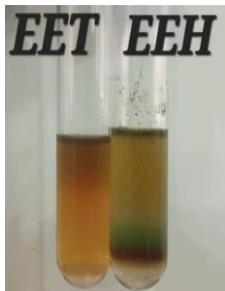
Tabla 6. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación)

Antraquinonas NH₄OH []	EEH: - EET: -  Ausencia de coloración rojo
Quinonas Cápsula con H₂SO₄ []	EEH: - EET: -  Ausencia de coloración rojo
Lactonas (sesquiterpenos) NaOH al 10 % con HCl	EEH: - EET: -  No hay pérdida de color amarillo o naranja

EEH: extracto etanólico de las hojas EET: extracto etanólico del tallo

Presente: + Abundante: ++ Ausente: -

Tabla 6. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Continuación)

Glicósidos cardiotónicos Prueba para glucósidos cardiotónicos	EEH: + Anillo marrón EET: - 
--	--

EEH: extracto etanólico de las hojas **EET:** extracto etanólico del tallo

Presente: + Abundante: ++ Ausente: -

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

De modo que, al comparar los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* (Tablas 5 y 6) con los trabajos previos de esta especie, acotando que los reportes actuales más comunes en cuanto al tamizaje fitoquímico son de las semillas, reflejó ser similar en cuanto a la presencia de metabolitos secundarios como terpenoides, fenoles, alcaloides y flavonoides, no siendo así para taninos que si se evidencia en trabajos previos y en el tamizaje de dichos extractos etanólicos de esta investigación no se presentaron, al contrario de los glicósidos cardiotónicos que son positivos para el extracto etanólico de las hojas de dicha investigación y no se reflejó en esta investigación previa (Falana y Nurudeen, 2023).

De igual manera, Khammassi y cols., (2023), en los extractos metanólicos de semillas de *Foeniculum vulgare* Mill identificarón 18 compuestos fenólicos distribuidos en ocho ácidos fenólicos, un ácido no

fenólico y nueve flavonoides, demostrando así que esta especie es rica en compuestos fenólicos y flavonoides. Por otra parte, Crescenzi y cols., (2023), cuantificaron diez compuestos polifenólicos en los extractos hidroalcohólicos de los tallos y hojas de tres variedades de *F. vulgare*, Tiziano, Pegaso y Preludio, donde se logró evidenciar un mayor contenido de flavonoides en las hojas que en los tallos de todas las variedades analizadas; siendo este un diferimiento con esta investigación que reporto en el tamizaje fitoquímico una mayor proporción de flavonoides en el extracto etanólico del tallo que en el extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare*.

Actividad antioxidante

Asimismo, a dichos extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare* se le determinó la actividad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la cual se expresó en porcentaje de inhibición (Tabla 7), indicando la cantidad de radical DPPH neutralizado por los extractos y a su vez, por ser mayor al 50 % se le determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀); para ello, se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico (Tabla 8) (Gráfico 1), la cual nos indicó la mínima concentración de un antioxidante capaz de reducir un 50 % de radicales libres presentes en el medio, se determinó para el extracto etanólico de los tallos (Tabla 9) (Gráfico 2) y el extracto etanólico de las hojas (Tabla 10) (Gráfico 3) de *Foeniculum vulgare*, obteniéndose los siguientes resultados.

Actividad inhibitoria del DPPH

De forma que, para su determinación se realizó un barrido inicial con los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*, a una concentración de 1000 µg/mL y se comparó con el ácido ascórbico (sustancia antioxidante utilizada como referencia). Obteniéndose así un porcentaje de inhibición frente al radical DPPH de 92,17 % para el extracto etanólico de los tallos y de 86,44 % para el extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare*, siendo el del ácido ascórbico de 95,83 % (Tabla 7), confirmando que los extractos analizados presentan una alta actividad antioxidante y semejante al patrón de comparación.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la Actividad Antioxidante *in vitro* por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

Extractos de <i>Foeniculum vulgare</i>	Concentración extractos patrón referencia (µg/mL)	% Inh ± DE
Tallos Etanol	1000	92,167 ± 0,471
Hojas Etanol		86,444 ± 0,079
Patrón:	Ácido Ascórbico	95,833 ± 0,024

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Leyenda: Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) de los extractos etanólicos ensayados.

Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Puesto que, el % In $\geq$ al 50 % de ambos extractos se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀). Así, se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico (12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 75 µg/mL;

100 µg/mL) y sus resultados analíticos se reflejan en la Tabla 8 y Gráfico 1. Asimismo, se prepararon una serie de diluciones del extracto etanólico de los tallos (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL) (Tabla 9), (Gráfico 2) y del extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL) (Tabla 10), (Gráfico 3) para determinar la CI_{50} ; siendo de 37,95 µg/mL para el extracto etanólico de los tallos y de 106,73 µg/mL para el extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare*.

Tabla 8. Datos para curva de calibración con ácido ascórbico.

Muestras	Concentración de Patrones	Absorbancias Promedio	% Inh ± DE
Ácido Ascórbico (µg/mL)	12,5	0,552	20,67 ± 0,473
	25	0,438	37,09 ± 0,430
	50	0,216	69,02 ± 0,187
	75	0,025	96,36 ± 0,264
	100	0,020	97,08 ± 0,078
Patrón DPPH (mM)	0,06	0,696	0,000 ± 0,000

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Leyenda: Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) de las concentraciones patrones ensayados.

Gráfico 1. Curva de calibración con ácido ascórbico.

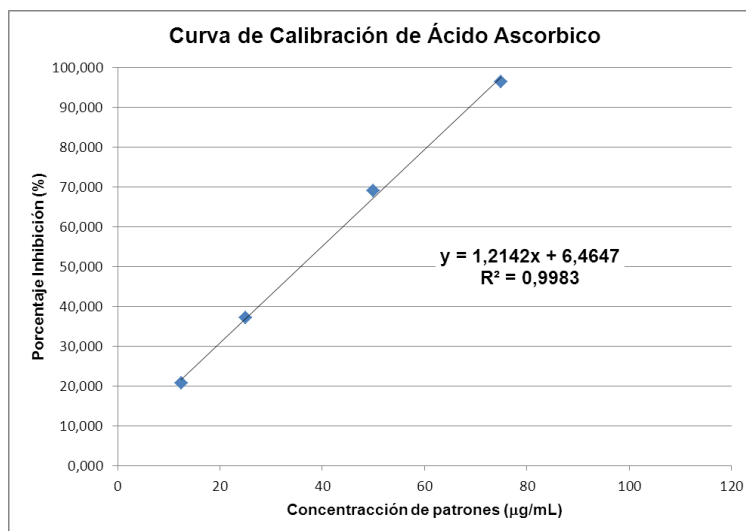


Tabla 9. Valores obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto de etanol de los tallos de *Foeniculum vulgare*.

Extractos analizados	Concentraciones (µg/mL)	% Inh ± DE	CI ₅₀ (µg/mL)
Tallos Etanol	31,25	49,90 ± 0,074	37,95± 1,601
	62,5	51,72 ± 0,193	
	125	56,98 ± 0,185	
	250	59,28 ± 0,446	
	500	80,82 ± 0,481	
	1000	92,16 ± 0,471	

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Leyenda. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) y Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀ expresada en µg/mL)

Grafico 2. Determinación de la CI_{50} del extracto de etanol de los tallos de *Foeniculum vulgare*.

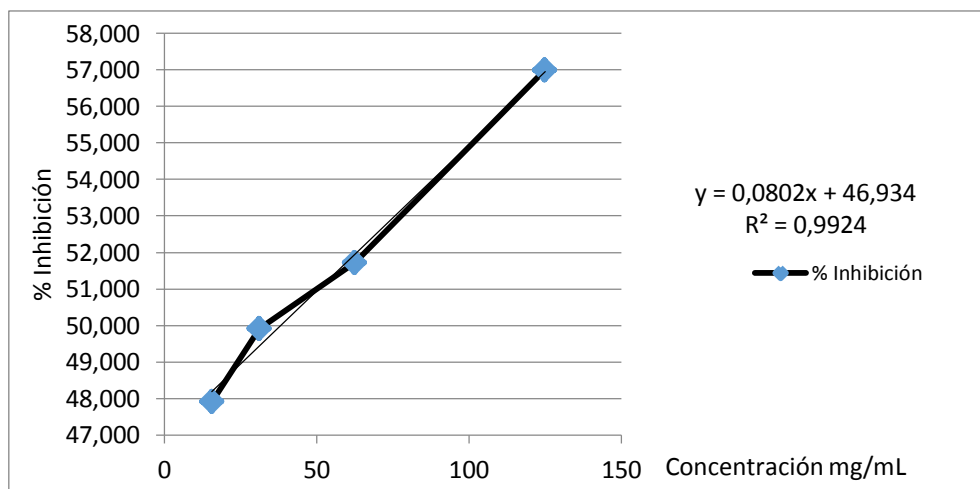


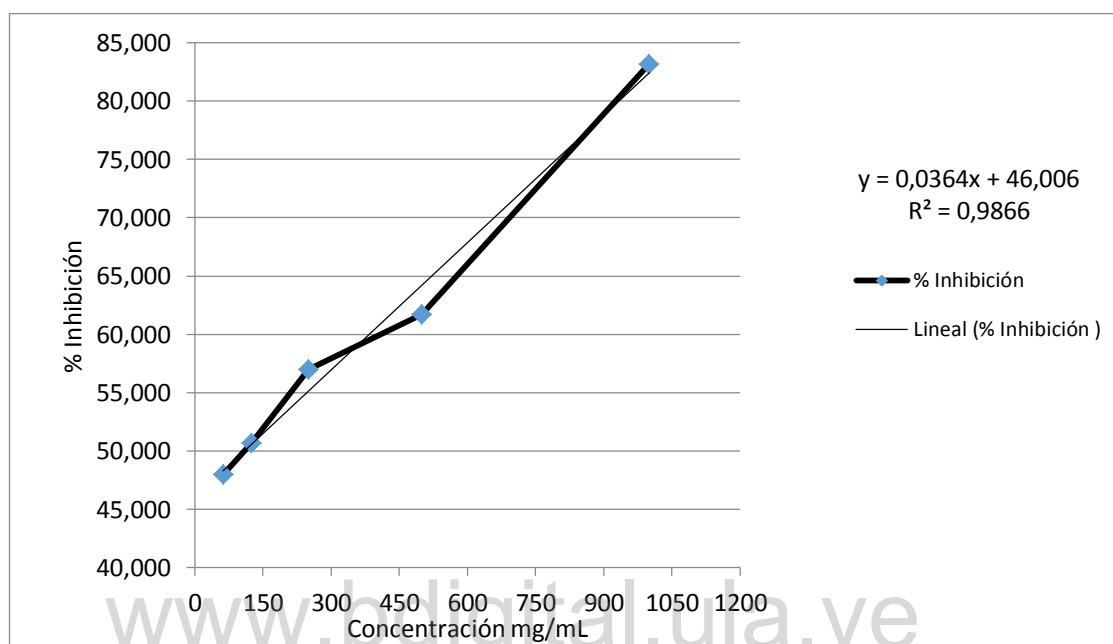
Tabla 10. Valores obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) del extracto de etanol de las hojas de *Foeniculum vulgare*.

Extractos analizados	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)	% Inh $\pm$ DE	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Hojas Etanol	62,5	47,97 $\pm$ 0,369	106,73 $\pm$ 4,753
	125	50,69 $\pm$ 0,155	
	250	56,98 $\pm$ 0,076	
	500	61,70 $\pm$ 0,440	
	1000	86,44 $\pm$ 0,079	

Fuente: Angarita, Torres y Pérez, 2023.

Leyenda: Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% Inh) $\pm$ Desviación Estándar (DE) y Concentración Inhibitoria Media (CI_{50} expresada en $\mu\text{g/mL}$).

Gráfico 3. Determinación de la CI_{50} del extracto de etanol de las hojas de *Foeniculum vulgare*.



En efecto, estos resultados nos muestran que el extracto etanólico de los tallos presentan mayor porcentaje de inhibición que el extracto etanólico de las hojas, por lo tanto, el CI_{50} del extracto de los tallos es menor que el extracto de las hojas de *Foeniculum vulgare*. A diferencia de la investigación de Crescenzi y cols., (2023), quienes determinaron la actividad antioxidante por el método del DPPH y el ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de tres variedades de diferente estacionalidad de *F. vulgare* Tiziano (cultivo de invierno), Pegaso (cultivo de primavera) y Preludio (cultivo de verano), donde cada extracto mostró una buena actividad antioxidante, pero las hojas en general en comparación con los tallos de estas variedades estacionales de *Foeniculum vulgare* demostraron ser más activas.

Por lo que, los datos del análisis cuantitativo mostraron que las hojas de las variedades Pegaso y Preludio ejercieron la mayor actividad antioxidante, alcanzando valores de TEAC expresada en mg/mL de 1,501 para hojas (FVLE-PR) de *F. vulgare* de Preludio y 1,676 para hojas (FVLE-PE) de *F. vulgare* de Pegaso respectivamente, con un CI_{50} para DPPH expresada en mg/mL de 0,010 para FVLE-PR y 0,634 para FVLE-PE.

De tal manera, que la composición química de los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *Foeniculum vulgare*, difiere en los metabolitos secundarios presentes y en la proporción en que los mismos se encuentran, repercutiendo así en las propiedades de las partes de la planta; demostrándose que en los extractos etanólicos de los tallos hay mayor proporción de compuestos fenólicos y flavonoides que según estudios anteriores han demostrado tener una fuerte actividad antioxidante; por lo que, estos extractos presentan mayor porcentaje de inhibición en comparación con el extracto etanólico de las hojas que presenta menor proporción de estos metabolitos y menor porcentaje de inhibición.

Así lo confirma la investigación de Falana y Nurudeen, (2023), que reportan el aislamiento de flavonoides y fenoles obtenidos de las semillas de *F. vulgare* donde los cuales presentan fuerte actividad antioxidante mediante el método de DPPH y ABTS a diferentes concentraciones (10-100mg/mL). El estudio reveló que el extracto de las semillas de *F. vulgare* a una concentración de 100 mg/mL presentó un porcentaje de inhibición de 90,01 % para el DPPH y 89,64 % para el ABTS, la CI_{50} no fue determinada por los autores pero se puede apreciar en las gráficas de porcentaje de inhibición que se encuentra por debajo de 10 mg/mL.

De modo que, las funciones antioxidantes de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2; al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Escamilla, Cuevas y Guevera, 2009).

Asimismo, es necesario resaltar que el extracto etanólico de los tallos está constituido por flavonoles que han demostrado tener mayor actividad antioxidante, así se confirma en los estudios realizados por Escamilla y cols., (2009), donde los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y es potenciado este efecto por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4, tal es el caso de los flavonoles. Además, las agliconas se muestran más potentes en sus acciones antilipoperoxidativas que sus correspondientes glicósidos. Mientras que las flavonas presentes en el extracto etanólico de las hojas, poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3, por lo que, su actividad antioxidante es menor.

Así, los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células (Escamilla y cols., 2009). De este modo, la investigación de Ibrahim,

Hamouda y Akram, (2023), concluyen que el extracto del hinojo posee actividades antioxidantes por los flavonoides y polifenoles que contiene y se utiliza para reducir la formación de radicales libres, por lo que es un buen componente antioxidante.

En tal sentido, se confirma que los extractos etanólicos de las hojas y tallos de *F. vulgare* presentan actividad antioxidante por los compuestos fenólicos y flavonoides detectados en el tamizaje fitoquímico (Tabla 5), los cuales demuestran tener gran potencial antioxidante frente al radical DPPH, siendo mayor el porcentaje de inhibición para el extracto de los tallos de 92,167 % que de los extractos de las hojas de 86,444 %, tales resultados se deben a que los extractos de los tallos presentan mayor proporción de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes y presencia de flavonoles que presentan mayor actividad antioxidante que flavonas, que se encuentra en los extractos de las hojas y compuestos fenólicos pero en menor cantidad.

De este modo, conviene resaltar que los extractos de esta especie *F. vulgare* representan una alternativa terapéutica para el estrés oxidativo ya que se demostró que sus metabolitos secundarios presentan gran potencial antioxidante para neutralizar los radicales libres.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El tamizaje fitoquímico permitió determinar que en el extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare* predominan los metabolitos secundarios como triterpenos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, alcaloides; siendo relevante resaltar que también presentan compuestos fenólicos y flavonoides pero que los mismos predominan con una mayor proporción en el extracto etanólico de los tallos de *Foeniculum vulgare*, que también contiene alcaloides, triterpenos, esteroides en menor proporción y no contiene glicósidos cardiotónicos. Así, el extracto etanólico de las hojas fue positivo para flavonas y el extracto etanólico de los tallos fue positivo para flavonoles. Por otra parte, dichos extractos no presentan saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas ni lactonas sesquiterpenos.

El extracto etanólico de los tallos de *Foeniculum vulgare* presentó una mayor actividad antioxidante frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con un porcentaje de inhibición de 92,16 %, mientras que el extracto etanólico de las hojas tuvo un 86,44 % de inhibición.

La concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue de 37,95 µg/mL para el extracto etanólico de los tallos y de 106,73 µg/mL para el extracto etanólico de las hojas de *Foeniculum vulgare*.

Por lo tanto, se confirma que la composición química de los extractos etanólicos de *Foeniculum vulgare* con un predominio en compuestos fenólicos y flavonoides son los responsables de su actividad antioxidante inhibiendo el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en un mayor porcentaje en extractos de los tallos que en las hojas.

Los extractos de *Foeniculum vulgare* tienen una relevante actividad antioxidante siendo así una alternativa terapéutica contra el estrés oxidativo y la prevención y control de radicales libres; tal investigación representa un aporte científico para la sociedad.

Por otra parte, es de relevancia resaltar que este es el primer reporte de actividad antioxidante de *Foeniculum vulgare* de Mérida y Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

Realizar la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides de los extractos de las hojas, tallos y otras partes de *Foeniculum vulgare*, para correlacionar su proporción con la actividad antioxidante.

Determinar si los metabolitos secundarios de los extractos de *Foeniculum vulgare* presentan otras actividades biológicas como antifúngica, antibacteriana, citotóxica, entre otras.

Orientar a la población sobre los beneficios de esta planta medicinal *Foeniculum vulgare*, conocido como Hinojo, consiguiendo su conservación y uso adecuado.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Alam, N., Bristi, N., y Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: sustancia y drogas extraídas de plantas*. Caracas: Ediciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Albornoz, M. (1992). *Medicina tradicional herbaria*. Caracas: Instituto Farmacoterápico Latino. División de Fitoterapia y Productos Naturales.
- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., y Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *The Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19(2), 119-128.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(3), 183-198.
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica*. Caracas: EDITORIAL EPISTEME.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). "Metabolismo secundario de plantas". Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Badgujar, S., Patel, V., y Bandiudekar, A. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill. A Review of its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application and toxicology. *BioMed Research International*, 8(8), 250-260.
- Basaga, H. (1989). Biomedical aspects of free radicals. *Biochemistry and Cell Biology*, 68(7-8), 989-998.

- Beyazen, A., Dessalegn, E., y Mamo, W. (2017). Phytochemical screening, and biological activities of leaf of *Foeniculum vulgare* (ensilal). *International Journal of Chemical Studies*, 5(1), 18-25.
- Blanco, N., y García, A. (2019). Necesidad de la formación por competencias para la prescripción racional de plantas medicinales. *Revista Cubana Planta Medicinales*, 24(3), 914-118.
- Brand, W., Cuvelier, M., y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brenner, M., y Hearing, V. (2007). The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 539 – 549.
- Bravo, L. (2003). *Farmacognosia especial*. España: El sevier. Recuperado de https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-4310-0_4
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. Zaragoza - España: Editorial Acribia.
- Camacho, M., Ramos, D., Ávila, N., Sanchez, E., y López, S. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra latinoamericanas*, 38(2), 443-453.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3), 265-278.
- Carocho, M y Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15-25.
- Carrillo, T., y Moreno, R. (2006). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. *Revista De La Facultad de Farmacia*, 48(2), 20-28.

- Castillo, G., Zavala, D., y Carrillo, M. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Revista académica de investigacion*, 8(24), 71-86.
- Cheesman, K., y Slater, T. (1998). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3) ,481-493.
- Christensen, L., y Brandt, K. (2006). Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3), 683-693.
- Clarkson, P. (1995). Antioxidants and physical performance. *Crit Review Food Science*, 35(2), 131- 141.
- Clavijo, N., y Cruz, B. (2017). Análisis Fitoquímico Preliminar *Pachira quinata* (Jacq.) W.S. Alverson. *Boletín Semillas Ambientales*, 11(1), 30-39.
- Corrales, L., y Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(7), 214-223.
- Crescenzi, A., D'Urso, G., Piacente, S., y Montoro, P. (2023). Comparative UHPLC-Q-Trap-MS/MS-Based Metabolomics Analysis to Distinguish *Foeniculum vulgare* Cultivars Antioxidant Extracts. *Molecules*, 28(2), 900-914.
- Crespo, R., y Mora, I. (1997). *Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas*. España: Cultural, S.A.
- Dawidowicz, A., y Olszowy, M. (2010). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by betacarotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231(6), 835-840.
- Delgado, L., Betanzos, G., y Sumaya, T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 50(09), 10-15.

- Delporte, C. (2010). Farmacognosia, Trabajos prácticos. Departamento de farmacología y toxicología. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Díaz, L., De Monjito, S., Medina, A., Meléndez, P., Laurence, V., y Marti-Mestres, G. (2011). Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 153–158.
- Diplock, A. (1991). Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(1), 189S-193S.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Editorial Limusa, S.A.
- Downie, R., Katz, D., y Watson, M. (2000). A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA rpl6 and rpoC1 intron sequences: Towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany*, 87(2), 273-292.
- Escamilla, C., Cuevas, E., y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73-75.
- Expósito, L., Kokoszka, J., y Waymire, K. (2000). Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 754-766.
- Falana, M., y Nurudeen, Q. (2023). Phytochemical Components, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fermented Seeds of *Foeniculum vulgare*. *ABUAD International Journal of Natural and Applied Sciences*, 3 (2), 36-41.
- Gil, J., Villa, J., Ayala, F., Heredia, B., Sepulveda, D., Yahia, E., y Gonzalez, G. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An

- overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.
- González, M., y Betancourt, M., y Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3-9.
- Halliwel, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49(10), 1341-1348.
- Halliwel, B., y Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *El British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231- 255.
- Han, H., y Baik, B. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International journal of food science & technology*, 43(11), 1971-1978.
- Heywood, V. (1985). *Las plantas con flores*. España: Editorial Reverté.
- Huang, D., Ou, B y Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Ibrahim, M., Hamouda, M., y Akram, U. (2023). Medicinal activities of Fennel. *Clinical Medical Reviews and Reports*, 5(5), 1-3.
- Jerlick, A., Pitt, A., Schaur, R., y Spickett, C. (2000). Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5) ,673-682.
- Khammassi, M., Habiba, K., Mighri, H., Mouna, S., Oumayma, K., Seçer, E y Yassine, M. (2023). Phytochemical Screening of Essential Oils and Methanol Extract Constituents of Wild *Foeniculum vulgare* Mill.: a Potential Natural Source for Bioactive Molecules. *Chemistry Africa*, 6(3), 1-14.

- Khan, M., y Musharaf, S. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill. A medicinal herb. *Medicinal Plant Research*, 4(6), 46-54.
- Kocer, O. (2023). Usage areas, chemical contents, mineral and nutritional contents and biological activities of fennel. *International studies in science and mathematics*, 91.
- Koppula, S., y Kumar, H. (2013). *Foeniculum vulgare* Mill (Umbelliferae) atenúa el estrés y mejora la memoria en las ratas. *Revista Tropical de Investigación Farmacéutica*, 12(4), 553–558.
- Krishnamurthy, K. (2011). Medicinal plants: Madhurika, saunf or fennel (*Foeniculum vulgare*, Gaertn). *Journal of New Approaches to Medicine and Health*, 19(1), 1-4.
- Lai, H., y Lim, Y. (2011). Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts os Selected Ferns in Malaysia. *Internacional Journal of Enviroment Science and Development*, 2(6), 442-445.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica (1° ed.)*. Córdoba, Argentina: Editorial Encuentro.
- Left, J., Parson, P., y Day, C. (1992). Increased serum catalase activity in septic patients with the adult respiratory distress syndrome. *The American Review of Respiratory Disease*, 146(4), 985-989.
- Liu, R., y Finley, J. (2005). Potential cell culture models for antioxidant research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4311-4314.
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para determinar su actividad*. Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Lozada, S., García, L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 17, 172-179.

- Marcano, D., Hasegawa, M. (2018). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Editorial Torino.
- Martínez, A. (2020). *Química de Productos Naturales*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Mehra, N., Tamta, G., Nand, V. (2021). A review on nutritional value, phytochemical and pharmacological attributes of *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(2), 1255-1263.
- Montoya, B., Lemeshko, V., López, J., Pareja, A., Urrego, R., y Torres, R. (2003). Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 10(2), 72-79.
- Morales, M., García, M., Acosta, L., Vega, J., Céspedes, I., y Perdomo, J. (2020). Una alternativa natural para el tratamiento de la COVID19. *Revista Cubana Planta Medicinales*, 25(1), 1024-1030.
- Muckensturm, B., Foechterlen, D., Reduron, J., Danton, P., y Hildenbrand, M. (1997). Estudios fitoquímicos y quimiotaxonómicos de *Foeniculum vulgare*. *Sistemática bioquímica y ecología*, 25(4), 353 – 358.
- Nascimento, F., Diniz, E., De Mesquita, L., De Oliveira, A., y Costa, T. (2008). Extractos vegetales en el control de plagas. *Revista Verde de Agroecología E Desenvolvimento Sustentavel Grupo Verde de Agricultura Alternativa*, 3(3), 1-5.
- Naqui, A., Britton, C., y Cadenas, E. (1996). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 137-66.
- Ndhkala, A., Moyo, M., y Van Staden, J. (2010). Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules. *Journal Molecules*, 15(10), 6905-6930.

- O'Brien, N., Woods, J., Aherne, S., y O'Callaghan, Y. (2000). Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 22-26.
- Pamplona, J. (2006). *Salud por las plantas medicinales*. España: Editorial Safeliz.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Villa, J., y Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Prior, R., Wu, X., y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290- 4302.
- Rangon, V., y Bulkley, G. (1993). Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. *British Medical Bulletin*, 49(3), 700-718.
- Reylli, P., y Burkley, G. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *British Journal of Surgery*, 77(12), 1323-1324.
- Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México: OmniaScience.
- Robineau, G. (2005). *Farmacopea Vegetal Caribeña*. República Dominicana: Editorial Universitaria, UNAN-León.
- Roby, M., Sarhan, M., Selim, K., y Khalel, K. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44(1), 432-445.
- Rodrigues, M., Soszynski, A., Martins, A., Rauter, A., Neng, N., Nogueira, J., Varela, J., Barreira, L., y Custódio, L. (2015). Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different

- anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products*, 77(12), 315-322.
- Rodríguez, P., Mendez, L., y Trujillo, L. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1), 15-20.
- Sánchez, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121- 137.
- Sun, Y., y Oberl, L. (1996). Redox regulation of transcriptional activator. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(3), 335-348.
- Tamayo, R., Alba, E., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallos de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina el Caribe España y Portugal*, 15(3), 322-347.
- Valcargel, M., y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Editorial Reverte.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31(2) ,126-133.

ANEXOS



Anexo 1: Voucher A R y T B 01.

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN

Quien suscribe, Dr. Pablo Meléndez G., hace constar que la muestra de colección # 01, correspondiente a las bachilleres Rosa Angarita, CI: 23442375 y Beitsay Torres CI: 26198306, quienes desarrollan su tesis de grado de Bioanálisis en el Instituto de Investigaciones de Farmacia y Bioanálisis, bajo la tutoría de la Prof. Alida Pérez, fue procesada e identificada taxonómicamente por mi persona en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, cuya especie resultante es: *Foeniculum vulgare* Mill. , cuya familia taxonómica es APIACEAE

Certificado realizado en Mérida, a los 19 días del mes de octubre de

2023.




Dr. Pablo Meléndez González

Director-Curador Herbario MERF

Anexo 2: Certificado de identificación taxonómica de *Foeniculum vulgare*.