



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**ESTUDIO FITOQUIMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLOGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE**

*Brownea grandiceps* Jacq

**Tesista:**

Br Daisy González.

**Tutora:**

Prof. Marielba Morillo S.

Mérida, octubre 2019

## **DEDICATORIA**

A Dios por estar siempre presente en cada proyecto de mi vida, llenándome de fe y guiándome con bien para culminarlo.

A mis madres Herlinda y Julia por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

A mi hermanita Marilia, por su cariño y apoyo durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mi compañero Jesús, por su paciencia y amor incondicional, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A mi hijo Sebastián, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios, gracias porque sin tu ayuda no habría logrado desarrollar con éxito mis metas.

Dios los Bendiga, para ellos este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por guiarme en mi camino y por permitirme concluir con mi objetivo.

A la ilustre Universidad de Los Andes, en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por mi formación como profesional.

Al Instituto de investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, Mérida, por haberme permitido realizar esta investigación en sus instalaciones.

A la tutora. Profesora Marielba Morillo, por su entrega, atención, tiempo y dedicación brindada en esta investigación.

A los Departamentos de: Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

A las Profesoras: María Eugenia Rondón y Vanesa Hernández, jurados evaluadores, gracias por los conocimientos aportados, ayuda, atención y paciencia brindada en el presente trabajo de grado.

A los Profesores: Luis Beltrán Rojas y Tomás Visbal, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por toda la colaboración brindada en este trabajo.

Al profesor Henry Rodríguez, de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, por los conocimientos aportados, ayuda y atención en esta investigación.

Al Profesor Ender Fernández, de la Facultad de Ciencias, por su colaboración en la identificación de la planta utilizada en esta investigación.

Al Prof. Antonio de Ascensão del Departamento de Biología. Laboratorio de biodiversidad de artrópodos de la Facultad de Ciencias de la ULA, Mérida, por la identificación de la especie de garrapata utilizada en esta investigación.

A la estudiante Mayrena Camacho de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por sus aportes en este trabajo.

A mis Amigas Tatiana López y Heneymar González gracias por su apoyo, por ser tan incondicional y por la paciencia en mis momentos de estrés.

A todos, ¡GRACIAS!

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Pág
<b>Índice de contenido</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de gráficos</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de esquemas</b>	<b>xiii</b>
<b>Resumen</b>	<b>xiv</b>
Introducción	1
<b>Capítulo I</b>	
El problema	3
Planteamiento del Problema.	3
Justificación de la investigación.	5
Objetivos de la investigación.	6
Objetivo general.	6
Objetivos específicos.	6
Alcances y limitaciones de la investigación.	6
<b>Capítulo II</b>	
Marco Teórico	8
Trabajos previos.	8
Antecedentes históricos o epistemológicos.	11
Familia Fabaceae o Leguminosae.	12
Características botánicas de la familia Fabaceae o Leguminosae.	13
Distribución de la familia Fabaceae o Leguminosae.	14
Usos de la familia Fabaceae o Leguminosae.	15
Composición química de la familia Fabaceae o Leguminosae.	15
Género <i>Brownea</i> .	16
Clasificación taxonómica del género <i>Brownea</i>	16
Composición química reportada en el género <i>Brownea</i> y sus usos farmacológicos.	17
Especie <i>Brownea grandiceps</i>	18
Clasificación taxonómica de la especie <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	18

Características botánicas de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	19
Compuestos químicos reportados en <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	20
Actividad farmacológica reportada de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	22
Bases teóricas	22
Productos naturales	22
Metabolitos secundarios presentes en las plantas	23
Triterpenos	23
Compuestos Fenólicos	24
Quinonas	25
Cumarinas	25
Taninos	26
Flavonoides	27
Lignina	28
Glúcidos	28
Alcaloides	29
Extracto Vegetal	30
Obtención de los Extractos Vegetales	30
Maceración	31
Percolación	31
Decocción	31
Infusión	31
Digestión	32
Estudio Fitoquímico	32
Ensayo de Liebermann–Burchard	32
Ensayo de Dragendorff	33
Ensayo de Wagner y Mayer	33
Ensayo de Cloruro férrico	33
Ensayo de Shinoda	33
Ensayo de la espuma	33
Ensayo de la gelatina	33

Determinación de polifenoles de los extractos metanólicos de hojas y tallos de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	34
Método Folin–Ciocalteu para la determinación de polifenoles	35
Actividad Antioxidante	36
Método del radical catiónico ABTS	38
Método ORAC (Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno)	38
Método DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo)	38
Actividad garrapaticida	40
Garrapatas	40
Especies de garrapata comunes en Venezuela	40
Políticas oficiales de control de garrapatas en Venezuela.	42
Acaricidas usados en el campo.	42
Resistencia a acaricidas	43
Diagnóstico de la resistencia a acaricidas	44
Pruebas in-vitro	45
Pruebas in-vivo	46
Métodos para determinar la actividad garrapaticida	46
Prueba de paquete de larvas (PPL)	46
Prueba de inmersión de larvas (PIL)	46
Prueba de inmersión de adultas (PIA)	47
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	47
Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	48
Los hospedadores de las garrapatas <i>R. microplus</i>	49
Distribución Geográfica de <i>R. microplus</i>	49
<i>Definición operacional de las variables de la investigación</i>	50
Hipótesis.	52
Hipótesis Nula.	
<b>Capítulo III</b>	53
Marco Metodológico	53
Tipo de investigación.	53
Diseño de investigación.	53

Población y muestra.	54
Instrumento de recolección de datos.	54
Procedimientos de la investigación.	55
Recolección del material vegetal	55
Preparación de los extractos vegetales	56
Tamizaje fitoquímico	57
Determinación de fenoles totales por el método Folin- Ciocalteu	60
Contenido de compuestos fenólicos	61
Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH	62
Determinación de la actividad garrapaticida por el Método Prueba de paquete de larvas (PPL).	64
Recolección de los parásitos en el ganado vacuno	64
Estudio Estadístico.	68
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Resultados y Discusión	69
Capítulo V	97
Conclusiones	97
Recomendaciones	98
<b>Referencias Bibliográficas</b>	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Pág</b>
Figura 1. Estructura del ácido fítico reportado en la familia Fabaceae o Leguminosaceae.	16
Figura 2. Especie <i>Brownea grandiceps</i> Jacq	20
Figura 3. Estructura de algunos compuestos reportados en <i>B. grandiceps</i> Jacq	21
Figura 4. Estructuras químicas de algunos triterpenos	24
Figura 5. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos	24
Figura 6. Estructuras de algunas quinonas.	25
Figura 7. Estructura de algunas cumarinas	26
Figura 8. Estructura del tanino Corilagina	27
Figura 9. Estructura de algunos flavonoides	27
Figura 10. Estructuras de algunas ligninas	28
Figura 11. Estructura química de la arbutina	29
Figura 12. Estructura química de la Papaverina	30
Figura 13. Reacción química Folin Ciocalteu	36
Figura 14. Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante	40
Figura 15. Especie <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	47
Figura 16. Recolección del material vegetal de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq	55
Figura 17. Vaucher de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	56
Figura 18. Instrumento y material utilizado para la preparación de las diluciones del extracto metanólico de hojas y tallos de <i>B. grandiceps</i> Jacq.	63
Figura 19. Inmovilización de las garrapatas adultas	64
Figura 20. Oviposición de huevos de <i>R. microplus</i> .	65
Figura 21. Larvas de <i>R. microplus</i> observadas con la lupa estereoscópica	65
Figura 22. Se muestra la solución Tween 80 utilizada y la forma como fueron sembradas las larvas de garrapatas en el papel de filtro	66

- Figura 23. Se muestra la cámara de vidrio donde se colocaron las capsulas y la forma como se hizo, el conteo de larvas muertas y vivas de las garrapatas, utilizando una lupa estereoscópica. 67
- Figura 24. Estudios fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq. 71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág
Tabla 1. Taxonomía de la familia Fabaceae o Leguminosae	13
Tabla 2. Taxonomía del género <i>Brownea</i>	17
Tabla 3. Taxonomía de la especie <i>Brownea grandiceps</i> Jacq.	19
Tabla 4. Compuestos químicos reportados en <i>Brownea grandiceps</i> Jacq	20
Tabla 5. Taxonomía de <i>Rhipicephalus microplus</i>	48
Tabla 6. Definición operacional de las variables de la investigación	50
Tabla 7. Rendimiento de los extractos obtenidos	57
Tabla 8. Diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración	61
Tabla 9. Diluciones empleadas para preparar la solución madre a una concentración 1 mg/mL.	63
Tabla 10. Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico.	63
Tabla 11. Estudios fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq	70
Tabla 12. Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón	74
Tabla 13. Cuantificación de fenoles totales de los extractos metanólicos de hojas y tallos de <i>B. grandiceps</i>	75
Tabla 14. Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	77

Tabla 15. Análisis de varianza de ANOVA de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de <i>B. grandiceps</i> .	77
Tabla 16. Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de tallos de <i>B. grandiceps</i> .	78
Tabla 17. Análisis de varianza de ANOVA de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de los tallos de <i>B. grandiceps</i>	78
Tabla 18. Actividad antioxidante de los extractos del tallo de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq a 4 mg/mL	79
Tabla 19. Curva patrón de ácido ascórbico	81
Tabla 20. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas y tallos; Y el extracto hexanoico de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	82
Tabla 21. IC <sub>50</sub> de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de <i>B. grandiceps</i>	89
Tabla 22. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	91
Tabla 23. Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	92
Tabla 24. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	92
Tabla 25. Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	93
Tabla 26. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de los tallos de <i>B. grandiceps</i>	93
Tabla 27. Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de los tallos de <i>B. grandiceps</i>	94
Tabla 28. Porcentaje de mortalidad de las larvas de la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , tratadas con los extractos metanólicos de las hojas y tallos de <i>Brownea grandiceps</i> , al 20%, en solución acuosa de Tween 80 al 2%.	95

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico</b>	<b>Pág</b>
Gráfico 1. Curva de calibración de ácido gálico.	74
Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del ácido ascórbico.	81
Gráfico 3. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de las hojas de <i>B. grandiceps</i> .	83
Gráfico 4. Porcentaje de inhibición del extracto hexanoico de las hojas de <i>B. grandiceps</i>	84
Gráfico 5. Porcentaje de inhibición (% I) del extracto metanólicos de los tallos <i>B. grandiceps</i>	85
Gráfico 6. Porcentaje de inhibición de los extractos metanolicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de tallos de <i>B. grandiceps</i> .	86
Gráfico 7. IC <sub>50</sub> de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de <i>B. grandiceps</i> .	90



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO USUBILLAGA DEL HIERRO”



## ESTUDIO FITOQUIMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE

*Brownea grandiceps* Jacq (FABACEAE O LEGUMINOSAE)

Mérida – Venezuela

Trabajo de Grado

**Realizado por:**  
**Br. Daisy González**  
**Tutora: Dra. Marielba Morillo**

### RESUMEN

Se obtuvieron los extractos hexanoico, diclorometanoico y metanólico, de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq, familia Fabaceae, el estudio de la composición química cualitativa, de los mismos, mostraron en los extractos hexanoico y diclorometanoico de las hojas, la presencia de esteroides y en el metanólico alcaloides, esteroides, polifenoles, taninos y flavonoides. En el extracto hexanoico de los tallos se evidenció la presencia de terpenos; en el diclorometanoico esteroides; y en el metanólico alcaloides, polifenoles, taninos y flavonoides. Por otro lado, los extractos metanólicos de hojas y tallos de esta especie, presentaron un contenido de compuestos fenólicos de 0,888 y 0,0886  $\mu\text{g}$  AG/mg de extracto, respectivamente. En cuanto al % de inhibición del radical DPPH, los extractos metanólicos de hojas y tallos tuvieron 88,9 y 89,2 y el extracto hexanoico 20,1 %, comparado con el ácido ascórbico, utilizado como control positivo, que tuvo un 95,6 %. Mientras que el  $\text{IC}_{50}$  (mg/mL), para los extractos metanólicos de hojas y tallos fue 0,10 y 0,14 respectivamente y para el extracto hexanoico de las hojas 1,46. Además, los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps* no mostraron actividad sobre las larvas de *Rhipicephalus microplus*.

**Palabras claves:** *Brownea grandiceps* Jacq, Fabaceae, porcentaje de inhibición, *Rhipicephalus microplus*.

## Introducción

En todas las culturas el uso de plantas por sus propiedades medicinales es de gran importancia, en las poblaciones rurales e indígenas es el principal recurso y es usada por la mayor parte de la población (Hernández, 2015). La medicina herbaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Gallego, 2016).

Las plantas medicinales forman parte del recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, la Organización Mundial de la Salud, ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional y que gran parte de los tratamientos tradicionales involucran el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Giraldo, Baquero, Bermudez y Oliveira, 2009).

Existen diversas formas de preparar remedios caseros a bases de plantas, entre las cuales tenemos decocciones, infusiones, inhalaciones y ungüentos. Además, las plantas presentan compuestos que puede ser o no benéficos para los humanos dependiendo como se prepare, que parte se utilice pudiendo causar daño o no en el metabolismo del ser humano (Hernández, 2015).

En este sentido, se conoce diversidades de plantas que son utilizadas dentro de la medicina tradicional, entre estas, las plantas pertenecientes a la familia Fabaceae, la cual tiene distribución cosmopolita, comprende 600 géneros, con 12000 a 17000 especies, además cuenta con especies que han sido reportadas con propiedades medicinales como son las pertenecientes al género *Brownea* (Bosisio, 2007).

*Brownea grandiceps* Jacq es una de las especies con mayor importancia dentro su género, ya que sus extractos pueden usarse para tratar diversos problemas médicos, cabe destacar que esta especie es usada para el tratamiento de hemorragias en la mujer durante la menstruación. Además, los estudios fitoquímicos de los extractos de *Brownea grandiceps* Jacq, han demostrado la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas y fenoles (Pereira y Brazón 2015).

El objetivo de este trabajo es confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq.

El trabajo se dividió en cinco capítulos, distribuidos de la siguiente forma. En el capítulo I, se abarca la problemática, justificación, objetivos y la denominación de las variables del estudio. En el capítulo II, se abordan los antecedentes que acompañan el estudio y los fundamentos necesarios para la realización y comprensión de las variables, se establece la hipótesis y la conceptualización de las variables. En el capítulo III, se describe el diseño, metodología, técnicas necesarias para la investigación, además se define la población y la muestra. En el capítulo IV, se presentan los resultados obtenidos durante la investigación, datos estadísticos, gráficas y se discute sobre el significado de cada resultado y en el capítulo V, las conclusiones y recomendaciones.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### **Planteamiento del Problema.**

Las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura, su uso y aplicaciones constituye un conocimiento que se transmite de generación en generación, a pesar de tener avances en la medicina moderna (Pérez, 2008).

Así mismo algunas especies de plantas son empleadas en medicina tradicional, con fines ornamentales y otras industrialmente ya que de ellas se extraen ceras, alcoholes, insecticidas, mucilagos, ácidos orgánicos, taninos, tintes y perfumes (Leython y Ruiz, 2006).

El género *Brownea grandiceps* Jacq, es considerado en la medicina tradicional como hemostático de gran potencia, por ello su gran importancia en la contribución a la salud (Echeverry, 2003). También, se han realizado varias investigaciones sobre la especie *Brownea grandiceps* y se ha determinado la presencia de metabolitos secundarios de gran interés (Mostafa, Musa, Abdelgawad y Ragab, 2019).

También, a la corteza, tallos, hojas y flores de esta especie, se le han reportado propiedades como antiséptico genitourinario para enfermedades como: cáncer, diarrea, esterilidad femenina, hemorragias y prostatitis (Albornoz, 2001).

En este sentido, el estudio de metabolitos secundarios que son de origen vegetal, tiene gran significación, la cual incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales están los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos,

agentes antitumorales, esto significa que estos compuestos han ayudado a cambiar la expectativa de vida (Martínez y Moreno, 2007).

Por otra parte, es necesario destacar la infestación por garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus*, la cual constituye uno de los principales problemas de la ganadería bovina de los países del trópico, siendo el agente causal de enfermedades y ocasionando daños directos e indirectos de graves perjuicios a los bovinos (Rachinsky, Guerrero y Scoles, 2007). El control de las garrapatas en bovinos, a nivel mundial se ha venido realizando desde el siglo XIX con el uso de agentes químicos (fármacos alopáticos), pero dado al manejo irresponsable de dichos productos, estos organismos han sufrido un proceso de selección, generado resistencia a estos productos (Rajput, Hu, Chen, Arijo y Xiao, 2006).

La FAO (2004), recomienda desarrollar estrategias de control de parásitos (garrapatas) en los sistemas de producción animal sustentables desde la perspectiva ambiental y efectivas desde la visión de la salud animal; es así que el uso de extractos de plantas medicinales para este fin, con bases en los reportes etnofarmacológicos, es una práctica científica ampliamente distribuida, que ha demostrado buenos resultados en el manejo integrado de plagas (Ribeiro, Avanani, Goncalves, Toigo y Von Poser, 2008). Por esta razón, nos planteamos investigar la actividad de los extractos de las hojas y tallos de *B. grandiceps*, en larvas de *Rhipicephalus microplus*.

A pesar del uso tradicional que se le ha dado a *Brownea grandiceps*, son pocos los estudios que se han realizado sobre esta planta por ello, se planteó la siguiente interrogante:

¿Cuál es la relación entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps*?

### **Justificación de la investigación.**

Las plantas tienen una gran cantidad de compuestos con actividad en diferentes sistemas biológicos, se ha comprobado que las plantas medicinales se encuentran disponibles en el ambiente en que viven los seres humanos y de forma abundante, por lo que existen tantas diferencias de medicina tradicional como culturas y diversas recetas para curar diferentes enfermedades (Hernández, 2015).

En esta investigación se consideró que la especie *Brownea grandiceps* Jacq., ha sido de gran importancia en la medicina tradicional por presentar propiedades curativas y por esta razón resulta interesante estudiar esta planta y así, encontrar nuevos componentes que puedan ser farmacológicamente útiles para la industria y medicina moderna, los cuales podrían ayudar a mejorar la calidad de vida de las poblaciones justificando así el avance de esta investigación.

También es importante mencionar, que el control de garrapatas en Venezuela, por lo general, ha sido orientado a la utilización de compuestos químicos (garrapaticidas), aplicados mediante aspersión, inmersión y aplicación tópica sobre el dorso del animal. La aplicación parenteral de productos ectoparasiticida (Ivermectinas), son tratamientos de control utilizados de forma indiscriminada, tanto en el modo de aplicación como en la concentración o dosis utilizadas, lo que ha traído como consecuencia el desarrollo de cepas de garrapatas resistentes a estos productos diferentes regiones del país (Santos, Perdomo, García y Torres 2010).

A pesar de estos importantes hallazgos, existe la necesidad de implementar dentro del manejo integral de parásitos de los sistemas de producción bovino, alternativas terapéuticas sostenibles desde la perspectiva ambiental y eficaces en los procesos de control de este ectoparásito; es así, que el uso de plantas medicinales con actividad acaricida, es una de las

actividades que brinda una salida a la situación. Es por ello que la investigación plantea también, investigar la factibilidad del empleo de *B. grandiceps* Jacq, como antiparásito para el control de garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

### **Objetivos de la investigación.**

#### ***Objetivo general.***

Confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq.

#### ***Objetivos específicos.***

- Determinar cualitativamente los componentes químicos presentes en los extractos hexanoicos, diclorometanoicos y metanólicos, de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq, a través de tamizaje fitoquímico.
- Comprobar la actividad antioxidante por el método DPPH, de los extractos hexanoicos, diclorometanoicos y metanólicos, de las hojas y tallos de *B. grandiceps*.
- Cuantificar la cantidad de polifenoles presentes en los extractos metanólicos de hojas y tallos de *B. grandiceps*.
- Evaluar la actividad garrapaticida de los extractos metanólicos, de las hojas y tallos de *B. grandiceps*.

### **Alcances y limitaciones de la investigación.**

El alcance de esta investigación se relaciona con la profundidad sobre el hecho en estudio y establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos (Hernández, Fernández y Batista, 2010). Esta investigación pretende estudiar la relación que existe entre la composición

química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* ya que, diversos autores han reportado compuestos activos beneficiosos para la salud del ser humano.

Entre las limitaciones que se puede presentar durante la realización de esta investigación podemos mencionar en primer lugar el alto costo de los reactivos, fallas constantes de la electricidad y daños de equipos necesarios para alcanzar los objetivos de esta investigación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos previos.

Mostafa y col., (2019), estudiaron la citotoxicidad de cinco metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las hojas de *Brownea grandiceps* Jacq, recolectadas en Egipto (Continente Africano). De igual manera, determinaron la actividad inhibitoria de estos metabolitos sobre la proteinquinasa y realizaron un estudio de acoplamiento molecular de los mismos. Para la identificación de los metabolitos secundarios utilizaron Espectroscopia UV, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM), mientras que, para la determinación de citotoxicidad, emplearon las líneas celulares MCF-7 y HepG2, mediante el método de ensayo de proliferación celular (MTT) y para determinar el acoplamiento molecular de los compuestos el programa Molecular Operating Environment (MOE). En su estudio, confirmaron la presencia de los siguientes compuestos: Catequina (**1**), quercitrina (quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido) (**2**), *trans*-taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (**3**), ácido 13R-hidroxi-9Z,11-*E*-octadecadienoico (**4**) y ácido 13-R-hidroxi-9Z, 11E,15Z-octadecatrienoico (**5**) (Figura 3). En cuanto, a la actividad citotóxica determinaron que la quercitina mostró alta actividad frente a las líneas celulares MCF-7 y actividad moderada frente a las líneas celulares HepG2, igualmente este compuesto mostró alta actividad inhibitoria frente a la proteinquinasa.

Pereira, Brazón, Rincón y Vonasek (2017), realizaron un estudio con el objetivo de aislar a partir del extracto acuoso de las flores de *Brownea grandiceps* Jacq, el tanino condensado Browplasminina, caracterizarlo y confirmar su actividad fibrinolítica. El extracto se obtuvo mediante una decocción del material vegetal de *Brownea grandiceps* Jacq, el cual fue fraccionado

por filtración en gel y fase reversa empleando HPLC y caracterizaron este compuesto activo utilizando MALDI-TOF MS. Los parámetros cinéticos de la actividad antiplasmina se evaluaron con un ensayo amidolítico utilizando un sustrato cromógeno. Por otro lado, la actividad fibrinolítica frente a la plasmina y el factor X activado se evaluó por el método de placa de fibrina. Los autores confirmaron la presencia del tanino Browplasmina y la capacidad de dicho tanino de inhibir la actividad de la plasmina, así como también mostró un efecto menor sobre el factor X activado.

Pereira y Brazón (2015), realizaron un estudio sobre los extractos acuosos de *Brownea grandiceps*. El objetivo de esta investigación fue evaluar in vitro los efectos del extracto acuoso en flores de *Brownea grandiceps* en el sistema de coagulación y fibrinólisis, los resultados de este comprobaron la existencia de metabolitos secundarios como: Taninos, saponinas, glucósidos, alcaloides, flavonoides y cumarinas. Además, el extracto acuoso de *Brownea grandiceps* a bajas concentraciones redujo el PT (tiempo de protombina), mientras que las concentraciones más altas prolongaron el PT. Sin embargo, las concentraciones del extracto entre 1250 y 25000 µg/mL prolongaron el PTT (tiempo de tromboplastina parcial). Estas altas concentraciones se debieron a la presencia del inhibidor factor Xa (FXa) encontrados en el extracto, asimismo los resultados presentaron componentes fibrinolíticos, fibronectinasa y anti factor Xa, además de compuestos antiplasmina que podrían estar actuando como antifibrinolíticos, retrasando así la degradación de fibrina en los procesos fisiopatológicos, como se ha observado en mujeres que presentan menorragia debido a una alta concentración de plasmina, finalmente este compuesto antiplasmina junto con componentes procoagulantes también presentes en el extracto acuoso de *Brownea grandiceps*, podría hacerse responsable de reducir el sangrado menstrual en las mujeres.

Mack-Wen, Rico, Alarcon y Pereañez (2011) estudiaron la inhibición in vitro del veneno de *Bothrops asper*, por la acción de extractos etanólicos de *Brownea ariza* Benth (Caesalpinaceae)”, y evaluaron la capacidad inhibitoria de los extractos etanólicos de hojas y corteza de esta especie, sobre las actividades proteolítica, fosfolipasa A2 y coagulante del veneno de la serpiente. Los resultados mostraron que los extractos de corteza inhiben la acción de fosfolipasas A2 ( $93,2 \pm 0,4$  %), prolongan el tiempo de coagulación (más de 10 min) e inhiben la actividad proteolítica, aunque ésta última con menores efectos que el extracto foliar ( $77 \pm 0,6$  y  $93,8 \pm 0,6$  % respectivamente).

Lizcano, Bakkali, Ruiz-Larrea y Ruiz-Sanz (2010), determinaron la actividad antioxidante contenido de polifenoles y flavonoides de 19 plantas amazónicas, entre ellas: *Piper putumayoense*, *Piper glandulosissimum*, *Piper krukoffii* y *Senna reticulata* y *Brownea rosademonte* (corteza). Los extractos los prepararon como infusiones, como se utilizan en la medicina tradicional. La cantidad de fenoles totales lo determinaron por el método de Folin-Ciocalteau, el contenido de flavonoides por el método colorimétrico de clorohidroaluminio y la actividad antioxidante por la prueba de capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC) y la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). El contenido de fenoles fue expresado en término de ácido gálico equivalentes por gramo de la parte fresca de la planta utilizada, Los extractos de la corteza de *Brownea rosademonte*, mostró un elevado contenido de fenoles totales con  $17,18 \pm 0.24$  mg AG/g de extracto.

Gil, Gómez y Trejo (2008), evaluaron la citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de *Brownea ariza* Benth. En este estudio se identificaron dos flavonoides no reportados antes en esta especie, que es el 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona-3-O-ramnosido (Quercitrina) y 3,5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona (Quercetina), los cuales poseen

actividad anticancerígena frente al mieloma murino SP2/0-Ag14 y citotoxicidad frente a células VERO (células de riñón de mono verde: *Cercopithecus aethiops*).

### **Antecedentes históricos o epistemológicos.**

Las plantas medicinales tienen su origen desde el inicio de la historia del ser humano, los cuales entraron en contacto con la naturaleza y fueron desarrollando costumbres y experiencias tras la ingestión accidental o voluntaria de algunas especies vegetales (Cruz, 2007).

La medicina herbaria se utiliza desde tiempos antiguos para curar o aliviar las dolencias. A partir de aquí surgen los fitofármacos y su empleo es válido para mejorar la salud humana, ya que se adquiere a bajos costos y es ideal para aplicar en atención primaria de salud. Existen hierbas que contienen muchos compuestos químicos que se dan por sí solos en la naturaleza y que presentan actividad biológica, en los últimos 150 años, los químicos y farmacólogos se han dedicado a aislar y purificar los compuestos activos de las plantas con la finalidad de producir nuevos fármacos (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

De hecho, los avances científicos que revelaron la farmacología, a mediados del siglo XIX, corresponden a los avances tecnológicos que permitieron aislar los principios activos de las plantas farmacológicamente más activa, como belladona, opio, quina entre otras. Sin embargo, el desarrollo de la farmacología en el siglo XX, relegó el uso de las plantas medicinales (Alonso, 2002).

En el siglo XVII marcó el apogeo de las plantas medicinales y aromáticas, que hasta entonces se emplearon de manera limitada, como medicina su número había aumentado y a finales del siglo XVIII, su valor principal era el curativo (Fretes ,2010).

En la actualidad las personas han tenido experiencia con las recetas de sus antepasados para dolores de cabeza, malestares, irregularidad menstrual, náuseas, hemorragias nasales, dolor de hombros y otros síntomas. El uso de las plantas medicinales tanto para uso interno como externo, a menudo puede lograr una rápida solución del problema, en ese sentido el interés por la investigación y comercialización de la flora medicinal (Magaña, Gama y Méndez, 2010).

### ***Familia Fabaceae o Leguminosae.***

A lo largo del tiempo las plantas leguminosas se han incluido en la familia Fabaceae. Al principio se conocieron como Leguminosae, nombre tan introducido y extendido que aún hoy se usa como nombre conservado. Además, es necesario disponer de un nombre para la familia derivado del nombre de un género añadiendo la desinenciaeae, por lo que también recibe el nombre de Fabaceae (Llamas y Acedo, 2016).

La familia Fabaceae o Leguminosae, es de distribución mundial, se caracterizan por ser árboles, hierbas tropicales, plantas trepadoras y arbustos (Mabberley, 2008). Las leguminosas representan la segunda familia más importante de las plantas cultivadas después de las familias gramíneas o Poaceae que incluye los cereales. Además, esta familia posee una característica que es albergar en sus raíces bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, y como consecuencia las leguminosas no necesitan fertilizantes para alcanzar un desarrollo normal (Llamas y Acedo, 2016).

Los estudios de filogenia molecular de las leguminosas han aclarado notablemente las controversias existentes. Está aceptado actualmente que todas las leguminosas pertenecen a un gran grupo taxonómico, una única familia con al menos dos subgrupos o linajes que se distinguen bien tanto molecular como morfológicamente: las Papilionoideae (Fabaceae, en el sentido estricto para algunas clasificaciones precedentes) y las Mimosoideae. Además de estos dos grupos, se acomodan entre ellas, el resto de las leguminosas que forman una mezcla de gran variación

morfológica y molecular y que suele tratarse como la tercera subfamilia. Este grupo se ha reconocido como Caesalpinoideae (Llamas y Acedo, 2016).

Es decir, la familia Fabaceae o Leguminosae, se divide en tres grandes familias: Caesalpinioidea, Mimosoideae, Papilionoideae. La Caesalpinioideae, se caracterizan por ser árboles, arbustos o hierbas, inermes o espinosas, hojas bipinnadas o pinnadas, poseen flores zigomorfas con pétalo superior interno, semilla con o sin endosperma mucilaginoso y ovulo anatropo. Mientras que, Mimosoideae son arbóreas, arbustivas o herbáceas, inermes o con espinas, hojas paribipinnadas, con flores actinomorfas en cabezuelas o espigas, y específicamente Papilionoideae presentan flores zigomorfas, corola de prefloración imbricada, pétalo superior generalmente amariposada, hojas pinnadas, digitadas o simples, óvulos campilotropos y embrión curvado (Bosisio, 2007).

En la Tabla 1 se muestra la taxonomía de la familia Fabaceae o Leguminosae. (Stafleu, 2008).

Tabla 1

*Taxonomía de la familia Fabaceae o Leguminosae*

---

Reino:	Plantae
División:	Macroliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Caesalpinioidea, Mimosoideae, Papilionoideae

---

***Características botánicas de la familia Fabaceae o Leguminosae.***

Esta familia tiene importancia económica y cultural debido a su extraordinaria diversidad y abundancia de representantes en diversas formaciones vegetales y por sus aplicaciones como jardinería ornamental, forrajeras, alimento, obtención de compuestos con interés medicinal, en farmacia y extracción de aceites y grasas (Watson y Dallwitz, 1992). Por otra parte, las

leguminosas se consideran como una de las tres familias más grande de angiospermas de las familias compuestas y orquídeas. Esta familia es considerada importante porque produce granos comestibles como frijoles (*Phaseolus* sp), maní (*Arachis hypogaea*), lentejas (*Lens culinaris*), alfalfa (*Medicago sativa*) y plantas ornamentales como pata de vaca (*Bauhinia variegata*) (Lawrence, 1969).

La principal característica de la familia Fabaceae o Leguminosae, radica en la posesión de un fruto conocido como legumbre además de tener utilidad para el hombre y los animales, al tener frutos y semillas comestibles (Llamas y Acedo, 2016).

Son plantas erguidas, epifitas o enredaderas. Las hierbas a su vez, pueden ser anuales, bienales o perennes, sin agregaciones de hojas basales o terminales (Watson y Dallwitz, 2008). También, presentan raíces nodulares que contienen bacterias que fijan nitrógeno. Las hojas son pinnadas, bipinnadas, unifoliadas, trifoliadas, simples y rara vez palmeada a veces con filodios. Las flores usualmente son hermafrodita, actinomorfas, ovarios supero, inflorescencia en racimos, espigas o cabezuelas (Mabberley, 2008).

#### ***Distribución de la familia Fabaceae o Leguminosae.***

Es una familia de distribución cosmopolita, está representada en los bosques tropicales lluviosos, en los bosques secos, con casi 20000 especies y 750 géneros (Llamas y Acedo, 2016).

En Venezuela las Leguminosas tienen amplia distribución geográfica y altitudinal, entre los tipos de habitas que sus especies crecen se encuentran aéreas perturbadas, lugares abiertos, bosques semidecuidos, bosques deciduos, bosques ribereños y sabanas (Avendaño, 2013).

La familia Fabaceae o Leguminosae, está representada en la ciudad de Mérida por 25 géneros y 42 especies, siendo la subfamilia Mimosoideae la mejor representada con 9 géneros y

17 especies, representando el 36 % y 40,5 % respectivamente del total, seguida por Faboideae con 8 géneros (32 %) y 13 especies (30,9 %) y la Caesalpinioideae con 8 géneros (32 %) y 12 especies (28,6 %); de estas especies, 36 corresponden a especies nativas y 6 a exóticas (Cárdenas y Rodríguez, 2005; Aymard y col. 2004; Stergios, Klitgaard y Redden, 2004). Los géneros mejor representados son *Inga* y *Erythrina* con 4 especies cada uno, las cuales se encuentran en parques, plazas y jardines dado su gran valor ornamental.

Por su parte, hay otras especies como *Brownea coccinea*, *Brownea macrophylla*, *Hymenaea courbaril*, *Lonchocarpus sp.*, *Ormocia macrocalyx* y *Ormocia tovarensis* que sólo están representadas por uno o dos individuos que se encuentran de forma muy aisladas en la ciudad. (Rodríguez y Gámez, 2010)

#### ***Usos de la familia Fabaceae o Legunomiceae.***

Se conocen por ser comestibles tanto por animales y humanos, desde el punto de vista de la alimentación humana, lo más importante son las semillas tomada directamente como alimento o utilizadas como oleaginosa (Llamas y Acedo 2016). Son numerosas las especies que se usan en medicina popular o que se cultivan con fines decorativos, otras con usos industriales ya que de ellas se extraen ceras, alcoholes, insecticidas, mucilagos, ácidos orgánicos, taninos, tintes, perfumes y muchas sirven para proteger el suelo, producir abono orgánico y fijar nitrógeno por medio de las bacterias presentes en los nódulos que se forman en sus raíces (Forero y Romero 2005).

#### ***Composición química de la familia Fabaceae o Legunomiceae.***

Las legumbres contienen una serie de compuestos que tienen beneficios potenciales para la salud, así como algunos que pueden reducir la biodisponibilidad o ser tóxicos. Estos compuestos incluyen saponinas, ácido fítico (6), esteroides vegetales, compuestos fenólicos, compuestos que

generan cianuro, inhibidores de enzimas y lectinas, sin embargo, estos compuestos tóxicos se eliminan o se inactivan con la cocción (Araneda, 2018).

En la Figura 1, se puede observar la estructura del ácido fítico (6) reportado en la familia Fabaceae o Legunomiceae.

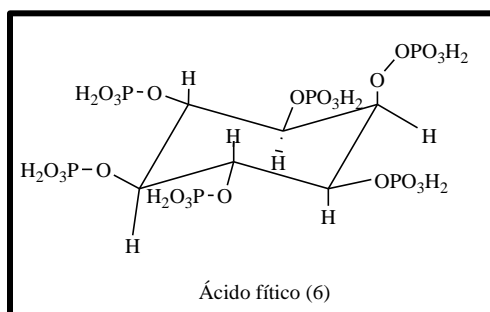


Figura 1. Estructura del ácido fítico (6) reportado en la familia Fabaceae o Leguminosae.

### ***Género Brownea.***

El género *Brownea* fue descrito por el austriaco Nicolás Jacquin, en su obra colectanea publicada en 1789, en honor al botánico irlandés Patric Browne. Son árboles de 3 a 20 metros de altura con tronco delgado y ramificado, presenta hojas compuestas, además presentan inflorescencias en cabezuelas, terminales y/o axiales, flores hermafroditas que pueden ser blancas, rojas, amarillas o anaranjadas, con 10 a 13 estambres, fruto tipo legumbre de 20 a 25 cm de largo (Oliva, 1969).

Este género está representado en la de flora de Venezuela por unas 12 especies, que son: *Brownea ariza*, *Brownea aroensis*, *Brownea birschellii*, *Brownea coccinea*, *subespecies capitella*, *Brownea gladysrojassiae*, *Brownea leucantha*, *Brownea longipedicellata*, *Brownea macrophylla*, *Brownea similis*, *Brownea speciosa*, *Brownea tillettiana*, *Brownea grandiceps*, las cuales están distribuidas en los bosques húmedos y cálidos del país (Hokche-Berry y Huber, 2008).

### ***Clasificación taxonómica del género Brownea***

En la Tabla 2, se muestra la taxonomía del género *Brownea*.

Tabla 2

*Taxonomía del género Brownea.* (Stafleu, 2008)

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Macroliophyta
<b>Orden:</b>	Fabales
<b>Familia:</b>	Fabaceae
<b>Subfamilia:</b>	Caesalpinioideae
<b>Tribu:</b>	Detarieae
<b>Genero:</b>	<i>Brownea</i> Jacq.

### ***Composición química reportada en el género Brownea y sus usos farmacológicos.***

El género *Brownea* se caracteriza por presentar metabolitos como flavonoides de tipo flavonoles como la quercetina aislado de *B. ariza* la cual posee actividad anticancerígena y citotoxicidad frente a células VERO (Mack-Wen y col.). De igual forma se ha aislado en varias especies como de *B. coccinea*, taninos, saponinas, gomas, y azúcares reductores la cual es usada para el tratamiento de trastornos ginecológicos como menorragia y también está asociada a propiedades analgésicas (Sarwar, Binte, Malik, y Kumar 2015).

Según Hoyos (1992) desde el punto de vista medicinal las partes aéreas de *Brownea* se utilizan como hemostático (antihemorrágico). Entre los estudios realizados sobre este género en la Amazonía Brasileña se reporta que las indígenas lo utilizaban como un método anticonceptivo y también para tratar flujos menstruales y dolores post parto. Se considera que las especies con mayores cualidades medicinales son *Brownea ariza*, *Brownea latifolia*, *Brownea macrophylla*, y *Brownea grandiceps*.

### ***Especie Brownea grandiceps***

Esta especie fue descrita por Nicolas Jacquin y fue colectada por el botánico alemán Bredemeyer en la quebrada de cotiza en el valle de Caracas en 1803, como planta ornamental. Aunque el arbusto es nativo de Venezuela no se le reconoce con frecuencia (Oliva, 1969).

Se encuentra en su forma natural en regiones altas de montañas, quebradas y en los alrededores de la cordillera de la costa y valles centrales (Oliva, 1969). Es una especie ampliamente distribuida en Venezuela en bosques húmedos ubicados desde 100 a 1400 m.s.n.m., en estados como Amazonas, Aragua, Lara, Carabobo, Zulia, Yaracuy, Delta Amacuro y en el Distrito Capital, en lugares abiertos (Hockche y col., 2008).

Debido a sus flores vistosas, en Venezuela se conoce comúnmente como: Rosa de montaña, rosa de monte, palo de cruz, el nombre rosa de cruz es más empleado en el estado Anzoátegui y palo de cruz en el sur este del país. Por otro lado, en Costa Rica se conoce como flor de Jesucristo; en Panamá como arizá, cuchillito y unmancri; en Colombia como arizá, arizal, clavellin, flor de la cruz, palo de rosa; en Ecuador recibe el nombre de bimiti, topong, rosa de montaña y en Brasil es llamada rosa de montaña, sol de Bolivia (Record y Hess, 1972). También, en algunos países es conocida con el nombre de flor de Venezuela debido a la descripción científica del botánico alemán Bredemeyer (Hoyos, 1992).

### ***Clasificación taxonómica de la especie Brownea grandiceps Jacq.***

En la Tabla 3 se muestra la taxonomía de la especie *Brownea grandiceps* Jacq.

Tabla 3.

*Taxonomía de la especie Brownea grandiceps Jacq (Stafleu, 2008)*

---

Reino:	Plantae
División:	Macroliophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Rosanae
Orden:	Fabales
Familia	Fabaceae
Género:	<i>Brownea Jacq</i>
Especie:	<i>Brownea grandiceps Jacq</i>

---

***Características botánicas de Brownea grandiceps Jacq.***

Son arboles de entre 3 a 20 metros de altura, de corteza morena y escamosa, las hojas son imparipinnadas con cinco a quince pares de hojuelas ovales (Albornoz, 2001). Presenta flores de color escarlata dispuestas en cabezuelas de diez a quince centímetros de diámetro que nacen pegadas al tronco del árbol. El sistema radical es profundo, se distingue fácilmente porque al hacer un corte transversal en el leño aparece una cruz de donde viene la mayor parte de sus nombres vulgares o porque sus flores brotan como grandes rosas (Mahecha y Echeverri, 1983).

En la Figura 2, Se muestra el árbol y la flor de *Brownea grandiceps Jacq*. (Foto tomada en el Jardín Botánico de Mérida, estado Mérida,).



Figura 2. Árbol y la flor de *Brownea grandiceps* Jacq.

Este árbol se caracteriza por poseer hojas que tienen como función proteger la delicada flor de los fuertes rayos solares, además sus flores producen mucha miel por lo que es codiciada por hormigas, abejas y pájaros (Oliva, 1969). Igualmente, *B. grandiceps* es de crecimiento lento, se propaga fácilmente por semillas, es poco resistente a la sequía, se recomienda sembrarlo en zonas resguardadas del viento, requiere de lugares sombreados y terrenos fértiles (Hoyos, 1992).

***Compuestos químicos reportados en Brownea grandiceps Jacq.***

En la Tabla 4, se muestran los compuestos químicos reportados según la literatura en diferentes extractos de *Brownea grandiceps* Jacq (Mostafa y col., 2019; Pereira y col., 2017; Pereira y Brazón, 2015).

Tabla 4

***Compuestos químicos reportados en Brownea grandiceps Jacq.***

<b>Extracto</b>	<b>Compuestos químicos</b>
Extracto metanólico	Flavonoides como la catequina y Quercetrina.
Extracto acuoso	Taninos, saponinas, glucósidos, alcaloides, cumarinas, polifenoles y carbohidratos.

En la Figura 3, se pueden observar las estructuras químicas de algunos compuestos reportados en *B. grandiceps* Jacq. Entre ellos catequina (1), quercetrina (quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido) (2), *trans*-taxifolin-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (3), ácido 13R-hidroxi-9Z,11-*E*-octadecadienoico (4) y ácido 13-R-hidroxi-9Z, 11E,15Z-octadecatrienoico (5) (Mostafa y col., 2019).

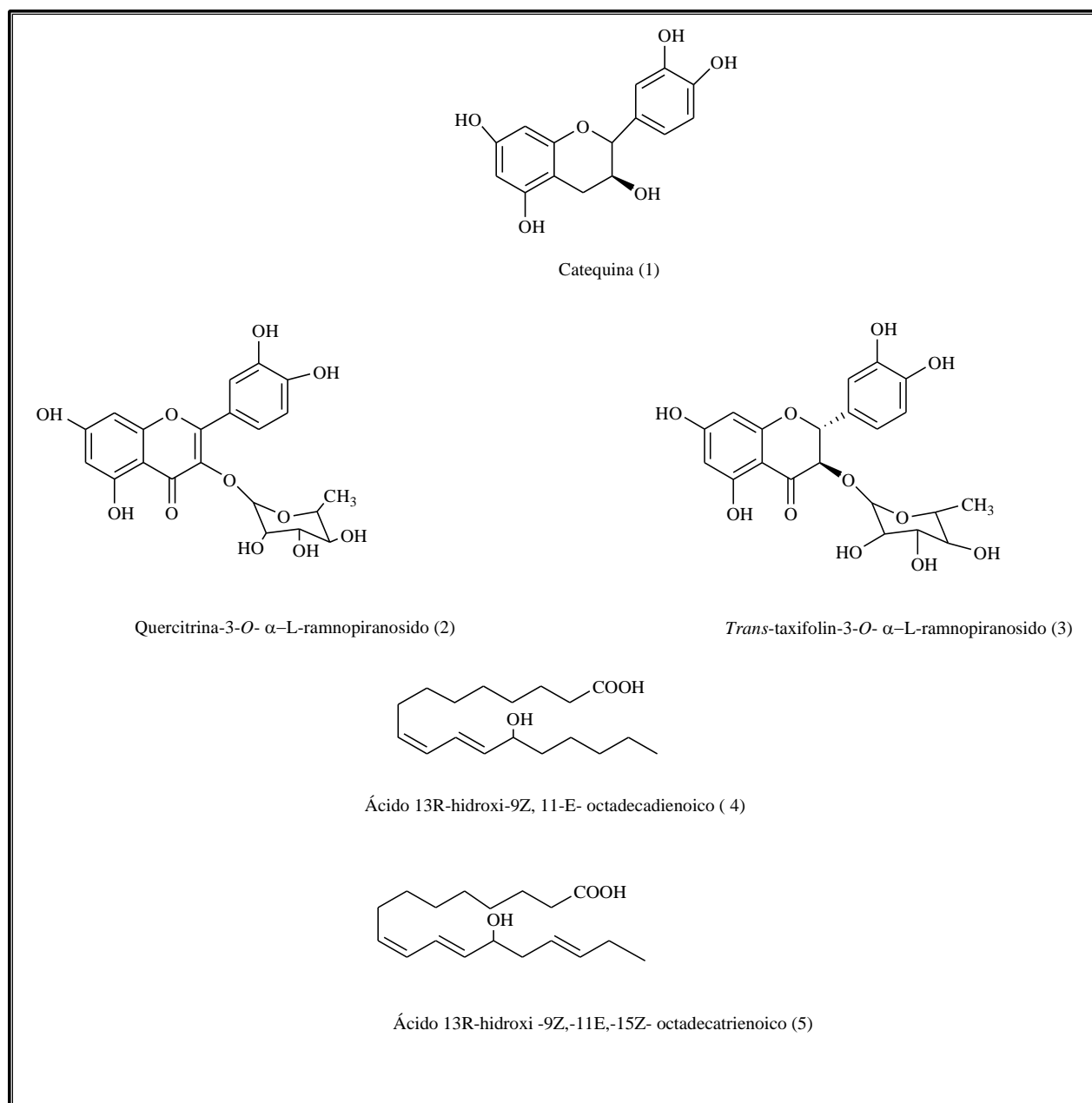


Figura 3. Estructura de algunos compuestos reportados en *B. grandiceps* Jacq.

### ***Actividad farmacológica reportada de Brownea grandiceps Jacq.***

*Brownea grandiceps* Jacq, ha sido usada en muchos países por presentar citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer de mama y de cáncer hepatocelular (Mostafa y col., 2019). También posee actividad importante en el sistema de coagulación y fibrinólisis por lo que es usada para detener hemorragias (Pereira y col., 2017). *B. grandiceps* Jacq, se considera en la medicina tradicional como un hemostático de gran potencia, las flores en infusión o en decocción se utilizan para prevenir el aborto, los pétalos secos sobre las heridas se usan para detener hemorragias, las hojas, tallos y flores en infusión o maceración, regulan el exceso del flujo menstrual e igualmente alivian los dolores después del parto. Además, el cocimiento de la corteza se emplea para curar la ictericia y también se usa como laxante (Echeverry y Villegas 2003).

Según Hoyos (1992), las hojas, corteza y el leño de la especie *Brownea grandiceps*, tiene propiedades hemostáticas en heridas recientes. También, la decocción de flores, corteza tiene propiedades astringentes usadas para la diarrea y disentería.

### **Bases teóricas**

#### **Productos naturales**

Son metabolitos secundarios o metabolitos especiales de fuentes de origen vegetal, animal, fúngico, marino y bacteriano. Estos compuestos orgánicos provienen del metabolismo secundario que se producen en un organismo vivo como respuesta ante las condiciones externas ya sea estrés hídrico, térmico, de superpoblación, siendo en general señales químicas frente a plagas, patógenos y simbiosis con otros organismos (Pomilio, 2012).

Estos son justamente compuestos de interés porque poseen en su estructura química algunas subestructuras que son bioactivas en organismos animales, incluidos el hombre. La

mayoría de los compuestos orgánicos presentan peso molecular bajo o intermedio y están representados por terpenoides y sus glucósidos, alcaloides, agliconas naturales, las de mayor peso molecular (PM) son glicopéptidos, péptidos y proteínas (Pomilio, 2012).

### **Metabolitos secundarios presentes en las plantas**

Las plantas son organismos autótrofos, además del metabolismo primario presentes en todos los seres vivos, tienen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química, presentan propiedades biológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes (Sierra, 2018).

La síntesis de metabolitos secundario depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementa como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento es importante para la supervivencia de las plantas ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta (Sierra, 2018). Dentro de la clasificación de los metabolitos secundarios tenemos:

#### ***Triterpenos***

Los triterpenos han sido identificados como uno de los principales componentes de las plantas medicinales utilizadas de forma tradicional, y han mostrado efectos analgésicos, antitumorales, antiinflamatorio, antioxidantes, además que representan un amplio grupo de metabolitos secundarios en numerosas especies distribuidas ampliamente en el reino vegetal (Fernández, 2014).

Estos son compuestos naturales de 30 átomos de carbono que se sintetizan a partir de 6 unidades de isopreno, dichas estructuras se pueden encontrar en un estado libre o en forma de glucósidos, los cuales presentan una gran diversidad estructural. Hasta ahora se conocen 100

diferentes tipos de esqueletos en la naturaleza (Flores, 2013). Ejemplos de estos derivados son: El estigmasterol (7) y sistosterol (8) (Figura 4) (Ávalos y Pérez, 2009).

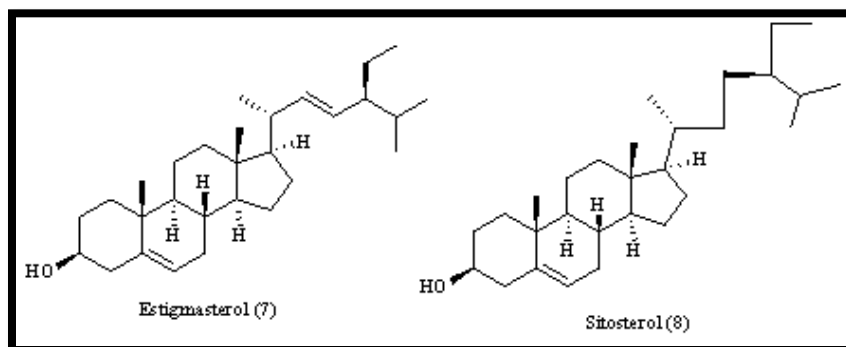


Figura 4. Estructuras químicas de algunos triterpenos (Pérez y Ávalos, 2009).

### ***Compuestos Fenólicos***

Son compuestos que tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático, miles de compuestos fenólicos se encuentran en las plantas y se clasifican en diferentes tipos de grupos funcionales juegan un papel importante en el metabolismo de las plantas, en el crecimiento, reproducción y en la protección contra patógenos externos. Ellos son responsables del color y las características sensoriales de las plantas (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014). Ejemplos de estos derivados son el catecol (9), piragalol (10) y ácido cafeico (11) (Figura 5) (Domingo y López, 2003).

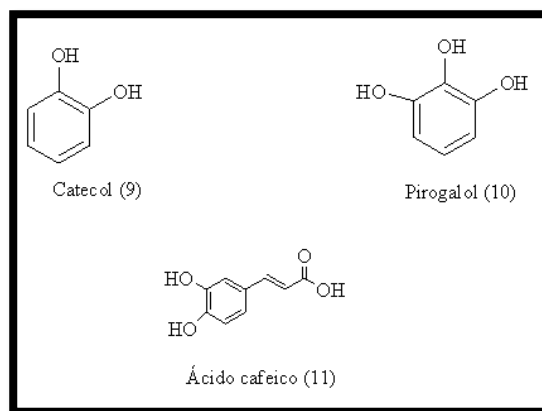


Figura 5. Estructuras químicas de algunos compuestos fenólicos.

## *Quinonas*

Son compuestos presentes en la naturaleza, se forman de la oxidación de compuestos aromáticos para dar la correspondiente dicetona, estos compuestos han sido utilizados en la medicina tradicional como antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos, y anticancerígenos, también poseen propiedades de óxido reducción y ácido base. Se clasifican en benzoquinonas (monocíclicas), naftoquinona (bicíclica), y antraquinona (tricíclicas). (Leyva, López, Escobedo y Navarro, 2017). En la Figura 6, se muestran las estructuras de algunas quinonas como la *p*-Benzoquinona (**12**), *p*-Naftoquinona (**13**) y *o*-Benzoquinona (**14**) (Miskovsky, 2002).

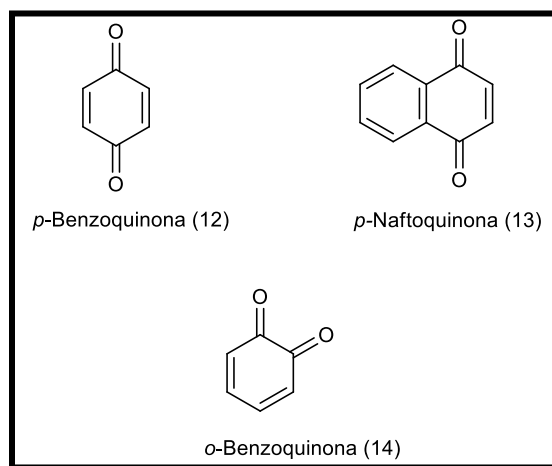


Figura 6. Estructuras de algunas quinonas.

## *Cumarinas*

Son compuestos derivados de la benzopironas, son de origen natural y sintético, tienen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiespasmódicas, antivirales, antioxidantes, antihelmínticas, existen derivados tricíclicos de las cumarinas que se comportan como intercalantes del ADN, y por tanto tienen interés antitumoral. La warfarina (**15**) y carbocromeno pertenece a este grupo tienen actividad cardioprotectora debido a su acción vasodilatadora (Serra, 2010).

En la Figura 7, se muestran las estructuras de algunas cumarinas como la warfarina (**15**), escopoletina (**16**) y umbeliferona (**17**) (Domingo y López 2003).

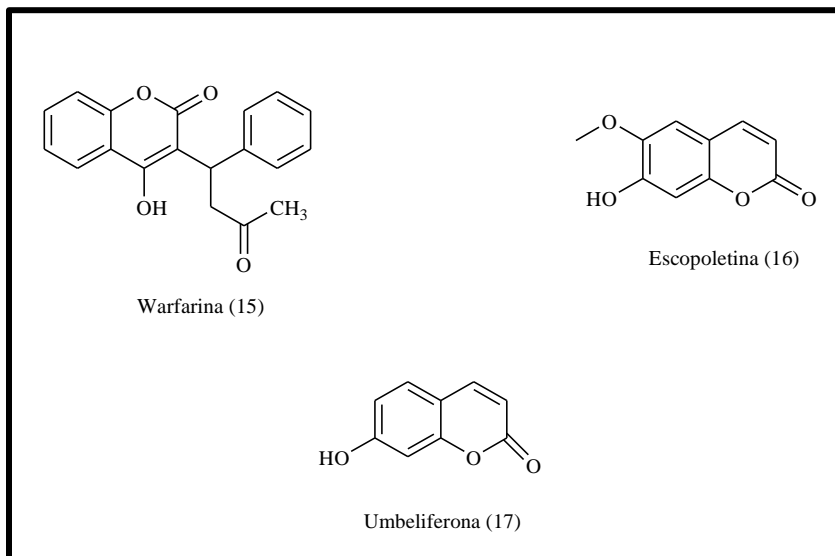


Figura 7. Estructura de algunas cumarinas

### ***Taninos***

Los taninos son compuestos polifenólicos, más o menos complejos de origen vegetal, tiene sabor astringente conocidos y empleados por su propiedad de ser capaces de convertir la piel en cuero. Esto se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas. Se pueden clasificar en dos grupos en hidrolizables y condensados (Carretero, 2000).

En la Figura 8, se muestra la estructura del tanino corilagina (**18**) (Cruz, Domínguez, Domínguez y Parajó, 2001).

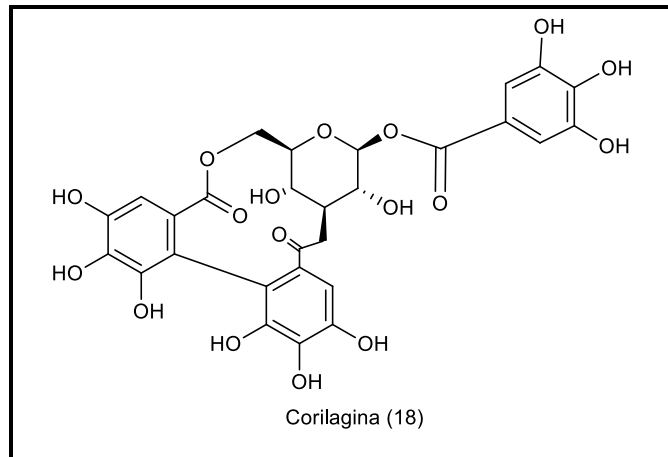


Figura 8. Estructura del tanino Corilagina (18).

### ***Flavonoides***

Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentra casi en cualquier vegetal, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares. Las funciones de estos flavonoides se consideran antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos, antinutricionales, fotoreceptores, protectores de la luz UV, agentes quelantes de metales, entre otros. La estructura de los flavonoides es un anillo A derivado de la cadena del policétido, y también posee un anillo B derivado del ácido shikímico (Marcano y Hasegawa 2001).

En la Figura 9, se muestran las estructuras de algunos flavonoides como la flavona (19) y la apigenina (20) (Fukai y col., 2001).

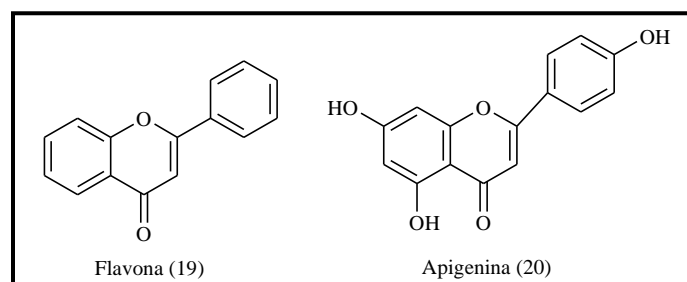


Figura 9. Estructura de algunos flavonoides.

## ***Lignina***

Es un polímero tridimensional complejo cuyas subunidades aromáticas son sintetizadas a través de los fenilpropanoides, además de ser un componente fundamental ya que refuerza y proporciona rigidez a los tejidos vegetales (Lagunes y Zabaleta, 2016). La lignina también se considera un mecanismo de defensa importante, su biosíntesis y deposición en paredes celulares se incrementa cuando las plantas son sometidas a estrés de tipo biótico o abiótico (Lagunes y Zabaleta 2016). En la Figura 10, se muestran las estructuras de algunos molignoles como alcohol *p*-cumarílico (21), alcohol coniferílico (22) y alcohol sinapílico (23) (Ávalos y Pérez 2009).

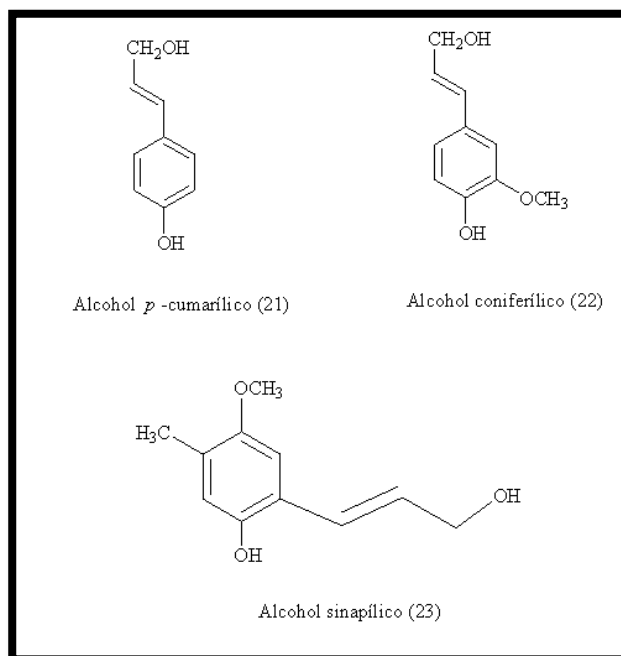


Figura 10. Estructuras de algunas ligninas

## ***Glúcidos***

Los glúcidos son polihidroxialdehidos o polihidroxiacetonas, sustancias de reserva y material estructural de los tejidos vegetales. Las plantas con glúcidos tienen una acción emoliente, vulneraria y hemostática, encontramos en este grupo el malvavisco, borraja, llantén, cebada, maíz,

soya, rosa, polipodio, lino, y zábila (Albornoz, 2001). Un ejemplo de los compuestos glúcidos es la Arbutina (**24**), la observamos en la Figura 11 (Ávalos y Pérez 2009).

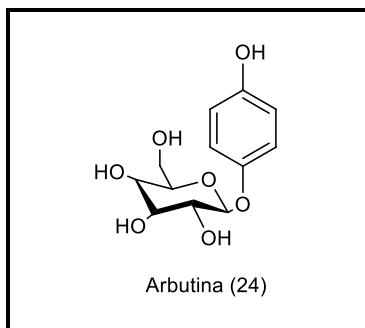


Figura 11. Estructura química de la arbutina (**24**).

### *Alcaloides*

Es un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal) nitrogenado intracíclico, derivados de aminoácidos de carácter más o menos básico, tiene distribución restringida con propiedades farmacológicas importantes a dosis baja y que responden a reacciones comunes de precipitación (Arango, 2008). En su estado natural los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta pueden encontrarse en hojas (cocaína, nicotina), en flores (escopolamina, atropina), en corteza (quinina, tubocurarina) en raíz (emetina y cefalina) y específicamente los alcaloides se encuentran principalmente en las angiospermas que son plantas que tienen sus semillas recubiertas por un epicardio (Arango, 2008).

Un ejemplo de un compuesto alcaloide lo podemos observar en la Figura 12, donde se muestra la estructura de Papaverina (**25**) (Martínez, Valencia, Jiménez y Galeano, 2008).

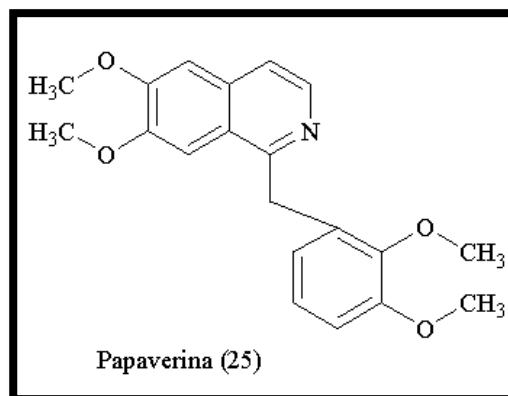


Figura 12. Estructura química de la Papaverina (**25**)

### **Extracto Vegetal**

Los extractos vegetales son una mezcla de compuestos químicos, obtenidos por procesos químicos, físicos o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Caldas, 2012). También los extractos vegetales han sido reconocidos como agentes antimicrobianos desde la antigüedad y en la actualidad han atraído el interés ya que presentan una importante producción de metabolitos secundarios. Asimismo, los extractos de plantas son de gran importancia porque presentan propiedades farmacológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antitumorales y la habilidad de promover la cicatrización de heridas (García, 2006).

### ***Obtención de los Extractos Vegetales***

Los extractos, son obtenidos a partir de especímenes seleccionados, mediante técnicas especializadas de extracción y concentración química, utilizando diversos solventes y siendo posteriormente analizados por técnicas cromatografías (Bruneton, 2001).

### *Maceración*

Es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción a utilizar. Para realizar el proceso se corta o muele el material vegetal, fresco o seco, se coloca en recipientes adecuados, se coloca el disolvente seleccionado por polaridad: hexano, cloroformo y finalmente etanol o metanol en reposo con un equipo en agitación continua a temperatura ambiente durante un intervalo de días que puede ser de 3 a 5 (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

### *Percolación*

Consiste en colocar el material fragmentado en un recipiente cónico o cilíndrico haciendo pasar un disolvente apropiado a través del mismo. El tamaño de la particular no debe ser menor a 3 mm para permitir que el disolvente fluya sin embargo el material debe estar debidamente compactado para que el disolvente eluya con cierta lentitud dando tiempo al mismo de tomar contacto con los componentes que se desean extraer (Lamarque y col., 2008).

### *Decocción*

La planta es cubierta con el disolvente (agua), y se lleva a ebullición por 15 a 30 minutos posteriormente se enfría y se filtra (Valcárcel y Gómez, 1988).

### *Infusión*

El disolvente se hierve y posteriormente se introduce la planta a extraer, dejándose enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente. El extracto recibe el nombre de infusión o té (Valcárcel y Gómez, 1988).

### *Digestión*

Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60 °C. Al aumentar mediante la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión y García, 2010).

### *Estudio Fitoquímico*

Las plantas poseen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios que le permiten crecer, multiplicarse defenderse y sobrevivir. Por otra parte, dada la riqueza química de las plantas fueron consideradas la fuente natural de numerosos medicamentos y por ellos fueron usados en la medicina tradicional (Sampietro, Isla, Quiroja, y Vattvone, 1997).

Sampietro y col., (1997) refieren que el estudio fitoquímico de las plantas permite conocer los principios activos y evaluar la complejidad de biosíntesis y degradación, así como los mecanismos de regulación.

Por otro lado, el análisis fitoquímico de las plantas permite identificar la presencia de algunos núcleos secundarios, a través de las siguientes pruebas:

#### *Ensayo de Liebermann–Burchard*

Es la prueba más usada para la identificación de terpenos y esteroides con un doble enlace. Esta prueba específica para esteroides con insaturación en sus anillos causa un cambio de color debido a la deshidratación que se da para la formación de dienos y se da una coloración rosa, violeta, azul y verde (Montealegre, 2011).

### *Ensayo de Dragendorff*

En esta prueba se observa un precipitado de color naranja, esto se debe a que, la reacción de este reactivo, produce sales de alcaloides que se precipitan y colorean (Flores, Prieto, Martínez y Ruiz 2008).

### *Ensayo de Wagner y Mayer*

También permiten identificar alcaloides, si se observa turbidez o precipitados (rojo naranja, blanco a crema y marrón) se considera que la muestra contiene alcaloides (Bermejo, Pereira, Cintra y Morales 2014).

### *Ensayo de Cloruro férrico*

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos. Si el extracto de la planta se obtiene con etanol, el ensayo determinará fenoles (Bermejo y col., 2014).

### *Ensayo de Shinoda*

Esta prueba identifica la presencia de flavonoides en un extracto vegetal produce coloraciones rojizas indicando que la prueba es positiva (Bermejo y col., 2014).

### *Ensayo de la espuma*

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y persiste por más de 2 minutos, la cual determina la presencia de saponinas (Bermejo y col., 2014).

### *Ensayo de la gelatina*

Los taninos tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, la prueba más empleada para la detección de este grupo de metabolitos secundarios emplea el

reactivo de gelatina-sal el cual produce un precipitado blanco, indicando la presencia de taninos (Carvajal, Hata, Sierra, Martínez y Rueda, 2009).

### **Determinación de polifenoles de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq.**

Los compuestos fenólicos, constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas. Actualmente existe gran interés en estos compuestos debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importante por su contribución al mantenimiento de la salud humana ( Jurado y col., 2016).

La actividad biológica de los polifenoles, está relacionada con su carácter antioxidante, el cual es debido a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres (García, Fernández y Fuentes 2015).

Existen numerosos estudios que proporcionan datos que apoyan la correlación negativa entre la ingestión de compuestos fenólicos y el riesgo de padecer ciertas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad de Alzheimer, cataratas. Además de estos efectos beneficiosos para la salud, también se ha estudiado su efecto antiinflamatorio y su efecto preventivo en el tratamiento de asma (García y col., 2015).

Sin embargo, la cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas) horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo y condiciones de almacenamiento (García, y col., 2015).

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos son denominados polifenoles, se originan principalmente en las plantas que lo sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales (Quiñonez, Miguel y Aleixandre, 2012).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de estos compuestos son: Ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñonez y col., 2012).

La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias. La ruta del ácido shikímico y la ruta de los poliacetatos, la ruta del ácido shikímico, proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina) y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) y finalmente la ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas (Quiñonez y col., 2012).

#### **Método Folin–Ciocalteu para la determinación de polifenoles**

El ensayo de Folin Ciocalteu, se usa como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se fundamenta en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo, a pH básico dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. Igualmente, el ácido fosfomolibdotúngstico (formado por dos sales en el medio ácido),

de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da una coloración azul intenso cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles (García y col., 2015).

El mecanismo de acción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de 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. Es 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. En la Figura 13, se muestra la reacción Folin Ciocalteu (García y col., 2015).

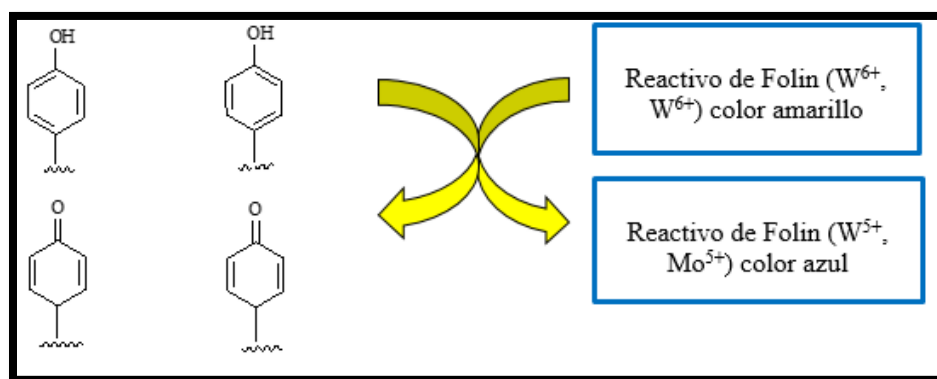


Figura 13. Reacción química Folin Ciocalteu

### Actividad Antioxidante

Los antioxidantes son grupos de moléculas reconocidas por su capacidad de neutralizar los efectos negativos de los radicales libres y el estrés oxidativo. Pueden ser productos muy diferentes entre sí, en cuanto a origen, estructura química y modo de acción, pero tienen en común la capacidad de inhibir o frenar los mecanismos implicados en la oxidación (Peiró, 2015).

Así mismo, los antioxidantes de origen vegetal son un conjunto fitoquímico tales como las antocianinas, carotenoides, flavonoides y vitaminas los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Figuroa y Mollinedo, 2017).

La actividad antioxidante en productos de origen vegetal, se debe principalmente a la presencia de antioxidantes naturales. Entre las sustancias antioxidantes se encuentra el ácido lipoico, bilirrubina, bioflavonoides, vitamina E, vitamina C, vitamina A, carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides (Figuroa y Mollinedo, 2017).

Muchos autores han descrito los efectos beneficiosos de los antioxidantes contenidos en gran diversidad de plantas y productos naturales en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson y también se ha estudiado su uso como paliativo del cáncer (Peiró, 2015).

Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales, en general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides como el ácido ascórbico (Muller, 2015).

Los tipos de antioxidantes antes mencionados se pueden encontrar tanto en alimentos procesados como alimentos naturales: avena, soya, té, granos de café, especias, arroz, aceites vegetales, papas, frutas, productos microbianos. Los antioxidantes contenidos en frutas y vegetales son efectivos en la prevención de enfermedades relacionada con el estrés oxidativo (Muller, 2015).

Existen muchos métodos para medir la capacidad de antioxidante de una sustancia, por ejemplo, el método de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), TEAC (capacidad

antioxidante como equivalentes Trolox), el DPPH (2,2 –difeníl -1- picrilhidrazilo) y ABST (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6- sulfonato de amonio) con persulfato de potasio, son métodos simples y de rápido análisis (Cofré, 2015).

#### *Método del radical catiónico ABTS*

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS• debido a la interacción con 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 ABST (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6- sulfonato de amonio) con persulfato de potasio, las mediciones se realizan a una longitud de onda de 734nm (Meza y col.,2015).

#### *Método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)*

El método consiste en evaluar la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína), en presencia de un iniciador de radicales libres, como los azocompuestos (AAPH). El AAPH (Dihidroclorato de  $\alpha,\alpha'$ -Azodiisobutiramidina), se utiliza como radical iniciador, que por descomposición térmica origina radicales peróxido que causan daño a las moléculas fluorescentes. En este método, los radicales peróxido oxidan a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia en presencia de un antioxidante, los ROO•, captan preferiblemente un átomo de hidrógeno de este, de forma que se disminuye dicha pérdida de fluorescencia. El método ORAC, mide por tanto el retraso, en presencia de compuestos antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia debida a la acción de radicales peróxido (López, 2015).

#### *Método DPPH (2,2-Difeníl-1-picrilhidrazilo)*

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante ya sea *in vitro* o *in vivo*, unas de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* consiste en determinar la actividad del antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento frente a sustancias cromógenas de naturaleza

radical. La actividad antioxidante de un compuesto puede evaluarse *in vitro* por medio de experimentos sencillos que examinan la habilidad y a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas (Barrón y col.,2011).

También se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la que técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. Este radical es susceptible de reaccionar con compuestos a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno proporcionado por el agente oxidante (Guija, Inocente, Ponce y Zarzosa, 2015).

Esta reacción se representa de la siguiente manera:



El fundamento del método DPPH, consiste en que, este reactivo es un radical libre, de color violeta intenso, que al ser expuesto a compuestos antioxidantes capaces de donar átomos de hidrogeno, provocan la reducción del DPPH, con la respectiva perdida del color violeta, quedando un color amarillo pálido (Guzman, 2009).

En la Figura 14, se muestra la reacción química entre el 2,2 – difenil-1- picrilhidrazilo (DPPH) y una molécula antioxidante.

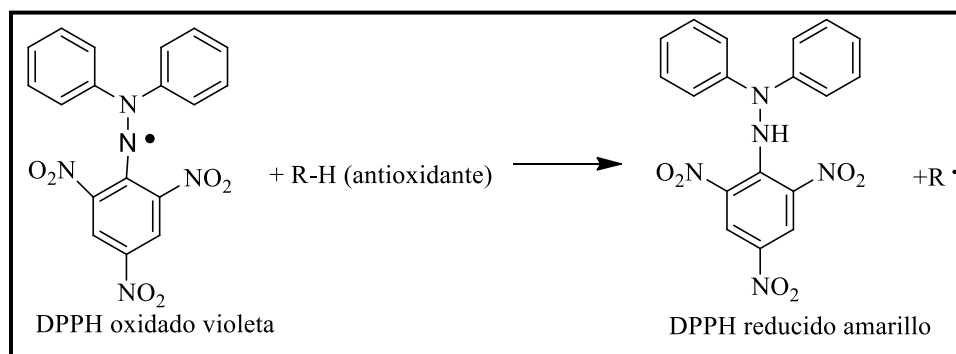


Figura 14. Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante.

## Actividad garrapaticida

### Garrapatas

Las garrapatas son artrópodos arácnidos de extensa distribución en el mundo, tienen importancia por su impacto en la salud humana y animal además constituyen un factor limitante en el desarrollo de la ganadería, especialmente en países cálidos tropicales y subtropicales. De esta manera la adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia, es la principal causante de grandes pérdidas económicas, sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y humanos es a través de los patógenos que transmiten (Mayahua, 2015).

Las garrapatas ocasionan graves lesiones a los bovinos tales como disminución en la producción de carne, en la producción de leche, daño a la piel y transmisión de enfermedades. De allí su gran importancia en identificarlas y conocer sus distribuciones en las aéreas de producción bovina ya que no todas las especies de garrapatas transmiten las mismas enfermedades ni el tratamiento para su control es el mismo (Hernández, 1999).

### *Especies de garrapata comunes en Venezuela*

Venezuela es un país tropical, apto para el desarrollo de actividades ganaderas cuenta con extensas aéreas de clima tropical favorables para el desarrollo de numerosos ectoparásitos. La

incidencia de garrapatas en Venezuela está altamente influenciada por las condiciones climáticas, durante la época de lluvias (mayo a octubre) las poblaciones disminuyen notablemente, en tanto que, en la época de verano, de (noviembre a abril), se incrementan considerablemente. La especie más prevalente es *R. microplus*, con un 85 %, seguida de *Amblyomma cajennense* con un 12 %. Esta situación cambia de una finca a otra en función del régimen de aplicación de acaricidas (Coronado, 1996).

Las especies de garrapatas que han sido citadas en el ganado bovino en Venezuela son las siguientes: *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum* y *Anocentor nitens* (Hernández, 1999). *Rhipicephalus microplus* (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*), la garrapata tropical del bovino, la cual fue reportada por primera vez en Venezuela en 1919. Este ixódido, es responsable por la transmisión de enfermedades hemotrópicas del bovino, tales como la babesiosis conocida también como fiebre del ganado y la anaplasmosis (Coronado, 1996).

Según, El Centro de Seguridad Alimentaria y Salud Pública (2007) (The Center for Food Security and Public Health), la especie *Rhipicephalus microplus*, es un miembro de la familia Ixodidae (garrapatas duras). Anteriormente se conocía a esta garrapata como *Boophilus microplus*, pero recientemente *Boophilus* se ha convertido en un subgénero del género *Rhipicephalus*. Las garrapatas duras poseen un escudo dorsal (scutum) y su aparato bucal (capitulum) sobresale cuando se observa desde arriba, posee un capitulum con base hexagonal. La placa espiracular tiene forma redonda u ovalada y los pedipalpos son pequeños, comprimidos y acanalados dorsalmente y lateralmente. Los machos tienen placas adanales y accesorias. El surco anal está ausente o poco definido en las hembras, y levemente visible en los machos.

### ***Políticas oficiales de control de garrapatas en Venezuela.***

La legislación oficial venezolana en materia de control de garrapatas fue aprobada en 1950, cuando el gobierno nacional a través del decreto número 80, señaló la necesidad de iniciar una campaña sistemática de control que ampliase la zona libre de garrapatas y lograrse la erradicación de estos ectoparásitos. Sin embargo, el control de garrapatas en Venezuela está basado exclusivamente en el uso de acaricidas, debiendo resaltar el hecho de que el mismo no responde a ninguna política oficial de control (campaña u otros) (Coronado,1996).

Debido a la falta de una política de control por parte del estado, la aplicación de estos acaricidas lo realizan los propios ganaderos, muchas veces desconociendo las características propias tanto de la especie de garrapatas a tratar como de los acaricidas empleados. Como ejemplo podemos citar que la bioecología de *B. microplus*, es desconocida por la gran mayoría de los ganaderos y, por lo tanto, el control de este ixódido se realiza a través de la aplicación de acaricidas cada 21 días, de acuerdo al ciclo de esta garrapata. Este hecho ha significado un incremento en la presión química sobre *B. microplus*, ocasionando cepas resistentes y aumentando los costos de producción (Coronado ,1996).

### ***Acaricidas usados en el campo.***

Existen en el mercado venezolano alrededor de 40 productos químicos con actividad acaricida. Los grupos más comunes son: organofosforados, diamidinas y piretroides sintéticos. En el mercado se comercializa la doramectina, del grupo de las avermectinas, que posee actividad acaricida y una alta eficacia contra *B. microplus*. Además, también son utilizados organoclorinados, fosforados y creosota. La principal razón de esta práctica es que estos productos son más baratos que los acaricidas, sin que se tomen las debidas precauciones en cuanto a toxicidad y forma de aplicación de estos compuestos químicos. (Coronado ,1996).

### ***Resistencia a acaricidas***

Los agentes acaricidas presentaron una evolución, tanto en el principio activo como en la vía de aplicación. Al comienzo, se realizaban exclusivamente por inmersión, actuando los principios activos por contacto directo y las formulaciones presentadas eran a base de organofosforados luego, por su menor toxicidad y mayor eficacia, aparecen alternativas de tratamiento con piretroides sintéticos y diformamidinas. En la actualidad, el control se realiza con agentes de administración parenteral o derrame dorsal (fipronilo, fluazuron, lactonas macrocíclicas) (Araque, Ujueta, Bonilla, Gómez y Rivera, 2014).

Es así, como la resistencia de diferentes especies de garrapatas a los productos garrapaticidas existe en la mayor parte de las regiones del mundo, donde se ha realizado control químico y es consecuencia de su uso inadecuado. El futuro de nuevos antiparasitarios, no sólo se encuentra comprometida por el progresivo aumento de los casos de resistencia y los crecientes costos de investigación y de desarrollo, sino también por cierta falta de conocimiento y de competencia para el descubrimiento de nuevas moléculas (Araque y col., 2014).

La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal. La resistencia cruzada (RC) es el mecanismo que utilizan especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico. La resistencia múltiple (RM) es la utilización de varios mecanismos hacia la acción de varias clases de insecticidas no relacionados químicamente (Alonso, Rodríguez, Fragosó y Rosario, 2006).

El primer reporte acerca de resistencia a garrapaticidas órganofosforados en Venezuela se realizó en 1970, en *Boophilus microplus*, posteriormente, otra cepa resistente a órganofosforado fue aislada de la región Central del país. Coronado (1996), cita un estudio donde se realizó la determinación de la sensibilidad en garrapatas provenientes de ocho estados de Venezuela, habiendo encontrado poblaciones de *B. microplus* resistentes a órganofosforados, coumafos y clorfenvinfos, y piretroides sintéticos como la cipermetrina. Algunas de esas poblaciones fueron tratadas con acaricidas a dosis diez veces mayor que la recomendada por los fabricantes, obteniéndose porcentajes de control bajos (menores de 50%). En teoría el primer síntoma clásico de resistencia a acaricidas es la presencia de ninfas ingurgitadas después de un tratamiento acaricida. En todo caso, la conducta a seguir por el ganadero puede ser: aumentar la dosis del acaricida en los tratamientos subsiguientes; cambiar de acaricida (por lo general cambian de nombres comerciales y con frecuencia el “producto nuevo” es la misma molécula del anterior) o procurar asistencia técnica (Coronado ,1996).

Según Coronado (1996), para el manejo de la resistencia a acaricidas, en años recientes se ha incremento considerable el uso de diamidinas en fincas con antecedentes de fallas terapéuticas, en específico el amitraz. No obstante, se espera que con el pasar del tiempo cepas resistentes a amitraz comiencen a aparecer en Venezuela, como ha ocurrido en otros países.

### ***Diagnóstico de la resistencia a acaricidas***

De acuerdo a lo referido por Benavides, Romero y Rodríguez (2014), existen dos métodos de aplicación para confirmar la presencia de resistencia a acaricidas: La primera es la utilización de pruebas de laboratorio (conocidas como pruebas in-vitro) y, la segunda, es la prueba biológica sobre animales experimentales (bovinos), la que se conoce como prueba in-vivo.

### *Pruebas in-vitro*

Las pruebas in-vitro a su vez se dividen en dos grupos: las que utilizan larvas y las que se realizan con garrapatas repletas (adultas). Cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas. En el primer tipo se requieren más de seis semanas para entregar los resultados, debido a que es necesario recolectar en la finca garrapatas repletas, esperar cuatro semanas para que nazcan las larvas y luego otras dos o tres hasta que tengan la edad adecuada para desarrollar la prueba. El uso de esta técnica permite disponer de un número amplio de individuos y evaluar cantidades importantes de principios activos y concentraciones de producto. En ellas se mide la capacidad del producto para matar (o inmovilizar) los individuos expuestos. Existen dos formas de exponer las larvas al acaricida: sumergiéndolas en suspensiones del producto, a partir de concentrados emulsionables disponibles en el mercado, por un determinado tiempo (técnica de emparedado o de Sha) o ponerlas en contacto con sobres impregnados con él. Esta última ha sido adoptada por la FAO como prueba estándar para el estudio de resistencia en todo el mundo (Benavidez y col., 2014).

Las técnicas que trabajan con garrapatas adultas se basan en la evaluación de parámetros de fertilidad, es decir, miden la capacidad de un producto para inhibir la postura de huevos por parte de la garrapata. Esta técnica es conocida como “prueba de inmersión de adultos” o técnica de Drummond y trabaja con base en productos comerciales ofreciendo información rápida sobre la situación de resistencia en condiciones de campo (es factible obtener resultados a las dos semanas). La desventaja de esta prueba es que requiere de un alto número de garrapatas adultas (100-200) de buena calidad, las que en ocasiones son difíciles de recolectar en condiciones de campo (Benavidez y col., 2014).

### *Pruebas in-vivo*

Se consideran la "prueba reina", ya que permiten conocer el grado de resistencia que ocurre realmente sobre los animales afectados, tratados adecuadamente con el producto que se evalúa. Consisten en infestar con garrapatas (de manera natural o artificial) a grupos de animales (10 - 15 cada uno), los que luego son tratados con el garrapaticida a evaluar, realizando posteriormente evaluaciones cuantitativas. Estos métodos requieren de infraestructura y personal entrenado, lo que las hace costosas y realizables solamente para fines de investigación (Benavidez y col., 2014).

### ***Métodos para determinar la actividad garrapaticida***

#### *Prueba de paquete de larvas (PPL)*

Está sustentada y desarrollada en una serie de ensayos con garrapatas *B. microplus* durante muchos años en el CSIRO, Australia y después descrita por Stone y Haydock (1962) y estandarizada por FAO (1999), fue adoptada por la FAO (2004), como la principal prueba de diagnóstico de resistencia en garrapatas. Consiste en exponer larvas de garrapatas en una superficie de papel filtro previamente impregnada con ixodicidas. La mortalidad larval se cuantifica 24 horas después (Rodríguez, 2005).

#### *Prueba de inmersión de larvas (PIL)*

Este método (Shaw 1966) no ha sido ampliamente usado en el diagnóstico de resistencia ni promovido por la FAO (2004). Generalmente emite un diagnóstico en aproximadamente seis semanas, el mismo tiempo requerido para la prueba de paquete de larvas. Se han realizado estudios comparativos donde se concluye que los resultados de la prueba de inmersión pueden ser comparados con los resultados del paquete de larvas (Rodríguez, 2005).

### *Prueba de inmersión de adultas (PIA)*

Esta prueba fue descrita y desarrollada por Drummond y col (1967), para determinar la eficacia de nuevos ixodicidas contra varias especies de garrapatas. Fue adaptada como prueba de resistencia en varios laboratorios, pero nunca fue estandarizada. Los bioensayos estandarizados para el diagnóstico de resistencia de una muestra de garrapatas son valiosos, porque fenotipan la respuesta poblacional al ixodicida. Posiblemente su principal desventaja es que requieren de gran número de larvas y varias semanas para obtener resultados. (Rodríguez, 2005)

### *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

En la Figura 15, se muestra la hembra adulta de garrapata *Rhipicephalus microplus* (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*). Considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. Una alta carga de estas garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir la babesiosis y la anaplasmosis. Bajo condiciones experimentales, esta garrapata puede transmitir *Babesia equi*, que causa la piroplasmosis equina (Roque, 2015).



Figura 15. Hembra adulta de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

En la Tabla 5 se muestra la taxonomía de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Tabla 5.

Taxonomía de *Rhipicephalus microplus* (Cordero del Campillo y col.,1999).

Reino	Animal
Phylum	Arthropoda
Subphylum	Chelicera
Clase	Aracnida
Subclase:	Acari
Grupo	Parasitiformes
Orden	Acarina
Sub-orden:	Ixodidea
Familia	<i>Ixodidae - Argasidae</i>
Géneros	<i>Boophilus, Amblyomma</i> <i>Dermacentor (Anocentor),</i> <i>Rhipicephalus</i>

### ***Ciclo biológico de Rhipicephalus microplus***

*R. microplus*, es una garrapata de un sólo huésped, pasa todos sus estadios de vida en un animal. Los huevos hacen eclosión en el medio ambiente y las larvas se arrastran por el pasto u otras plantas para encontrar un huésped. También pueden ser transportadas por el viento. En el verano, la garrapata *R. microplus* pueden sobrevivir durante un período de hasta 3 o 4 meses sin alimentarse (The Center for Food Security and Public Health, 2007).

Sin embargo, a temperaturas más frías pueden vivir sin alimento hasta seis meses. Las garrapatas que no pueden encontrar un huésped finalmente mueren de inanición. Las garrapatas recién nacidas (larvas) se suelen encontrar adheridas a las zonas más finas de la epidermis tales como la cara interna de los muslos, los flancos y las patas traseras. También se las puede observar en el abdomen y el pecho. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en

ninfas y posteriormente en garrapatas adultas (The Center for Food Security and Public Health, 2007).

Cada estadio de desarrollo (larva, ninfa y adulta) se alimenta una sola vez, pero la alimentación dura varios días. Las garrapatas macho adultas maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que están alimentándose. Una garrapata hembra adulta que se ha alimentado y apareado se separa de su huésped y deposita una gran cantidad de huevos en el medio ambiente. Por lo general, colocan los huevos en grietas o detritus, o debajo de las piedras. La garrapata hembra muere después de la oviposición (The Center for Food Security and Public Health, 2007).

#### ***Los hospedares de las garrapatas *R. microplus****

Suelen encontrarse en el hombre, caninos (depende de la presencia de bovinos), bovinos, equino, caprino, porcino doméstico, ovinos, tapir, zorros del *Lycalopex* sp (Navarrete, Rodríguez, Valle, Vargas y Romero, 2014).

#### ***Distribución Geográfica de *R. microplus****

La especie *R. microplus* se distribuye a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales. Esta garrapata es endémica en el subcontinente indio, gran parte de Asia tropical y subtropical, el nordeste de Australia, Madagascar, el sudeste de África, el Caribe, México y varios países en América Central y del Sur. Ha sido erradicada de EE.UU., pero algunas veces se la puede encontrar en Texas o California en la zona de cuarentena que sirve como área de amortiguamiento en la frontera con México (The Center for Food Security and Public Health, 2007).

*Tabla 6.*  
*Definición operacional de las variables de la investigación*

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicador</b>
Composición química	Independiente	Estudios químicos que permiten aislar e identificar metabolitos secundarios por diversos métodos (Plaza, 2015).	Mediante tamizaje fitoquímico	Presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos o esteroides, saponinas, quinonas, entre otros.	Aparición de un precipitado o turbidez, espuma y cambio de coloración o fluorescencia
Contenido de polifenoles totales	Independiente	Determinación del contenido de fenoles a través del ensayo Folin Ciocalteu. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo a pH básico, se observa cambio a color azul y se determina espectrofotométricamente a 765 nm (García y col., 2015).	Mediante cuantificación de fenoles totales	Presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, entre otros.	Contenido de fenoles totales expresados en $\mu\text{g}$ de ácido gálico/mg de extracto.

Continuación de la Tabla 6.

*Definición operacional de las variables de la investigación*

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicador</b>
Actividad antioxidante	Dependiente	La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres, como el DPPH (Londoño, 2012).	Método de DPPH	Compuestos: fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros	Porcentaje de inhibición. (%I) del radical libre. IC50
Actividad garrapaticida	Dependiente	Es la capacidad que poseen ciertas sustancias químicas, orgánicas, inorgánicas o microbiológicas, líquidas o sólidas de producen efectos tóxicos sobre las garrapatas (Bedmar, 2011).	A través de Prueba de paquete de larvas (PPL).	Se determina la capacidad de ciertos compuestos químicos de ocasionar la muerte de la garrapata, como las saponinas, alcaloides, entre otros.	% de mortalidad Dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> )

**Hipótesis.**

*Brownea grandiceps* Jacq, es una especie del género *Brownea*, a la cual se le han reportado múltiples usos farmacológicos, asociados a su composición química, por lo anteriormente expuesto es posible que los extractos de hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq, recolectada en el estado Mérida Venezuela, presenten actividad antioxidante y tengan utilidad como garrapaticidas.

**Hipótesis Nula.**

*Brownea grandiceps* Jacq, es una especie del género *Brownea* a la cual se le han reportado múltiples usos farmacológicos, asociados a su composición química, por lo anteriormente expuesto es posible que los extractos de hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq, recolectada en el estado Mérida Venezuela, no presenten actividad antioxidante y no tengan utilidad como garrapaticidas.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

Según Arias (2006), la metodología de un trabajo de grado incluye el tipo o tipos de investigación, así como las técnicas y procedimientos que serán utilizados para llevar a cabo la investigación. A continuación, se describe como se llevó a cabo esta investigación:

#### **Tipo de investigación.**

Esta investigación es de tipo confirmatorio, según Hurtado (2000) lo define como las posibles relaciones entre eventos a partir del control de una serie de variables. En este trabajo se estudió la composición química de *Brownea grandiceps* y su actividad biológica con el fin de comprobar la relación que existe entre ambas.

#### **Diseño de investigación.**

El diseño de la investigación se refiere al plan o estrategia concebida para dar respuesta a las preguntas de investigación. El diseño de esta investigación es experimental, según Arias (2006) el diseño experimental consiste en someter a un objeto o grupo de individuos, a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente).

Esta investigación se efectuó con un diseño experimental, ya que la especie vegetal fue sometida a determinados tratamientos, para observar los efectos y reacciones. El estudio se realizó en: Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis; En el departamento de Ciencias de Los Alimentos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y en el Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, en un lapso de tiempo determinado.

### **Población y muestra.**

Según Arias (2006), se entiende por la población el conjunto finito o infinito de elementos con características comunes, para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación, ésta queda limitada por el problema y por los objetivos de estudio. La población en la investigación está conformada por la planta del género *Brownea* perteneciente a la familia Leguminosae.

Respecto a la muestra, Arias (2006) establece que es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población. Es decir, representa una parte de la población objeto de estudio y se debe asegurar que sea lo suficientemente representativa para que permita hacer generalizaciones. En esta investigación, la muestra fue la planta de la especie *Brownea grandiceps* Jacq, que fue recolectada en el jardín botánico de Mérida, estado Mérida (Venezuela), la muestra a su vez está constituida por tallos, hojas, frutos y flores.

### **Instrumento de recolección de datos.**

Por otro lado, las técnicas de recolección de datos son definidas por Tamayo (1999), como la expresión operativa del diseño de investigación y que especifica concretamente como se hará la investigación. La recolección de datos se hizo con cuadernos de trabajos, para llevar los registros de los resultados de cada prueba realizada, con el fin de elaborar tablas las cuales permitirán el reporte en un orden lógico y secuencial de los datos obtenidos en dicha investigación.

## **Procedimientos de la investigación.**

### ***Recolección del material vegetal***

Las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq se recolectaron en la Parroquia Milla, Sector avenida Alberto Carnevali, Jardín Botánico de Mérida, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes, Municipio Libertador estado Mérida.

Se tomaron tallos con hojas, frutos y flores para su identificación y elaboración del vaucher. La planta fue identificada por el profesor Ender Fernández encargado del Jardín Botánico de Mérida, Mérida estado Mérida. En la Figura 16, se muestra el proceso de recolección del material vegetal.



*Figura 16.* Recolección del material vegetal de *Brownea grandiceps* Jacq.

Luego se procedió a depositar un vaucher en el herbario MERF “Dr. Luis Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de fecha 26 de marzo de 2019, con número 07 de la colección, con una breve descripción de la planta (Figura 17).


 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA MÉRIDA- VENEZUELA HERBARIO	<i>Fecha:</i> 26-02-2019	<i>Colectores:</i> Ender Fernández, Daisy González & Marielba Morillo	<i>Número:</i> 07
	DET.		
CAESALPINIACEAE			
<u>Brownea grandiceps</u> Jacq Árbol de 3 a 8. De alto, de tronco delgado y diversamente ramificado, hojas compuestas, y péndulas en su estado juvenil, tienen aspecto de estar marchitas luego van tomando una coloración verde oscuro. Inflorescencias grandes vistosas en forma de cabezuelas, nacen directamente del tronco de las ramas gruesas. Frutos en legumbres de unos 25 cm. de largo y de aspecto coriáceo			
<u>LOCALIDAD:</u> Venezuela. Edo. Mérida. Municipio. Libertador. Núcleo La Hechicera. Jardín Botánico de Mérida			
<u>Altitud:</u> m.s.n.m. aprox.			

Figura 17. Vaucher de *Brownea grandiceps* Jacq.

### ***Preparación de los extractos vegetales***

Para esta investigación se tomó aproximadamente 1 Kg del material vegetal, se procedió a moler y secar en una estufa a 45 °C por 48 horas. Luego se tomó 200 g del material (seco y molido) y se colocó en un erlenmeyer con aproximadamente 200 mL de hexano. La maceración se realizó tanto en hojas y tallos. Este proceso se repitió 3 veces, se filtró y se evaporó el solvente, usando el rotaevaporador IKA RV 10 digital a 45 °C, este procedimiento se realizó de la misma forma con diclorometano y metanol, y cada uno de los extractos se almacenaron en frascos tapados, rotulados y previamente tarados.

En la Tabla 7, se muestra la cantidad en gramos (g), de cada uno de los extractos obtenidos y el rendimiento en porcentaje (%):

Tabla 7

*Rendimiento de los extractos obtenidos*

Extractos	Cantidad (g)		Rendimiento (%)	
	Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
Hexanoico	1,96	1,78	0,98	0,89
Diclorometanoico	1,23	1,15	0,62	0,58
Metanólico	2,32	2,05	1,16	1,03

***Tamizaje fitoquímico***

La determinación de la composición química a través de tamizaje fitoquímico, se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA, bajo la supervisión de la profesora Marielba Morillo.

Para la determinación de ciertos compuestos químicos presentes en los extractos de *Brownea grandiceps* Jacq se realizaron una serie de pruebas químicas:

*Terpenos y/o esteroides*

Ensayo de Lieberman – Burchard

Técnica:

Se disolvieron los tres extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro, se añadió 0,5 mL de anhídrido acético y se procedió a agregar cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva la prueba cuando apareció una coloración roja o verde.

### *Alcaloides*

#### Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer

##### Técnica:

Se pesó aproximadamente 100 mg de cada uno los extractos metanólicos (tallos y hojas), en tubos de ensayos y se le adicionó a cada tubo, 10 mL de HCl 10 %, se colocaron los tubos en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos. Luego se filtró cada tubo y el filtrado se distribuyó en los 3 tubos de ensayo, además se le adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer), la aparición de turbidez o un precipitado, indica la positividad de las pruebas.

### *Saponinas*

#### Ensayo de la espuma

##### Técnica:

Se colocó en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se le adiciono un 1 mL de agua, se agitó vigorosamente durante un minuto. La prevalencia de espuma durante más de 5 minutos indicó la positividad de la prueba.

### *Taninos*

#### Prueba de la gelatina

##### Técnica:

Se disolvió el extracto metanólico (tallos y hojas) en agua, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto acuoso. La producción de desnaturalización de la proteína que se evidenció con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, indicó la positividad de la prueba.

### *Flavonoides*

#### Ensayo de Shinoda

##### Técnica:

Se colocó un 1 mL de solución de cada extracto, en un tubo de ensayo, se le añadió algunas virutas de magnesio (Mg), se adicionó cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de ácido clorhídrico (HCl) concentrado. La aparición de color naranja se consideró una prueba positiva.

### *Polifenoles*

#### Prueba con FeCl<sub>3</sub>

##### Técnica:

A 1 mL de solución alcohólica de los extractos diclorometanoico y metanólico (tallos y hojas), en un tubo de ensayo, se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La formación de color azul o verde indico la presencia de fenoles.

### *Quinonas*

Técnica: Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto metanólico (tallos y hojas) disuelto en etanol en un tubo de ensayo. La prueba se considera positiva si se presenta una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.

### *Cumarinas*

Técnica: Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto metanólico (tallos y hojas) en tubo de ensayo. La prueba se considera positiva si se presenta una fluorescencia azul- violeta bajo luz UV.

### *Determinación de fenoles totales por el método Folin- Ciocalteu*

La determinación de los polifenoles totales se llevó a cabo en el Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos y el Instituto de Investigaciones de La Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Bajo la supervisión de las Profesoras: María Eugenia Rondón y Marielba Morillo.

#### Procedimiento:

Se inició preparando la solución de ácido gálico en un matraz aforado, 50 mg de ácido gálico se disolvió en 100 mL de etanol (o acetona: agua 1:1 v/v), esta solución debe conservarse en refrigeración.

Luego se preparó la solución de carbonato de sodio 0.7 M y se disolvió en 74,19 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua desmineralizada y se lleva a ebullición. Dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente y completar hasta 1L de agua.

Se elaboró una curva de calibración preparando una solución inicial del patrón (ácido gálico) a 50 mg/L, para tal fin, se diluyó 10 mL de la solución madre de ácido gálico hasta 100 mL con etanol (o acetona: agua 1:1 v/v) (Ainsworth y Gillespie, 2007).

En la Tabla 8 se muestran las diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración, y las diferentes proporciones en mL de los diferentes componentes de la reacción de Folin-Ciocalteu.

Tabla 8  
*Diferentes concentraciones de ácido gálico, con la que se construyó la curva de calibración*

<b>Componentes de la Reacción</b>	<b>Concentración en mg/L</b>					
	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
Solución de patrón ácido gálico	0	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8
Etanol (acetona/agua 1:1) (mL)	1	0,8	0,6	0,5	0,2	0
Reactivo Folin Ciocalteu (mL)	2	2	2	2	2	2
Reactivo carbonato-tartrato (mL)	8	8	8	8	8	8

**Procedimiento:**

Mezclar bien los tubos, utilizando un agitador vortex, colocarlos en la oscuridad, esperar 30 minutos para que se desarrolle el color azul y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 760 nm. Trazar la curva de calibración concentración/absorbancia (Ainsworth y Gillespie, 2007).

Análisis de los extractos: tomar 1 mL de la muestra filtrada y añadir 0,5 mL de Rx Folin Ciocalteu y a los dos minutos 2 mL de solución de carbonato de sodio, esperar 30 minutos para que se desarrolle el color. Efectuar la lectura en el espectrofotómetro a 760 nm y extrapolar los valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración de compuestos fenólicos en el extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

***Contenido de compuestos fenólicos***

La determinación de fenoles totales en el extracto metanólico de las partes aéreas de *B. grandiceps*, es considerado un valor arbitrario, ya que se relaciona la absorbancia de la muestra con la absorbancia del fenol estándar, a través de sus respectivas curvas de calibración, se determina de acuerdo a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración del ácido gálico (y

= ax + b). Las cantidades reportadas, se expresarán como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por mg de extracto (Ainsworth y Gillespie, 2007).

### ***Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH***

La determinación de actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq, se realizó en el Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la supervisión de la prof. Marielba Morillo y el Prof. Tomas Visbal.

#### Técnica

1. Se realizó un barrido inicial de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq para determinar si tiene la actividad antioxidante. Para ello se tomaron 4 mg de cada uno de los extractos en tubos eppendorf y se disolvieron en un 1 mL de metanol.
2. El ensayo se realizó por triplicado utilizando 3 tubos para cada uno de los extractos, los cuales contenían 700  $\mu\text{L}$  de DPPH y 300  $\mu\text{L}$  del mismo, estos se dejaron en reposo durante 30 minutos en la oscuridad.
3. Luego de los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation a una longitud de onda de 517 nm.
4. De los extractos que presentaron actividad antioxidante en el barrido inicial, es decir un porcentaje de inhibición (% I) mayor o igual a 50, se prepararon soluciones madre de concentración de 1 mg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones y se procedió a determinar la actividad antioxidante (Tabla 9).
5. Se realizó una curva patrón de ácido ascórbico partiendo de una solución madre con una concentración de 0,176 mg/mL.

En la Tabla 9, se muestran las diluciones para preparar una solución madre de concentración 1 mg/mL. En la misma se muestra las cantidades en  $\mu\text{L}$  de la solución madre y metanol.

Tabla 9

*Diluciones empleadas para preparar la solución madre a una concentración 1 mg/mL.*

	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$
Solución madre (1mg/mL)	500 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Metanol	500 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	850 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	975 $\mu\text{L}$

Las diluciones para realizar la curva del ácido ascórbico se muestran en la Tabla 10. Donde se pueden observar las diferentes proporciones en  $\mu\text{L}$  de solución madre y metanol.

Tabla 10

*Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico.*

	Concentración $\mu\text{g/mL}$			
	100	75	50	25
Solución madre (176 $\mu\text{g/mL}$ )	568,2 $\mu\text{L}$	426,1 $\mu\text{L}$	284,1 $\mu\text{L}$	142,1 $\mu\text{L}$
Metanol	431,8 $\mu\text{L}$	573,9 $\mu\text{L}$	715,9 $\mu\text{L}$	857,9 $\mu\text{L}$

En la Figura 18, se muestra instrumento y material utilizado para la preparación de las diluciones del extracto metanólico de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq.

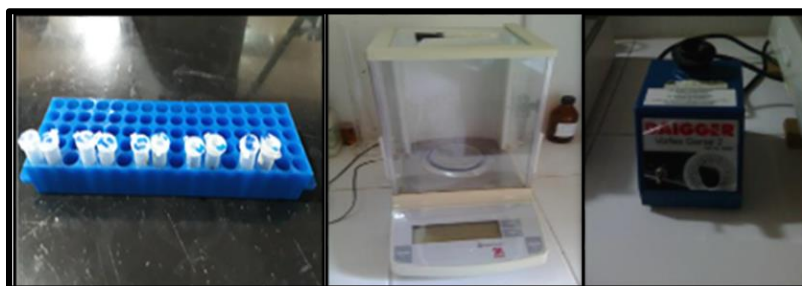


Figura 18. Instrumento y material utilizado para la preparación de las diluciones del extracto metanólico de hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq.

***Determinación de la actividad garrapaticida por el método Prueba de paquete de larvas (PPL).***

La determinación de la actividad garrapaticida de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps*, se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia, del Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, bajo la supervisión de las profesoras: María Eugenia Rondón, Vanesa Hernández y Marielba Morillo.

**Identificación del parásito.**

La especie de garrapata utilizada en esta investigación fue identificada por el Prof. Antonio Ascensão del Laboratorio de Biodiversidad de Artrópodos, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. ULA. Su nombre científico es *Rhipicephalus microplus*, de la Familia Ixodidae-Argasidae.

**Recolección de los parásitos en el ganado vacuno.**

La recolección de las garrapatas, se realizó el día 12 de julio de 2019, en la finca del señor Humberto Belandria, ubicada en el sector el Filo Chiguará, Municipio Sucre estado Mérida, para tal fin se tomaron 30 garrapatas adultas y llenas de sangre directamente del animal y se almacenaron en un frasco con tapa.

***Inmovilización de la garrapata***

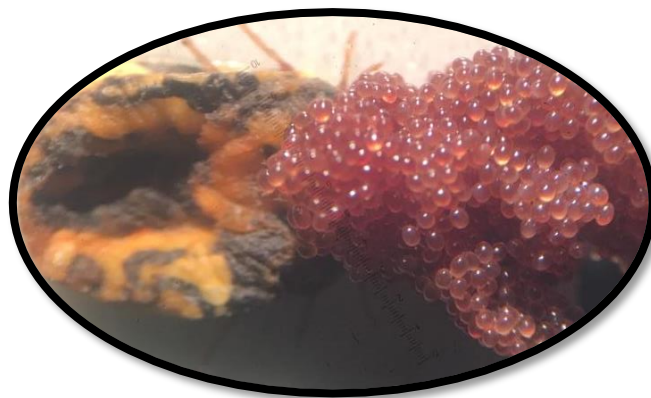
Para la inmovilización de la garrapata se utilizaron 30 garrapatas *R. microplus*, adultas ingurgitadas, las cuales se pegaron con cinta adhesiva en placas de vidrio, para obtener la masa de huevos tras su incubación por 18 días a  $26^{\circ} \text{C} \pm 85 \% \text{HR}$  (húmeda relativa) en cabinas de vidrio o incubadora.

En la Figura 19, se observa la inmovilización de las garrapatas adultas



*Figura 19. Inmovilización de las garrapatas adultas  
Obtención de los huevos*

Después de aproximadamente 7 días desde la recolección (19 de julio de 2019), ocurrió la ovoposición (Figura 20). La masa de huevos de *R. microplus*, se recolectó en tubos de ensayo tapados con algodón en cantidad suficiente para no permitir la fuga de las larvas (Figura 25), fueron llevados a incubación nuevamente bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad por 21 días.



*Figura 20. Oviposición de huevos de R. microplus*

#### *Obtención de las larvas.*

Luego de la eclosión de los huevos se dejan madurar las larvas por 14 días más. En la (Figura 21) se muestra las larvas de *R. microplus* observadas con la lupa estereoscópica.

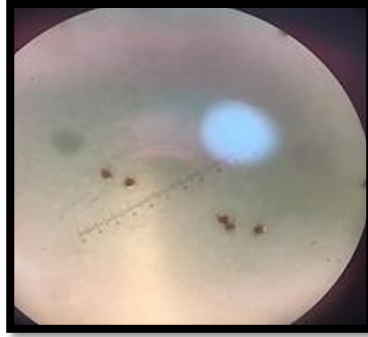


Figura 21. Larvas de *R. microplus* observadas con la lupa estereoscópica  
*Desarrollo de la prueba.*

Utilizando capsulas de Petri con un papel filtro adosado en el fondo, se realizó una prueba inicial a la concentración máxima del extracto metanólico de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq., al 20 % (para tal fin se pesaron 2 g del extracto de *B. grandiceps* Jacq de tallos y hojas, y se diluyó hasta 10 mL en una solución de Tween 80 en agua destilada al 2%), para saber si los extractos mostraban actividad o no sobre las larvas de garrapata. En la (Figura 22), se muestra la solución Tween 80 utilizada y la forma como fueron sembradas las larvas de garrapatas en el papel de filtro impregnadas con el control positivo (3 capsulas) control negativo (3 capsulas) y extractos al 20 % (3 capsulas cada uno) que se encuentra en el fondo de la capsula de Petri.

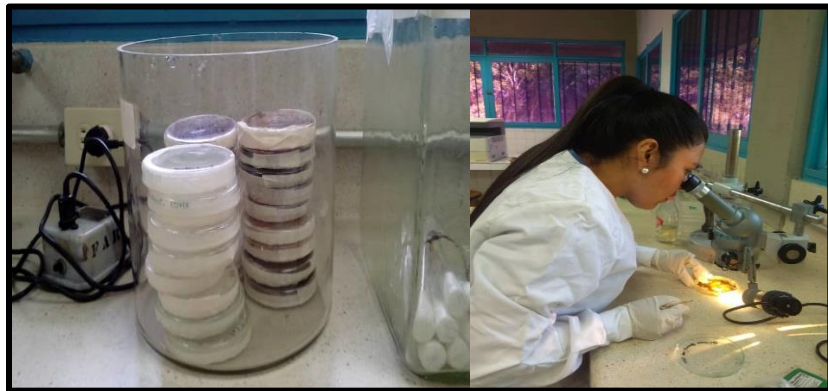


Figura 22. se muestra la solución Tween 80 utilizada y la forma como fueron sembradas las larvas de garrapatas en el papel de filtro

### *Control positivo y control negativo*

Se prepararon tres capsulas del control negativos con (Solución Tween 80 al 2 % en agua destilada) y tres capsulas para el control positivo con el medicamento ivermectina (diluida con agua destilada al 0,1%).

Todas las capsulas (extracto y controles) fueron colocadas en una cámara de vidrio a las mismas condiciones de temperatura y humedad explicadas anteriormente y se esperó 24 horas para hacer el conteo de las larvas muertas y vivas utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas. En la Figura 23, se muestra la cámara de vidrio donde se colocaron las capsulas y la forma como se hizo, el conteo de larvas muertas y vivas de las garrapatas, utilizando una lupa estereoscópica.



*Figura 23.* Se muestra la cámara de vidrio donde se colocaron las capsulas y la forma como se hizo, el conteo de larvas muertas y vivas de las garrapatas, utilizando una lupa estereoscópica.

En caso de que algunos de los extractos muestren actividad contra las larvas de garrapata, se realizaran 5 concentraciones más del mismo, de 10 %, 5 %, 2,5 %, 1,25 %, 0,625 %, usando el mismo control positivo y negativo, se probaría la actividad garrapaticida por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento.

### *Determinación del porcentaje (%) de mortalidad.*

Se consideran larvas muertas aquellas que no caminan ni mueve sus patas. Se contará el número de larvas muertas por capsula y el total de larvas por capsula utilizando una lupa estereoscópica y pinzas entomológicas calcula mortalidad corregida con la fórmula de Abbott (1925).

Esta corrección se logra a través de la fórmula de Abbott, en la cual:

$$\% Mc = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

Donde:

% Mc = Porcentaje de mortalidad corregida

X = Porcentaje de larvas vivas en el control

Y = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento

Si el porcentaje de mortalidad en el control excede el 20 %, se debe descartar el bioensayo para ser repetido nuevamente (Busvine 1971).

### **Estudio Estadístico.**

El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics editor de datos, versión 21 Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Brownea grandiceps* Jacq.**

La composición química, se determinó a través de pruebas específicas de laboratorio y se pudo comprobar en los extractos de las hojas de *B. grandiceps*, la presencia de los siguientes compuestos: En los extractos hexanoico y diclorometanoico, esteroides y en el metanólico alcaloides, esteroides, polifenoles, taninos y flavonoides

En los extractos de los tallos de *B. grandiceps* se determinó la presencia de los siguientes compuestos: En el extracto hexanoico terpenos; en el diclorometanoico esteroides; y en el metanólico alcaloides, polifenoles, taninos y flavonoides.

En la Tabla 11 y Figura 24, se presentan los resultados del estudio fitoquímico de los extractos hexanoico, diclorometanoico y metanólico de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq.

Tabla 11.

Estudios fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq

Metabolitos Secundarios	Prueba	Extractos de <i>Brownea grandiceps</i> Jacq					
		Hojas.			Tallos		
		Hexanoico	Diclorometanoico	Metanólico	Hexanoico	Diclorometanoico	Metanólico
Alcaloides	Dragendorf			+++			+++
	Wagner			+++			+++
	Mayer			+++			+++
Esteroles	Liebermann-Bucher	+++	+++	+++	-	+++	-
Terpenos	Liebermann-Bucher	-	-	-	+++	-	-
Compuestos fenólicos / taninos	FeCl <sub>3</sub>	ND	-	+++	ND	No determinado	+++
Taninos	Prueba de la gelatina	ND	ND	+++	ND	No determinado	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	++	-	-	++
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-	-	-	-
Cumarinas Quinonas	y Prueba NH <sub>4</sub> OH	-	-	-	-	-	-

+++ Muy abundante, ++ abundante, + presente en poca concentración, - ausente.

ND: no determinado.

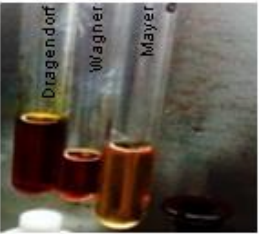
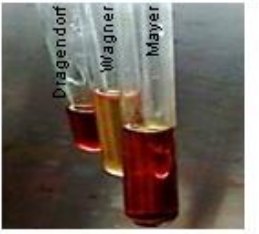

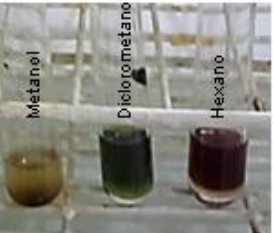
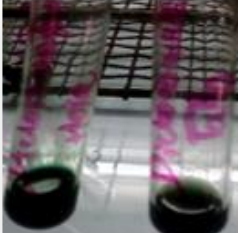


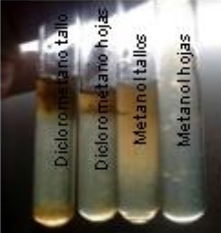
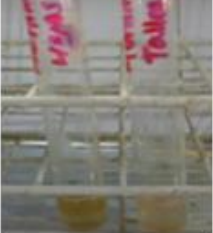
		
Alcaloides	Alcaloides	Polifenoles
Extractos metanólicos hojas	Extractos metanólicos tallos	Extractos metanólicos hojas y tallos
		
Esteroles y terpenos	Esteroles y terpenos	Esteroles y terpenos
Extractos metanólico, diclorometanoico y hexanoico tallos	Extracto diclorometanoico hojas y tallos	Extracto metanólico Tallos y hojas
		
Flavonoides	Saponinas	Taninos
Extracto metanólico tallos y hojas	Extracto diclorometanoico y metanólico tallos y hojas	Extractos metanólicos hojas y tallos

Figura 24. Estudios fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de *Brownia grandiceps* Jacq

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, coinciden con los reportados por Mostafa y col. (2019) en extractos de las hojas de *B. grandiceps*, recolectada en Giza, Egipto; Pereira y col., (2017). Sin embargo, difieren del resultado de Pereira y Brazón (2015), quienes también reportaron presencia de cumarinas y saponinas, mientras que, en nuestro estudio, no se encontraron dichos metabolitos. Esto podría deberse a diferentes factores ambientales

como luz, temperatura y precipitaciones, que pueden variar dependiendo del lugar y de la época del año (Acosta, 2003).

De acuerdo, a los estudios de Waterman y Mole (1994), el contenido de metabolitos secundarios está influenciado, por características ambientales como la radiación solar y la disponibilidad de agua, la madurez de la planta, la velocidad de crecimiento, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades, así como por el genotipo de la planta (la especie y la variedad).

Acosta (2003), afirmó que la luz es considerada un factor determinante en el crecimiento de tejidos jóvenes los cuales son responsables de una mayor producción y acumulación de metabolitos activos. De igual forma la temperatura puede acelerar el crecimiento y los procesos de fotosíntesis y respiración y esto puede afectar directamente la producción de principios activos, mientras que, las precipitaciones se relacionan con la regulación de la temperatura.

Igualmente, la disponibilidad de agua contribuye a la producción de taninos condensados; al encontrarse en periodo de escasez de agua, las plantas cierran sus estomas y restringen el proceso de fotosíntesis. De este modo se esperaría una relación negativa entre el estrés hídrico y la producción de estos compuestos (Varón y Granados, 2012).

Por otro lado, características de la planta como el contenido de agua, proteínas y metabolitos secundarios generalmente cambian durante la estación de crecimiento y estado de desarrollo de las plantas, por ejemplo, algunos compuestos presentan diferencias significativas en hojas jóvenes y maduras (Valares, 2011). Por tanto, la edad de la planta es

otro aspecto que pudo haber influido en que no se hayan aislado cumarinas y saponinas en el presente estudio.

Otro aspecto a tomar en cuenta es la parte de la planta utilizada. Se ha demostrado que las plantas presentan distintas productividades de metabolitos secundarios y que se acumulan cantidades de metabolitos diferentes de acuerdo con la parte de la planta a la cual corresponde tal acumulación (Varón y Granados, 2012).

**Cuantificación de fenoles totales de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *B. grandiceps*.**

***Curva de calibración del ácido gálico***

Para la determinación del contenido de fenoles totales se realizó una curva de calibración utilizando como patrón el ácido gálico. En la Tabla 12, se muestran las lecturas de absorbancia de las distintas concentraciones de ácido gálico.

Tabla 12  
*Lectura de absorbancia de las distintas concentraciones de la solución de ácido gálico empleada como patrón.*

Concentración de Ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia a 760 nm		
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$
10	0,118	0,193	0,155
20	0,362	0,432	0,397
25	0,532	0,574	0,553
40	0,919	0,925	0,922
50	1,100	1,098	1,099

En el Grafico 1 se muestra las curvas de calibración del ácido gálico.

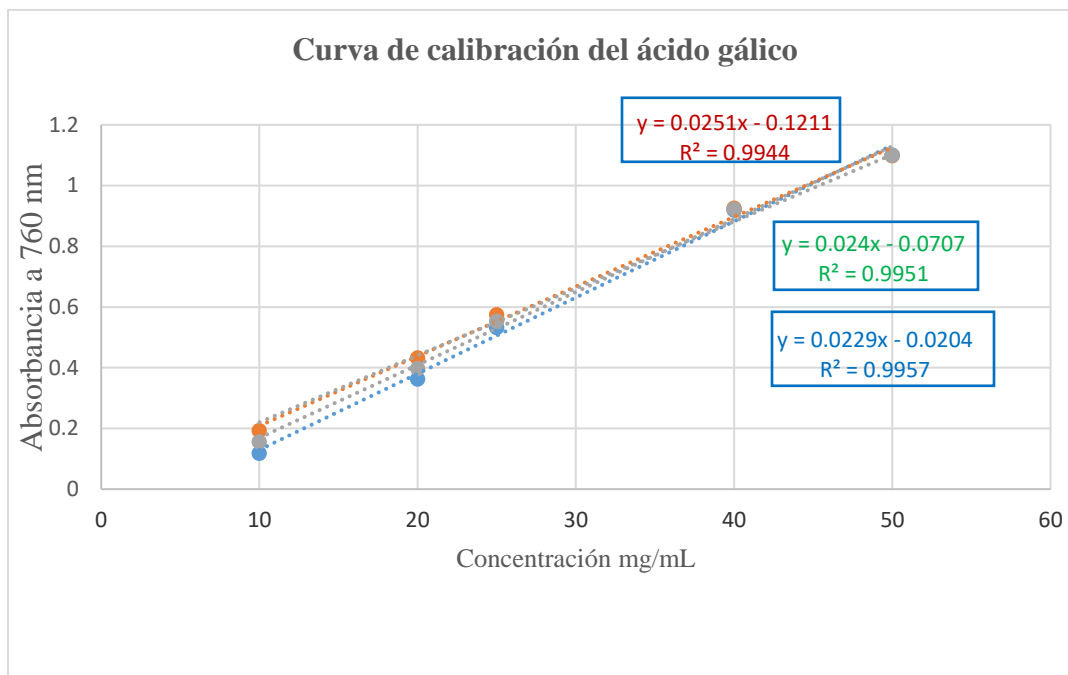


Gráfico 1. Curva de calibración de ácido gálico

Las curvas de calibración del ácido gálico, se realizaron por triplicado, y las correspondientes ecuaciones de la recta ( $y = 0.0251x - 0.1211$ ,  $R^2 = 0.9944$ ;  $y = 0.024x - 0.0707$ ,  $R^2 = 0.9951$ ;  $y = 0.0229x - 0.0204$ ,  $R^2 = 0.9957$ ), se emplearon para cuantificar el contenido total de fenoles en la muestra analizada, Los valores de absorbancia de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps*, fueron reemplazados en la ecuación, pudiéndose determinar el contenido total de fenoles en  $\mu\text{g AG/mg}$  de extracto seco (Tabla 13). El contenido de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas fue  $0,888 \pm 0,07 \mu\text{g AG/mg}$  de extracto y el del extracto metanólico de los tallos,  $0,886 \pm 0,07 \mu\text{g AG/mg}$  de extracto.

Tabla 13

*Cuantificación de fenoles totales* de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *B. grandiceps*.

Extracto	Concentración μg/mL	Absorbancia 760 nm			[ ] μg AG/mg de extracto seco			[ ] μg AG/mg de extracto seco ± DE
		λ <sub>1</sub>	λ <sub>2</sub>	λ <sub>3</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	
Metanólico hojas	50	1,133	1,135	1,131	0,89	0,81	0,97	0,888 ± 0,07
Metanólico tallos	50	1,133	1,130	1,130	0,89	0,80	0,97	0,886 ± 0,07
Blanco		0,062	0,062	0,062				

AG = ácido gálico

Para el extracto metanolico de hojas, existen diferencias estadísticamente significativa entre datos ( $p < 0,05$ ), Para el extracto metanolico de tallos, no existen diferencias estadísticamente significativa entre datos ( $p > 0,05$ ), con un nivel de confianza de 95%.

De acuerdo a los resultados, se puede inferir que los extractos metanólico de hojas y tallos de *B. grandiceps* contienen compuestos fenólicos, particularmente relacionados con el ácido gálico, considerando que la composición química de los extractos metanólicos de hojas y tallos de la especie en cuestión, presentaba compuestos fenólicos, flavonoides y taninos.

Son pocos los estudios reportados sobre el contenido de polifenoles en *B. grandiceps*, sin embargo, Lizcano y col. (2010), reportaron en los extractos de la corteza de *Brownea rosademonte* un elevado contenido de fenoles totales con  $17,18 \pm 0.24$  mg AG/g de extracto, el cual es un resultado mucho mayor que el reportado en nuestro estudio. Cabe mencionar que la investigación de Lizcano y col., se realizó en los extractos de la corteza de la planta únicamente.

De igual forma, se ha reportado que la familia Fabaceae, es rica en compuestos fenólicos tanto taninos como no taninos. La concentración de estos compuestos, puede variar en función de la temperatura a la cual la especie crece como: La fertilidad del suelo, del estado de madurez de la planta y de la especie. En este sentido, la precipitación baja o alta y

duración del periodo son condiciones ambientales a las cuales las fabáceas forrajeras tropicales están expuestas durante su crecimiento. Esto puede limitar la acumulación de biomasa y modificar la concentración de metabolitos secundarios (García, Bolaños, Lagunes, Ramos y Osorio, 2015).

Según los estudios de García y col. (2015), los meses secos, la edad del rebrote (madurez de la planta) y su interacción tienen efecto significativo en la concentración de polifenoles totales en las plantas de esta familia.

***Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de B. grandiceps.***

En la Tabla 14, se muestra el estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de *B. grandiceps* y en la Tabla 15, el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 14  
*Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de B. grandiceps.*

		Absorbancia 760 nm	µg AG/mg de extracto
N	Válidos	3	3
	Perdidos	0	0
Media		1,1330	0,8900
Mediana		1,1330	0,8900
Moda		1,13 <sup>a</sup>	0,81 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,00200	0,08000
Varianza		0,000	0,006
Rango		0,00	0,16
Mínimo		1,13	0,81
Máximo		1,14	0,97
Suma		3,40	2,67

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 15

*Análisis de varianza de ANOVA de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de las hojas de B. grandiceps.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	0,013	1	0,013	.	0,000
Residual	0,000	1	0,000		
Total	0,013	2			

La variable independiente es absorbancia a 760 nm.

La variable dependiente concentración en µg AG/mg de extracto.

En la Tabla 16 se muestra el estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de los tallos de *B. grandiceps* y en la Tabla 17, el análisis de varianza ANOVA.

Tabla 16

*Estudio estadístico de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de tallos de B. grandiceps.*

		Absorbancia 760 nm	µg AG/mg de extracto
N	Válidos	3	3
	Perdidos	0	0
Media		1,1310	0,8867
Mediana		1,1300	0,8900
Moda		1,13	0,80 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,00173	0,08505
Varianza		0,000	0,007
Rango		0,00	0,17
Mínimo		1,13	0,80
Máximo		1,13	0,97
Suma		3,39	2,66

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 17  
*Análisis de varianza de ANOVA de la cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de los tallos de B. grandiceps.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	0,000	1	0,000	0,001	0,978
Residual	0,014	1	0,014		
Total	0,014	2			

La variable independiente es absorbancia a 760 nm.

La variable dependiente concentración en µg AG/mg de extracto.

### Actividad antioxidante de los extractos, de las hojas y tallos de *B. grandiceps*, por el método DPPH.

#### *Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH*

La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, para tal fin, se realizó un barrido a los extractos de hojas y tallos de *B. grandiceps* con el fin de conocer si estas tenían actividad antioxidante importante. Los resultados del barrido preliminar se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18  
*Actividad antioxidante de los extractos del tallo de Brownea grandiceps Jacq a 4 mg/mL*

Extractos	Absorbancias				% I
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	Promedio $\lambda$	
Hojas					
Hexanoico	0,086	0,086	0,086	0,086	85,6
Diclorometanoico	0,300	0,310	0,318	0,309	48,4
Metanólico	0,089	0,090	0,088	0,089	85,1
Tallos					
Hexanoico	0,555	0,558	0,550	0,554	7,5
Diclorometanoico	0,507	0,516	0,521	0,514	14,2
Metanólico	0,099	0,101	0,100	0,100	83,3
DPPH	0,599	0,599	0,599	0,599	-

*Cálculos del porcentaje de inhibición, de los extractos de las hojas de B. grandiceps*

Extracto hexanoico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,086}{0,599} \times 100 = 85,6 \%$$

Extracto diclorometanoico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,309}{0,599} \times 100 = 48,4 \%$$

Extracto metanólico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,089}{0,599} \times 100 = 85,1 \%$$

*Cálculos del porcentaje de inhibición, de los extractos de los tallos de B. grandiceps*

Extracto hexanoico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,554}{0,599} \times 100 = 7,5 \%$$

Extracto diclorometanoico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,514}{0,599} \times 100 = 14,19 \%$$

Extracto metanólico

$$\% I = \frac{0,599 - 0,1}{0,599} \times 100 = 83,3 \%$$

Se procedió a hacer el estudio de la actividad antioxidante del extracto metanólico del tallo y de los extractos hexanoico, y metanólico de las hojas debido a que en el barrido inicial estos extractos mostraron un % I mayor a 50 %, lo que sugirió que dichos extractos poseían actividad antioxidante. Por el contrario, se descartaron los extractos hexanoico y diclorometanoico del tallo y el diclorometanoico de las hojas ya que su % I fue menor al 50 %.

***Curva patrón de ácido ascórbico.***

En la Tabla 19, se muestran los resultados de % inhibición, correspondiente a la curva patrón del ácido ascórbico. Y en el gráfico 2, se muestra la curva de calibración del ácido del ácido ascórbico.

Tabla 19

*Curva patrón de ácido ascórbico*

[ ] $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia			Promedio $\lambda$	DE	%I
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$			
176	0,022	0,022	0,029	0,024	0,0	95,6
100	0,044	0,038	0,031	0,038	0,01	93,9
75	0,16	0,162	0,172	0,165	0,01	73,4
50	0,271	0,304	0,291	0,289	0,02	53,4
25	0,461	0,463	0,456	0,460	0,0	25,7
DPPH	0,62	0,619	0,619	0,619	0,0	
Blanco	0,062	0,061	0,067			

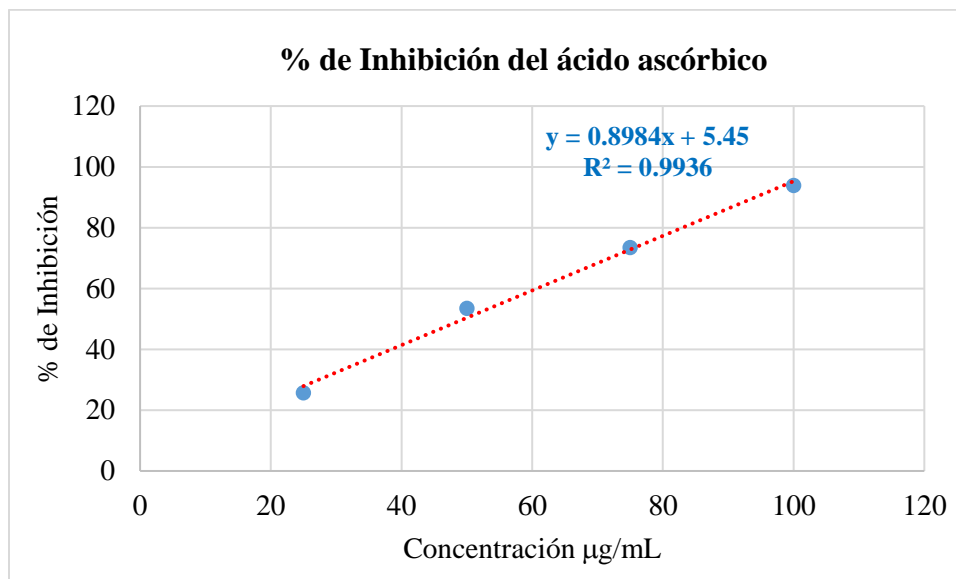


Gráfico 2: Porcentaje de inhibición (% I) del ácido ascórbico.

***Porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de las hojas y tallo; y el extracto hexanoico de las hojas, de *B. grandiceps*.***

La actividad antioxidante se determinó en los extractos metanólicos de las hojas y tallos; Y el extracto hexanoico, de las hojas de *B. grandiceps*, a través del método DPPH, en la Tabla 20, se muestran los resultados de % I obtenidos en los diferentes extractos de esta especie. Se puede observar que el mayor % I, los presentaron los extractos metanólico de los tallos y hojas de *B. grandiceps* a 0,5 mg/mL, que fue de 89,2 y 88,9 respectivamente, mientras que a la misma concentración el extracto hexanoico de las hojas, mostró un % I de 20,1.

Tabla 20

*Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas y tallos; Y el extracto hexanoico de las hojas de B. grandiceps.*

Concentración (mg/mL)	Extracto hojas		Extracto tallos
	% I Metanol	% I Hexano	% I Metanol
0,025	20,7 ± 0,1	4,4 ± 0,4	18,8 ± 0,3
0,05	34,4 ± 0,0	6,2 ± 0,4	29,9 ± 0,3
0,1	56,8 ± 0,1	8,3 ± 0,0	39,8 ± 0,0
0,15	70,7 ± 0,1	9,6 ± 0,4	55,4 ± 0,1
0,25	78,9 ± 0,1	11,2 ± 0,8	78,9 ± 0,1
0,5	88,9 ± 0,1	20,1 ± 0,5	89,2 ± 0,1
0,176	95,6 ± 0,0	95,6 ± 0,0	95,6 ± 0,0

Las diferentes concentraciones de los extractos, se evaluaron por triplicado (n=3), y los datos se presentan como % I ±. Existen diferencias estadísticas significativas entre datos (p<0,05), con un nivel de confianza de 95 %

En el Gráfico 3, se muestra el porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, por los componentes químicos presentes en el extracto metanólico de las hojas de *B. grandiceps*, comparado con el % I del ácido ascórbico a la concentración de 0,176 mg/mL.

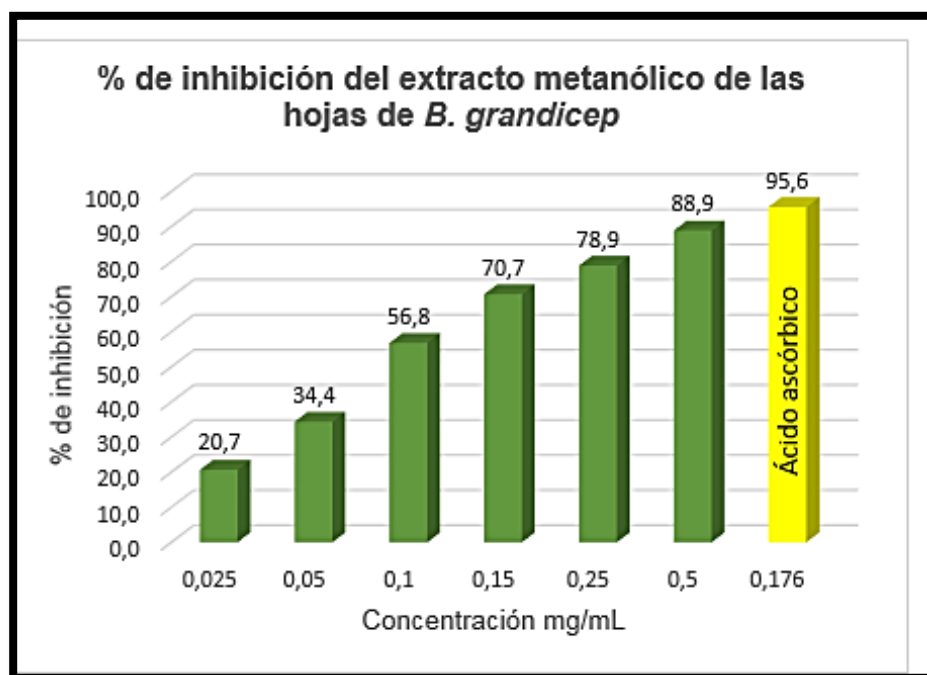


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de las hojas de *B. grandiceps*.

En el Gráfico 4, se muestra el porcentaje de inhibición (% I) del extracto hexanoico a diferentes concentraciones de las hojas de *B. grandiceps*, comparado con el % I del ácido ascórbico a la concentración de 0,176 mg/mL.

Según los resultados, se puede observar que la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas es alta ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $88,9 \pm 0,1$  %, en comparación de 95,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Gráfico 3).

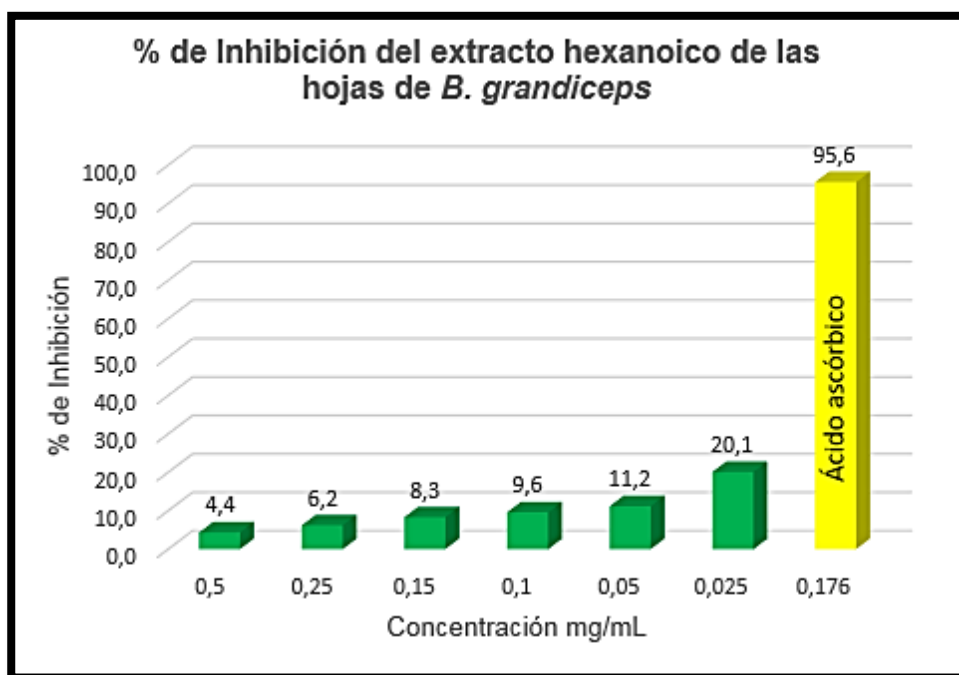


Gráfico 4. Porcentaje de inhibición del extracto hexanoico de las hojas de *B. grandiceps*.

En el Gráfico 5, se muestra el porcentaje de inhibición (% I) del radical DPPH, por los componentes químicos presentes en el extracto metanólico de los tallos de *B. grandiceps*, comparado con el % I del ácido ascórbico a la concentración de 0,176 mg/mL.

Según los resultados, se puede observar que la capacidad antioxidante del extracto hexanoico de las hojas es baja ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $20,1 \pm 0,5$  %, en comparación de 95,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Gráfico 5).

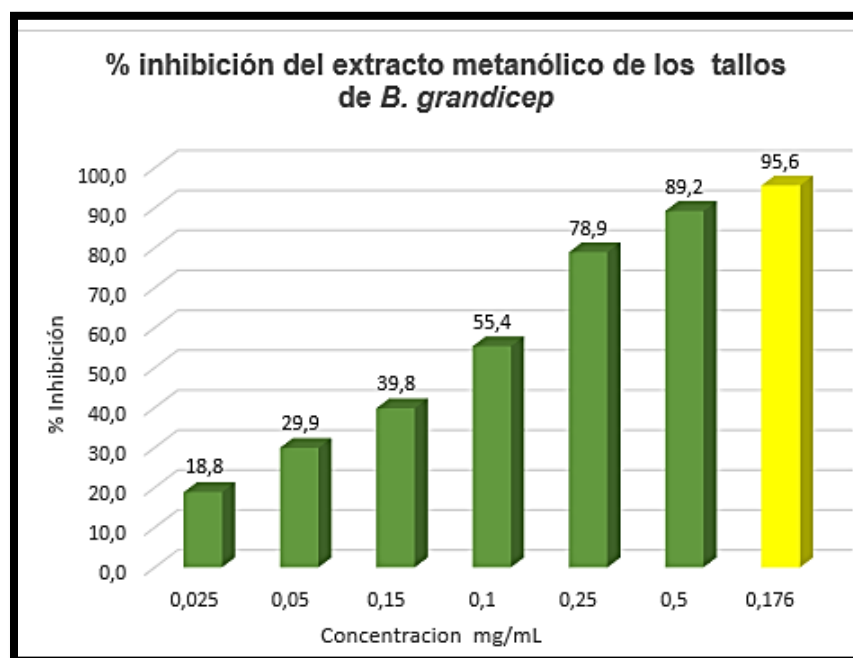


Grafico 5. Porcentaje de inhibición del extracto metanólico de los tallos de *B. grandiceps*.

Según los resultados, se puede observar que la capacidad antioxidante del extracto metanólico de los tallos es alta ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $89,2 \pm 0,1$  %, en comparación de 95,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Grafico 4).

***Comparación del porcentaje (%) de inhibición, de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de B. grandiceps.***

En el Gráfico 6, se muestra la comparación del porcentaje de inhibición (% I) de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de *B. grandiceps*. a las diferentes concentraciones.

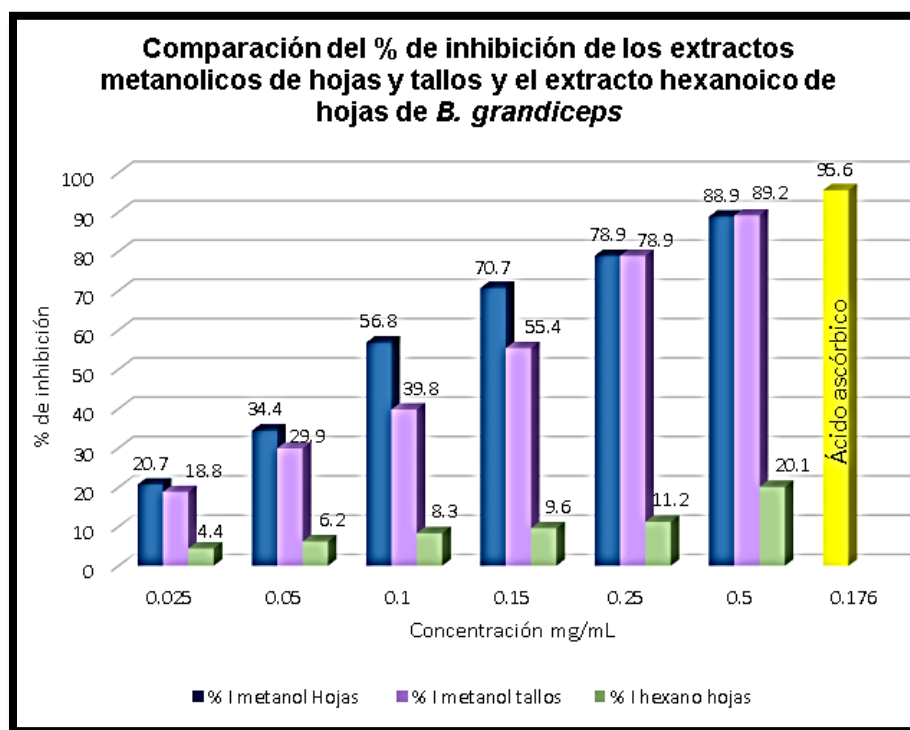


Gráfico 6. Porcentaje de inhibición (% I) de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de *B. grandiceps*. a las diferentes concentraciones.

En base a los resultados obtenidos, se puede inferir que los extractos metanólicos de *B. grandiceps* de los de tallos y hojas, son los que presentan mayor actividad antioxidante de los tres extractos, con un porcentaje de inhibición por encima del 50 %. La alta actividad antioxidante mostrada por los extractos metanólicos de hojas y tallos de *B. grandiceps*, coinciden con los metabolitos reportados en el estudio fitoquímico de los dichos extractos, principalmente flavonoides, compuestos fenólicos y taninos, que son sustancias conocidas por su alta actividad antioxidante (Paladino, 2008).

No obstante, el extracto hexanoico, que no presentó compuestos fenólicos, taninos, ni flavonoides, sin embargo, mostró actividad antioxidante. Esto se podría explicar por la

presencia de esteroides y probablemente, aunque no verificada la presencia de ácidos grasos. Un ejemplo de esta afirmación es lo reportado por Williamson 1998, quien afirmó que el ciclostadienol ( $\alpha$ -sitosterol), que es un 4-metil-esterol, es también un eficaz antioxidante. Este hecho puede explicarse por la hipótesis de que tanto los 4-metil como los 17-etiliden esteroides pueden reaccionar rápidamente con los radicales libres de los lípidos para dar otros radicales, relativamente estables, que son los antioxidantes, ya que interrumpen la reacción en cadena de la autooxidación de los lípidos. De esta manera, los esteroides con un grupo etiliden en la cadena lateral son más eficaces como antioxidantes, pero su eficiencia mayor puede alcanzarse con la presencia y la posición de uno o más dobles enlaces endocíclicos.

Son pocos los trabajos de investigación donde se reporta actividad antioxidante de los extractos de *Brownea grandiceps*, sin embargo, Lizcano y col. (2010), estudiaron los extractos de la corteza de *B. rosademonte*, y reportaron, por el método TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox)  $117.4 \pm 4.9 \mu\text{mol/g Trolox /g}$  y la capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)  $289.4 \pm 9.3 \mu\text{mol/g Trolox /g}$ , en nuestro estudio se utilizó el método que mide el % de inhibición del radical DPPH, sin embargo, es complicado hacer una comparación directa con los resultados aportados por Lizcano y col (2010) ya que ellos utilizaron métodos diferentes sin embargo, es común que haya una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles, taninos y flavonoides y en ambos casos se encuentran presentes en los extractos.

Según, Martínez, González, Culebras y Tuñón (2002), los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilos fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una

gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Estos compuestos no solo tienen habilidad para atrapar radicales libres sino también de quelatar metales pesados y modular la actividad de ciertas enzimas (Barrón y col., 2011).

Por otro lado, Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini y Fett, (2005) afirmaron que existe una relación entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente. Además, es necesario considerar que dicha correlación no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

De igual manera, existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de distintas hierbas culinarias y medicinales (Paladino, 2008). Es decir, entre mayor concentración de compuestos fenólicos, mayor actividad antioxidante. Esto se coincide con nuestro trabajo ya que los extractos metanólicos de la planta presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos y además mostraron mayor actividad antioxidante.

**Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) en mg/mL, (n =3) de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de *B. grandiceps*. a las diferentes concentraciones.**

En este estudio cabe aclarar, que la determinación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de *B. grandiceps*, se calculó a partir de la ecuación de la recta  $y=ax + b$ , donde “a” es la pendiente; “b” la intersección de corte en la recta,  $y = 50$  y  $x = IC_{50}$ . En la Tabla 16, se muestra los valores de IC<sub>50</sub> (n = 3), para los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de *B. grandiceps*.

Los resultados muestran un promedio de IC<sub>50</sub> (mg/mL), para los extractos metanólico y hexanoico de las hojas de 0,10 y 1,46 respectivamente, mientras que, para el extracto metanólico de los tallos fue 0,14 (Tabla 21).

Tabla 21

*IC<sub>50</sub> de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de hojas de B. grandiceps.*

Extracto	Recta	Pendiente	corte	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> mg/mL	Promedio IC <sub>50</sub> (mg/mL)	DE
Metanólico hojas	1	389,900	12,6460	0,994	0,10	0,10	0,00
	2	390,300	12,7100	0,994	0,10		
	3	389,900	12,6440	0,994	0,10		
Hexanoico hojas	1	29,132	5,0826	0,990	1,54	1,46	0,06
	2	32,739	4,3752	0,996	1,39		
	3	31,441	4,6330	0,990	1,44		
Metanólico tallos	1	259,470	14,9020	0,993	0,14	0,14	0,00
	2	262,860	14,2310	0,993	0,14		
	3	260,760	14,5290	0,994	0,14		

En el Gráfico 6, se muestra la IC<sub>50</sub>, de los extractos, de las hojas y tallos de *B. grandiceps*., podemos observar que los extractos metanólico de hojas y tallos presentan una menor IC<sub>50</sub> en mg/mL, que, el extracto hexanoico de las hojas.

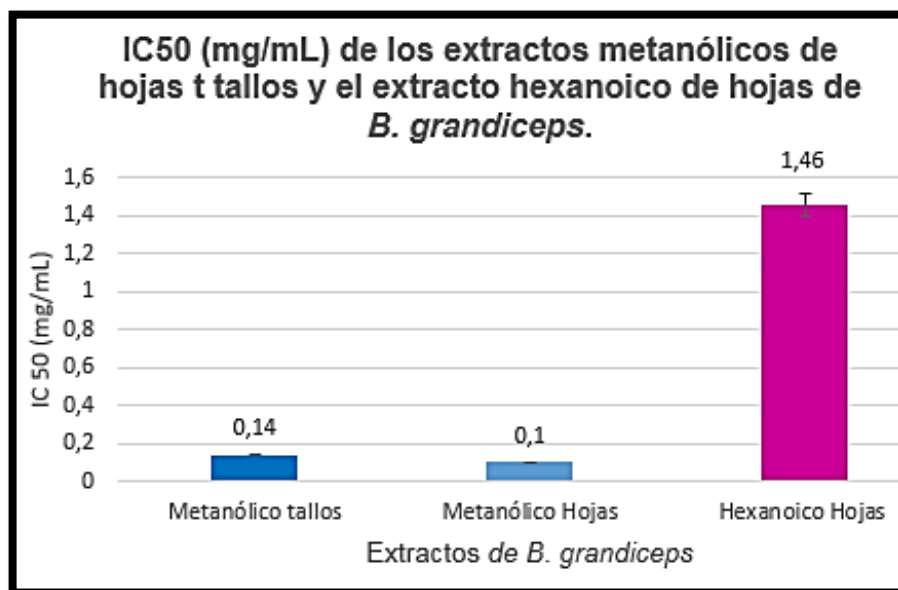


Gráfico 7. IC<sub>50</sub> de los extractos metanólicos de hojas y tallos y el extracto hexanoico de *B. grandiceps*.

Según, Murillo, Lombo, Tique y Méndez (2007), la concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>) no es más que la concentración efectiva del extracto que logra atrapar el 50 % de los radicales libres DPPH. Echavarría, Franco y Martínez (2009), afirmaron que las especies vegetales que presentan valores de IC<sub>50</sub> similares entre sí, tienen una capacidad análoga de capturar el radical DPPH, además esta capacidad se corresponde a una mayor concentración de fenoles totales. Esto explica el hecho de que, en nuestro estudio, tanto el extracto metanólico de hojas y tallos, los cuales poseen un % de inhibición muy cercanos entre si y elevado, mostraron a su vez una IC<sub>50</sub> muy similar (0,14 y 0,10 mg/mL), mientras que el extracto hexanólico, que mostró un % de inhibición menor, tuvo un IC<sub>50</sub>, mayor (1,56 mg/mL).

Benitez y col., (2016), afirmaron que, existe una relación inversamente proporcional, entre la IC<sub>50</sub> y la actividad antioxidante, a menor valor del IC<sub>50</sub> mayor actividad anti radical. Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio, ya que los extractos metanólico de hojas y tallos presentaron un alto % I mientras que su IC<sub>50</sub> fue bajo, en este sentido, el extracto hexanoico de hojas tuvo un % I menor en tanto que su IC<sub>50</sub> fue mayor si la comparamos con la de los otros dos extractos.

***Estudio estadístico de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de B. grandiceps***

En la Tabla 22 se muestra los datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *B. grandiceps*.

Tabla 22  
*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de B. grandiceps*

		Concentración mg/mL	% I
N	Válidos	6	6
	Perdidos	1	1
Media		0,1792	58,4000
Mediana		0,1250	63,7500
Moda		0,03 <sup>a</sup>	20,70 <sup>a</sup>
Desv. típica.		0,17636	26,46371
Varianza		0,031	700,328
Rango		0,48	68,20
Mínimo		0,03	20,70
Máximo		0,50	88,90

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

En la Tabla 23, se muestran los análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de *B. grandiceps*.

Tabla 23

*Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de las hojas de B. grandiceps*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	2550,827	1	2550,827	10,731	0,031
Residual	950,813	4	237,703		
Total	3501,640	5			

La variable independiente es concentración mg/mL.

La variable dependiente % de inhibición

En la Tabla 24, se muestra los datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de las hojas de *B. grandiceps*.

Tabla 24

*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de las hojas de B. grandiceps*

	mg/mL	%I
N	Válidos	6
	Perdidos	1
Media	0,1792	9,9667
Mediana	0,1250	8,9500
Moda	0,03 <sup>a</sup>	4,40 <sup>a</sup>
Desv. típica.	0,17636	5,51894
Varianza	0,031	30,459
Rango	0,48	15,70
Mínimo	0,03	4,40
Máximo	0,50	20,10

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

En la Tabla 25, se muestran el análisis de varianza ANOVA, de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de las hojas de *B. grandiceps*.

Tabla 25

*Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de las hojas de B. grandiceps*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	149,746	1	149,746	235,169	0,000
Residual	2,547	4	0,637		
Total	152,293	5			

La variable independiente es concentración mg/mL.

La variable dependiente % de inhibición

En la Tabla 26, se muestra los datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto metanólico de los tallos de *B. grandiceps*.

Tabla 26

*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico, de los tallos de B. grandiceps.*

	Concentración mg/mL	%I
N	Válidos	6
	Perdidos	1
Media	0,1792	52,0000
Mediana	0,1250	47,6000
Moda	0,03 <sup>a</sup>	18,80 <sup>a</sup>
Desv. típica	0,17636	27,77949
Varianza	0,031	771,700
Rango	0,48	70,40
Mínimo	0,03	18,80
Máximo	.50	89,20

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

En la Tabla 27, se muestran el análisis de varianza ANOVA, de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de los tallos de *B. grandiceps*.

Tabla 27

*Análisis de varianza ANOVA de una sola vía de la actividad antioxidante del extracto metanólico, de los tallos de B. grandiceps*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	3307,482	1	3307,482	24,010	0,008
Residual	551,018	4	137,754		
Total	3858,500	5			

La variable independiente es concentración mg/mL.

La variable dependiente % de inhibición

**Actividad garrapaticida de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps*, sobre la larva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, utilizando el método Prueba de paquete de larvas (PPL).**

La actividad garrapaticida, de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps*, se realizó por triplicado (n = 3), a través del método de Prueba de paquete de larvas (PPL) (FAO, 2004). Y mostró un % de mortalidad de 0 %, en ambos casos, es decir todas las larvas sobrevivieron al tratamiento con el extracto metanólico de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps*, al 20%, en solución acuosa de Tween 80 (2 %).

En la Tabla 28, se muestra el porcentaje (%) de mortalidad de las larvas de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tratadas con los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps*, al 20 %, en solución de Tween 80 al 2%.

Tabla 28

*Porcentaje de mortalidad de las larvas de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus, tratadas con los extractos metanólicos de las hojas y tallos de Brownea grandiceps, al 20%, en solución acuosa de Tween 80 al 2%.*

Muestra	% mortalidad <sub>1</sub>	% mortalidad <sub>2</sub>	% mortalidad <sub>3</sub>
Extracto metanólico hojas	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Extracto metanólico tallos	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Solución de Tween 80 en agua destilada (2 %)	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
Ivomecrina 0,1 %	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0

Las determinaciones se realizaron por triplicado (n = 3), los resultados se muestran con % mortalidad ± SD, control negativo (Solución de Tween 80 en agua destilada al 2 %), control positivo (Ivomecrina 0,1 %).

En nuestro estudio, los resultados de mortalidad de las larvas de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tratados con los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps*, mostraron que los mismos, no poseen actividad garrapaticida.

No existe en la literatura, ningún otro reporte de actividad garrapaticida de los extractos de *B. grandiceps*. Sin embargo, Quispe (2016), reportó que la planta *Lonchocarpus sp* de la familia Fabaceae, es eficiente para el control de las garrapatas de la especie, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ya que ésta tiene una sustancia llamada rotenona (sustancia de origen vegetal utilizada como insecticida), la cual es muy tóxica para los animales de sangre fría. Esta sustancia no ha sido aislada en extractos de *B. grandiceps*, lo que podría explicar que aun perteneciendo a la misma familia Fabaceae, no posee actividad garrapaticida.

Por su parte, Jaramillo (2016), reportó un estudio realizado sobre *Gliricida sepium*, especie de la familia Fabaceae, recolectada en Colombia y demostró que la misma podría ser

utilizada para el control de parásitos, estudió los metabolitos secundarios presentes en la planta, con capacidad para alterar la biología de ácaros e insectos, como lo son: Cumarinas, taninos condensados, flavonoides, triterpenos, rotenoides, saponinas. Afirmó, que plantas ricas en estos mismos grupos de metabolitos secundarios, mostraron actividad acaricida sobre *Rhipicephalus microplus*. Por otro lado, las cumarinas, presentes, en el extracto acetónico de *G. sepium*, se han relacionado, con su capacidad antiparasitaria sobre ácaros, por esta razón, los extractos vegetales de *G. sepium*, podría ser utilizados para el control de la garrapata común del ganado.

Con base en lo expuesto anteriormente, nuestra investigación, difiere de lo reportado por Jaramillo (2016), ya que en los extractos metanólicos de hojas y tallos, de *Brownea grandiceps*, no se encontraron cumarinas ni saponinas, que fueron algunos de los metabolitos secundarios que mostraron actividad acaricida sobre *Rhipicephalus microplus*, esto podría explicar el hecho de que en nuestro estudio no se observó letalidad sobre las larvas de garrapata.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- El estudio fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq, demostró la presencia de esteroides en el extracto hexanoico de las hojas y terpenos en los tallos; Esteroides en los extractos diclorometanoicos de tallos y hojas y esteroides en el extracto metanólico de hojas. En cuanto a los extractos metanolicos de hojas y tallos mostraron la presencia de alcaloides, polifenoles, taninos y flavonoides.
- El contenido de fenoles totales, de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq, fue de 0,888  $\mu\text{g}$  y 0,886 AG/mg, respectivamente.
- El % I del radical DPPH, de los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *B. grandiceps* Jacq, fue de 88,9 y 89,2 respectivamente, mientras que el extracto hexanoico de las hojas dio un 20,1 %.
- El  $\text{IC}_{50}$  para los extractos metanólico de hojas y tallos fue 0,10 y 0,14 mg/mL, respectivamente, mientras que el del extracto hexanoico fue 1,46 mg/mL.
- Los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq, no mostraron actividad, sobre las larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, siendo el porcentaje (%) de mortalidad de 0, a la concentración de 20 %, de ambos extractos.

## RECOMENDACIONES

- Para completar el estudio se recomienda hacer la determinación del contenido de flavonoides presentes en los extractos metanólicos de las hojas y tallos de *Brownea grandiceps* Jacq.
- Sería recomendable verificar la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las hojas debido a que el % I del radical DPPH a la concentración de 4 mg/mL fue de 48,4% muy cercano al 50%.

## Referencias Bibliográficas

- Acosta, L. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales, versión On-line ISSN 1028-47961*.
- Albornoz, A. (2001). Medicina tradicional herbaria. Caracas Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Caracas Venezuela: 1-564.
- Alonso, M. (2002). Mesa redonda: El medicamento en la oficina de farmacia plantas medicinales. Recuperado de <https://www.portalfarma.com/Profesionales/jornadasycongresos/informacion/Documents/plantas%20medicinales.pdf>.
- Alonso, M. Rodríguez, R. Fragoso, H. y Rosario, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de Medicina veterinaria* 38 (2), 105-113.
- Arango, G. J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Araneda, M. (2018). Legumbres. composición y propiedades. Recuperado de <http://www.edualimentaria.com/legumbres-composicion-y-propiedades>.
- Araque, A. Ujueta, S. Bonilla, R. Gómez, D y Rivera, J. (2014). Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 17 (1), 161 – 170.
- Ávalos, A., y Pérez-Urria, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3), 119-145.
- Aymard, G.; P. Fantz, R. Fortunato, J. Fariñas, T. Calles, N. Cuello, J. Gillett, P. Meléndez, R. Maxwell, J. Granados, J. y L. Ruíz. (2004). Fabaceae. Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 859 p.

- Benavides, E. Romero, N. y Rodríguez, J. (2014). Situación de resistencia de la *garrapata Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. Recuperado de [https://www.academia.edu/24768982/Situaci%C3%B3n\\_actual\\_de\\_resistencia\\_de\\_la\\_garrapata\\_Boophilus\\_microplus\\_a\\_acaricidas\\_en\\_Colombia.\\_Segunda\\_Entrega](https://www.academia.edu/24768982/Situaci%C3%B3n_actual_de_resistencia_de_la_garrapata_Boophilus_microplus_a_acaricidas_en_Colombia._Segunda_Entrega).
- Benitez, R., Echavarría, H., D'Armas, R., Nubia, L., Matute, L., Jaramillo, C., y Rojas, L. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*. 9 (20), 29-35.
- Bermejo, A. Pereira, S. Cintra, J. y Morales, G. (2014). Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13 (5), 670-680.
- Bosisio, A. (2007). Catálogo de la Familia Fabaceae representada en el Herbario del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino." Recuperado de. [www.museoameghino.gob.ar/archivos/126\\_descarga\\_84\\_bosisio\\_andrea](http://www.museoameghino.gob.ar/archivos/126_descarga_84_bosisio_andrea) de Santa Fe. Argentina.
- Bruneton, J. (2001). *Flavonoides en farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales*. Zaragoza, España: Acribia.
- Caldas, A. (2012). "optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido". (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca. Cuenca- Ecuador.
- Cárdenas, L. y Rodríguez, H. (2005). Mimosaceae. En: Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 859 p.
- Carretero, M.E. (2000). Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual Med* 24 (235),633-636.
- Carrión, J., y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.

- Carvajal, L. Hata, Y. Martínez, N. y Rueda, N. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, y tallos y semillas de Cúpata (*Strychnos Schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal*, 12 161-170.
- Cofré, A. (2015). *Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtillo (Ugni molinae Turcz) Obtenido por Condensación de Vapor* (tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Ingeniería en Alimentos. Valdivia Chile.
- Cordero de Campillo, M. Rojo V, F. Martínez F, A. Sánchez A, M. Hernández R, S. Navarrete L, I. Díez B, P. Quiroz R, H. Carvalho V, M. (1999.) *Parasitología Veterinaria*. (en línea). Madrid, ES. S.A.U Interamericana. Recuperado de [dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596](http://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596).
- Coronado, A. (1996). Estado actual de la garrapata del bovino *Boophilus microplus*, en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 2 (1),67-74.
- Cruz, J. Dominguez, J. Dominguez, H. y Parajó, J. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolsates of lignocellulosic materials. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (5), 2459-2464.
- Echavarria B., Franco A., y Martinez A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*. 16 (1), 126-131.
- Echeverry, A., y Villegas , M. (2003). Compendio de 151 especies de flora nativa de uso tradicional o potencial en el área de la jurisdicción de la Corporación Autónoma Regional del centro de Antioquia. Corantioquia. Recuperado de. <http://cia.corantioquia.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=12051>.
- Estrada, P.(2010). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)* (Tesis de pregrado). Escuela Superior

- Politecnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador.
- Fernández, I. M. (2014). Bioquímica del olivo: Triterpenos pentacíclicos. Recuperado de <http://tauja.ujaen.es/jspui/handle/10953.1/561>.
- Fretes, F. (2010). Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial. Recuperado de: [https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/plantas\\_medicinales.pdf](https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/plantas_medicinales.pdf).
- Figuroa, S. y Mollinedo, O. (2017). *Actividad antioxidante del extracto etanólico del mesocarpio del fruto Hylocereus undatus “ pitahaya” e identificación de los fitoconstituyentes* (Tesis de pregrado). Universidad Wiener., Lima Perú.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2004) Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, 53 p.
- Food and Agriculture Organization (FAO) 1999. Resistance of ecto- and endo-parasite: current and future solution, 67th General session. International Comité. OIE. Paris, France. pp. 17-21.
- Flores, E. Prieto, E. Martínez, E. Ruiz S (2008). Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” de la ciudad de Chanchamayo Región Junín. Perú. *Revista de medicina Vallejana*, 5 (1),50-64.
- Forero, E. y Romero, C. (2005). Estudio en Leguminosas Colombianas. Bogotá Colombia: editora Guadalupe Ltda. Printed and Made in Colombia – Impreso en Colombia. P 4- 174.
- Gallegos, M., (2016). Las plantas medicinales principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77 (4),1025-5583.

- García, C. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de staphylococcus aureus con resistencia múltiple*. (tesis de posgrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro., Torreón Coahuila, México.
- García, L. Bolaños, D. Lagunes, C. Ramos, J. y Osorio, M. (2015). Concentración de compuestos fenólicos en fabáceas forrajeras tropicales en edad diferente del rebrote. *Agrociencia* 5 (4),430-440.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., y Fuentes López, A.(2015) . *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu*. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València, Departamento de Tecnología de alimentos.
- Gil, J., Gómez, M., y Trejos, J. (2008). Citotoxicidad y actividad anticancerígena de dos flavonoides aislados y purificados de *Brownea ariza* Brenth. *Vitae*, 16(1), 93-101.
- Giraldo, D., Baquero, E., Bermúdez, A., y Oliveira, M. (2009). Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas, Venezuela. *Acta Botánica venezolana*, 32(2), 267-301.
- Guija, E. Inocente, M. Ponce, J. Y Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* 15 (1) 57-60.
- Guzman, P. (2009). *Actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos (crudo, acuoso, y etanólico) de Pipicha (Porophyllum tagetoides)* (tesis de pregrado).Universidad Veracruzana.,Instituto de Ciencias Básicas.,Xalapa, Veracruz Mexico.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5ta edición). México, D.F.: Editorial Mc Graw Hill.

- Hernández, H, A. (2015). *Aislamiento y caracterización de compuestos fibrinolíticos presentes en el extracto acuoso floral de Brownea macrophylla* (Tesis de pregrado). Universidad Central de Venezuela., Caracas.
- Hernández, F.(1999). Garrapatas (Acarina: Ixodoidea) del ganado bovino y controles utilizados en el Municipio Jesus E. Lossada, estado Zulia, Venezuela. *Revista científica FCV-LUZ 11* (1), 47-51.
- Hoyos, J. (1992). *Arboles tropicales ornamentales cultivados en Venezuela*. Caracas Venezuela: Sociedad de Ciencias Naturales la salle.
- Hokche, O. Berry, P. y Huber, O. *Nuevo catalogo de la flora vascular de Venezuela*. Fundacion Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobias Lasser Caracas, Venezuela.
- Jaramillo, D. (2016). Estudio de la actividad acaricida in vitro del extracto acetónico de *gliricidia sepium* sobre *rhhipicephalus microplus*. (tesis pregrado). Universidad de la salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Maestría en Ciencias Veterinarias. Bogotá Colombia.
- Jurado, B. Aparcana, I. Villarreal, L. Ramos, L. Calixto, C. Hurtado P. y Acosta A. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Rev Soc Quím Perú.*, 82(3), 272-279.
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4), 726-732.
- Lagunes, E. y Zabaleta, E (2016). Función de la Lignina en la Interacción Planta-Nematodos Endoparásitos Sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34 (1), 43-63.
- Llamas, F. y Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *Ambio ciencias – revista de divulgacion científica*. 5- 18.

- Lamarque, A., Zygodlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D. (2008). Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica. Córdoba, Argentina: Grupo editor Encuentro.
- Lawrence, G.H. (1969). Taxonomy of vascular plants. New York, macmillan company. P 1951. 823 .
- Leyva, E., Lopez, I. Escobedo, E. y Navarro, G (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica.
- Leython, S. y Ruiz, T. (2006). Leguminosae de un bosque estacional, La Trilla, Parque Nacional “Henri Pittier”, Estado Aragua, Venezuela. *Ernstia [online]*, 16 (2), 81-84.
- Lizcano, L., Bakkali, F., Ruiz-Larrea, B., y. Ruiz-Sanz, J. I. (2010). Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chemistry*, 119, 1566–1570.
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Programa de Ingeniería de Alimentos Facultad de Ingenierías, Corporación Universitaria Lasallista. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10567/133>.
- López, P. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de Sambucus ebulus L. utilizando el método ORAC* (tesis de pregrado). Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid., Madrid España.
- Mack-Wen, V., Rico, L., Alarcón, J., y Pereañez, J. (2010). Inhibición in vitro del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos de *Brownea ariza* Brenth. (caesalpiniaceae). *Vitae*, 18(1), 43-48.
- Mabberley, D. J. (2008). Mabberley’s plant Book, Cambridge (3era edición). Cambridge, Cambridge. Editorial U. Press.
- Magaña, A., Gama, L., y Méndez, R. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades mayachontales de nacajuca, tabasco, México. *Polibotánica*, (29), 213-262.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.

- Mahecha, G, y Echeverri, R. (1983). Arboles del valle del cauca. Litografía Arco Bogotá Colombia.
- Martínez, Z. y Moreno, A. (2007). Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. *Bio Tecnología*, 11 (3), 37-50.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., y Galeano, M. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Martínez, S. González, J. Culebras, J. y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitañaria*, (6) 271-278.
- Mayahua, L. (2015). *Actividad acaricida de la semilla del árbol de neem (azadirachta indica) sobre garrapatas rhipicephalus microplu* (tesis de posgrado). Universidad Veracruzana., Veracruz México.
- Meza, A., Zapata, S., Arana, L., Zapata, I., Monsalve, Z. y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas*, 14 (1), 1-10.
- Montealegre, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del espíngo (ocotea quixos (lam.) kosterm.) en la medicina tradicional indígena inga, pruebas fitoquímicos y evaluación de la actividad antimicrobiana* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana., Bogotá Colombia.
- Mostafa, E., Musa, A., Abdelgaw, M., Y Ragab, E. (2019). Cytotoxicity, protein kinase inhibitory activity, and docking studies of secondary metabolites isolated from *Brownea grandiceps* Jacq. *Pharmacognosy Magazine*, 15(63), 438-442.
- Muller, K. (2015). “*Capacidad antioxidante y contenido de flavonoides entre las semillas de chia negra (salvia nativa) y chia blanca (salvia hispánica l.)* (tesis de pregrado). Universidad nacional del Antiplano., Puno Perú.

- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., y Méndez, J. (2007). Potencial Antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica*. 18(6), 65-74.
- Navarrete, L. Rodríguez, E. Valle, C. Vargas, M y Romero, L. (2014). Principales especies de garrapatas (ixodidae) en el salvador. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas. Recuperado de:<http://ri.ues.edu.sv/5989/2/CATALOGO%20DE%20GARRAPATAS%20.pdf>.
- Oliva, F. (1969). Arboles ornamentales y otras plantas del trópico. Ediciones Armitano Caracas, Venezuela.
- Plaza, L. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante in vitro y toxicidad de seis especies de *Ericaceas* colombianas, *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19 (2),182-199.
- Pascual, D. Pérez, Y. Morales, I. Castellano, I. González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN*, 18 (10), 1467.
- Peiró, S. (2015). Actividad antioxidante del té blanco y de los residuos de limón: optimización de la extracción y aplicaciones en carne y en envases activos. Universidad de Barcelona. Barcelona España.
- Peñarrieta, J. Tejada, L. Mollinedo, P. Vila, J. Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química* 31(2),68-81.
- Pérez, I., C. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural* 25, 1-4. Recuperado de [https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6\\_p2326\\_20100.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6_p2326_20100.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Pereira, B., y. Brazón, J. (2015). Aqueous extract from *Brownea grandiceps* flowers with effect on coagulation and fibrinolytic system. *Journal of Ethnopharmacology*, 160(3), 6-13.

- Pereira, B., Brazón, J., Ricón, M., Y Vonasek, E. (2017). Browplasminin, a condensed tannin with anti-plasmin activity isolated from an aqueous extract of *Brownea grandiceps* Jacq. flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 282-290.
- Paladino, S. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L.)*. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
- Pomilio, A. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(1), 73-82.
- Quiñonez, M. Miguel, M. y Aleixandre, A. Los polifenoles compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27 (1), 76-89.
- Quispe, J. (2016). *Efecto de la raíz molida del Kumu (Lonchocarpus sp) en el control de garrapatas (Boophilus microplus) en ganado Vacuno.* (tesis de pregrado). Universidad nacional agraria de la selva, provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco – Perú.
- Rachinsky, A., Guerrero, F., Scoles, G. (2007). Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1291-1301.
- Rajput, Z., Hu, S., Chen, W. Arijó, A., Xiao, C. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(11), 912 - 921.
- Record, S. y Hess, R. (1972). *Monthly Catalog of United States Government Publications* New York, Arno press.
- Ribeiro, V. Avancini, C. Gonçalves, K. Toigo, E. Von Poser, G. (2008). Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*. 151(2-4), 351–354.
- Rivas, C., Oranday, y Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Nuevo León, México: OmniaScience.

- Rodríguez, S. y Gámez, L. (2010). Clave vegetativa para la identificación de árboles de la familia fabaceae de la ciudad de mérida, Venezuela. *Pittieria*, 34 89-111.
- Rodríguez V. R. (2005). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a Ixodicidas en el Sureste de México. (en Línea). 2005. Conacyt-Sagarpa. México. Consultado el 13 abr. 2008. Disponible en [www.uady.mx/~veterina/cuerpos/salud\\_animal/Resistencia.pdf](http://www.uady.mx/~veterina/cuerpos/salud_animal/Resistencia.pdf).
- Roque, E. (2015). Fundamentos de parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Editorial Educación. La Habana. Cuba.
- Sampietro, A. Isla, M. Quiroga, E. y Vattuone, M. (1997). Importancia del estudio fitoquímico en la formación del profesional farmacéutico. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 16 (4), 245-249.
- Santos, O. Perdomo, D. García, D. y Torres, A. (2010). Programa “Control integral de garrapata(PCIG) del ganado bovino en el estado Trujillo”. Instituto de Investigaciones Agrícolas del Estado Trujillo. Recuperado de <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/574.pdf>.
- Sarwar, A. Binte, T. Malik, M y Kumar, B. (2015). Actividades antioxidantes y analgésicas del extracto de hoja de etanol de *Brownea coccinea*. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 3 (2), 69-74.
- Stafleu, F. (2008). Código Internacional de Nomenclatura Botánica. Madrid: Herman Blume.
- Serra, S. (2010). *Desarrollo de derivados de 4-hidroxycumarina con diferente actividad farmacológica*. (Tesis de pregrado) Università degli studi di cagliari scuola di dottorato in scienze e tecnologie farmaceutiche. Recuperado de [https://www.academia.edu/22176866/Desarrollo\\_de\\_derivados\\_de\\_4\\_hidroxycumarina\\_con\\_diferente\\_actividad\\_farmacologica](https://www.academia.edu/22176866/Desarrollo_de_derivados_de_4_hidroxycumarina_con_diferente_actividad_farmacologica).
- Shaw R. D. 1966. Culture of an organophosphorus resistant strain of *B. microplus* and an assessment of its resistance spectrum. *Bull Entomol. Res.* 56, 389-405.

- Stergios, B. Klitgaard, B. y Redden, K. (2004). Caesalpiniaceae. En: Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela. Hokche, O.; P. Berry y O. Huber. (Editores). Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 859 p.
- The Center for Food Security and Public Health, (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Institute for Internacional Cooperation in animal Biologics, 1-3. Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Badajoz Universidad de Extremadura. Recuperado de: <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494332.pdf>.
- Valcárcel, M., y Gómez, A. (1988). Técnicas analíticas de separación (1ª edición). Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Varón, L., y Granados, J. (2012). *Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo*. Bogota, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Waterman, P., y Mole, S. (1994). *Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites*. Boston, United State: Blackwell Sci.
- Watson, L. y Dallwitz, J. (1992). The families of flowering plants, Leguminosae Juss. On line. <http://deltaintkey.com/angio/www/legumino.htm>.
- Williamson, E. (1988). The antioxidant activity of  $\Delta^5$ avenasterol». -Univ. Reading. U.K.