



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



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
DE LOS EXTRACTOS DE *Solanum hirtum* (Solanaceae)

Trabajo de Grado Presentado como Requisito para Optar al Título de Licenciados en
Bioanálisis

Autores:

Yelitza S. Molina Nieto

C.I.15.921.924

Omar D. Contreras Parada

C.I. 19.492.561

Tutor:

Prof. Alida Pérez

DEDICATORIA

- A Dios primeramente por estar siempre a mi lado.
- A mis padres, Carmen y Wilson por haberme traído al mundo.
- A mis hijos, Dhilan Villarreal y Maximiliano Romero que cada día me impulsan, los amo.
- A mi compañero de vida Javier Romero por creer en mí, su amor y apoyo.
- A mi tutora la profesora Alida Pérez por su confianza, aceptación y contribución en el desarrollo de este trabajo.
- A mi máxima casa de estudio Universidad de Los Andes por haberme permitido formar parte de ella.
- A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Escuela de Bioanálisis) por brindarme la oportunidad de desarrollarme en lo profesional.
- A mis amistades que aunque fueron pocas, su influencia y animo fue muy importante durante esta etapa especialmente a Francisco Uzcategui.
- A todos mis profesores por su enseñanza y dedicación.

Yelitza S. Molina M.

DEDICATORIA

- A mis padres y abuela que me apoyaron con mucho amor y cariño en todo este proceso.
- A mi hijo, Sebastián Contreras por ser mi motivo de lucha y esfuerzo, te amo.
- A mi novia, Milexy Garrido por su apoyo incondicional en todo momento.

Omar D. Contreras P.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios por habernos dado la vida y sabiduría para enfrentarla, a nuestros padres e hijos que han sido un apoyo en todos los momentos de nuestras vidas, y que gracias a ellos se hizo posible nuestro crecimiento personal, intelectual y profesional.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” porque ahí se hizo posible este trabajo de investigación.

A la profesora Alida Pérez (tutora) por aportarnos sus conocimientos, su tiempo y apoyo durante todo este proceso y brindarnos la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en la dirección de esta tesis.

A nuestra querida Universidad de Los Andes forjadora de excelentes profesionales.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Escuela de Bioanálisis) y a todos los docentes por sus enseñanzas durante nuestra formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	4
Planteamiento del problema.....	4
Justificación e importancia de la investigación.....	6
Objetivos de la investigación.....	7
<i>Objetivo General.....</i>	<i>7</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>7</i>
Alcances y Limitaciones de la investigación.....	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos previos.....	9
Antecedentes históricos.....	11
Bases teóricas.....	13
Familia Solanáceae.....	13
<i>Aspectos botánicos.....</i>	<i>13</i>
<i>Distribución geográfica de las Solanáceas.....</i>	<i>15</i>
<i>Metabolitos secundarios de las Solanáceas.....</i>	<i>15</i>

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

	Pág
<i>Usos etnobotánicas de las Solanáceas.....</i>	16
<i>Aspectos farmacológicos.....</i>	17
Género <i>Solanum</i>.....	17
<i>Composición química.....</i>	19
<i>Alcaloides.....</i>	19
<i>Saponinas.....</i>	20
<i>Flavonoides.....</i>	21
<i>Actividades farmacológicas.....</i>	22
<i>Solanum hirtum</i> Vahl.....	23
<i>Composición química.....</i>	24
<i>Actividad farmacológica.....</i>	25
Productos naturales.....	25
<i>Clasificación.....</i>	26
<i>Rutas biosintéticas.....</i>	27
Extractos vegetales.....	28
<i>Métodos de obtención.....</i>	28
Análisis fitoquímico preliminar.....	29
Radicales libres.....	32
<i>Tipos de radicales libres.....</i>	33
<i>Fuentes de Radicales libres.....</i>	34

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

	Pág
<i>Estrés oxidativo</i>	35
Antioxidantes	35
<i>Clasificación</i>	36
<i>Actividad antioxidante</i>	36
<i>Métodos para determinar la actividad antioxidante</i>	37
Compuestos fenólicos	41
<i>Clasificación de los fenoles</i>	42
<i>Determinación del contenido de fenoles totales</i>	45
Definición operacional de términos	47
Operacionalización de las variables	48
Hipótesis	51
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	52
Tipo de investigación	52
Diseño de investigación	52
Población y muestra	53
<i>Unidad de investigación</i>	53
<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	53
Sistema de variables	53
Instrumento de recolección de datos	54
Procedimiento de la investigación	54

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

	Pág.
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	60
Resultados y Discusiones.....	60
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
Conclusiones.....	69
Recomendaciones.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Título	Pág.
1	Actividades farmacológicas del género <i>Solanum</i>	23
2	Clasificación de los modelos de ensayo <i>in vitro</i> según su modo de reacción ET y HAT.....	38
3	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antioxidante de los extractos de <i>Solanum hirtum</i>	49
4	Operacionalización de la variable dependiente. Cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de <i>Solanum hirtum</i>	49
5	Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de <i>Solanum hirtum</i>	50
6	Resultados del tamizaje fitoquímico de los frutos de <i>Solanum hirtum</i>	60
7	Resultados obtenidos de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH).....	63
8	Resultados obtenidos curva de calibración con ácido ascórbico.....	64
9	Valores de obtenidos de concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de los extractos de <i>Solanum hirtum</i>	65
10	Resultados obtenidos del contenido total de compuestos fenólicos del extracto metanólico de <i>Solanum hirtum</i>	66
11	Datos para curva de calibración con ácido gálico.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Pág.
Figura		
	Estructura química de algunos núcleos de alcaloides del género	19
1	<i>Solanum</i>	
2	Estructura química de algunas saponinas del género <i>Solanum</i>	21
3	Estructura química de algunos flavonoides del género <i>Solanum</i>	22
4	<i>Solanum hirtum</i>	24
5	Estructura química de compuestos tóxicos de la especie <i>Solanum</i> <i>hirtum</i>	25
6	Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)...	39
7	Estructuras de los Flavonoides.....	44
8	Determinación de compuestos fenólicos Método Folin-Ciocalteau.....	46
9	Ecuación para el calculado del Porcentaje de Inhibición (% Inh).....	57
10	Resultados del tamizaje fitoquímico de los frutos de <i>Solanum</i> <i>hirtum</i>	61
11	Curva de Calibración del Ácido Ascórbico.....	64
12	Curva de calibración de ácido gálico.....	67



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



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS
DE LOS EXTRACTOS DE *Solanum hirtum* (Solanaceae)
Trabajo de Grado

Autores:

Yelitza S. Molina Nieto

C.I.15.921.924

Omar D. Contreras Parada

C.I. 19.492.561

Tutor:

Prof. Alida Pérez

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la composición química y evaluar la actividad antioxidante de los extractos de los frutos de *Solanum hirtum* Vahl. Los frutos secos y molidos fueron sometidos a un proceso de extracción mediante maceración en metanol, luego el extracto obtenido se fraccionó mediante cromatografía al vacío utilizando hexano, diclorometano y metanol. Las fracciones fueron analizadas mediante pruebas químicas para la identificación de los metabolitos secundarios, revelando la presencia de esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides en la fracción diclorometano y metanol. Posteriormente se realizó la cuantificación del contenido de fenoles totales a través del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, los resultados mostraron que la fracción metanólica contenía $18,54 \pm 0,30$ microgramos de ácido gálico por miligramo de extracto. Por otra parte, se realizó la determinación de la actividad antioxidante por medio del ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) la fracción metanólica se utilizó a una concentración de $1000 \mu\text{g/mL}$, dando como resultado un porcentaje de inhibición (% Inh) de 92,33 % similar al compuesto de referencia utilizado (ácido ascórbico % Inh= 95,83 %). La concentración inhibitoria fue de $236,05 \mu\text{g/mL}$. Este es el primer reporte de actividad antioxidante de los frutos de *S. hirtum*.

Palabras Claves: Solanaceae, *Solanum*, *Solanum hirtum*, actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Como resultado del metabolismo normal del cuerpo, algunos organelos celulares como mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, membrana nuclear citoplasmática y retículo endoplásmico, originan radicales libres, como las especies reactivas del oxígeno (EROS): superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($OH^{\cdot}$), piróxilo ($R-OO^{\cdot}$), alcóxilo ($RO^{\cdot}$) e hidroperóxilo ($HOO^{\cdot}$), y las especies reactivas del nitrógeno (ERN): óxido nítrico (ON), dióxido de nitrógeno (NO_2) y peróxido de nitrato. Sin embargo, estos también pueden generarse por factores externos como contaminación ambiental, exposición a radiación y productos químicos como medicamentos, aditivos alimenticios, pesticidas, herbicidas, tabaco, entre otros (Islas, Castañeda, Álvarez, Valenzuela, Romero y Torres, 2017).

Estos radicales atacan moléculas como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para contrarrestar su efecto, las células han desarrollado mecanismos de protección y reparación del daño, como la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NADPH-quinona oxidorreductasa y epóxido hidrolasa, también metabolitos antioxidantes que atrapan y neutralizan estos radicales; sin embargo, resultan insuficientes para protegerlas completamente (Islas y cols., 2017).

Cuando los oxidantes superan la cantidad de antioxidantes ocurre el estrés oxidativo, que provoca daños importantes en biomoléculas y componentes celulares, lo cual está asociado a enfermedades crónicas degenerativas como Alzheimer, Parkinson, arterioesclerosis, cáncer, artritis, desordenes neurodegenerativos, enfermedades coronarias y envejecimiento

precoz. Se ha demostrado que los componentes fenólicos son los principales antioxidantes derivados de plantas. Entre los más importantes se encuentran los flavonoides, los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les han atribuido efectos terapéuticos, tales como actividad cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplásica y antimicrobiana, entre otros (Islas y cols., 2017).

Igualmente, el género *Solanum* incluye especies de plantas de gran importancia desde el punto de vista alimenticio, ecológico y farmacéutico además de presentar gran variedad de compuestos, estas plantas han demostrado poseer metabolitos secundarios con actividad antioxidante (Ramón y Galeano, 2020). Teniendo en cuenta la necesidad actual del aprovechamiento de los recursos que nos brinda la madre naturaleza para el beneficio humano y que deben utilizarse de forma racional, segura y efectiva, resulta importante realizar la evaluación de la actividad antioxidante y cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *Solanum hirtum* (Solanaceae) para confirmar la relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de dicha planta y poder recomendar su estudio en posteriores investigaciones.

Este proyecto de Investigación está estructurado en cinco Capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación de la investigación, Objetivos, Hipótesis, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición operacional de términos y Operacionalización de las variables. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo de investigación, Diseño de investigación, Población y Muestra, Unidad de investigación, Selección del tamaño de la muestra,

Sistema de variables, Instrumento de recolección de datos, Procedimientos de la investigación y Diseño de análisis. El Capítulo IV comprende: Resultados y Discusión y el Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Hoy en día, uno de los inconvenientes que causan el deterioro en la calidad de vida, la aparición de enfermedades y muertes en la población, son provocadas por radicales libres (RL), debido a que cada célula del cuerpo padece unos 10.000 impactos de estos al día, pudiendo incluso convertir a otras sustancias en RL, estableciendo reacciones en cadena muy dañinas (Youngson, 2003), por lo cual nos centramos en el estudio de la evaluación de la actividad antioxidante de una especie de la familia Solanaceae cómo: *Solanum hirtum*, cuyo género produce alcaloides y compuestos fenólicos que pueden tener propiedades antioxidantes (Muñoz, Brachet, Gupta, Veuthey y Christen, 1997).

Diariamente el cuerpo origina cierto tipo de moléculas conocidas como radicales libres, las mismas que producidas en menor cantidad son necesarias y hasta beneficiosas para el organismo; el problema se genera cuando el número de estos aumenta, ya sean por esta vía o por influencia ambiental y será necesario eliminarlas del organismo, las plantas juegan un papel fundamental en esta necesidad ya que son en ellas donde se encuentran estos elementos denominados antioxidantes que ayudan a eliminarlos del organismo (Coba, Mayacu y Vidari, 2010).

Este principio activo (antioxidante) de algunas plantas ayuda a combatir los efectos dañinos de los RL producidos en el organismo como el envejecimiento prematuro, alteraciones en el aparato circulatorio,

alteraciones del sistema nervioso, e incluso se las relaciona con el cáncer y otras enfermedades degenerativas. Estudios recientes ponen de manifiesto que existe relación entre los antioxidantes y la cura de fracturas e indican que las ingestas de antioxidantes ayudan a la pronta recuperación de fracturas es por eso que las búsquedas de compuestos químicos con estas características generan una novedosa expectativa (Coba y cols., 2010).

El daño producido por las especies reactivas de oxígeno es un proceso natural que no se puede evitar, ya que estos compuestos son originados por el metabolismo normal del cuerpo y son importantes en funciones fisiológicas. Debido a su alta reactividad, su acumulación ocasiona daño que afecta la estructura celular y la integridad funcional (Avello y Suwalsky, 2006).

Un gran número de contribuciones sobre el reporte de extractos y/o sustancias validadas por sus propiedades antioxidantes se ha incrementado significativamente en los últimos años. El estudio de nuevos y efectivos antioxidantes puede ser de gran beneficio en la mejora de la calidad de vida mediante la prevención y aparición de enfermedades degenerativas. Además, de presentar un sustancial ahorro en el costo de los servicios de atención de la salud. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de sustancias y/o especies vegetales validadas por poseer propiedades antioxidantes para inhibir el deterioro oxidativo, son pocos los estudios complementarios y los recursos que se destinan en la investigación, ya que sólo unas pocas especies se utilizan como suplementos antioxidantes o alimentarios (Suhaj, 2006).

Los estudios acerca de la actividad antioxidante en plantas de la familia Solanaceae toman gran importancia por la capacidad de enfrentar a los radicales libres que atacan a las células evitando enfermedades que pueden convertirse en un problema social (Fernández, 2009). En relación a lo

expuesto anteriormente y descrita la situación del problema de estudio se elaboró del siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Solanum hirtum*?

Justificación e importancia de la investigación

Desde tiempos remotos el ser humano se vio en la necesidad de curar o apaciguar sus dolencias y encontraron de manera empírica en la naturaleza muchos de los remedios para sus males. Este conocimiento ancestral unido al avance tecnológico nos permite hoy en día investigar a fondo los principios activos de las plantas que durante siglos han curado muchos males, para así ponerlas en conocimiento y consideración de la ciencia (Coba y cols., 2010).

Actualmente, existe un interés por los estudios de plantas con un alto contenido en antioxidantes naturales, como son los compuestos fenólicos; en donde, están ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuyo consumo se ha asociado con una disminución en la aparición de enfermedades, entre otros beneficios. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias con estructuras químicas y actividades metabólicas diferentes, como es el caso de estudios realizados en extractos de *Solanum elaeagnifolium* (Martínez, Mejías, Macías y Sánchez, 2017).

Con base a este contexto, los principios activos de las plantas son una alternativa real y visible para desarrollar nuevas estrategias y ofrecer tratamientos más específicos sobre diversas enfermedades clínicas o encontrar soluciones farmacéuticas o cosméticas más confiables (Martínez, Mejías, Macías y Sánchez, 2017).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Confirmar la relación entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Solanum hirtum*.

Objetivos específicos

Obtener el extracto metanólico de los frutos *S. hirtum*, mediante maceración.

Fraccionar el extracto metanólico obtenido previamente a través de cromatografía al vacío utilizando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, metanol).

Identificar cualitativamente mediante pruebas químicas los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de hexano, diclorometano y metanol.

Determinar la actividad antioxidante de las fracciones de los frutos de *S. hirtum* por medio del método del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en las fracciones obtenidas de los frutos de *S. hirtum* mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de esta investigación, es decir, la profundidad del logro fue confirmar la relación causa-efecto entre la actividad antioxidante y la composición química de los extractos de *Solanum hirtum* por medio del método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y pruebas químicas de coloración y/o precipitación, así como la cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones de *Solanum hirtum*.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones de esta investigación son variadas, entre las cuales destacan:

- Cuarentena debido a la pandemia ocasionada por el Covid-19.
- Costos elevados de materiales y reactivos para la realización de la tesis.
- Problemas eléctricos (cortes de luz) y de internet.
- Falta de transporte debido a la escasez de gasolina.
- Dificultad para la recolección del material vegetal.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Akanitapichat y Sethabouppha (2019), realizaron un trabajo Intitulado Actividades antioxidantes y citoprotectoras *in vitro* de los extractos de cuatro frutos de *Solanum*, el objetivo fue evaluar las actividades antioxidantes *in vitro*, el contenido total de fenoles, flavonoides y el potencial citoprotector contra el estrés oxidativo inducido por el hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH) en una célula hepática humana, HepG2, de cuatro frutos comestibles de *Solanum* (*S. sanitwongsei*, *S. stramonifolium*, *S. torvum*, *S. xanthocarpum*). Se evaluaron las actividades antioxidantes *in vitro* para determinar la capacidad de barrido de radicales 2,2-difenil-1-picril-hidracil (DPPH) y ácido 2,2' azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS): y el poder de reducción. El contenido total de fenoles y flavonoides se determinó mediante los métodos colorimétricos de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio, respectivamente. Para evaluar el efecto citoprotector, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Los extractos metanólicos de los frutos de las cuatro especies de *Solanum* evaluadas mostraron actividades antioxidantes. El contenido total de fenoles y flavonoides estuvo en el rango de 1031,23 ± 11,87 a 4474,36 ± 23,74 miligramos de ácido gálico equivalente por cien gramos de muestra (mg GAE/100 g de extracto) y 1283,04 ± 12,61 a 2984,98 ± 10,21 miligramos de catequina equivalente por cien gramos de muestra (mg CE/100 g de extracto), respectivamente. Los extractos de los frutos de *S.*

stramonifolium, *S. torvum* y *S. sanitwongsei* tuvieron un potencial antioxidante y efectos citoprotectores contra el *t*-BuOOH en la célula hepática humana. Podrían considerarse fuentes potenciales de antioxidantes naturales y podrían utilizarse en aplicaciones farmacéuticas para tratar enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Kristina, Henderson, Djohan, Lister, Girsang y Fachrial (2019), publicaron una investigación Intitulada Actividad antioxidante y anticologenasa del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y licopeno. El análisis fitoquímico mostró que el extracto de *Solanum lycopersicum* L. (LES) tiene flavonoides, fenoles, saponinas, taninos y alcaloides. El licopeno ($79,45 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$) tiene una actividad antioxidante mejor que el LES ($147,20 \pm 16,97 \mu\text{g/mL}$) de la actividad de barrido de DPPH. El licopeno ($85,09 \pm 1,81 \mu\text{g/mL}$) también tiene la mayor actividad antienviejecimiento que el LES ($236,74 \pm 9,74 \mu\text{g/mL}$), particularmente como inhibidor de la colagenasa. En conclusión, el licopeno tiene una mayor actividad antioxidante a través de la actividad de eliminación de DPPH y la actividad antienviejecimiento, particularmente como un inhibidor de la colagenasa.

Eletta, Orimolade, Oluwaniyi y Dosumu (2017), publicaron un trabajo Intitulado Evaluación de las actividades proximales y antioxidante de la berenjena etíope (*Solanum aethiopicum* L) y la berenjena Gboma (*Solanum macrocarpon* L). Se estudió la composición nutricional, la selección fitoquímica y la actividad antioxidante de *S. aethiopicum* y *S. macrocarpum*. Los contenidos de humedad, proteína bruta, grasa bruta y fibra bruta fueron $91,20 \pm 0,34 \%$; $1,07 \pm 0,01 \%$; $0,38 \pm 0,03 \%$ y $2,44 \pm 0,04 \%$ respectivamente para *S. aethiopicum*. Por otra parte, *S. macrocarpum* presentó $92,00 \pm 0,43 \%$; $0,52 \pm 0,02 \%$; $0,15 \pm 0,02 \%$ y $2,50 \pm 0,02 \%$. Los resultados revelaron que la especie *S. aethiopicum* tiene mayores valores

nutricionales que la especie *S. macrocarpum*. El análisis fitoquímico determinó la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, terpenoides y glucósidos cardíacos en ambas especies en diferentes concentraciones. Los extractos de *S. macrocarpum* tienen actividad antioxidante con un valor de concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 33,56 $\mu\text{g/mL}$ mientras que los extractos etanólicos de *S. aethiopicum* tuvieron una IC_{50} de 38,92 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados experimentales han revelado que las dos especies de berenjena africana son valiosas desde el punto de vista nutricional y terapéutico, y que pueden desarrollarse como alimentos funcionales con beneficios tanto nutricionales como medicinales para los consumidores.

Antecedentes Históricos

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos de hecho, han sido utilizadas desde tiempos remotos con fines curativos, ya que uno de los anhelos de los seres humanos ha sido siempre intentar combatir sus enfermedades. Para ello, han hecho uso de organismos y productos que la naturaleza ofrece. Los usos particulares se han transmitido en forma oral o escrita y de generación en generación a lo largo de la historia, hasta nuestros días. A partir de la década de 1940 el desarrollo económico de las plantas medicinales se ha caracterizado en todo el mundo, por la identificación, la selección y el procesamiento de recursos vegetales para la elaboración de fármacos (González y Morales, 2005).

A finales del siglo XIX y a principios del siglo XX, extensos estudios, fueron dedicados a las aplicaciones de antioxidantes en importantes procesos industriales, tales como la prevención de la corrosión del metal, la

vulcanización del caucho, y la polimerización de combustibles en la formación de escoria en motores de combustión interna (Robert, 1996).

Los antioxidantes fueron comunes en la industria química y de alimentos durante los siglos XIX y XX. En la industria química se habían estudiado los antioxidantes, un grupo de compuestos caracterizados por su capacidad de oxidarse en lugar de otras sustancias presentes en el medio de reacción. Su uso varió, pasando de aditivos en la vulcanización del caucho hasta conservantes de alimentos. 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 (Cameron y Pauling, 1978).

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, intentando entender sus mecanismos y blancos moleculares (Willett y Macmahon, 1984).

En cuanto los hallazgos se difundían, el mercado crecía. Para los años 90 el uso de los antioxidantes se había popularizado en los Estados Unidos de América, de tal manera que la mitad de la población consumía suplementos dietarios, un tercio tomaba multivitamínicos y alrededor de una octava parte de la población consumía periódicamente suplementos de vitaminas E y C (Radimer, 2004).

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74 % fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional. Esto nos brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente

de materia prima más económica y natural: las Plantas medicinales (Meckes, Torres, Calzada, Rivera, Camorlinga y Lemus, 1997).

Bases Teóricas

Familia Solanaceae

La familia Solanaceae consta de 98 géneros y cerca de 2700 especies, incluye plantas con gran representatividad e importancia entre las Angiospermas (Spooner, Anderson y Jansen, 1993). Se distribuye en todos los continentes excepto en la Antártida, aunque la mayor parte de la diversidad de especies se produce en América Central y del Sur, y otras áreas de diversidad incluyen Australia y África (Solanaceae Source, 2012).

Aspectos botánicos

En general las especies de la familia Solanaceae se caracterizan por ser hierbas, arbustos, lianas o pequeños árboles, a menudo ramificados simpódicamente, con diversos tipos de pelos estrellados, ramificados o espinosos, pueden ser anuales, bienales o perennes, erguidas o decumbentes. En tal sentido a continuación se detallan algunos aspectos botánicos (Niño, Correa, Cardona y Mosquera, 2011):

- **Tallos:** Los tallos pueden estar provistos de tubérculos subterráneos. No presentan laticíferos, ni látex, ni jugos coloreados. Pueden presentar una agregación basal o terminal de hojas o pueden no tener ninguno de ambos tipos.

- **Flores:** Las flores son en general hermafroditas, Las flores en la gran mayoría de los casos presentan un perianto diferenciado en cáliz y corola (con 5 sépalos y 5 pétalos, respectivamente).
- **Cáliz:** El cáliz es gamosépalo (ya que los sépalos están unidos entre sí formando un tubo), con los 5 (a veces 4 o 6) segmentos iguales entre sí, es pentalobulado, con los lóbulos más cortos que el tubo, es persistente y puede muy a menudo ser acrescente.
- **Corola:** La corola usualmente presenta 5 pétalos que también se hallan unidos entre sí formando un tubo.
- **Androceo:** El androceo presenta 5 estambres (raramente 2, 4 o 6), libres entre sí, opositisépalos (es decir, alternan con los pétalos), son usualmente fértiles.
- **Anteras:** pueden ser conniventes, tocándose en su extremo superior formando un anillo, o totalmente libres.
- **Gineceo:** El gineceo es bi-carpelar (raramente 3- o 5-locular), de ovario súpero y presenta dos lóculos. Los lóculos pueden estar secundariamente divididos por falsos septos. Cada lóculo lleva de 1 a 50 óvulos anátropos o hemianátropos de placentación axilar.
- **Fruto:** El fruto en las solanáceas puede ser una baya (como en el caso de *Solanum*), una drupa, o una cápsula. Las cápsulas son normalmente septicidas o, raramente, loculicidas o valvares.

- **Semillas:** Las semillas son usualmente endospermadas, oleosas (raramente almidonosas), sin pelos conspicuos. El embrión, que puede ser recto a curvo, presenta dos cotiledones.

Distribución geográfica de las Solanáceas

A pesar que las solanáceas se encuentran en todos los continentes, la mayor riqueza de especies se distribuye en América Central y América del Sur. Otros dos centros de diversidad incluyen Australia y África. Las solanáceas pueden ocupar una gran variedad de ecosistemas, desde los desiertos hasta los bosques tropicales y frecuentemente se las halla también en la vegetación secundaria que coloniza áreas disturbadas, a continuación, se presenta la clasificación taxonómica de la familia Solanaceae (Niño y cols., 2011):

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Asteridae
- **Orden:** Solanales
- **Familia:** Solanaceae
- **Subfamilias:** Cestroideae, Solanoideae, Nicotianoidea, Petunoideae, Schizanthoideae

Metabolitos secundarios de las Solanáceas

En cuanto a sus particularidades fitoquímicas, muchas de las especies de la familia Solanaceae son ricas en principios activos, como alcaloides, sobre todo del grupo de los tropanos y alcaloides esteroidales o glucósidos, adicionalmente se han aislado saponinas (Lucchetti, 2001).

Se ha determinado la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides, esteroides, taninos, triterpenos, saponinas y sapogeninas, que han sido trabajados para estudiarlos a nivel experimental e identificar sus posibles actividades frente a bacterias, hongos, insectos o células (Niño y cols., 2011).

Los alcaloides se encuentran en las raíces, en los tallos, hojas, frutos y semillas, aunque su distribución no es la misma en todos estos vegetales. Por lo regular, son principios tóxicos, estupefactivos o alucinantes. Las solanáceas contienen asimismo diversos glucósidos, pero de mucho menor importancia; grasas, no pocos ácidos orgánicos, materias tánicas (Font, 1999). También es notable que esta familia contiene en la mayoría de sus órganos, alcaloides como la nicotina, la atropina y la solanina; además de ciertos esteroides conocidos como glicoalcaloides, usados como precursores de hormonas (Sierra, Siqueiros, Flores, Moreno y Arredondo, 2015).

Usos etnobotánicos

Estas plantas en general se han utilizado de múltiples formas, entre ellas como te, infusión, ungüento e inclusive se fuman las hojas, aunque como ya se señaló son tóxicas y varias de ellas pueden llegar a causar la muerte; son ricas en alcaloides y sus diferentes géneros botánicos, los poseen de tipo tropánico, como la hiosciamina, la escopolamina y la atropina (Guzmán y Cazáres, 2008).

Además destaca la importancia comercial y económica a nivel mundial del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), así como las especies de esta familia que han sido base para la alimentación del hombre como la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y el chile o ají (*Capsicum annuum* L.) y otras de amplia tradición de uso en prácticas europeas de “brujería “ y denominadas por Dioscórides “tenebrosas” por su gran toxicidad como el beleño negro (*Hyoscyamus albus*), la mandrágora

(*Mandragora autumnalis*), la belladona (*Atropa belladonna*), y el estramonio (*Datura estramonium*) (Font, 1999).

Aspectos farmacológicos

Los derivados tropánicos presentes en la familia de las Solanáceas son utilizados por la industria farmacéutica, de especies de *Datura*, *Hyoscyamus* y *Duboisia* se extrajeron alcaloides como atropina (hiosciamina) e hioscina (escopolamina). A partir de atropina se obtiene el metilbromuro de octatropina, una sal de amonio cuaternario que se ha utilizado como antiespasmódico y anti secretor gástrico. El ipratropio es particularmente útil en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) al inhibir el espasmo bronquial. Se obtiene por hemisíntesis a partir de la noratropina mediante sucesivas isopropil y metil alquilaciones (Osorio, 2009).

Así mismo, y a partir de la escopolamina se ha obtenido por semisíntesis el tiotropio, fármaco anticolinérgico de larga duración debido a la presencia de dos grupos tiofuránicos que, administrado por vía inhalatoria, carece de efectos centrales y evita la bronca constricción en EPOC. También a partir de escopolamina se obtienen dos derivados semisintéticos, el bromuro de butilescopolamina y el bromuro de metilescopolamina, ambos utilizados como antiespasmódicos (Osorio, 2009). Los alcaloides esteroideos presentan diversas actividades biológicas que incluyen su acción antimicrobiana y antimalárica entre otras (Martínez, 2002).

Género *Solanum*

Solanum es uno de los géneros más grandes de Angiospermas, con cerca de 1500 especies, distribuidas en los trópicos, subtrópicos y en las regiones templadas de ambos hemisferios. La más alta concentración de especies se encuentra en los Andes y en el Sur Este de Brasil. Las especies

crecen preferiblemente en bosques húmedos tropicales, taxonómicamente se divide de la siguiente manera (Orozco y Beltrán, Porras y Nee, 2008):

- **Familia:** Solanaceae
- **Subfamilia:** Solanoideae
- **Género:** *Solanum*
- **Subgéneros:** *Solanum*, *Bassovia* y *Leptostemonum*

Desde el punto de vista botánico las especies que constituyen este género se caracterizan por ser herbáceas y arbustivas, penrennes y anuales, con las siguientes características (Ancco, 2003):

- **Tallos:** herbáceos con ramificaciones.
- **Hojas:** generalmente alternas, sin estipulas.
- **Inflorescencias:** cimosas.
- **Flores:** hermafroditas, actinomorfas, generalmente violáceas, blancas y amarillas.
- **Cáliz:** acampanado o extendido, 5-dentado, raras 4 ó 6 divisiones, a veces entero.
- **Corola:** rotácea; tubo muy corto; limbo extendido, plegado o anguloso con e igual número de dientes que el cáliz.
- **Estambres:** son exertos, insertos en la garganta del tubo corolino, número de 5 estambres, filamentos cortos; anteras dispuestas en un cono, libres, dehiscencia por un poro apical.
- **Gineceo:** Ovario súpero, bilocular; estilo simple; estigma obtuso, bilobulado o entero.
- **Fruto:** en baya bilocular.
- **Semillas:** numerosas.

Composición química del género *Solanum*

Varias especies del género se conocen por su uso ornamental pero también por el contenido de compuestos químicos, como alcaloides, saponinas esteroideas, esteroides, taninos, flavonoides, cumarinas y vitamina D (Coy, Cuca y Orozco, 2006). Seguidamente se mencionan algunos de estos compuestos:

- **Alcaloides:** son un tipo de metabolitos secundarios, es decir, compuestos químicos sintetizados por las plantas que no son esenciales para su metabolismo (Seijo, 2017) en su mayoría poseen un esqueleto de 27 carbonos y pueden dividirse en 4 núcleos: Solanidina (**1**), Solacongestidina (**2**), Solanocapsina (**3**) y Jurubidina (**4**) (Figura 1) (Cerney y Sorn, 1967).

www.bdigital.ula.ve

Figura 1. Estructuras químicas de algunos núcleos alcaloidales del género *Solanum*

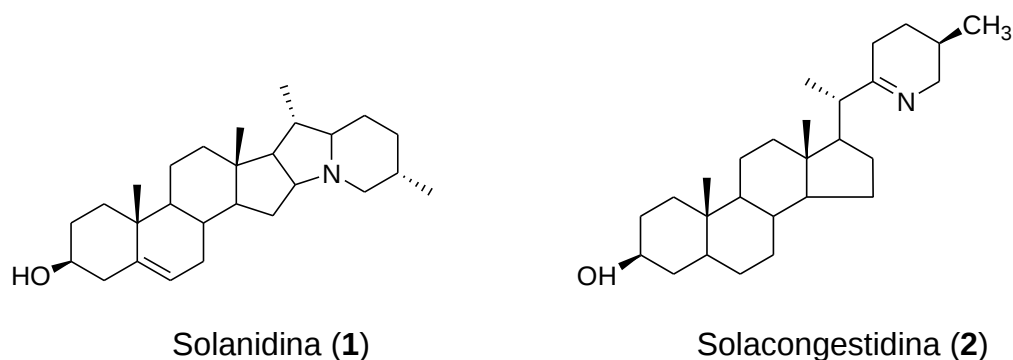
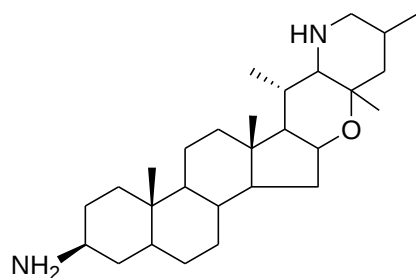
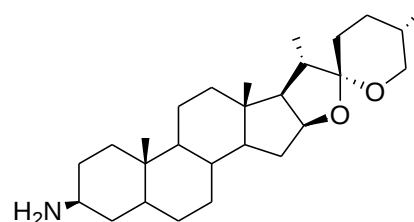


Figura 1. Estructuras químicas de algunos núcleos alcaloides del género *Solanum* (Continuación)



Solanocapcina (3)



Jurubidina (4)

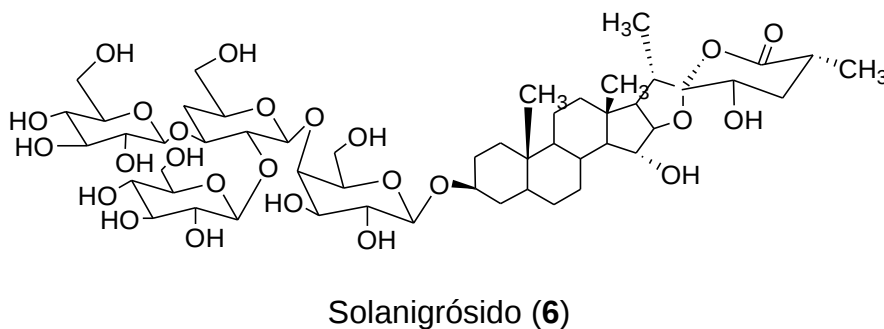
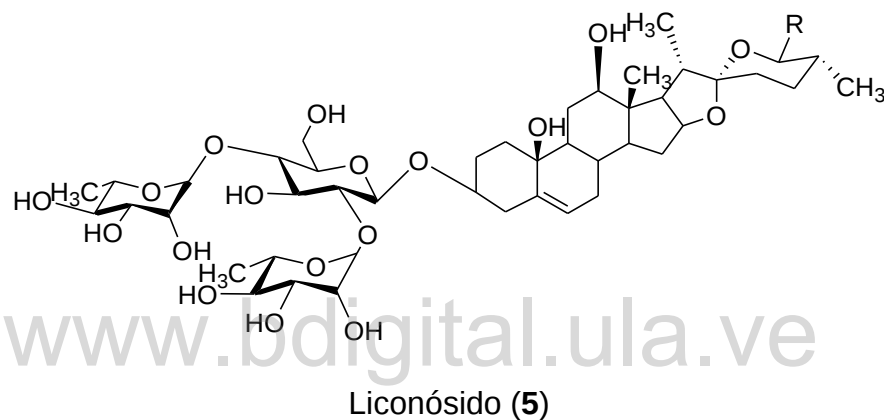
Tomada y modificada de Cerney y Sorn, 1967.

- **Saponinas:** el género *Solanum* se caracteriza químicamente por la presencia de saponinas esteroidales básicas y neutras, que justifican el uso de algunas especies como detergentes y la existencia de nombres vernáculos como “jaboncillo”. Por lo general, predominan fuertemente las saponinas básicas, o alcaloides esteroidales glicósilicos, que son glicósidos de diversas agliconas entre las cuales la más importante desde el punto de vista industrial es la solasodina (Morales y Urzúa, 1972).

Éstas son de importancia farmacéutica, porque se utilizan como materia prima para la producción de medicamentos esteroidales. Los extractos naturales estandarizados ricos en sapogeninas tienen muchas aplicaciones en varios sectores de la industria. En farmacéutica los mayores usos de estos productos están en la síntesis de hormonas, drogas para el tratamiento contra el cáncer y el alzhéimer, control del colesterol e investigación de vacunas humanas

(herpes y HIV), entre otros (Flechas, Sánchez y Silva, 2008). Estudios reportan saponinas esteroidales en especies del género *Solanum* entre ellos se encuentra el liconósido (5) y solanigrósido (6) (Figura 2) (Cardona, 2011).

Figura 2. Estructura química de algunas saponinas del género *Solanum*

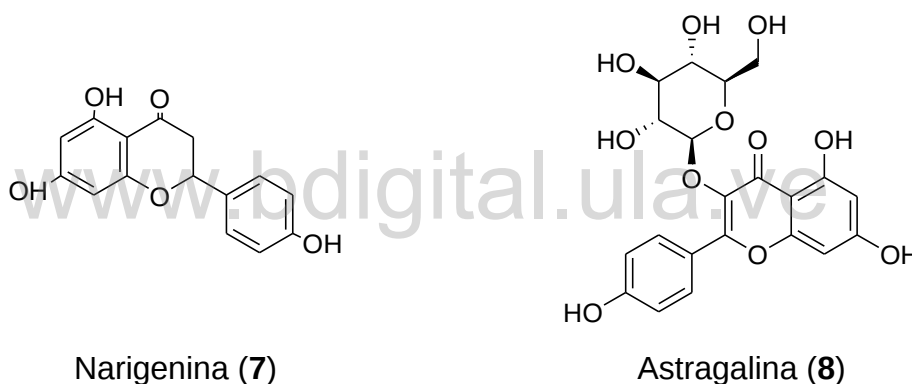


Tomada y modificada de Cardona, 2011.

- **Flavonoides:** los flavonoides en las plantas son involucrados en una variedad de procesos orgánicos, tal como protección de las mismas contra el efecto de los rayos ultravioleta y visible; protección contra insectos, hongos, bacterias y virus; atracción de los animales de la

polinización; Ellos tienen actividad antioxidante; controlar la acción de las hormonas vegetales; ellos son agentes alelopáticos y enzimas de inhibición, son de ruta biosintéticamente mezcla, en la que una parte del esqueleto flavonoídico se deriva del ácido shikímico y otro acetil CoA. Junto con los procesos oxidativo, se originan diferentes clases de flavonoides entre los cuales podemos mencionar: La narigenina (7) y astragalina (8) (Figura 3) (Flechas y cols., 2008).

Figura 3. Estructura química de algunos flavonoides del género *Solanum*



Tomada y modificada de Flechas y cols., 2008.

Actividades farmacológicas del género *Solanum*

Algunas especies del género *Solanum* son utilizadas para el tratamiento de una gran variedad de aplicaciones medicinales: antimaláricas, anticonceptivas, antimicrobianas, enfermedades cardíacas y enfermedades sexuales, a continuación en la Tabla 1 se presentan algunas de estas actividades (Coy y cols., 2006).

Tabla 1. Algunas actividades farmacológicas del género <i>Solanum</i>		
Especies	Actividades Farmacológicas	Referencias
<i>S. nigrum</i>	Antiséptico, expectorante, Cardiotónico, digestivo diaforético y sedativo. Se considera un potente antiinflamatorio	Chang, García, Rosalbal, Espinosa y Ramos (2013)
<i>S. tuberosum</i>	Actividad antioxidante	Saikhani, Howard y Miller (1995)
<i>S. lycopersicum</i>	Aplicación dermatológica como hidratante y antifúngico	Esponda y Hernández (2011)
<i>S. mammosum</i>	Tratamiento de pie de atleta y	Esponda y Hernández
<i>S. torvum</i>	Demucante, antiácido, antiinflamatorio, antipruriginoso	Esponda y Hernández (2011)
<i>S. incanum</i>	Infecciones micóticas cutáneas patológicas	Beaman y Muhammed (1976)
<i>S. surattense</i>	Actividad antibacteriana y antioxidante	Thirumalai, Therasa y Elumalai (2012)
<i>S. lycocarpum</i>	Tratamiento de la diabetes, esteroides anabolizantes, anticonceptivos y antiinflamatorios	Aguilar (2005)
<i>S. dolichosepalum</i>	Actividad antimicrobiana y antioxidante	Ramírez, Isaza y Pérez (2013)
<i>S. quitoense</i>	Propiedades antioxidantes	Moreno, Andrade, Cocellon y Díaz (2013)

***Solanum hirtum* Vahl**

Solanum hirtum (Figura 4) es un arbusto pequeño, muy espinoso y de frutos pequeños que crece en los potreros a libre exposición solar, Es de amplia distribución a nivel mundial, puede alcanzar 2 metros de alto, presenta aguijones fuertes en tallo y hojas, sus frutos son bayas de pulpa seca y aunque son venenosos tienen diferentes usos medicinales (Ordoñez, Gómez, Ordoñez y Lagos, 2012). Taxonómicamente se divide la siguiente manera:

- **Reino:** Plantae
- **Phylum:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Solanales
- **Familia:** Solanaceae
- **Género:** *Solanum*
- **Especie:** *hirtum*
- **Autor:** Valh (Salinas, 2012)

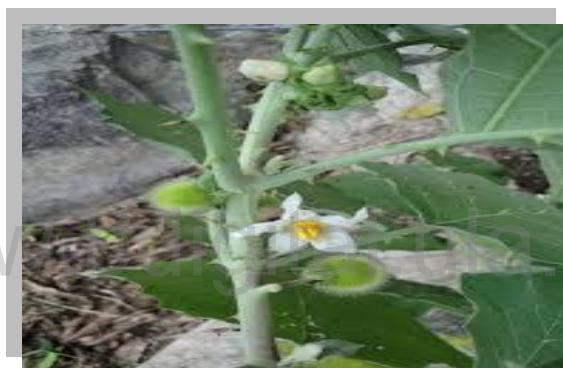
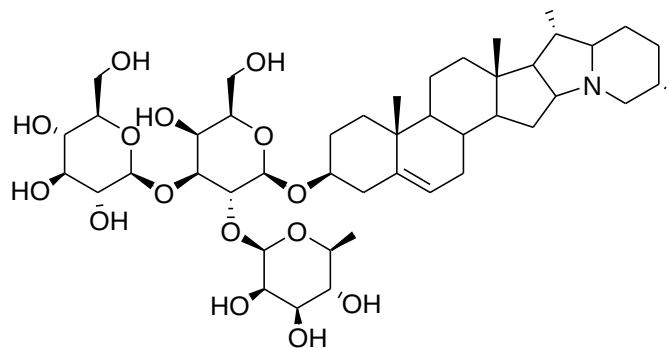


Figura 4. *Solanum hirtum*
(Ordoñez y cols., 2012)

Composición química de *Solanum hirtum*

La presencia de diversos metabolitos principalmente saponinas, alcaloides, fenoles, taninos, glucósidos cardiotónicos y flavonoides, hacen que el género (*Solanum*) tenga propiedades antiinflamatorias, analgésicas, cicatrizantes para tratar enfermedades bucales y del trato respiratorio; y represente una alternativa para su uso medicinal (Ancona, Valencia, García, Chin y Luna, 2015). También contiene compuestos tóxicos como solanina (**9**) que es un tipo de glicoalcaloide y solanidina (**1**) que es un tipo de alcalina (Salinas, 2012).

Figura 5. Algunos compuestos aislados de *Solanum hirtum*



Solanina (9)

Tomada y modificada de Salinas, 2012.

Actividad farmacológica de *S. hirtum*

La especie *Solanum hirtum* Vahl se caracteriza por presentar diversos usos farmacológicos tradicionales como: dolor de garganta, fogajes, infecciones en boca y garganta, carraspera y paperas (Méndez y cols., 2014). La ingestión del fruto de *S. hirtum* desencadena una fenomenología característica de la intoxicación por solaninas, con dolor abdominal, cefalea, vómitos tardíos, taquicardia, fiebre, sudoración profusa, midriasis, disfagia, trastornos visuales, alucinaciones, parálisis respiratoria y muerte. El grado de toxicidad depende del grado de madurez del fruto (Salinas, 2012).

Productos naturales

Son compuestos formados esencialmente por carbono, obtenidos de fuentes naturales (flora, fauna, tierra) y que generalmente poseen muy diversas e interesantes propiedades. Son metabolitos secundarios; pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a

sobrevivir en un ecosistema particular. Éstos se forman a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los mismos comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Su importancia radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial como estructuras privilegiadas usando el concepto de farmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos. Sin lugar a dudas los productos naturales son estructuras biológicamente validadas a través de la co-evolución con el resto de los seres vivos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Clasificación de productos naturales

A fin de establecer un ordenamiento, estos compuestos se clasificarán teniendo en cuenta: su origen biosintético, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad. Los grandes grupos de metabolitos secundarios a tratar serán (Ringuelet y Viña, 2013):

- **Compuestos nitrogenados y azufrados:** Caracterizados por poseer nitrógeno y/o azufre en su estructura, de solubilidad y origen biosintético diverso, pero mayoritariamente derivados de aminoácidos (Ringuelet y Viña, 2013).

- **Compuestos fenólicos:** Con al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría hidrosolubles y derivados biosintéticamente del ácido shikímico (Ringuelet y Viña, 2013).
- **Terpenoides:** Con la molécula de isopreno como unidad estructural, liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato (Ringuelet y Viña, 2013).
- **Ácido pirúvico:** Dependiendo de la clase de terpenoides en cuestión. Varios compuestos no esenciales considerados metabolitos secundarios distribuidos en plantas y microorganismos, pueden no estar incluidos en estos grupos por no compartir algunas propiedades o características (Ringuelet y Viña, 2013).

Rutas biosintéticas de los productos naturales

Se conocen en la actualidad tres grandes vías o rutas fundamentales que permiten la biosíntesis de la gran mayoría de los diferentes tipos de productos naturales conocidos:

- Ruta del ácido mevalónico: A partir de él se forman unidades de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides) (Avalos y cols., 2009).
- Ruta del ácido shikímico: A partir de él se forman los aminoácidos y desde ellos los otros compuestos aromáticos más complejos (fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides) (Avalos y cols., 2009).
- Ruta del acetato-malato (ruta policétida): A partir de malonato y acetato se forman los policetidos (acetogeninas) y ácidos grasos (Avalos y cols., 2009).

Extractos vegetales

Los extractos vegetales son productos extraídos directamente de los frutos, hojas, semillas o raíces de una planta, los cuales contienen componentes que pueden realizar una función beneficiosa en el organismo cuando se ingieren a través de un alimento un complemento alimenticio, o cuando los aplicamos en la piel mediante un cosmético. También actúan como conservantes y antioxidantes de dichos alimentos y cosméticos (Bonatti, 1991).

Un extracto contiene los componentes activos más importantes del vegetal, de manera muy concentrada. De hecho, en un extracto, la cantidad del compuesto puede ser miles de veces superior a la que se encuentra originariamente en el vegetal (Bonatti, 1991).

Métodos de obtención de extractos vegetales

Los métodos extractivos más empleados son: Maceración: frío o en calor, Lixiviación, Soxhlet y Arrastre por vapor de agua (Bonatti, 1991).

Extracción por maceración: este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción. Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (Bonatti, 1991).

Extracción por lixiviación: en este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente, durante 3 días, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor, (se puede emplear otro solvente o agua) (Walton y Brown, 1999).

Extracción por Soxhlet: este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o día (Luque y Priego, 2010).

Arrastre por vapor: se utiliza principalmente para aceites esenciales. Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticas, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica (Harborne, 1998).

Análisis fitoquímico preliminar

La marcha fitoquímica preliminar se apoya en un tratamiento general de extracción y sucesivas separaciones mediante solventes de diferentes polaridades con el fin de agrupar en fracciones los metabolitos estructuralmente semejantes y poder caracterizarlos por su comportamiento

químico frente a ciertas reacciones químicas estandarizadas (Bilbao, 1997). A continuación, se mencionan algunas pruebas para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios en extractos:

Reconocimiento de alcaloides: en el análisis fitoquímico preliminar las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff), (Bilbao, 1997), en este sentido se realizan las siguientes pruebas:

Prueba de Mayer: Es una reacción de precipitación para la identificación cualitativa de alcaloides totales, la reacción se da en medio ácido al adicionarse el reactivo de Mayer se forma una opalescencia leve (+), una turbidez definida (+) o precipitación abundante (+++) dependiendo de la concentración del alcaloide (Bilbao, 1997)

Prueba de Dragendorff: La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando los alcaloides están en presencia del reactivo en una solución ácida (Bilbao, 1997).

Reconocimiento de compuestos fenólicos: químicamente los flavonoides y taninos son polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos, en presencia de cloruro férrico se producen cambios de coloración. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provoca una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo) (Bilbao, 1997), el ensayo para determinar la presencia de estos compuestos es el siguiente:

Prueba de cloruro férrico ($FeCl_3$): el cloruro de hierro (III) actúa como catalizador de reacciones de alquilación de benceno. La “prueba del cloruro

férico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de $\text{FeO}(\text{OH})$. La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la disolución neutra de cloruro: se forma un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol. Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, dependiendo de la coloración (Bilbao, 1997):

- Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul, taninos del tipo pirogalol, derivados del ácido gálico.

Reconocimiento de Taninos: se realiza la prueba de Gelatina-sal, todos los taninos reaccionan con este reactivo, precipitando las proteínas de sus soluciones (Restrepo, 2011).

Reconocimiento de Flavonoides: se realiza la siguiente prueba:

Prueba de Shinoda: los extractos etanólicos que son tratados con un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl generan coloraciones rojizas si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas (flavonoides con el núcleo benzopirona) (Botero, 2011).

Reconocimiento de Terpenos y esteroides: se realiza la siguiente prueba:

Prueba de Lieberman Burchard: Esta es una prueba colorimétrica con la cual se puede determinar colesterol empleando una mezcla ácida compuesta de ácido acético, ácido sulfúrico y anhídrido acético lo que da un color de verde a verde intenso lo cual se debe a que el grupo hidroxilo (OH)

del colesterol reacciona con los reactivos y existe un aumento en la conjugación de la saturación del anillo fusionado, El anillo formado es el precursor de la formación del color. Puesto que este ensayo utiliza anhídrido acético y ácido sulfúrico como reactivos, se debe tener precaución para no recibir quemaduras graves (Bilbao, 1997).

Reconocimiento de Saponinas: se realiza los siguientes ensayos:

Prueba de altura y estabilidad de Espuma: Esta reacción se basa en la formación de una espuma persistente, transcurridos 15 min, la cual tendrá una altura superior a 1cm si la prueba es positiva. Esto se debe a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua, son por lo tanto tenso-activos naturales (Carranza y Huayanay, 2009).

Reconocimiento de Quinonas: Las quinonas tienden a dar colores amarillos, rojos o purpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados. La reacción con HCl comprueba la inexistencia de quinonas, al dar nuevamente negativa la reacción en este caso con NaOH (Botero, 2011).

Radicales libres

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen uno o más electrones desapareados lo cual los hace altamente inestables y reactivos. Estos radicales recorren nuestro organismo deseando robar un electrón de las moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica por medio de reacciones de óxido-reducción (Avello y Suwalsky, 2006).

Una vez que el RL ha conseguido robar el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede se convierte a

su vez en un nuevo RL, por quedar con un electrón desapareado; iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células; estas reacciones en cadena se combate con la acción de los antioxidantes, los cuales neutralizan los átomos de oxígeno. La vida biológica media del RL es de microsegundos; pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un estrés oxidativo que puede conducir a diversas enfermedades, tales como envejecimiento, problemas del sistema cardiovascular (arterosclerosis), problemas en el sistema nervioso, daño genético (mutaciones y cánceres) (Avello y Suwalsky, 2006).

Tipos de radicales libres

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente:

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 éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico (Venereo, 2002).

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 que actúan como radicales son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre (Venereo, 2002).

Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno: 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, los hidroperóxidos orgánicos (Venereo, 2002).

Fuentes de radicales libres

Fuentes endógenas

Mitocondria: El metabolismo oxidativo se da en la mitocondria, conocida como el organelo con mayor importancia dentro de la producción de ATP, molécula indispensable para el organismo porque de ella es liberada la energía necesaria para los diferentes procesos vitales. Es considerada como la principal fuente de radicales libres, ya que al producirse el metabolismo oxidativo se da la reducción tetraelectrónica del oxígeno con un consumo del 95 al 98 % de este elemento (Corrales y Muñoz, 2012).

Fagocitosis: Durante este proceso se producen ERO benéficas, debido a que estas son las primeras líneas de defensa contra los patógenos. Al activarse en las células fagocíticas (leucocitos polimorfonucleares) a través de; los mediadores proinflamatorios, o de la presencia de productos bacterianos, víricos o de parásitos, se da una “explosión” oxidativa en la que se producen gran cantidad de radicales para destruir las células infectadas (Corrales y Muñoz, 2012).

Fuentes exógenas

No obstante, los RL no solamente son formados de manera endógena. Existen otros factores o fuentes que favorecen la formación de los radicales libres, tales como; la exposición a rayos X, al ozono, al tabaco, a contaminantes del aire y productos químicos industriales, además de ciertos medicamentos, que promueven el aumento de producción de ERO (Corrales y Muñoz, 2012).

Estrés oxidativo

El desequilibrio a favor de la acción pro-oxidante es lo que se conoce como el estrés oxidativo. De hecho, el daño oxidativo solamente se produce cuando los mecanismos oxidantes superan la capacidad de los sistemas de defensa. Por lo tanto, la supervivencia de las células aeróbicas precisa de mecanismos que contrarresten los efectos negativos de los RL donde los sistemas antioxidantes permitan mantener un balance favorable entre los productos deletéreos y antioxidantes celulares (San-Miguel y Martín-Gil, 2009).

Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula suficientemente estable como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad para dañar (Villanueva, 2014).

Existen antioxidantes endógenos y exógenos que limitan la actividad y producción de ERO, y mantienen el sistema bajo control. Los sistemas antioxidante endógenos más importantes son las enzimas SOD que transforman el radical superóxido en peróxido de hidrógeno la CAT que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno y la GPX que oxida el glutatión y reduce de esta manera el peróxido de hidrógeno. Como antioxidante exógeno es importante señalar las vitaminas A, C, y E, los polifenoles, la metionina y algunos metales como el zinc, el cobre y el selenio (Viada, Gómez y Campaña, 2017).

En particular, los antioxidantes naturales (hidrosolubles y liposolubles) pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la formación de radicales libres, inhiben la formación de oxígenos libres e inactivan los metales pro-oxidativos. Los radicales libres se forman en el organismo

mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y alcóxilos (Villanueva, 2014).

Clasificación de los antioxidantes

Antioxidantes primarios: son aquellos que previenen la formación de nuevas “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) y las transforman en otras menos perjudiciales antes de que reaccionen. En este grupo se destacan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), ferritina, ceruloplasmina de tipo ferroxidasa y catalasa (Tovar del Rio, 2013).

Antioxidantes secundarios: Capturan los radicales y evitan las reacciones en cadena. Algunos ejemplos de ellos son la vitamina E y C, β -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las que se encuentran el glutatión urato, bilirrubina, ubiquinona, albúmina y ácido úrico (Tovar del Rio, 2013).

Antioxidantes terciarios: Son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas. Se incluyen las enzimas endonucleasa apurinica/apirimidínica y polimerasa β , reparadoras del ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Tovar del Rio, 2013).

Actividad antioxidante

Cada vez son más abundantes los estudios que afirman que varias especies de origen vegetal son capaces de producir gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar, el oxígeno y otros factores; y que pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes (Aguirre y Barreiro, 2015)

Los antioxidantes son entonces, compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar el inicio o la propagación de la

cadena de reacciones de oxidación. Esta actividad antioxidante también se le atribuye a otras especies químicas diferentes a los polifenoles, como lo son las vitaminas, carotenoides, terpenos, alcaloides, flavonoides, lignanos, etc. (Lindenschmidt y cols., 1986).

Métodos para determinar la actividad antioxidante

Existen numerosos métodos para medir la capacidad antioxidante de los compuestos, los que se clasifican en dos categorías: La primera, mide la inhibición de la oxidación en un sistema modelo por monitoreo a los cambios asociados usando medios físicos, químicos o instrumentales. La segunda, involucra a los ensayos captadores de radicales, los cuales incluyen métodos basados en mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno por sus siglas en inglés (HAT) o transferencia de electrones por sus siglas en inglés (ET) (Tabla 2). Los ensayos capacidad de absorber radical oxígeno (ORAC) y parámetro antioxidante que atrapan los radicales totales (TRAP), son los mejores métodos utilizados para medir el HAT. Los ensayos capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y el 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) representan a los métodos basados en ET (Muedas, 2013).

Tabla 2: Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET y HAT.

ENSAYO	CATEGORÍA
• Ácido 2,2'azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS*+). • 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). • Poder de reducción antioxidante del hierro (FRAP) • N, N- dimetil-<i>p</i>-fenilendiamina (DMPB). • Capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC).	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET)
• Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC). • Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP). • Inhibición de la oxidación del ácido linoleico. • Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad (LDL).	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

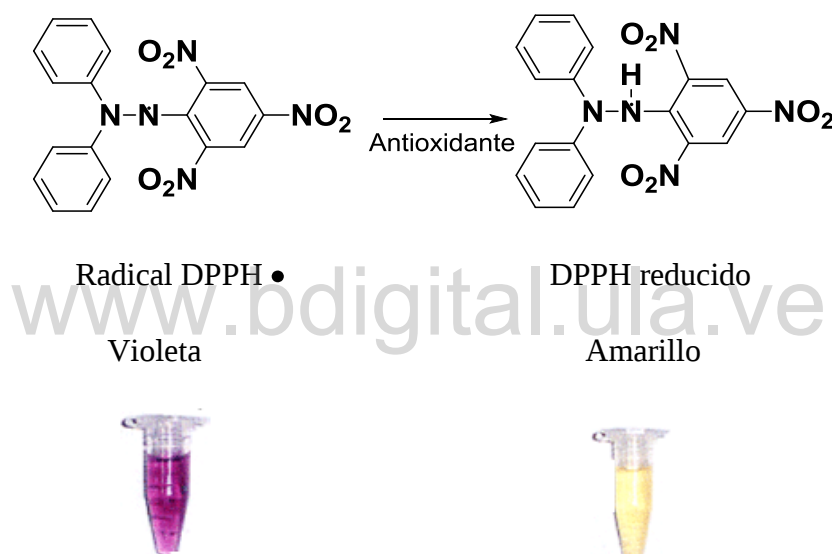
Tomada y modificada de Bohórquez, 2016

Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

El método DPPH consiste en la neutralización del radical libre fue planteado por Brand-Williams (1995) 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Este método es empleado para sustancias liposolubles o hidrosolubles. La solución del reactivo de DPPH es de color violeta y con una absorción de 517 nm. La reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante) por el radical libre DPPH, desarrollando un cambio

del color violeta a amarillo, al disminuir la concentración del radical libre (Figura 6). El grado de este descoloramiento indica la habilidad del antioxidante de secuestrar al radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de treinta minutos a una hora de reacción (Mensor, Menezes, Leitaó, Reis, Dos santos, Coube y Leitaó, 2001).

Figura 6. Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH).



Tomada y modificad de Molyneux, 2004

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ácido 2,2', azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS):

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $ABTS^{•+}$, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ($ABTS^{•+}$) es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Pellegrini, 1999).

La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada caso y que proporciona rápidamente los resultados más reproducibles empleando un equipo de laboratorio relativamente común como es el espectrofotómetro, ampliamente utilizado. Además, como la longitud de onda a la que se realizan las medidas de absorbancia no es común en los alimentos, hace que este método sea particularmente interesante para el estudio de extractos vegetales ya que elimina la posibilidad de interferencias de color (Pellegrini, 1999).

Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power o capacidad para reducir el hierro ferrico):

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro ferrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm. Este ensayo se llevó a cabo en un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contiene TPTZ y FeCl_3 , se utilizan 900 μL de ésta solución, 50 μL de muestra y 50 μL de agua destilada, Luego de 60 minutos de reacción se determina la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm, Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores. La curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón primario Las actividades de las muestras se expresaron como AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity: mg de ácido ascórbico/100 g extracto) (Benzie y Strain, 1996).

Ensayo ORAC (Oxygen radical absorbance capacity o capacidad de absorción de radicales de oxígeno):

El procedimiento experimental está basado en emplear Trolox como estándar y condiciones controladas de temperatura a 37° C y pH 7,4. Las lecturas se realizan a una λ de excitación de 493 nm y slit de excitación 5, λ de emisión 515 nm y slit de emisión 13, con atenuador del 1 % y sin placa atenuadora, Para el desarrollo de la técnica, se utilizan soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75 mM) AAPH 0,6 M en PBS (75 mM), La muestra contiene 21 μ L de fluoresceína, 2,899 μ L de PBS, 30 μ L del extracto ensayado y 50 μ L de AAPH. Como referencia se usó Trolox, El efecto protector del antioxidante es calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, y se compara contra la curva del Trolox, y expresa en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μ mol Tx/g muestra) (Ou y cols., 2001).

Compuestos Fenólicos

Poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captore de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero (Skerget y cols., 2005).

Constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal. Establecen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Estos compuestos

tradicionalmente han sido considerados como anti nutrientes, debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios, los taninos, sobre la digestibilidad de la proteína. Sin embargo, actualmente se ha despertado un reciente interés por estos compuestos debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como en el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedad cardiovascular y otras patologías de carácter inflamatorio (Martínez, Valverde, Periago y Gaspar, 2000).

Clasificación de los fenoles

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional (Harborne, 1998):

Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos: dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, *p*-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario, existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales (Belitz y Grosch, 1988).

Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles: los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se haya presente en forma de derivados. Así, por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido quínico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico vegetales (Belitz y Grosch, 1988). Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido (Bravo,

1998). Mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio (Belitz y Grosch, 1988).

Lignan y **neolignan**: son metabolitos de las plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxi fenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano (Chesson y cols, 1997).

Taninos: los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 Y 3000 D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100 D), siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas (Chung, 1998).

Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidroxidifenico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos dan glucosa y ácido gálico (Chung, 1998).

Flavonoides: los flavonoides (Figura 7) constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos (Harborne, 1998), siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavanoles (**10**), flavonas (**11**), flavanonas (**12**), flavonoles (**13**), isoflavonas (**14**), antocianidinas (**15**), catequinas, calconas, dihidrocalconas, leucoantocianidinas o flavandiol y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (quercitina, mirecitina y kaempferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales (Hertog, Hollman y Van de Putte, 1993).

Figura 7. Estructuras básicas de los Flavonoides

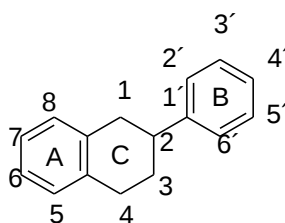
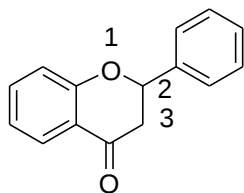
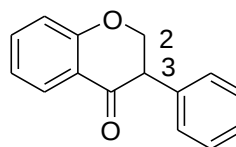


Figura 7. Estructuras básicas de los Flavonoides

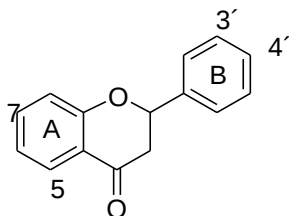
(Continuación)



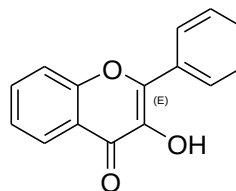
Flavanoles (10)



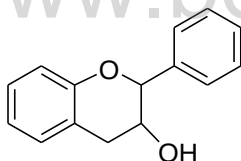
Flavonas (11)



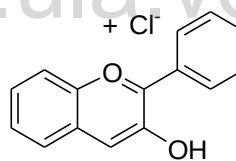
Flavanonas (12)



Flavonoles (13)



Isoflavonas (14)



Antocianidinas (15)

Tomado y modificado de Hertog, Hollman y Van de Putte, 1993

Determinación del contenido de fenoles totales

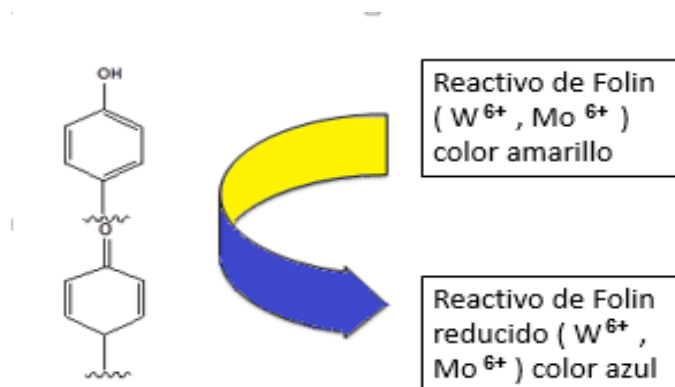
La determinación de contenido de fenoles totales se realizó mediante el método de espectrofotometría de Folin-Ciocalteu, para lo cual se usó ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia (Carpio y Figueroa, 2017).

El ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada

espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de walframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotungstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la medimos para evaluar el contenido de polifenoles (Gómez, 2014).

La oxidación de todos los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (figura 8). Se trata de un método preciso y sensible que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (Gómez, 2014).

Figura 8: Determinación de compuestos fenólicos Método Folin- Ciocalteau.



Tomado y modificado de Gómez, 2014.

Definición operacional de términos

Principio Activo: componente responsable de las propiedades farmacológicas o tóxicas de una sustancia (Real Academia Española, 2020).

Medicina Tradicional: es el conjunto de prácticas, creencias y conocimientos sanitarios basados en el uso de recursos naturales (plantas, animales o minerales), terapias espirituales y técnicas manuales que buscan mantener la salud individual y comunitaria (Elias y Delgado, 2012).

Absorbancia: medida de atenuación de una radiación al atravesar una sustancia, que se expresa como el logaritmo de la relación entre la intensidad saliente y la entrante (Real Academia Española, 2020).

Estudios de Etnobotánica: estudia la relación existente entre grupos humanos con el entorno vegetal, así como el aprovechamiento que el ser humano da a este recurso renovable (Romero, Vera, Calderón, Sabando, Moreira y Bravo, 2019).

Macerar: mantener sumergida alguna sustancia sólida en un líquido a la temperatura ambiente, con el fin de ablandarla o de extraer de ellas las partes solubles (Real Academia Española, 2020).

Concentración de extractos: consiste en la evaporación del solvente empleado en la extracción de principios activos de la planta, mediante el equipo rotavapor que concentra con parámetros como: temperatura, movimiento y presión (Marcano y Hasegawa, 2002).

Metabolitos bioactivos: son aquellos compuestos que abarcan los metabolitos primarios los cuales están involucrados de forma directa en el crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta (aminoácidos, carbohidratos, lípidos y 60 ácidos nucleicos) y metabolitos secundarios que son compuestos químicos sintetizados a partir del metabolismo primario (fenoles, terpenos y alcaloides) (Arratea y Mamani, 2017).

Operacionalización de las variables

Las variables se operacionalizan con la finalidad de transformar los conceptos abstractos en empíricos, en consecuencia, se podrán medir a través de los indicadores respectivos. En tal sentido, se operacionalizaron las variables dependientes como la actividad antioxidante de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 3) y cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 4). Por otra parte, la variable independiente fue definida como la composición química de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 5).

Tabla 3. Operacionalización de la variable Dependiente: Actividad antioxidante de los extractos de *S. hirtum*

Variable	Tipo	Definición conceptual
Actividad antioxidante de los extractos de <i>S. hirtum</i>	Dependiente y cuantitativa	Capacidad de una sustancia de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Pastene, 2009)
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	Metabolitos secundarios captadores de radicales libres	% de DPPH Inhibido Mayor a 50 %

Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021).

Tabla 4. Operacionalización de la variable Dependiente: Cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *S. hirtum*

Variable	Tipo	Definición conceptual
Cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos de <i>S. hirtum</i>	Dependiente y cuantitativa	Capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes (Gutiérrez, Ortiz y Mendoza, 2008)
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de Folin-Ciocalteu	Metabolitos secundarios que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxilos	Formación de complejos coloreados de color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula

Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021)

Tabla 5. Operacionalización de la variable Independiente: Composición química de los extractos de *S. hirtum*

Variable	Tipo	Definición conceptual
Composición química de los extractos de <i>S. hirtum</i>	Independiente y cualitativa	Metabolitos secundarios presentes en un extracto (Marcano y Hasewaga, 2000)
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Pruebas químicas preliminares cualitativos de coloración y/o precipitación	Alcaloides	Aparición de turbidez y un precipitado
	Fenoles	Formación de una coloración que varía de verde azul
	Flavonoides	Coloración naranja o violeta se considera prueba positiva
	Triterpenos/Esteroles	Coloración roja o verde se considera prueba positiva
	Cumarinas	Fluorescencia azul-violeta
	Saponinas	Espuma persistente
	Quinonas	Coloración Rojo cereza
	Taninos	Precipitado

Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021).

Hipótesis

Estudios previos reportan que varias especies del género *Solanum* contienen metabolitos secundarios de interés biológico, por lo cual se presume que el extracto metanólico y las fracciones obtenidas de los frutos *Solanum hirtum* posean actividad antioxidante.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Particularmente, la investigación de tipo confirmatoria se lleva a cabo cuando ya existen investigaciones previas de carácter exploratorio, descriptivo y explicativo, y a la vez, se puede predecir el efecto a partir de la causa o inferir la causa a partir del efecto. Por lo tanto, esta investigación es de tipo confirmatorio, ya que se estableció la relación de causa-efecto entre los componentes químicos de los extractos de *Solanum hirtum* y su actividad antioxidante.

Diseño de investigación

Según Hurtado (2010), el diseño de la investigación se refiere a las estrategias que se implementarán para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. En ese sentido, el diseño de la presente investigación es de tipo experimental, porque la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos, para observar los efectos o reacciones que se producían en la variable dependiente. El diseño de investigación experimental es netamente explicativo, por cuanto su propósito es demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron

causados por la variable independiente. Es decir, se pretende establecer con precisión una relación causa-efecto; este estudio se realizó en un lapso de tiempo determinado, por lo tanto, es un tipo de diseño de investigación transversal, porque los datos se recolectan en un solo momento y en un tiempo único (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población es definida por Hernández, Fernández y Baptista (2010) como el conjunto de todos los casos que concuerdan con determinadas especificaciones. Y la muestra, como un subgrupo de la población que debe ser representativo de ésta, del cual se recolectan los datos. La unidad de investigación estará representada por la especie *Solanum hirtum* perteneciente a la familia Solanaceae.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra estuvo integrada por la recolección de 300 gramos de los frutos secos de la especie vegetal *Solanum hirtum*.

Sistema de Variables

Mediante el proceso de Operacionalización de las Variables, se visualizaron las propiedades del objeto que no son cuantificables directamente, son llevadas a expresiones más concretas y directamente medibles (Hurtado, 2010). Según su función las variables estudiadas en la presente investigación se clasifican en:

- **Variables Dependientes:** Actividad antioxidante de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 3) y Cuantificación de compuestos fenólicos de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 4).
- **Variable Independiente:** Composición química de los extractos de *S. hirtum* (Tabla 5).

Instrumento de recolección de datos

Los instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos fueron fotografías y tablas donde se registraron los resultados de la composición química y actividad antioxidante de los extractos estudiados.

Procedimiento de la investigación

- **Recolección del material vegetal:** Los frutos de *Solanum hirtum* fueron recolectados en el Municipio Urdaneta, Sector Quebrada de Cuevas, Estado Trujillo. La planta fue identificada por el Ing. Juan Carmona, adscrito al Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.
- **Preparación de los extractos vegetales:** Para la extracción del material vegetal, los frutos fueron separados de la planta tomando aproximadamente 300 g, luego se secaron a temperatura ambiente durante varios días. Posteriormente, se procedió a triturar los frutos en un mortero para luego preparar el extracto metanólico por maceración, durante 48 horas a temperatura ambiente y separarlo mediante la técnica cromatografía al vacío, utilizando 10 gramos del extracto metanólico en la columna, con tres solventes orgánicos de polaridad

creciente obteniendo las fracciones de hexano (0,27 g), diclorometano (0,24 g) y metanol (5,0 g).

- **Tamizaje fitoquímico:** La identificación de los diferentes metabolitos secundarios de los extractos de *Solanum hirtum*, fue realizada por las siguientes pruebas químicas:
 - **Ensayo de Libermann-Burchard (terpenos y/o esteroides):** en un tubo de ensayo limpio y seco se tomó 1-2 mg del extracto y se agregó por la pared del tubo 1 mL de anhídrido acético y con precaución 1-2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de coloraciones verdes, azules, rojas o violeta indica que la prueba positiva para esteroides y/o triterpenos en la muestra (Bilbao, 1997).
 - **Ensayo de Shinoda (flavonoides):** en un tubo de ensayo se colocó 2 mg del extracto y se adicionaron varias limaduras de magnesio, luego por la pared del tubo se dejó caer lentamente HCl concentrado (37 %). La aparición de colores rojo, naranja, violeta o rosado indica que es prueba presuntiva para la presencia de flavonoides en la muestra (Bilbao, 1997).
 - **Ensayo Dragendorff y Mayer (alcaloides):** en un tubo de ensayo limpio y seco se colocó una pequeña porción del extracto y se le añadió HCl al 10 % suficiente que cubra la muestra, se llevó a baño de maría por 15 min, se dejó enfriar para proceder a filtrar. El filtrado se dividió en dos tubos y se agregó a uno de los tubos dos gotas de reactivo de Dragendorff y al otro tubo reactivo de Mayer,

si se observa turbidez o precipitado en ambos tubos se considera como prueba presuntiva de presencia de alcaloides (Bilbao, 1997).

- **Ensayo de FeCl_3 (compuestos fenólicos):** una porción del extracto se disolvió en etanol y se adicionaron 2 gotas de solución de tricloruro férrico (FeCl_3 al 1 %). La aparición de un color verde, azul o negro es prueba positiva para compuestos fenólicos (Restrepo, 2011).
- **Ensayo de gelatina 1 % (taninos):** en un segundo tubo de ensayo se disolvieron 3 mg de extracto en agua y se agregaron unas gotas de la solución gelatina-sal, si se presenta turbidez o formación de precipitado es prueba presuntiva de la presencia de taninos en la muestra (Restrepo, 2011).
- **Hidróxido de amonio concentrado (quinonas y cumarinas):** a una porción del extracto disuelta en etanol se le adicionó NH_4OH concentrado, la aparición de una coloración roja es indicio de quinonas en la muestra analizada. Posteriormente, se visualizó bajo la luz ultravioleta la visualización de fluorescencia azul indica la presencia de cumarinas (Restrepo, 2011).
- **Prueba de altura y estabilidad de espuma (saponinas):** se colocó en un tubo una pequeña cantidad del extracto y se le adicionó 1 mL de agua. Se agitó vigorosamente durante un minuto. La prueba será positiva si hay prevalencia de espuma durante más de 5 minutos. El resultado fue negativo (Marcano y Hasegawa, 2002).

Actividad Antioxidante

Se han propuesto diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, en general se basan en la capacidad de los antioxidantes para captar radicales libres, sin embargo, el modelo de captura del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), es uno de los más usados, por lo cual se seleccionó para llevar a cabo esta investigación.

El efecto de los extractos sobre el radical DPPH•, fue estimado usando el método experimental descrito por Díaz y cols., (2011); en tal sentido, 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 reposar en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic Genesystm 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 expresó como porcentaje de inhibición (% Inh) 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:

Figura 9. Ecuación para el calculado del Porcentaje de Inhibición (% Inh)

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

ADPPH: absorbancia del DPPH

AM: absorbancia de la muestra

- **Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀):** Aquellas muestras que alcanzaron un % Inh $\geq$ al 50% se les determinó 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. Para ello, 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 una serie de diluciones de las muestras (500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL y 32,25 µg/mL), con las absorbancias obtenidas y la concentración de cada solución ensayada, se obtuvo por regresión lineal una ecuación que nos permitió obtener el CI₅₀. Por ejemplo, $y=mx+b$; $y=50$, $x=CI_{50}$ = expresado en µg/mL. De esta forma se compara la capacidad antioxidante entre el ácido ascórbico y el extracto de la especie vegetal. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Cuantificación de fenoles

La determinación de contenido de fenoles totales se realizó mediante el método de espectrofotometría de Folin-Ciocalteu, para lo cual se usó ácido gálico como el compuesto fenólico de referencia. Se realizó de la siguiente manera:

- Se pesó la fracción metanólica de *S. hirtum* para preparar una solución de 0,5 mg/mL y se disolvió en agua, utilizando un balón volumétrico de 10 mL, luego se tomó 1 mL de la muestra se colocó en un tubo de ensayo y se le agregó 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, 1,5 mL de carbonato de sodio (NaCO₃) al 20 % y se enrazó con agua destilada hasta completar 4 mL. Los tubos se colocaron en

la oscuridad durante una hora para proceder a leer absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Pasado el tiempo se realizó la lectura. El ensayo se hizo por triplicado.

- Se preparó una curva de calibración con ácido gálico a las siguientes concentraciones: 0,5; 10; 20; 30; 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Para determinar el valor del contenido de fenoles totales se procedió a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas, de tal manera que se obtuvo la siguiente ecuación: $y=bx+a$, donde “a” es la intersección y “b” pendiente, para calcular el contenido de fenoles totales se debe reemplazar en el valor correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y en el eje “X” (concentración $\mu\text{g/mL}$). Los resultados fueron expresados en μg Ácido gálico/mg muestra ($\mu\text{g GA/mg}$ muestra).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tamizaje fitoquímico

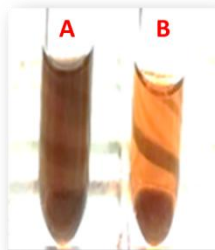
En el tamizaje fitoquímico se identificaron metabolitos secundarios por medio de pruebas colorimétricas y de precipitación. El rendimiento de la fracción de hexano fue muy bajo por lo cual no pudo ser analizado. Con respecto a la fracción de diclorometano se determinó la presencia de esteroides y compuestos fenólicos mientras que la fracción metanólica presentó triterpenos, flavonoides y alcaloides (Tabla 6, Figura 9).

Tabla 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los frutos de *Solanum hirtum*

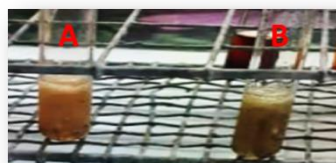
Metabolito	Ensayo	Evidencia	FHSH	FDSH	FMSH
Triterpenos y Esteroides	Liebermann-Burchard	Rojo (Triterpenos) Verde(Esteroides)	ND	Verde +	Rojo +
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	Verde oscuro	ND	+	+
Flavonoides	Shinoda	Rojo	ND	-	+
Cumarinas	NH ₄ OH _{conc}	Fluorescencia	ND	ND	-
Quinonas	NH ₄ OH _{conc}	Rojo	ND	ND	-
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja	N/D	N/D	+
	Mayer				+
Saponinas	Espuma	Espuma persistente	N/D	N/D	-
Taninos	Gelatina	Precipitado blanco	N/D	N/D	-
Leyenda: FHSH: Fracción de hexano de <i>S. hirtum</i> . FDSH: Fracción de diclorometano de <i>S. hirtum</i> . FMSH: Fracción metanol de <i>S. hirtum</i> . N/D: No determinado. (+) Presencia. (-) ausencia					

Figura 10. Resultados del tamizaje fitoquímico de los frutos de *Solanum hirtum*

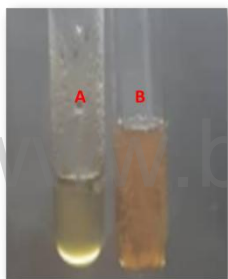
**Ensayo de Libermann-Burchard
(triterpenos y/o esteroides)**



**Ensayo de FeCl_3 (compuestos
fenólicos)**



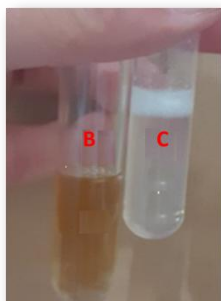
Ensayo de Shinoda (Flavonoides)



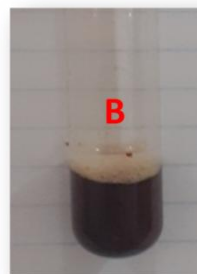
**Ensayo Dragendorff y Mayer
(alcaloides)**



Gelatina 1 % (Taninos)



Prueba de la espuma (saponinas)



A: Fracción de diclorometano. **B:** Fracción de metanol. **C:** Control negativo

El estudio fitoquímico de las fracciones de diclorometano y metanol obtenidas del extracto metanólico de los frutos de *S. hirtum* permitió

determinar que contienen esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides (Tabla 6). Estos resultados se correlacionan con investigaciones previas de varias especies del género *Solanum*, por ejemplo, el análisis fitoquímico de los extractos de hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanol los frutos de *Solanum aethiopicum* reportan la presencia de saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, esteroides y glicósidos cardíacos (Abubakar, Sani, Malami Yaro, 2020). Asimismo, diversos estudios realizados en los extractos metanólicos de los frutos de *Solanum torvum* han establecido que contienen saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Darkwah, Koomson, Miwornunyuie, Nkoom, Puplampu, 2020). De igual modo, Sakah y Zhang (2020) reportan el aislamiento de alcaloides, neolignan y cumarinas de los frutos de *Solanum incanum* y Abebe y Bayou (2021) indican la presencia de saponinas, taninos, flavonoides y alcaloides en los extractos de cloroformo y metanol de los frutos de *Solanum zanthocarpum*. En relación a lo expuesto anteriormente, cabe destacar, que según las investigaciones referenciales realizadas este es el primer reporte de la composición química de *Solanum hirtum* en Venezuela, la presencia de los metabolitos secundarios determinados en los frutos de esta especie (esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides) le podrían conferir propiedades medicinales a esta planta.

Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante con el extracto metanólico de los frutos de *Solanum hirtum* a una concentración de 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) y se comparó con el ácido ascórbico (sustancia antioxidante utilizada como referencia), en la cual se obtuvo como resultado un porcentaje de inhibición de 92,33 % en el extracto metanólico, mientras que para el ácido ascórbico

fue de 95,83 % demostrando así que el extracto analizado presenta una actividad antioxidante similar al patrón de referencia (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados obtenidos de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH).

Muestra	Concentración extractos patrón referencia ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias promedio	% Inh $\pm$ DE
FMSH	1000	0,046	92,33 $\pm$ 0,03
Patrón:	Ácido Ascórbico	0,024	95,83 $\pm$ 0,01

Leyenda: FMSH: Fracción metanol de *S. hirtum*. % Inh $\pm$ DE: Porcentaje de Inhibición (% Inh) $\pm$ Desviación Estándar (DE) de los extractos metanólicos ensayados. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de las muestras ensayadas.

Concentración inhibitoria media (CI_{50})

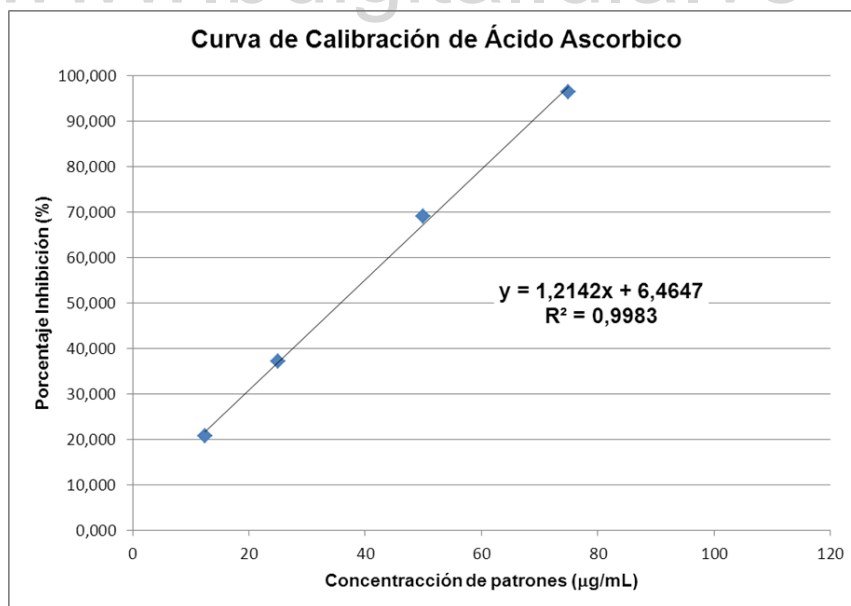
Se procedió a realizar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) al extracto metanólico, preparando una curva de calibración con ácido ascórbico (12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25 $\mu\text{g/mL}$; 50 $\mu\text{g/mL}$; 75 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$) y una serie de diluciones de las muestras (500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$ y 32,25 $\mu\text{g/mL}$), cuyos resultados se observan en la Tabla 8, 9 y Figura 10.

Tabla 8. Resultados obtenidos Curva de Calibración con Ácido Ascórbico

Muestras	Concentración de Patrones	Absorbancias Promedio	% Inh $\pm$ DE
Patrón Ácido Ascórbico ($\mu\text{g/mL}$)	12,5	0,552	20,68 $\pm$ 0,47
	25	0,438	37,09 $\pm$ 0,43
	50	0,216	69,03 $\pm$ 0,18
	75	0,025	96,36 $\pm$ 0,26
	100	0,020	97,08 $\pm$ 0,08
DPPH (mM)	0,06	0,696	0,000 $\pm$ 0,000

Leyenda: DPPH: Reactivo 2,2-difenil-1-picril-hidrácilo Milimolar (mM). % Inh $\pm$ DE: Porcentaje de Inhibición (% Inh) $\pm$ Desviación Estándar (DE) de los patrones analizados.

Figura 11. Curva de Calibración de Ácido Ascórbico



Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021)

Tabla 9. Valores de obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto Metanólico de *Solanum hirtum*.

Muestra	Concentraciones (μg/mL)	Absorbancias Promedio	% Inh ± DE	CI ₅₀ (μg/mL)
FMSH	125	0,315	42,83 ± 0,14	236,05 ± 4,22
	250	0,271	50,82 ± 0,19	
	500	0,186	66,18 ± 0,15	
	1000	0,046	92,33 ± 0,03	

Leyenda: **FMSH:** Fracción metanol de *S. hirtum*. **% Inh ± DE:** Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) de los extractos metanólicos ensayados. Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de las muestras ensayadas.

Los resultados muestran una concentración inhibitoria media de 236,05 μg/mL en la fracción metanólica, lo cual indica que esta es la mínima concentración necesaria capaz de reducir en un 50 % el radical DPPH.

Contenido de fenoles totales

Se procedió a la cuantificación del contenido de fenoles totales de la fracción metanólica de los frutos de *Solanum hirtum* mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Para ello se elaboró una curva de calibración de ácido gálico, cuyos resultados analíticos se reflejan en la Tabla 10 con un coeficiente de correlación de 0,9989 representado en la Figura 11 y Tabla 11, obteniendo como resultado 18,54 ± 0,30 μg GA/mg Muestra.

Tabla 10. Resultados obtenidos del Contenido Total de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de *Solanum hirtum*.

Muestra	Concentración muestras (mg/mL)	Absorbancia Promedio	Concentración en μg Ácido gálico/mg Extracto $\pm$ DE
FMSH	0,5	0,290	18,54 $\pm$ 0,30

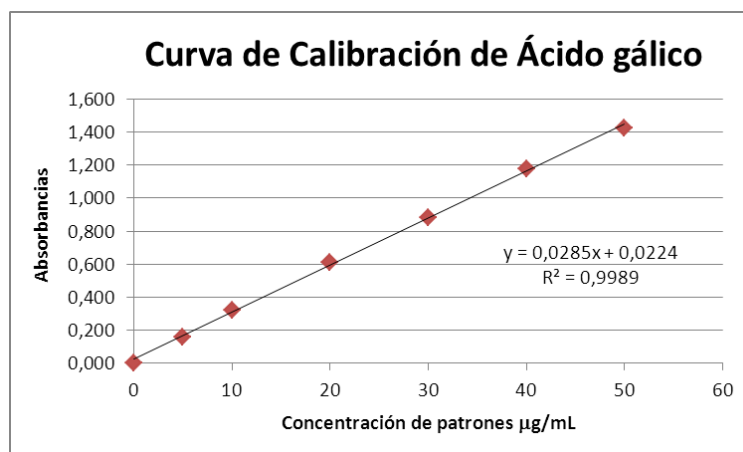
Leyenda: FMSH: Fracción metanol de *S. hirtum*. Concentración en microgramos (μg) de Ácido gálico por miligramos (mg) de extractos $\pm$ Desviación Estándar (DE). Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de las muestras ensayadas.

Tabla 11. Datos para Curva de Calibración con Ácido Gálico

Patrón de Referencia	Concentración de Patrones ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancias Promedio	Desviación Estándar
Ácido Gálico	0	0,000	0,00
	5	0,159	0,00
	10	0,322	0,01
	20	0,612	0,00
	30	0,881	0,01
	40	1,175	0,01
	50	1,424	0,00

Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021).

Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico



Fuente: Molina, Contreras, Pérez y Obregón (2021).

El género *Solanum*, ha sido ampliamente estudiado y presentas diversas actividades biológicas, con respecto a la actividad antioxidante mediante el método de DPPH y cuantificación de fenoles Acheampong, Badu y Agyemang (2016) reportan la actividad para los frutos de *S. torvum* con una CI_{50} de 416,8 µg/mL y un contenido de fenoles a 180 µg equivalentes de ácido tánico por mg de extracto, de la misma forma, Eletta, Orimolade, Oluwaniyi y Dosumu (2017) señalan que los extractos etanólicos de los frutos de *S. aethiopicum* y *S. macrocarpon* presentan una CI_{50} de 38,92 µg/mL y 33,56 µg/mL. Por otra parte, Kristina, Henderson, Djohan, Lister, Girsang y Fachrial (2019) indican que el extracto etanólico de los frutos de *S. licopersycum* tienen una CI_{50} de 147,20 µg/mL. De igual modo, un estudio realizado por Akanitapichat y Sethabouppha (2019) sobre los frutos de *S. sanitwongsei*, *S. stramonifolium*, *S. torvum* y *S. xanthocarpum* reportan una CI_{50} de 1671,0 µg/mL; 279,0 µg/mL, 520,0 µg/mL y 174,0 µg/mL, respectivamente. Asimismo determinaron el contenido de compuestos

fenólicos para *S. sanitwongsei* (10,31 $\mu\text{g AG/mg extracto}$), *S. stramonifolium* (26,34 $\mu\text{g AG/mg extracto}$), *S. torvum* (43,47 $\mu\text{g AG/mg extracto}$) y *S. xanthocarpum* (44,74 $\mu\text{g AG/mg extracto}$).

En este sentido, la actividad antioxidante la fracción metanólica de los frutos de *Solanum hirtum* fue analizada utilizando el método del DPPH a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ dando como resultado un % de inhibición de 92,33 % similar al compuesto de referencia utilizado (ácido ascórbico, % Inh= 95,83 %) lo cual indica una elevada actividad antioxidante. Asimismo, la concentración inhibitoria media (CI_{50}) fue de 236,05 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el contenido de fenoles totales fue equivalente a 18,54 μg de ácido gálico por mg de extracto. En relación a lo expuesto anteriormente, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los frutos de *S. hirtum* contienen metabolitos secundarios que son capaces de captar los radicales libres y pueden prevenir el inicio de reacciones en cadena mediadas por estos compuestos, por lo cual esta planta tiene valor terapéutico para tratar afecciones producidas por agentes oxidantes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El análisis fitoquímico de los frutos de *Solanum hirtum* permitió identificar la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en las fracciones de diclorometano y metanol.

La fracción metanólica obtenida de los frutos de *S. hirtum* presentó un % de inhibición de 92,33 % frente al radical DPPH a una concentración de 1000 µg/mL y la concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue de 236,05 µg/mL, lo cual sugiere que los frutos de esta planta tienen una elevada actividad antioxidante.

La cuantificación de compuestos fenólicos en la fracción metanólica obtenida de los frutos de *S. hirtum* determinó que contenían un promedio equivalente a 18,54 µg ácido gálico por mg de extracto.

Los diferentes componentes polifenólicos presentes en los frutos de *S. hirtum* contribuyen con la capacidad antioxidante mediante el empleo de diferentes mecanismos de acción para neutralizar las especies reactivas de oxígeno confiriendo propiedades farmacológicas y medicinales a esta planta.

Esta investigación constituye el primer análisis fitoquímico y de actividad antioxidante de los frutos de *S. hirtum* en Venezuela, constituyendo un aporte al conocimiento de la composición química y actividad biológica del género *Solanum*.

Recomendaciones

Realizar la cuantificación de flavonoides en los extractos y fracciones de los frutos de *S. hirtum*.

Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los frutos de *S. hirtum*.

Efectuar estudios de otras actividades biológicas (antifúngica, fotoprotectora, citotóxica).

Analizar las hojas, tallos y raíces de la especie *S. hirtum* para tratar de identificar los metabolitos secundarios presentes y su posible actividad farmacológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe H y Bayou H. (2021). Phytochemical investigation on the fruits of *Solanum xanthocarpum*. *World journal of pharmaceutical research*, 10 (4): 131-145.
- Abubakar A, Sani I, Malami S, Yaro A. (2020). Quantitative determination of secondary metabolites of fractions obtained from *Solanum aethiopicum* (L.) fruit. *Dutse journal of Pure and Applied Sciences*, 6(3): 2476-8316.
- Acheampong A, Badu M y Agyemang A. (2016). Comparative total phenolics and antioxidant activities of *Xanthosoma colocasia*, *Solanum torvum* and *Allium ascalonicum* L. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 2(4): 73-79.
- Aguir L. (2005). First record on the use of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) and fruits of *Emmotum nitens* (Icacinacea) by *Platyrrhinus lineatus* (E. Geoffroy) (Chiroptera, Phyllostomidae) in the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Zoología*, 22 (2): 509-510. doi.org/10.1590/S0101-81752005000200030.
- Aguirre E y Barreiro W. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens*. L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*, 14 (2): 21-36.
- Akanitapichat P y Sethabouppha B. (2019). *In vitro* Antioxidant and Cytoprotective Activities of Extracts from four *Solanum* Fruits. *Indian journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(19): 49-58.
- Ancco L. (2003). Distribución de las Solanáceas en la Provincia de Jorge Basadre Grohmann (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Jorge Basadre, Tacna, Perú.

- Ancona J, Valencia M, García M, Chin G y Luna M. (2015). Evaluación de los Metabolitos del Tomatillo (*Solanum hirtum*) para uso medicinal. (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Guadalajara, México.
- Arratea B y Mamani Y. (2017). Actividad antibacteriana del extracto acuoso *Solanum tuberosum* (papa fermentada) y aceite esencial *Thymus vulgaris* (tomillo), Frente a cepa *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro. (Tesis de pregrado). Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Bellavista, Perú.
- Ávalos A, Pérez E y Carril V. (2009). Metabolitos Secundarios de las Plantas. *Revista Reduca*, 2 (3): 119-145.
- Avello M, Suwalsky M, (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (concepción)*, 494 (2): 161-172.
Doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>.
- Beaman V y Muhammed S. (1976). Antibiotic Action of *Solanum incanum* Linnaeus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 9 (6): 920-924.
- Belitz y Grosch. (1988). Química de los alimentos. Ed. Acribia España: Zaragoza.
- Benzie F y Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1): 70 - 76.
- Bilbao M., (1997). Análisis fitoquímico preliminar. Armenia. Colombia.
- Bohórquez F. (2016). Determinación de actividad antioxidante de extractos de hojas de *Diplostephium phyllicoides* (Kunth) Wedd. (Tesis de Pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá, Colombia.

- Bonatti A. (1991). Formulation of plant extracts into dosage form. En R. O. B. Wijesekera (Ed.), *the Medicinal Plant Industry* (pp. 106-107). London: CRC Press.
- Botero H. (2011). "Plantas medicinales pasado y presente". Corantioquia. Medellín.
- Bravo L., (1998). Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev*, 56 (11): 317-333.
- Cameron E y Pauling L. (1978). Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *National Library of Medicine*, 75 (9): 4538 - 4542.
- Cardona J. (2011). Estudio de metabolitos fijos y volátiles en tres morfotipos de COCONA (*Solanum sessiliflorum* Dunal) procedentes del departamento del Guaviare. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Carpio R y Figueroa T. (2017). Efecto de la adición de goma arábiga y maltodextrina en el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante en extracto de sancayo (*Corryocactus brevistylus*) liofilizado. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa – Perú.
- Carranza D y Huayanay J. (2009). Determinación de metabolitos secundarios del tallo de *Croton alnifolius* L. (Tunga). (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Cerney V., Sorn F., (1967), Steroid alkaloids: alkaloids of Apocynaceae and Buxaceae. *The alkaloids chemistry and physiology*, 9: 305-426.

- Chang L, García A, Rosalbal Y, Espinosa A y Ramos M. (2013). Caracterización fitoquímica y evaluación de la actividad Antibacteriana *in vitro* de los extractos de hojas y tallos de *Solanum nigrum* L que crece en Cuba. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica*, 44 (4): 31.
- Chesson A, Russell R y Provan J. (1997). Metabolites of the phenylpropanoid pathway - common origin, common properties. Luxembourg: *In Polyphenols in foods*.
- Chung T, Wong Y, Wei I, Huang W y Lin Y. (1998). Tannins and Human Health: A review. *Crit. Rev Food Sci Nutr*, 38 (6): 421-464. doi: [10.1080/1040869981274273](https://doi.org/10.1080/1040869981274273).
- Coba P, Mayacu L y Vidari G. (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *La Granja*, 11 (1): 22-30.
- Corrales L y Muñoz M. (2012). Estrés oxidativo: Origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Ciencias Biomédicas*, 10: 135-250.
- Coy C, Cuca C y Orozco C. (2006). Un nuevo Alcaloide Esteroidal, dos Esteroles y un Triterpeno Pentacíclico de *Solanum cornifolium*, Sección Geminata. *Revista Actualidades Biológicas*, 27 (1): 131-134.
- Darkwah W, Koomson D, Miwornunyuie N, Nkoom M, Puplampu J. (2020). Phytochemistry and medicinal properties of *Solanum torvum* fruits. *All life*, 13(1): 498-506. doi: <https://doi.org/10.1080/26895293.2020.1817799>.

- Eletta, Orimolade, Oluwaniyi y Dosumu. (2017). Evaluation of Proximate and Antioxidant Activities of Ethiopian Eggplant (*Solanum aethiopicum* L.) and Gboma Eggplant (*Solanum macrocarpon* L). *Jasem*, 21(5): 967-972.
- Elías R y Delgado D. (2012). Medicina Tradicional versus Medicina Científica ¿En verdad somos tan diferentes en lo esencial? *Acta Médica Peruana*, 29 (2).
- Esponda R y Hernández R. (2011). Extracción de Alcaloides Esteroidales del *Solanum* (Friegaplatos, Tomate, Chichigua) y hacer un Producto Natural en una forma Farmacéutica Crema. (Tesis de Pregrado) Universidad Nacional Autónoma de Honduras.
- Fernández I. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de cinco especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones de la memoria y los nervios. Recuperado de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2882.pdf.
- Flechas H, Sánchez L y Silva J. (2008). Tamizaje fitoquímico y Cálculo de rendimiento de Sapogeninas Esteroidales de tres procedencias de *Solanum quitoense* Var. *Septentrionale* "naranjillo". *Revista Colombia Forestal*, 11 (1):203.
- Font Q. (1999). Plantas medicinales: el Dioscórides renovado. España: Península.
- Gómez D. (2014). Determinación de la capacidad antioxidante del aceite de híbrido de palma en diferentes estados de maduración. (Tesis de Pregrado). Pontificia universidad javeriana. Bogotá, Colombia.

- González M y Morales C. (2005). Análisis de la literatura sobre plantas medicinales en Costa Rica. 5 (1): 3-40.
- Gutiérrez A y Estévez A. (2009). Relevancia de los Productos Naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103 (2): 409-420.
- Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza A. (2008) Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Símposio de metrología*. Recuperado de https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Guzmán M y Cazáres L. (2008). Recursos fitogenéticos y sustentabilidad en Chiapas. México: UNICACH.
- Harborne A. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Recuperado de https://books.google.co.ve/books/about/Phytochemical_Methods_A_Guide_to_Modern.html?id=vCWHUU6iobwC&redir_esc=y
- Hernández R, Fernández C y Baptista P. (2010). Metodología de la investigación. México: McGraw-Hill.
- Hertog G, Hollman C y Van de Putte B. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agric Food Chem*, 41 (8): 1242-1246.
- Hurtado H. (2010). El proyecto de investigación, Comprensión Holística de la Metodología y la Investigación. Caracas, Venezuela: Quirón-Sypal.
- Islas M, Castañeda A, Álvarez A, Valenzuela R, Romero L y Torres M. (2017). Estudio preliminar de la actividad antioxidante de tres especies

del género *Ganoderma* (Polyporaceae) nativas del estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Micología*, (46):37– 45.

- Kristina K, Henderson A, Djohan D, Fachrial E, Lister N y Girsang E. (2019). Antioxidant and Anticollagenase Activity of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and Lycopene. *American Scientific Research Journal for Engineering, technology, and Sciences*, 52(1): 57-66.
- Lindenschmidt, Tryka, Goad, Witschi. (1986). the effects of dietary butylated hydroxyltoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, 38: 151-160
- Luchetti A. (2001). Las Solanáceas de la provincia de Santa Fe. *Natura Neotropicalis*, 32(2): 111-132.
- Luque C y Priego C. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography*, 1217 (16): 2383-2389. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
- Marcano D y Hasegawa M. (2002) Fitoquímica Orgánica. Caracas, Venezuela: Torino.
- Martínez A. (2002). Alcaloides Esteroidales de Solanáceas. (Tesis doctoral). Universidad de Antioquia. Medellín.
- Martínez I, Valverde M, Periago J y Gaspar R. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. 50 (1).
- Martínez J, Mejía S, Macías M, Sánchez S. (2017). Evaluación de la actividad biológica y determinación de contenido de fenoles y flavonoides de extractos de *Solanum alaeagnifolium* y *Panax ginsen*. *Revista de Simulación y Laboratorio*, 4(11):1-12.
- Meckes M, Torres J, Calzada F, Rivera J, Camorlinga M, Lemus H. (1997). Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*: a plant used in

- maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother Res (UK)*, 11(2):128-31.
- Méndez M, Torres W, Evan A y Duran R. (2014). Jardines Medicinales en Yucatán: una Alternativa para la Conservación de la Flora Medicinal de los Mayas, *Revista Fitotecnia Mexicana*. 37(2).
- Mensor L, Menezes F, Leitao G, Reis A, Dos Santos T, Coube C y Leitao S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2): 127-130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Morales R y Urzúa A. (1972). Aislamiento de Diosgenina de *Solanum tomatillo*. (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica del Estado Santiago Chile.
- Moreno G, Andrade C, Concellon M y Díaz A. (2013). Estudio de la Capacidad Antioxidante durante el Almacenamiento Refrigerado de Naranjilla (*Solanum quitoense*) tratada con Radiación UV-C. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 14 (2): 125-132.
- Muedas T. (2013). Estudio químico y de actividad antioxidante de la *Bauhinia guinensis* Var. (Tesis de pregrado). Pontificia universidad Católica del Perú. Lima-Perú.
- Muñoz O, Brachet A, Gupta M, Veuthey J y Christen P. (1997). Alkaloids of *Erithroxylum lucidum* Stem-Bark. Panamá: Elsevier, 46 (8):143-1442.
- Niño J, Correa M, Cardona D y Mosquera M. (2011). Antioxidant and antitopoisomerase activities in plant extracts of some Colombian flora

from La Marcada Natural Regional Park. *Revista de Biología Tropical*, 59 (3): 1089–1097.

Ordoñez C, Gómez M, Ordoñez M y Lagos T. (2012). Evaluación de un Sistema de Propagación Vegetativa mediante esquejes en Lulo Silvestre *Solanum hirtum* Vahl, *S. marginatum* L, *S sessilittorum* Dun, *S. mamosum* L y *S. umbellatum* Mill. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 29 (1): 29-41.

Orozco C, Beltrán G, Porras N y Nee M. (2008). Listado de especies espinosas de *Solanum* L (Leptostemonum, Solanaceae). *Revista Biota Colombiana*, 9 (2): 239- 249.

Osorio D. (2009). Aspectos básicos de Farmacognosia. (Tesis doctoral) Universidad de Antioquía. Colombia.

Ou B, Hampsch M y Prior R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49(10): 4619 - 4626. doi: [10.1021/jf010586o](https://doi.org/10.1021/jf010586o).

Pastene E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(6):449-455 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile.

Pellegrini N. (1999). Actividad Antioxidante aplicando un ensayo mejorado de de coloración de cationes radicales libres ABTS. *Biología y Medicina de Radicales libres*, 26 (9): 1231-1237.

Radimer K. (2004). Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey. *American journal of epidemiology*, 160 (4): 339-349.

- Ramírez A, Isaza G y Pérez J. (2013). Vegetal species studied by their antimicrobial, immunomodulatory and hypoglycemic properties in Caldas-Colombia, South America. *Revista Biosalud*, 12 (1): 59-82.
- Ramón J y Galeano P. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas de plantas del género *Solanum*. *Información Tecnológica*. 31(5).
- Real Academia Española. (2020). Diccionario de la Lengua Española. Recuperado de: <https://dle.rae.es>.
- Restrepo J. (2011). “*Plantas aromáticas y medicinales enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos*”. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/138198138/PLANTAS-AROMATICAS-Y-MEDICINALES-ENFERMEDADES-DE-IMPORTANCIA-Y-SUS-USOS-TERAPEUTICOS-ICA>.
- Ringuelet J y Viña S. (2013). Productos Naturales Vegetales. Buenos aires, Argentina: Edulp.
- Robert J. (1996). Three eras of vitamin C discovery. *Subcell Biochem*, 25 (1): 1-16
- Romero E, Vera A, Calderón A, Sabando J, Moreira D y Bravo A. (2019). Estudio etnobotánico y comercialización de plantas medicinales del bosque protector Murocomba y su área de influencia del cantón Valencia, Ecuador. *Cienc Tecno Agropecuaria, Mosquera*, 20 (3): 491-506.
- Saikhan M, Howard L y Miller J. (1995). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Different Genotypes of Potato (*Solanum Tuberosum*, L). *Journal of Food Science*, 60 (2): 341-343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb05668.x>

- Sakah J y Zhang Y. (2020) Chemical constituents from the fruits of *Solanum incanum* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. 90. doi: [10.1016/j.bse.2020.104031](https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104031).
- Salinas P. (2012). Plantas tóxicas comunes en el estado Mérida, Venezuela. Tercera parte. Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Umbelliferae (Apiaceae). *MedULA, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de los Andes*, 21 (2): 5-11.
- San-Miguel A y Martin-Gil F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (Radicales Libres) y los antioxidantes en clínica. *Gac Med Bilbao*, 106: 106-113.
- Seijo I. (2017). Plantas asesinas: las sospechosas habituales. Especial Crimen y Castigo. Recuperado de http://www.lalinternadeltraductor.org/pdf/lalinterna_n15.pdf
- Sierra J, Siqueiros M, Flores E, Moreno O y Arredondo O (2015). Riqueza y distribución de la familia Solanaceae en el estado de Aguascalientes, México. *Botanical Sciences*, 93 (1): 97-117.
- Skerget M, Kotnik P, Hadolin M, Rizner H, Simoncic M y Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavons and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*. 89: 191-198.
- Solanaceae Source. (2012). Recuperado de <http://www.nhm.ac.uk/researchcuration/research/projects/solanaceaesource>
- Spooner D, Anderson G y Jansen R. (1993). Evidencia de AND de cloroplasto para las interrelaciones de tomates, papas y pepinos (Solanaceae). *Revista estadounidense de botánica*, 80 (6): 676 – 688.

- Suhaj M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J Food Composition. Elsevier*, 19: 531-537.
- Thirumalai E, Therasa S y Elumalai E. (2012). Effect of *Solanun surattense* seed on the Oxidative Potential of Cauda Epididymal Spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (1): 21-23.
- Tovar del Rio J. (2013). Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. (Tesis de Pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Venereo J. (2002). Daño oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31(2): 126-133.
- Viada E, Gómez L y Campaña I. (2017). Estrés Oxidativo. *Correo Científico Médico de Holguín*. 1.
- Villanueva, B. (2014). Contenido de betalainas y determinación de la actividad antioxidante de accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd" quinua" del distrito de Tambillo-Ayacucho. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
- Walton, J y Brown, D. (1999). Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products. Imperial College Press.
- Willett, W y Macmahon B. (1984). Diet and cancer-An overview. *New England Journal of Medicine*, 310: 697-703.
- Youngson R. (2003). Antioxidantes y radicales libres. España: EDAF.