



Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

TESIS

“COMPLEJOS CÚPRICOS INSOLUBLES CON FLAVONOIDES DE

***Desmodium molliculum*”**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

BACHILLER: HUAMANI ZAMBRANO, DANTE ALFONSO

ASESOR: Q.F. BARRETO YAYA, DANILO ARTURO

LIMA - PERÚ

2016

DEDICATORIA

A Dios quien supo guiarme por el buen camino y a mis padres por su apoyo, me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios y principalmente la perseverancia para conseguir mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, a mis padres que han sido los pilares para la realización de este trabajo y al Q.F. Danilo Arturo Barreto Yaya, mi asesor de tesis, quien ha sabido guiarme el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

Existe en el país una gran variedad de plantas de uso terapéutico, entre ellas se encuentra el *Desmodium molliculum* o comúnmente conocida como Manayupa. La Manayupa ha sido usado como depurativo, antiinflamatorio y antialérgico, pero el conocimiento que se tiene es empírico, estas propiedades se debe posiblemente a la presencia de compuestos químicos secundarios llamados flavonoides. Esta investigación se realizó con el fin de evaluar la formación de complejos entre los flavonoides del *Desmodium molliculum* y el ión Cu (II).

Del extracto metanólico del *Desmodium molliculum* se extrajo los flavonoides con la resina Diaion HP-20. El eluato del extracto se llevó a cromatografía en capa fina y espectrofotometría UV, apreciándose manchas en la placa y picos de absorbancias respectivamente. Posteriormente se preparó las concentraciones de cobre al 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%, a estas soluciones se les agregó el eluato, obteniendo un precipitado marrón. Se llevó el sobrenadante a cromatografía en capa fina y espectrofotometría UV, observándose ninguna mancha en la placa cromatografía y ninguna absorbancia en la lectura al espectrofotómetro UV.

Se concluye, hay formación de complejo cobre-flavonoide con el eluato del extracto y todas las concentraciones de cobre usadas en esta investigación formaron el complejo cobre-flavonoide. También se determinó que a mayor concentración de cobre, mayor fue la formación del complejo cúprico.

PALABRAS CLAVE: Manayupa; Complejo cúprico; Precipitado insoluble; Flavonoide

ABSTRACT

There in the country a great variety of plants have been used on therapeutic, between them one finds the *Desmodium molliculum* or commonly known as Manayupa. The Manayupa has been used like depuratively, antiinflammatory and antiallergic, but the knowledge that had is empirical, these properties are by the presence of chemical secondary compounds so called flavonoids. This investigation was realized in order to evaluate the formation of complexes between flavonoids of the *Desmodium molliculum* and the ion Cu (II).

From the metanólic extract of the *Desmodium molliculum* was extracted the flavonoids with Diaion HP-20 resin. The eluato of the extract was to cromathography and spectrophotometry UV. Appreciating spots in the plate and beaks of absorbency respectively. Later It was prepares the concentrations of copper of 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% and 2%, to these solutions the eluato was joined, obtaining a brown precipitate. The supernatant was carried to chromatography and spectrophotometry UV, where didn't observe any spot in the plate and any absorbency in the reading by the spectrophotometry UV.

It concludes, there formation of complex copper-flavonoid with the eluato of the extract and all the concentrations of copper used in this investigation formed the complex copper-flavonoid. Also one determined that to major concentration of copper, major it was the formation of the complex copper.

KEYWORDS: Manayupa, complex copper, Insoluble precipitates, flavonoid

ÍNDICE

CARÁTULA	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCION.....	xi
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	12
1.2 Formulación del Problema	13
1.2.1 Problema General	13
1.2.2 Problemas Específicos.....	13
1.3 Objetivos de la Investigación	13
1.3.1 Objetivo General	13
1.3.2 Objetivos Específicos.....	13
1.4 Hipótesis de la Investigación	13
1.4.1 Hipótesis General.....	13
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	14
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación	14
CAPITULO II: MARCO TEORICO	15
2.1 Antecedentes de la Investigación	15
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	15
2.1.2. Antecedentes Internacionales	16
2.2 Bases Teóricas.....	18
2.2.1. Generalidades del <i>Desmodium molliculum</i>	18
2.2.1.1. Descripción General.....	18
2.2.1.2. Descripción Física.....	19
2.2.1.3. Origen y Distribución natural	19

2.2.1.4. Propiedades Terapéuticas.....	20
2.2.1.5. Composición Química	20
2.2.2. Generalidades de los Flavonoides	21
2.2.2.1. Estructura y clasificación de los flavonoides.....	22
2.2.2.2. Usos terapéuticos de los flavonoides	23
2.3. Definición de Términos Básicos.....	26
2.3.1. Climaterio.....	26
2.3.2. Enfermedad de Parkinson:.....	26
2.3.3. Enfermedad de Alzheimer:.....	26
2.3.4. Anafilaxia:	27
2.3.5. Urticaria:.....	27
2.3.6. Mastocito:.....	27
2.3.7. Metabolitos Primarios y secundarios:	27
2.3.8. Cromatografía:	28
2.3.9. Cromatografía en capa fina:.....	29
2.3.10.Complejo Metálico	29
CAPITULO III: METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION	30
3.1. Tipo de Investigación.....	30
3.2. Nivel de Investigación.....	30
3.3. Método de investigación	30
3.4. Diseño de investigación	30
3.5. Población y Muestreo de la Investigación	31
3.5.1. Población	31
3.5.2. Muestra.....	31
3.6. Variables e Indicadores	31
3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	31
3.7.1. Técnicas	31
3.7.1.1. Obtención de la Materia Prima	31
3.7.1.2. Obtención del extracto Metanólico	33
3.7.1.3. Fraccionamiento del extracto metanólico	34
3.7.1.4. Formación de complejos cúpricos	38
3.7.1.5. Cromatografía en capa fina.....	39

3.7.1.6. Separación de los flavonoides del complejo cúprico.....	43
3.7.2. Instrumentos	45
CAPITULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACION DE	
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	51
RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	53
ANEXO: MATRIZ DE CONSISTENCIA	55

INDICE DE TABLAS

CUADRO N°1: Resultados de la Cromatografía.....	47
--	-----------

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: Planta <i>Desmodium molliculum</i> (H.B.K.) D.C. Manayupa.....	19
FIGURA N°2: Flavonoides. Estructura básica y tipos.....	23
FIGURA N°3: Hojas y tallos de <i>Desmodium molliculum</i>	33
FIGURA N°4: Extracto metanólico con Resina.....	35
FIGURA N°5: Elución de la Resina en metanol/agua 95%.....	35
FIGURA N°6: Concentrado de la eluato metanol 95%	36
FIGURA N°7: Espectro UV de Barrido del Eluato 95% Metanol-Agua.....	37
FIGURA N°8: Espectro UV de Barrido del Sobrenadante del Precipitado Eluato 95% Metanol- Agua y Cobre.....	37
FIGURA N°9: Pesado del cloruro de cobre.....	38
FIGURA N°10: Concentraciones de Cobre.....	38
FIGURA N°11: Formación de precipitados cúpricos.....	39
FIGURA N°12: Filtrado de los precipitados cúpricos.....	40
FIGURA N°13: Distribución del sembrado en la placa cromatográfica.....	41
FIGURA N°14: Cromatografía en capa fina.....	42
FIGURA N°15: Revelado en UV de la placa cromatográfica.....	43
FIGURA N°16: Precipitado del complejo cúprico en la mezcla Metanol – Agua.....	44
FIGURA N°17: Presencia de Cobre de la separación del complejo cobre– flavonoides	44

INTRODUCCION

A través del tiempo, el hombre viene utilizando plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades, el conocimiento en la mayoría de los casos es empírico. De modo lento hasta la actualidad va ganado especial interés el uso de plantas medicinales.

Desde inicios del siglo XX, fueron usados como base terapéutica y, posteriormente pasaron a usarse como productos de síntesis para los medicamentos utilizados actualmente.

El *Desmodium molliculum* o conocido comúnmente como Manayupa es una planta muy usada por los pobladores de la sierra del Perú, está distribuida en diversas zonas del país, entre sus principales propiedades terapéuticas están las depurativas, antiinflamatorias y antialérgicas. Estas propiedades medicinales que se le atribuyen se debe a sus metabolitos secundarios, estos son los llamados flavonoides y saponinas.

Los flavonoides poseen diferentes propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales, anticancerígenas, antidepresivas, antitrombóticas y vasodilatadoras.⁽¹⁾

Esta investigación comprobó la existencia de un método para aislar los flavonoides del *Desmodium molliculum* por formación de complejos cúpricos. Las sales de cobre tienden a formar precipitados insolubles con flavonoides. La formación de precipitados insolubles con el cobre permitió buscar un método de separación con el que se logró aislar los flavonoides del *Desmodium molliculum*.

El presente estudio aisló los flavonoides del *Desmodium molliculum* y pretende incentivar una mayor investigación para síntesis farmacológica.

No se han reportado tesis sobre esta planta, por lo que la principal fuente de información fue la consulta a especialistas, artículos científicos y publicaciones de internet.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

El Perú tiene una variedad de plantas medicinales que han sido usadas desde la antigüedad por nuestros ancestros hasta la actualidad, pero el conocimiento que se tiene de sus propiedades medicinales es netamente empírico. Todas las plantas tienen compuestos orgánicos secundarios como los flavonoides, de los cuales se conoce más de 5000 distintos.⁽²⁾

La planta del *Desmodium molliculum* o más conocida como Manayupa, tiene usos terapéuticos como depurativo, antiinflamatorio y antialérgico. Actualmente en el país se viene utilizando la Manayupa en el área de Medicina Alternativa de los hospitales ESSALUD.

Su uso actual se basa solo en la experiencia y no en una base científica que pueda avalar los efectos terapéuticos de la Manayupa. La poca o escasa investigación en nuestro país sobre recursos vegetales y la falta de información sobre metodología para aislamiento de sustancias orgánicas secundarias de la planta como los flavonoides, me llevó a investigar un método de aislamiento de flavonoides por formación de complejos cúpricos, este puede ser el primer paso para investigaciones futuras y síntesis de estas importantes sustancias que puede derivar en el desarrollo de nuevos fármacos derivados de los flavonoides, así también, como una metodología de aislamiento de menor costo.

1.2 Formulación del Problema

1.2.1 Problema General

¿Existe una concentración de Cobre que permite la precipitación de flavonoides en el extracto alcohólico de *Desmodium molliculum*?

1.2.2 Problemas Específicos

¿Cuál es la concentración de cobre necesaria para formar precipitados insolubles con flavonoides de *Desmodium molliculum*?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar la existencia de concentraciones de cobre que permite la precipitación de flavonoides de *Desmodium molliculum*.

1.3.2 Objetivos Específicos

Determinar la concentración de cobre adecuada para la precipitación de flavonoides de *Desmodium molliculum*.

1.4 Hipótesis de la Investigación

1.4.1 Hipótesis General

Existe concentraciones de cobre que permite la precipitación de flavonoides de *Desmodium molliculum*.

1.4.2 Hipótesis Secundarias

Las posibles concentraciones de cobre adecuadas para la precipitación de flavonoides son: 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%.

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

En las siguientes líneas expongo los puntos que justifican los criterios de la investigación.

La posibilidad de formar complejos cúpricos insolubles con los flavonoides de *Desmodium molliculum*, permitió buscar un método de separación y poder aislar sus flavonoides.

El *Desmodium molliculum* o comúnmente conocida como Manayupa es muy usada en la serranía del país por sus propiedades depurativas, antiinflamatorias, antialérgicas y hasta se le atribuye propiedades anticonceptivas. No se tiene alguna prueba científica de cuál es el compuesto o sustancia que le da estos efectos terapéuticos.

No existe un método conocido para aislar flavonoides de *Desmodium molliculum* o Manayupa.

Los métodos de aislamiento de flavonoides actuales son muy costosos y usan una tecnología sofisticada.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

Al ser una investigación exploratoria y por los escasos estudios que se ha hecho a esta planta, mis antecedentes no son específicos. La metodología en la que se basó la investigación fue partir de consulta a profesionales, artículos científicos e información de internet.

2.1.1. Antecedentes Nacionales

La investigación realizada por Nancy Lozano R., Pablo Bonilla R., Jorge Arroyo A., Gladys Arias A., Angusta Córdova R., Fabiola Baldoceda (2001) **EVALUACION FITOQUIMICA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE *Desmodium molliculum*** concluyó que el efecto antiinflamatorio y cicatrizante, posiblemente se debe a los flavonoides presentes en los extractos vegetales. Así también no hay diferencias cualitativas de los metabolitos secundarios del *Desmodium molliculum*, pero sí hay una variación cuantitativa dependiente de las zona climáticas y geográficas de las muestras recolectadas. ⁽³⁾

La investigación realizada por Fidel Ernesto Acaro Chiquicaña (2010) **EFEECTO ANTICONCEPTIVO Y POST-COITAL DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL *Desmodium molliculum* (HBK). DC. “Manayupa” EN RATAS HEMBRAS CEPA HOLTZMANN** llegó a la conclusión que el extracto etanólico, al ser administrado por vía oral presenta efectos anticonceptivos y contraceptivo postcoital en ratas hembras cepa Holtzmann, este efecto probablemente se deba a la acción de flavonoides con acción estrogénica y no estrogénica a nivel uterino. ⁽⁴⁾

2.1.2. Antecedentes Internacionales

La investigación realizada por Priya R. Rao, K. Girish Kumar and Manoj C. Narayanan (2008) **UN NUEVO METODO DE AISLAMIENTO DE ISOFLAVONAS DE SOYA POR TECNICA COMPLEJA** llegó a la conclusión que el extracto de la planta forma complejos con sales selectivas, bajo condiciones de temperatura. Puede ser usado como método de aislamiento de flavonoides de la misma planta. La formación de compuestos insolubles fue mayor con sales de cloruro (cloruro de cobre, cloruro de cinc, cloruro de aluminio y cloruro de hierro).⁽⁵⁾

La investigación realizada por Regina M. S. Pereira, Norma E.D. Andrades, Niraldo Paulino, Alexandra C.H. F. Sawaya, Marcos. N. Eberlin, María C. Marcucci, Giovani Marino Favero, Estela María Novak y Sergio Paulo Byslowski (2007) **SINTESIS Y CARACTERIZACION DE COMPLEJOS METALICOS DE NARINGIN Y COBRE, Y SU ACCION ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIAL, ANTINFLAMATORIA Y CITOTOXICIDAD DE CELULAS TUMORALES** llegó a la conclusión que el cobre forma un complejo con Naringin (flavonoides), uniéndose a este en la posición 4 y 5 de su estructura química. Este complejo de Naringin con cobre (II) demostró tener una mayor acción antioxidante, antiinflamatoria y actividad citotóxica ante células tumorales a comparación del Naringin libre.⁽⁶⁾

La investigación realizada por Ana Victoria Carrión Jara y Cándida Rafaela García Gómez (2010) **PREPARACION DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACION DE EFICIENCIA DE METODICA,** concluyó que los extractos secos obtenidos mediante la Percolación según la USP XXX permite un mayor rendimiento en el 70% de las plantas objeto de estudios comparados con el rendimiento de extracción.⁽⁷⁾

La investigación realizada por Marzena Symonowicz y Mateusz Kolanek (2012) **FLAVONOIDES Y SUS PROPIEDADES PARA FORMAR COMPLEJOS QUELATOS**, demuestra las propiedades de los flavonoides para formar complejos con iones metálicos, los flavonoides por tener grupos hidroxilos en su estructura química tienden a reducirse con metales de transición, principalmente el ion hierro y el cobre.⁽⁸⁾

La investigación realizada por Safana Ahmed Farhan (2013) **ESTUDIO EN LA INTERACCION DE COMPLEJO DE COBRE(II) DE MORIN Y SUS ELECTOS ANTIMICROBIALES**, concluyó por espectrofotometría que hay formación del complejo cúprico cobre-flavonoides, demostrando que el cobre se une en la posición 4 y 5 del anillo C de la estructura química del Morín(flavonoide).⁽⁹⁾

La investigación realizada por Martina Medvidovi-Kosanovic, Mirela Samardzic, Nela Malatesti y Milan Sak-Bosnar (2011) **CARACTERIZACION ELECTROANALYTICA DEL COMPLEJO DE COBRE(II)-RUTINA**, concluyó que existe formación del complejo cúprico con el ion cobre(II) y la Rutina (flavonoide), demostrando gran selectividad y estabilidad en iones metálicos alcalino como el litio, sodio, potasio, entre otros.⁽¹⁰⁾

La investigación realizada por Dusan Malesev y Vesna Kuntic (2007) **INVESTIGACION DE QUELATOS METAL-FLAVONOIDE Y LA DETERMINACION DE FLAVONOIDES VIA REACCIONES COMPLEJO METAL-FLAVONOIDE**, concluyó que la acción antioxidante de los flavonoides se ve aumentada ante los radicales libres por la quelación con iones metálicos; además, detalla que la formación del complejo se da a un pH neutral o ligeramente básico y sería difícil la formación aun pH 3, por lo que se produciría una hidrólisis.⁽¹¹⁾

La investigación realizada por Young-Beob Yu (2014) **LA EFECTIVA PREPARACION DE FLAVONOIDES DE *Scutellaria baicalensis* Georgi POR RESINA Diaion HP-20**, concluyó que el método de extracción con la resina Diaion HP-20 es el método más adecuado para la extracción de flavonoides al comparar con diferentes métodos como etanol 50%, 70% y 90%.⁽¹²⁾

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Generalidades del *Desmodium molliculum*

2.2.1.1. Descripción General

La planta de *Desmodium molliculum* conocida como Manayupa es usada comúnmente como depurativa y desinflamatoria de aparato urogenital, taxonómicamente pertenece a la familia Fabaceae (antes llamada Leguminosae) es endémica de nuestro país.

Nombre científico:

Desmodium molliculum (HBK).DC.

Hedysarum Molliculum .H.B.K.

Mehommia mollicula (H.B.K).Kuntze⁽¹³⁾

Nombre Comunes:

Según fuentes orales y bibliográficas se le conoce con los siguientes nombres vulgares:

Desmodium moliculum (H.B.K.) D.C. conocida con los nombres vulgares de “manayupa” (del vocablo quechua mana: no, yupa: contra)⁽³⁾, Pata de perro, pie de perro, runa Manayupa, Pega Pega, Allco pachque, amor seco, carrapicho.⁽¹³⁾

2.2.1.2. Descripción Física

Planta herbácea perenne, hojas compuestas, trifoliadas, estipuladas y pubescentes. Inflorescencias terminales en pequeños racimos. Flores pequeñas blanco azulado o blanco rosado. Raíz abundante, penetra profundamente en el suelo, por lo que resisten sequías. ⁽¹⁴⁾

Se observa la planta de Manayupa (véase la figura N°1)

FIGURA N°1

PLANTA *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. Manayupa



Fuente: Ministerio del Ambiente (2015)

2.2.1.3. Origen y Distribución natural

Nativa de los Andes del país, ⁽¹⁵⁾ se desarrolla en climas fríos y alturas desde los 2800 hasta 3200 m.s.n.m, encontrándose en México, Guatemala, Colombia y Venezuela.

En nuestro país crece en las zonas altas de la Sierra en Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Junín, Lima, La Libertad, Apurímac y Huaraz. ⁽¹³⁾

2.2.1.4. Propiedades Terapéuticas

Antianafiláctica, antiasmática, antialérgica, antimicrobiana, medianamente antiespasmódica, antiinflamatoria, antimalarial, antiparasitaria (*Ascaris lumbricoides*), antitumoral, antiviral, aperitiva (estimulante del apetito), gastritis (agua y crónica), cronotrópico (controla la contracción del corazón), depurativo, digestivo (favorece el proceso de digestión), diurético, hepatoprotector, hipertensivo (saponinas, hordenina), hipolipidémica, medianamente hipotensiva (Astragalina), inmunomodulador, inotrópico (incrementa la fuerza de contracción del músculo cardíaco), detoxificante de la sangre y efecto sedación. ⁽¹⁵⁾

2.2.1.5. Composición Química

Ácidos orgánicos, Esteroides, Saponinas: Dehidrosoyasaponina I, soyasaponina I, Soyasaponina II, soyasaponina III, soyasaponinol B (soyasaponina I-IV), otras saponinas: triterpenoides; astragalina, beta-feniletildiamina, cosmosiin, hordenina, pelargonidina-3-orto-ramnoside, salsolina, Tectorigenina, Tetrahidroisoquinolinas, tiramina. ⁽¹⁶⁾
carotenoides, vitamina k, rivo flavina, sales de calcio y aluminio y ceras. ⁽¹³⁾

Proteínas y minerales:

La planta seca tiene alto contenido en proteínas y minerales:

Azufre, Calcio, cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, silicio, sodio, cinc. ⁽¹⁶⁾

Ácidos grasos:

Ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido gammalinolénico, ácido araquidónico. ⁽¹⁶⁾

Los compuestos en la mayoría del género *Desmodium*, son similares y solo difieren en su concentración.

2.2.2. Generalidades de los Flavonoides

Flavo, proviene del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, como la miel o el oro ⁽²⁾

Fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-Gyorgy, quien en 1930 aisló de la cascara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad capilar. En un principio se le denominó vitamina P (permeabilidad) y C2 (propiedades como la vitamina C). El hecho que fueran vitaminas no pudo comprobarse, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950. ⁽¹⁷⁾ El término de flavonoide se introdujo en 1952 por Geissman y Hirreier. ⁽¹⁸⁾

Son producto del metabolismo secundario de los vegetales. Abundan en las zonas aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, la luz solar favorece su síntesis ⁽¹⁹⁾, se han identificado más de 5000 flavonoides. ⁽²⁰⁾

Cumplen diferentes funciones en las plantas como: antioxidante, agente antimicrobiano y antinutricionales, fotoreceptor, secuestrados de radicales libres, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, además de su acción farmacológica. ⁽²⁰⁾

2.2.2.1. Estructura y clasificación de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).⁽¹⁷⁾ Su síntesis se produce a partir de acetatos y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Estos forman el ácido cinámico y parahidroxicinámico, dando paso al condensarse a la estructura del cinamol de los flavonoides.⁽²⁾

Clasificación:

Flavanos (catequina) posee un grupo –OH en posición 3 del anillo C.

Flavonoles (quercitina) posee un grupo carbonilo en posición 4 y grupo –OH en posición 3 del anillo C.

Flavonas (Diosmetina), posee grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y no tiene el grupo –OH en posición C3.

Antocianidinas, tiene grupo –OH en posición 3 y también doble enlace en el carbono 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función:

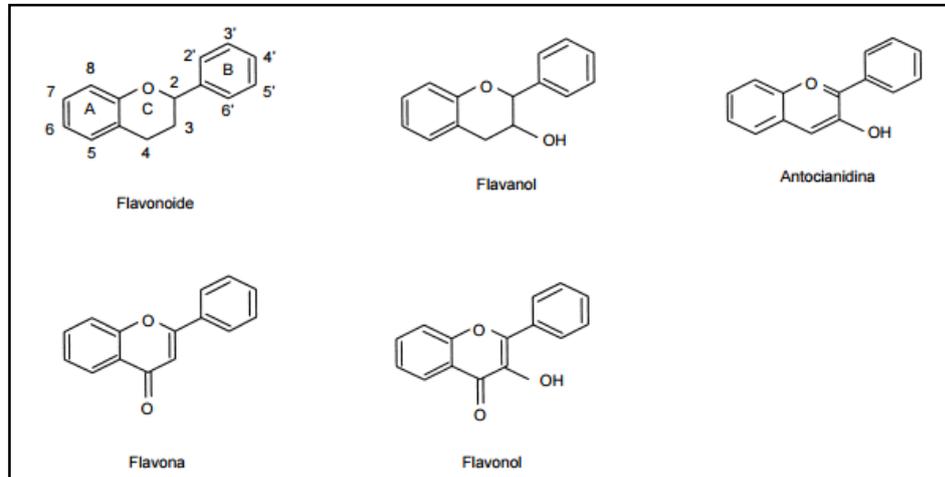
La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.

La presencia de un doble enlace en posición 2,3.

La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.⁽¹⁷⁾

FIGURA N°2

Flavonoides. Estructura básica y tipos.



Fuente: Revista Nutrición Hospitalaria

Imagen tomada del sitio Web Nutrición hospitalaria:
<http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>

(Fecha de actualización: 25 de noviembre de 2015)

2.2.2.2. Usos terapéuticos de los flavonoides

Síntomas del climaterio

Las isoflavonas encontrados principalmente en la soya (*Glycine max*) y el trébol rojo (*Trifolium pratense*). La actividad estrogénica se conoció a partir de los años 40, cuando se responsabilizó a los campos de trébol de la infertilidad de ovejas en el oeste de Australia.

Tiene una acción agonista sobre los receptores estrogénicos del centro termorregulador hipotalámico⁽¹⁸⁾

Acción antioxidante:

Se ha comprobado en ensayos clínicos, que la administración profiláctica de flavonoides disminuye la producción de radicales libres en cirugías vasculares. ⁽¹⁷⁾

La quercitina ejerce acción antioxidante, además de ser cinco veces mayor que la de las vitaminas C y E. Ejerce un acción sinérgica con las vitaminas anteriormente nombradas, pues al actuar juntas permite mantener el su efecto antioxidante por mayor tiempo y también protege de la oxidación a la vitamina E. ⁽²⁾

Acción hipolipemiente:

Actualmente se están estudiando sus efectos en la prevención de la aterosclerosis. ⁽¹⁸⁾

Acción cardiovascular:

Los flavonoides se caracterizan por tener un potencial oxidante fuerte y su ingesta ha sido relacionada con una disminución de la morbilidad y mortalidad por cardiopatías en varios estudios epidemiológicos. ⁽²¹⁾ En ratas se ha podido observar, que la quercitina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo, así también mejora la circulación coronaria y previniendo la formación de trombos. ⁽¹⁷⁾

Acción neuroprotectora:

Algunas experiencias en animales sugieren que la administración de flavonoides, por su efecto antioxidante, puede revertir la transducción deficiente de señales neuronales relacionadas con la edad (enfermedades Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica). ⁽¹⁸⁾

Acción antitumoral:

Entre las posibilidades para encontrar el mecanismo de acción antitumoral esta de la actividad estrogénica y sus propiedades antiproliferativas, inducción de apoptosis. La capacidad de

isoflavonas como (Genisteína y Daidzeína) hacen posible su uso para tratar carcinomas prostáticos y de mama. ⁽¹⁸⁾ La genisteína bloquea el desarrollo del tumor al bloquear la formación de nuevos vasos impidiendo la llegada de nutrientes a las células tumorales. ⁽¹⁷⁾

Acción antiinflamatoria

Los flavonoides actúan suprimiendo la fagocitosis de los macrófago y la activación de mastocitos. Aparte de su interacción con mediadores proinflamatorios como las prostaglandinas puede ser responsable de esta acción. ⁽¹⁸⁾

Acción antiasmática

Flavonoides como baicaleína, medicarpina y davidigenina han demostrado propiedades inhibitoras de leucotrienos y se usa para tratar el asma bronquial. ⁽¹⁸⁾

Acción antialérgica

Se debe a la afinidad de los flavonoides sobre mastocitos y basófilos, su acción para tratar la urticaria, anafilaxia, asma bronquial, rinoconjuntivitis. ⁽¹⁸⁾ Muchos de estos efectos antiinflamatorios y antialérgicos podrían explicarse por la inhibición sobre el factor de transcripción nuclear kappa B, activador de muchas citocinas proinflamatorias. ⁽¹⁷⁾

Acción antiulcerosa

Ciertos flavonoides tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*, causante de un elevado número de úlceras gastro-duodenales. ⁽¹⁸⁾

Acción antiviral

Las propiedades antivirales son conocidas desde los años cuarenta. En la actualidad se está llegando a estudiar la posibilidad de administrar tratamiento combinados con agentes antivirales para incrementar su eficacia ⁽¹⁸⁾

También se ha demostrado acción antibacteriana, antiespasmódica, antioxidante y diurética.

2.3. Definición de Términos Básicos

2.3.1. Climaterio

Es un periodo de transición de la vida reproductiva de la mujer a la no reproductiva. Comienza aproximadamente de 5 a 10 años antes de la menopausia y dura de 10 a 15 años.

Se caracteriza por una deficiencia de estrógenos. La menopausia es el último periodo, cuando se observa cese de las menstruaciones por un espacio mayor a un año, con pérdida de la función ovárica.⁽²²⁾

2.3.2. Enfermedad de Parkinson:

Es un trastorno del sistema neurodegenerativo de las neuronas que se encuentran en la sustancia negra. Estas neuronas producen la dopamina encargada para que los movimientos del cuerpo se realicen correctamente.

2.3.3. Enfermedad de Alzheimer:

Es una enfermedad que abarca problemas de la memoria, el pensamiento y el comportamiento. Entre las causas están la edad, antecedentes familiares y factores genéticos.

2.3.4. Anafilaxia:

Es una reacción alérgica grave, causado por un alérgeno. Después de estar expuesta a este alérgeno el sistema inmunitario puede volverse sensible a esta y cuando la persona se vuelve a exponer al alérgeno de nuevo presenta una reacción alérgica.

2.3.5. Urticaria:

Es una afección de la piel, se manifiesta por ronchas o habones, ligeramente elevadas, provocan intenso picor.

2.3.6. Mastocito:

Son células encontradas en el tejido conjuntivo, mucosas y diferentes órganos. Encargadas de enviar señales al sistema inmunitario y ejercer una respuesta de defensa ante bacterias o parásitos.

2.3.7. Metabolitos Primarios y secundarios:

Los metabolitos primarios son compuestos químicos que interviene en procesos que cada planta cumple como: fotosíntesis, síntesis de proteínas, enzimas, duplicación de material genético.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos cumplen funciones no esenciales, su ausencia o es letal para la planta, entre estos se encuentran: los terpenos, compuesto fenólicos y derivados y los compuestos nitrogenados o alcaloides.

2.3.8. Cromatografía:

Es una técnica de separación en la que dos componentes se distribuyen en dos fases, una inmóvil (fase estacionaria), y otra móvil (fase móvil). Se produce por resultado de sorción - desorción de los componentes arrastrados por la fase móvil, produciendo la separación por diferencias en las constantes de distribución de los componentes entre la fase estacionaria y la móvil.

Existen diferentes tipos de cromatografía:

Por la naturaleza de sus fases:

- Cromatografía líquido - líquido
- Cromatografía gas - líquido
- Cromatografía líquido - sólido
- Cromatografía gas – sólido

Por proceso químico-físico en el proceso de separación:

- Cromatografía de adsorción (líquido – sólido o cromatografía de fases normales)
- Cromatografía de Reparto (líquido – líquido), por la solubilidad de los solutos entre la fase móvil y fase estacionaria (líquido no polar).
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión.

Soporte en la fase estacionaria:

- Cromatografía plana: cromatografía en papel y cromatografía en capa fina (TLC)
- Cromatografía en columna: Cromatografía de gases (GC) y Cromatografía líquida (LC).

2.3.9. Cromatografía en capa fina:

La fase estacionaria está fijada a un soporte sólido de aluminio, plástico o aluminio. Después de aplicar la muestra, el disolvente comienza a producir la separación.

La ventaja de la cromatografía en capa fina es que se puede analizar simultáneamente una muestra y un patrón.

La mancha en una placa cromatografía es por la distancia que recorre en relación a la distancia recorrida por la fase móvil.

La detección y ubicación de las manchas en la placa cromatografía se hace observando con la absorción UV, de un indicador. Se puede observar el color de los compuestos después de reaccionar con reactivos específicos para grupos o metales, rociados sobre la placa.

2.3.10. Complejo Metálico

Un complejo metálico está formado por la unión de iones metálicos a varios aniones o moléculas circundantes conocidos como ligando. Los átomos de los elementos metálicos tienden a perder electrones para convertirse en cationes (carga positiva) es muy común que se asocie a moléculas e iones donadores una o dos pares de electrones para aumentar su estabilidad.

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. Tipo de Investigación

Aplicativo, Se preparó diferentes concentraciones de cobre para determinar la concentración adecuada para la precipitación con flavonoides.

3.2. Nivel de Investigación

Exploratoria, porque la metodología no ha sido anteriormente aplicada. La base para el procedimiento es netamente investigativa.

Descriptiva, una vez obtenido los resultados de precipitados se analizaron y se determinó cual es la concentración de cobre adecuada para formar complejos insolubles.

3.3. Método de investigación

Deductivo y Laboratorio

3.4. Diseño de investigación

Experimental Puro, no hay investigaciones científicas del *Desmodium molliculum*.

3.5. Población y Muestreo de la Investigación

3.5.1. Población

Plantas de *Desmodium molliculum* "Manayupa" comercializados en Mercado mayorista de Ate.

3.5.2. Muestra

Se usó 1000 gr. de la planta de *Desmodium molliculum* "Manayupa"

La preparación del extracto metanólico se efectuó en el laboratorio de la Facultad de farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.6. Variables e Indicadores

VARIABLE	INDICADORES
Concentración de Complejos cúpricos insolubles con flavonoides	Precipitados con flavonoides: 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%.

3.7. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.7.1. Técnicas

3.7.1.1. Obtención de la Materia Prima

A. Adquisición de Especie vegetal

Se recolectó 1000 gr. de *Desmodium molliculum* del Mercado Mayorista La Parada (Av. Aviación)

B. Selección, limpieza y Secado

Se lavó las hojas y tallos con agua destilada y se separó las partes deterioradas.

Se cubrió con papel craft y se dejó secar a temperatura ambiente en sombra por 5 días.

Posteriormente, se llevó a estufa a temperatura de 40°C, hasta deshidratar la planta totalmente.

FIGURA N°3

Hojas y tallos de *Desmodium molliculum*



Fuente: Elaboración propia

3.7.1.2. Obtención del extracto Metanólico

A. Molienda

Se molió las hojas y tallos secos con un molino de mano. La muestra molida fue pesada y se obtuvo 85gr.

B. Desengrasado

La muestra se desengrasó con éter de petróleo 40°. La muestra molida se colocó en un frasco de boca ancha color caramelo de capacidad de 1 litro.

A la muestra molida se agregó 400ml. de éter de petróleo, una vez cerrado el frasco se agitó por 10 minutos y se dejó reposar por 24 horas repitiendo el procedimiento 2 veces. Se dejó macerar por 2 días.

Se filtró la muestra y se desechó el extracto etéreo y se dejó abierto el frasco al ambiente por 24 horas para que volatilice el restante de éter de petróleo que pudo haberse quedado adherido a la muestra.

C. Maceración en Frío

Se pesó 75gr. de la muestra restante a la cual se agregó 600ml. de Metanol y se dejó macerar por 7 días, agitando el frasco diariamente por 10 minutos.

D. Filtrado y Evaporación

Se filtró la muestra, el extracto metanólico restante se refiltró y se llevó a estufa a 40°C por 24 horas en una bandeja.

Una vez concentrada la muestra, se pesó y se redisolvió en 50ml. de metanol.

Se envaso en frasco ámbar de vidrio de 60ml. de capacidad.

3.7.1.3. Fraccionamiento del extracto metanólico

A. Preparación de la resina

Se pesó 4 gr. de Resina Diaion HP 20, Esta resina se le agregó 20ml. de metanol en un matraz y luego se centrifugó a 175 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

La resina se enjuagó con agua destilada en proporción de líquido a sólido de 5 (g/g).

B. Adsorción de la muestra

Se midió 15 ml. del extracto metanólico y se agregó a la resina, dejando reposar por 1 hora, agitando cada 10 minutos. Una vez concluido el tiempo se decantó el sobrenadante.

FIGURA N°4

Extracto metanólico con Resina



Fuente: Elaboración propia

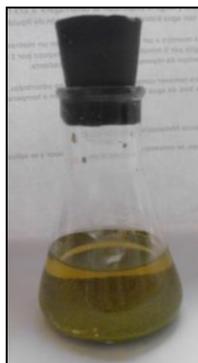
C. Lavado y desorción

Se usó agua destilada para remover otros compuestos no adsorbidos. El lavado se hizo en dos etapas con 3ml. y agitando la resina.

Para la desorción se empleó 20ml. de una mezcla de metanol/agua al 95% v/v a 40°C – 50°C.

FIGURA N°5

Elución de la Resina en metanol/agua 95%

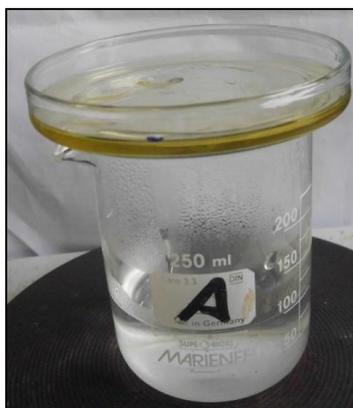


Fuente: Elaboración Propia

Se agitó por 10 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante, vertiéndose en una placa petri en baño de vapor para concentrar la muestra hasta 10 ml. aproximadamente.

FIGURA N°6

Concentrado del eluato Metanol 95%.



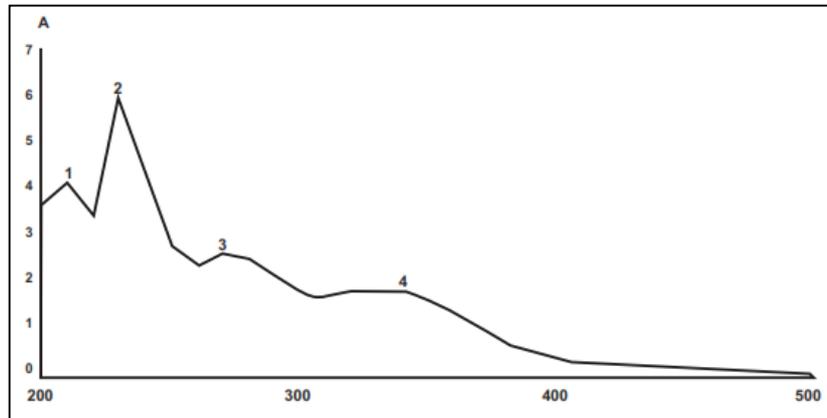
Fuente: Elaboración propia

D. Lectura al Espectrofotómetro del eluato del extracto metanólico

El eluato del extracto metanólico concentrado se leyó al espectrofotómetro UV a una absorbancia de 200 a 500 nm.

FIGURA N°7

Espectro UV de Barrido del Eluato 95% Metanol-Agua



Fuente: Elaboración propia

Se observó la presencia de 4 picos de absorbancia, demostrándose la presencia de flavonoides. La absorbancia de los 4 picos fue la siguiente:

Pico 1: 210 nm; 4.131 A

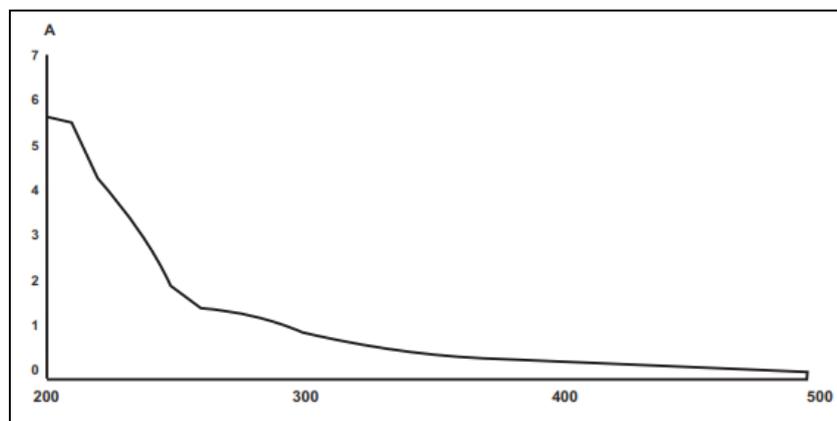
Pico 2: 230nm; 6000 A

Pico 3: 270nm; 2.625 A

Pico 4: 340nm; 1.820 A

FIGURA N°8

**Espectro UV de Barrido del Sobrenadante del Precipitado Eluato 95%
Metanol-Agua y Cobre**



Fuente: Elaboración Propia

3.7.1.4. Formación de complejos cúpricos

Se preparó las 5 concentraciones de cobre al 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%, a partir de cloruro de cobre di hidratado.

FIGURA N°9

Pesado de cloruro de cobre



Fuente: Elaboración propia

FIGURA N°10

Concentraciones de Cobre

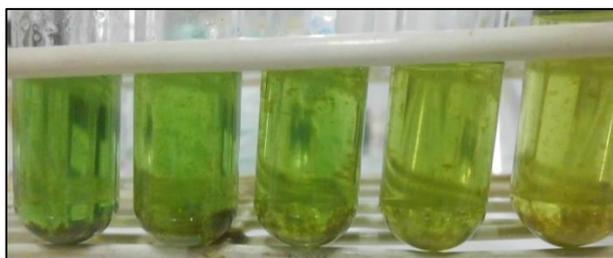


Fuente: Elaboración propia

Una vez terminada de preparar las concentraciones, se procedió a verter 1 ml. de cada concentración en un tubo de ensayo. Posteriormente en cada tubo se agregó 1ml. de la elución concentrada del extracto metanólico.

FIGURA N°11

Formación de precipitados cúpricos



Fuente: Elaboración propia

Se puede observar la formación del precipitado cúprico al contacto con la elución del extracto metanólico.

De izquierda a derecha las concentraciones de cobre son: 2%, 1.75%, 1.5%, 1.25 y 1%.

3.7.1.5. Cromatografía en capa fina

Una vez formado el precipitado se procedió a filtrar cada tubo. El precipitado se guardó y el filtrado se vertió en viales.

FIGURA N°12

Filtrado de los precipitados cúpricos



Fuente: Elaboración propia

A. Preparación de la fase móvil

Se preparó la fase móvil para la corrida cromatográfica, se prepararon dos fases móviles para 2 placas:

1° Fase móvil: Cloroformo/Acetato de Etilo se preparó 20ml. en proporción 1:1 respectivamente.

2° Fase móvil: Acetato de etilo/ ácido fórmico/Ácido acético/Agua se preparó 30ml. en proporción 100:11:11:26 respectivamente.

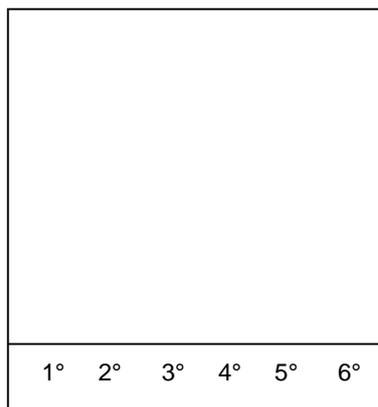
B. Cromatografía

Se sembró en cada placa la elución del extracto metanólico y los sobrenadantes de los precipitados cúpricos (1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%).

Se desarrolló la cromatografía con cada placa en su fase móvil.

FIGURA N°13

Distribución del sembrado en la placa cromatográfica



Fuente: Elaboración propia

Se sembró para las dos placas con su respectiva fase móvil de la siguiente manera:

En el 1°: Filtrado del precipitado con cobre 2%

En el 2°: Filtrado del precipitado con cobre 1%

En el 3°: Elución del extracto metanólico

En el 4°: Filtrado del precipitado con cobre 1.75%

En el 5°: Filtrado del precipitado con cobre 1.25%

En el 6°: Filtrado del precipitado con cobre 1.5%

FIGURA N°14

Cromatografía en capa fina



Fuente: Elaboración propia

Al final, se dejó secar al ambiente la placa cromatográfica.

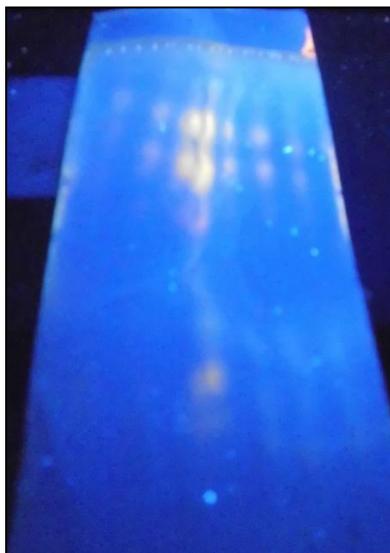
C. Revelado

Cada placa se reveló con el vapor de amoníaco concentrado y después de 5 minutos se esparció el revelador difenilborinato 1%, se dejó reposar por otros 5 minutos y se esparció propilenglicol 5%.

Finalmente, se llevó inmediatamente a la luz ultravioleta.

FIGURA N°15

Revelado en UV de la placa cromatográfica



Fuente: Elaboración propia

Puede observarse luz fluorescente al revelado UV visible de intensidad variable demostrando la concentración variable de los flavonoides en el eluato y el sobrenadante de los precipitados cúpricos.

3.7.1.6. Separación de los flavonoides del complejo cúprico

Se comprobó la formación del complejo cúprico con los flavonoides del *Desmodium molliculum* en el precipitado con la separación por hidrólisis ácida.

Se midió 3ml. de cloruro de cobre 2% y 3ml. del eluato, se llevó a baño María por 15 minutos y luego se vació en 9ml. de agua helada, se dejó reposar por 30 minutos, se centrifugó y se decantó el sobrenadante para lavarlos con una mezcla de metanol-agua 1:3 y se volvió a centrifugar.

FIGURA N°16

Precipitado del complejo cúprico en la mezcla Metanol – Agua



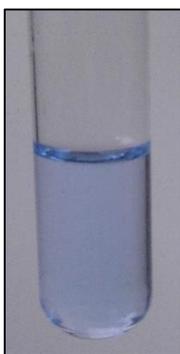
Fuente: Elaboración propia

A. Hidrólisis del complejo cúprico

Se agregó ácido clorhídrico 1M sobre el precipitado, posteriormente se agregó acetato de etilo y agua, este sobrenadante se llevó a un pera de bromo donde se observó una coloración azulina en la fase acuosa e incolora en la fase orgánica.

FIGURA N° 17

Presencia de Cobre de la separación del complejo cobre - flavonoides



Fuente: Elaboración propia

La fase orgánica con el acetato de etilo se procedió a llevar a cromatografía en capa fina junto con el eludado de la resina.

Observándose la presencia de flavonoides en el revelado. Con esto se logró la separación del complejo cúprico.

3.7.2. Instrumentos

Materiales y equipos:

- Beakers
- Agitador Magnético
- Balanza
- Cámara cromatográfica
- Centrifugadora
- Lámpara de luz ultravioleta
- Matraces
- Tubos de ensayo
- Mechero
- Embudo
- Pera de Bromo
- Viales
- Propipetas
- Papel filtro
- Cámara de Flujo laminar
- Bureta
- Probeta
- Balanza
- Molino de Mano
- Papel Craft
- Frascos ámbar color caramelo
- Placas cromatográficas de sílice de aluminio GF254 Marca Merck de 20 x 20cm.
- Resina Diaion HP20

Reactivos

- Acetato de Etilo
- Éter de Petróleo
- Ácido Acético glacial
- Acido fórmico
- Etanol
- Agua destilada
- Amoniaco Concentrado
- Cloruro de cobre dihidratado
- Metanol
- Ácido Clorhídrico

CAPITULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados son a partir del revelado de la placa cromatográfica con luz UV.

Fase Estacionaria:

Placas Cromatográficas de aluminio recubiertas de sílica gel GF254 Marca Merck de 20 x 20cm.

Fase Móvil:

1° Fase móvil: Cloroformo - Acetato de Etilo (1 /1)

2° Fase móvil: Acetato de Etilo – ácido fórmico – ácido acético – Agua (100/11/11/26)

Reactivo Revelador: Difetilborinato 1% y propilenglicol 5%

CUADRO N°1

Resultados de la Cromatografía

Muestra	Densidad de la concentración del eluato en la placa cromatográfica (Fase móvil de Cloroformo- Acetato de etilo)	Densidad de la concentración del eluato en la placa cromatográfica (Fase móvil de Acetato de etilo- ácido fórmico- ácido acético – Agua)
1%	+++	++
1.25%	+++	++
1.5%	++	+
1.75%	++	+
2%	+	+
Muestra patrón	++++	+++

++++= muy visible +++ = visible ++ = poco visible + = no visible

Resultado: El revelado de ambas placas cromatográficas fue a la luz ultravioleta. El revelado de placa cromatográfica es un resultado cualitativo. Las marcas del recorrido del eluato nos indican la presencia de flavonoides. Las marcas son más pronunciadas en la muestra patrón (eluato del extracto metanólico) y con mayor claridad en los sobrenadantes de las concentraciones al 1% y 1.25% de cobre. El sobrenadante de concentración al 2% presenta poca o ninguna presencia de flavonoides la no observase en la práctica una marca de su recorrido en la placa cromatográfica.

DISCUSIÓN

En el estudio realizado por Lozano (2001), concluyó que el efecto antiinflamatorio y cicatrizante del *Desmodium molliculum* es debido a la presencia de flavonoides en el extracto vegetal. El revelado de la cromatografía y lectura al espectrofotómetro demostró la presencia de flavonoides en el *Desmodium molliculum*.

Según la investigación de Acaro (2010), la posible presencia de flavonoides en el *Desmodium molliculum* da el efecto anticonceptivo al ser administrado en extracto alcohólico en ratas. En los resultados, La presencia de flavonoides en el *Desmodium molliculum* fue positiva en el revelado de la cromatografía.

El estudio de R. Rao (2008), llegó a la conclusión que las isoflavonas de la soya pueden ser aisladas por formación de compuestos insolubles con sales de cloruro (cobre, cinc, aluminio y hierro). El *Desmodium molliculum* tiene la misma familia que la Soya (leguminosae), por lo que la formación de los compuesto insolubles resultó positiva, lográndose aislar estos flavonoide del *Desmodium molliculum*. El tomar las concentraciones de cobre de 1%, 1.25%, 1.50, 1.75% y 2% guardan relación con el estudio de R. Rao.

Según Pereira (2007), El cobre forma un complejo con el Naringin (flavonoide) uniéndose en la posición 4 y 5 de su estructura química, demostrando una unión estable. La formación del complejo cobre y los flavonoides del *Desmodium molliculum* resultó ser estable y solo se llegó la ruptura de este enlace por hidrólisis en medio ácido.

Según el estudio de Carrión (2010), la preparación de extractos vegetales por percolación demostró un mayor rendimiento en la extracción, tomando en cuenta

estos estudios, el extracto metanólico se hizo por percolación, obteniéndose buen rendimiento y la muestra suficiente en la parte experimental.

Según los resultados de los estudios de Symonowicz (2012) demuestra las propiedades de los flavonoides para formar complejos con iones metálicos como el hierro y cobre, esto debido a los grupos hidroxilos en la estructura de los flavonoides que tienden reducirse al unirse con el cobre, formando un complejo estable. Al eluato del extracto metanólico del *Desmodium molliculum* se le aplicó diferentes concentraciones de Cu (II) para la formación de precipitados correspondientes al complejo cúprico, cobre-flavonoides. La formación de este complejo fue con todas las concentraciones de cobre.

Estudios de Farhan (2013) demuestran la formación de complejos entre el ion cobre (II) y flavonoides por Espectrofotometría UV Visible. También se observa la formación del complejo cobre-flavonoide como un precipitado marrón. Estos resultados se confirmaron con los flavonoides del *Desmodium molliculum*.

El estudio de Medvidovic-Kosanovic (2011) evidencia la formación del complejo del ion cobre (II) con Rutina (flavonoide). Este resultado, como el de Symonowicz (2012) y el de Pereira (2007), confirman la formación del complejo cobre y flavonoides del *Desmodium molliculum*.

El estudio de Malesev (2007) concluye principalmente que la formación del complejo se da a un pH neutral o ligeramente básico y sería difícil la formación a pH ácido, por lo que se produciría una hidrólisis. Estas conclusiones se corroboraron al agregar un ácido fuerte directamente en el precipitado, esto produjo la hidrólisis del enlace cobre-flavonoide, extrayendo en dos fases: fase orgánica (flavonoide) mientras que en la fase inorgánica (cobre), observándose por su coloración azulina (Fig. 17)

Para fraccionar y concentrar los flavonoides se usó la técnica de extracción en fase sólida con la resina Diaion HP-20. Estudios anteriores de Young-Beob (2014) compara la extracción de flavonoides por diferentes métodos de absorción (etanol 50%, 70%, 90% y resina Diaion HP-20), resultando la mayor concentración de componentes por la resina Diaion HP-20. De este resultado, se demuestra que es un método adecuado para la extracción de flavonoides.

CONCLUSIONES

- Hay formación del complejo flavonoide-cúprico insoluble. Se demuestra por la lectura al espectrofotómetro antes y después de la formación del precipitado, en la que se aprecian los picos de absorbancia y después no, respectivamente.
- Hay formación del complejo insoluble con todas las concentraciones de cobre. El revelado cromatográfico a la luz violeta demuestra que hay una mayor luminosidad en la mancha del eluato y esta luminosidad va disminuyendo conforme el sobrenadante sembrado es del complejo formado con mayor concentración de cobre. Esta luminosidad es directamente proporcional a la concentración de flavonoides en las muestras.

La formación del precipitado depende directamente de la concentración de cobre, a mayor concentración hay un mayor precipitado y una mayor formación del complejo cúprico insoluble.

RECOMENDACIONES

- El Desengrasado con éter de petróleo es un paso fundamental en la preparación de la muestra, porque al tener el éter un carácter no polar permite extraer compuestos químicos no polares que interferirían en los resultados. Los flavonoides por ser compuesto fenólicos tienen carácter polar y es necesario no excluir el desengrasado de la planta molida.
- El método por maceración en frío del extracto metanólico con metanol demostró ser una buena alternativa, si no se cuenta con un equipo soxhlet para la extracción por reflujo.
- Para el revelado de la placa cromatográfica con el difenilburinato, es necesario usar una cámara de reflujo por ser una sustancia muy tóxica, de igual manera para el revelador se recomienda rociar una cantidad moderada, ya que, no se podría observar claramente con la luz UV.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Varas Pacheco D. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica Hplc. Tesis de Grado. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Escuela de Química y Farmacia; 2004.
2. Escamilla Jiménez CI, Cuevas Martínez EY, Guevara Fonseca J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *medigraphic Artemisa*. 2009 Marzo - Abril; 52(2).
3. Lozano R. N, Bonilla R. P, Arroyo A. J, Arias A. G, Córdova R. A, Baldoceca F. Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa). *Ciencia e Investigación*. 2001; IV (2).
4. Acaro Chuquicaña FE. Efecto anticonceptivo y post-coital del extracto etanólico del *Desmodium molliculum* (HBK). DC. "Manayupa" en ratas hembras cepa holtzmann. Tesis magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2010.
5. R. Rao P, Kumar G, Narayanan M. A New Method of Isolation of isoflavones from *Glycine max* (Soya Beans) by Complexation Technique. *Asian Journal of Scientific Research*. 2008; 1(2) (176-179).
6. S. Pereira RM, D. Andrades NE, Paulino N, F. Sawaya ACH, Eberlin MN, Marcucci MC, et al. Synthesis and Characterization of a Metal Complex Containing Naringin and Cu, and its Antioxidant, Antimicrobial, Antiinflammatory and Tumor Cell Cytotoxicity. *Molecules*. 2007 Julio; XII (1352 - 1366).
7. Carrión Jara AV, García Gómez CR. Preparación de Extractos Vegetales: Determinación de Eficiencia de Metódica. Tesis de grado. Cuenca: Universidad de Cuenca, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2010.
8. Symonowicz M, Kolanek M. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnology and Food Sciences*. 2012; 76(1) (35-41).
9. Farhan Ahmed S. Study on the Interaction of Copper (II) Complex of Morin and its antimicrobial effect. *Sadguru Publications*. 2013; 11(3) (1247-1255).
10. Medvidovic-Kosanovic M, Samardzic M, Malatesti N, Sak-Bosnar M. Electroanalytical Characterization of a Copper(II)-Rutin complex. *International Journal of Electrochemical science*. 2011; VI (1075-1084).

11. Malesev D, Kuntic V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2007 Abril; 72(10)(921-939).
12. Young-Beob Y. The Effective Preparation of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* by Diaion HP-20 resin. *The plant Resources Society of Korea*. 2014 Junio; 27(6) (635-641).
13. INKAPLUS. sitio Web de INKAPLUS. [Online].; 2011 [cited 2015 Noviembre 22. Available from: <http://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Manayupa.pdf>.
14. Ministerio del Ambiente. sitio Web Biblioteca Ambiental. [Online].; 2002 [cited 2015 Noviembre 22. Available from: <http://bibliotecavirtual.minam.gob.pe/biam/bitstream/handle/minam/1455/BIV01236.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
15. Laboratorios Fitofarma E.I.R.L. sitio Web Laboratorios Fitofarma E.I.R.L. [Online].; 2013 [cited 2015 Noviembre 22. Available from: <http://www.laboratoriosfitofarma.com/doc/manayupa.pdf>.
16. Botanical-Online SL. sitio Web de Botanical-Online SL. [Online].; 1999 [cited 2015 Noviembre 22. Available from: <http://www.botanical-online.com/col/manapuya7.htm#>.
17. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002; VI (17).
18. Cita Publicaciones y Documentación SL. Especial I Congreso de Fitoterapia. *Revista de Fitoterapia*. 2002 Abril; II (1).
19. López Luengo T. Flavonoides. *Ámbito farmacéutico*. 2002 Abril; 21(4).
20. Castillo Osorio CA, Medina Gamboa CS. Identificación de Metabolitos secundarios presentes en la planta Nativa Cucharilla (*Oreocallis grandiflora*). Tesis de Grado. Lima: Universidad Nacional del Callao, Facultad de Ingeniería Química; 2013.
21. O. Russa R, Esperanza Sánchez M. Los Flavonoides en la terapia cardiovascular. *Revista Costarricense de Cardiología*. 2006 Enero - Abril; VIII (1).
22. Salvador J. Climaterio y Menopausia: Epidemiología y Fisiopatología. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2008 Mayo; 54(61 - 78).

ANEXO: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Proyecto de Tesis: Complejos Cúpricos insolubles con flavonoides de *Desmodium molliculum*

Bachiller: HUAMANI ZAMBRANO, Dante Alfonso

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
¿Existe una concentración de Cobre que permite la precipitación de flavonoides en el extracto alcohólico de <i>Desmodium molliculum</i> ?	Determinar la existencia de concentraciones de cobre que permite la precipitación de flavonoides de <i>Desmodium molliculum</i> .	Existe concentraciones de cobre que permite la precipitación de flavonoides de <i>Desmodium molliculum</i> .	<p>Tipo de Investigación</p> <p>Aplicativo,</p> <p>Se preparó diferentes concentraciones de cobre para determinar la concentración adecuada para la precipitación con flavonoides.</p>	<p>Método de investigación</p> <p>Deductivo y laboratorio</p>	<p>Variable:</p> <p>Concentración de Complejos cúpricos insolubles con flavonoides</p> <p>Indicadores:</p>	<p>Población:</p> <p>Plantas de <i>Desmodium molliculum</i> "Manayupa" comercializados en Mercado Mayorista de Ate</p>
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis específicas				
P.E.1.: ¿Cuál es la concentración de cobre necesaria para formar precipitados insolubles con flavonoides de <i>Desmodium molliculum</i> ?	O.E.1.: Determinar la concentración de cobre adecuada para la precipitación de flavonoides de <i>Desmodium molliculum</i> .	H.E.1: Las posibles concentraciones de cobre adecuadas para la precipitación de flavonoides son: 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%.	<p>Nivel de Investigación</p> <p>Exploratoria y Descriptiva</p> <p>Exploratoria, porque la metodología no ha sido anteriormente aplicada. La base para el procedimiento es netamente teórica.</p> <p>Descriptiva, una vez obtenido los resultados de precipitados se analizaran, qué concentración de cobre es la adecuada para formar complejos insolubles.</p>	<p>Diseño de Investigación</p> <p>Experimental Puro</p>	<p>Precipitados de flavonoides: 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2%.</p>	<p>Muestra:</p> <p>Se usarán 1000 gr. de la planta de <i>Desmodium molliculum</i> "Manayupa"</p>