

## Artículo Original

**Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (Manayupa)****Secondary metabolites in ethanolic extract of leaves of *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (Manayupa)**Danilo Barreto<sup>1\*</sup>, Pablo Bonilla<sup>2</sup>

\* Autor para correspondencia

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas Departamento Académico de Física y Química UNFV. Email: danbarusmp@gmail.com<sup>2</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara". Email: pbonillar@unmsm.edu.pe**Resumen**

El presente se realizó con el objetivo de evaluar la presencia y tipo de flavonoides y saponinas en extractos alcohólicos de hojas de *Desmodium molliculum* HBK "manayupa" con el propósito de contribuir a un mejor conocimiento de la composición química de esta planta. La especie fue colectada en el distrito de Baños del Inca de la Ciudad de Cajamarca, departamento de Cajamarca a 2776 msnm. La marcha fitoquímica confirmó la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides y saponinas. El análisis cromatográfico del extracto alcohólico usando como patrones los isoflavonoides genisteína y daizeína y el flavonoide vitexina, reveló la probable presencia de estos flavonoides en el extracto alcohólico. El análisis espectroscópico UV permitió confirmar uno de los isoflavonoides como genisteína y otro probablemente 5-O-metil-genisteína. Adicionalmente el análisis cromatográfico usando como referencia extractos metanólicos de semillas desengrasadas de soya, mostró la presencia de trazas de soyasaponinas en el extracto alcohólico.

**Palabras clave:** *Desmodium molliculum*; isoflavonoides; soyasaponinas.

**Abstract**

The aim of this study was evaluate presence of flavonoids and saponins in alcoholic extracts of leaves of *Desmodium molliculum* HBK "manayupa". These metabolites was valued with the aim of contributing to a better understanding of the chemical composition of this plant. The species was collected in the district of Baños del Inca City of Cajamarca, department of Cajamarca to 2776 meters. The phytochemical march revealed the presence of tannins, flavonoids, alkaloids and saponins in the alcoholic extract. Chromatographic analysis of the alcoholic extract using isoflavones genistein and daizein and vitexin flavonoid as reference standard revealed the probable presence of these isoflavonoids and the flavonoid in the alcoholic extract. UV spectroscopic analysis allowed us to confirm one of the isoflavone as genistein and 5-O-methylgenistein in addition chromatographic analysis using methanol extracts of defatted soybeans showed the probable presence of soyasaponins in the alcoholic extract.

**Keywords:** *Desmodium molliculum*; isoflavonoids; soyasaponins.

**Correspondencia:**

Nombre: Danilo Barreto

Dirección: Jr. Puno 1002 Lima.

Recibido: 04/06/2016

Aceptado: 29/09/2017

**Citar como:**

Barreto D, Bonilla P. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de hojas de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (Ma-nayupa). Ciencia e Investigación 2017 20(1):3-8.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia \_Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

## INTRODUCCIÓN

La manayupa, (*Desmodium molliculum* (Kunth) DC.), especie herbácea perteneciente a la familia *Fabaceae*, crece en la sierra del Perú entre 2000 – 2800 metros de altitud, y que tradicionalmente se le emplea como depurador de la sangre, hepatoprotector y en afecciones renales y urinarias. Además, esta especie forma parte del esquema de tratamiento desintoxicante en el programa de Medicina Alternativa de ESSALUD.

La revisión bibliográfica de fuentes nacionales, nos revela varios trabajos de investigación descriptivos de los aspectos botánicos<sup>1</sup>, farmacológicos<sup>2,3,4</sup> y fitoquímicos<sup>2,5</sup> de esta planta. Los estudios de la composición química de otras especies del género *Desmodium* revelan la presencia de polifenoles<sup>6</sup>, flavonoides<sup>7,8</sup> e isoflavonoides<sup>9</sup> y de saponinas triterpenoides<sup>10,11,12</sup> mientras que los estudios farmacológicos demuestran la actividad biológica de estos metabolitos<sup>13,14</sup>.

El presente estudio se planteó con el objetivo de complementar la información acerca de la composición química de las hojas de la especie *Desmodium molliculum* HBK, enfocando la atención en metabolitos como los flavonoides y saponinas cuya presencia nos ayudaría a explicar las propiedades benéficas que se le atribuyen a esta planta y de esa manera justificar su uso. Con este fin se investigaron extractos alcohólicos de hojas desecadas de Manayupa los cuales son fraccionados mediante extracción en fase sólida con la resina Diaion HP20 según Soto M<sup>15</sup> y los eluatos se evaluaron cromatográficamente con ayuda de patrones y mediante espectrofotometría de barrido UV-visible.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio es de tipo descriptivo y el diseño es transversal.

### Equipos, instrumentos y reactivos

Espectrofotómetro UV-visible de barrido con arreglo de diodos, evaporador rotatorio, lámpara de luz UV 365nm, cromatoplasmas de aluminio de silicagel G F254, estándares de daizeina y genisteina y vitexina, resina de extracción en fase sólida de fase reversa Diaion HP-20, solventes grado analítico.

### Recolección de la planta

La especie *Desmodium molliculum* “manayupa” fue colectada en el mes de abril del 2013 en el distrito de Baños del Inca en la ciudad de Cajamarca a 2776 metros de altitud. El material fue clasificado en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

### Preparación del extracto alcohólico

Se obtuvo por maceración de 100g de polvo seco de hojas de *D. molliculum*, en un litro de etanol de 96° durante ocho días con agitación periódica. El extracto obtenido se filtró y luego se concentró en un evaporador rotatorio y finalmente se secó a 40°C.

### Pruebas fitoquímicas preliminares

La marcha fitoquímica se realizó según Lock de Ugáz<sup>16</sup>. Pequeñas porciones de extracto seco se sometieron a los

siguientes ensayos : prueba de tricloruro férrico, prueba de Shinoda, prueba de Dragendorff , prueba de la gelatina, prueba de la espuma, prueba de Lieberman-Burchard.

### Estudio cromatográfico

Para realizar el análisis cromatográfico, el extracto alcohólico seco suspendido en agua se fraccionó con éter de petróleo, acetato de etilo y finalmente con n-butanol. Los extractos fueron concentrados en evaporador rotatorio rindiendo el extracto acetato de etilo (AcOEt) y el extracto n-butanol (n-BuOH) a los cuales se aplicó el análisis cromatográfico en capa fina. Adicionalmente, con otra porción de extracto alcohólico seco se realizó una extracción en fase sólida con la resina Diaion HP-20<sup>15</sup>, eluyendo con gradiente de metanol/agua. El análisis cromatográfico se realizó al eluato MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20).

Para el análisis cromatográfico se usaron cromatoplasmas de aluminio de Silicagel G F<sub>254</sub> de 20 x 20 cm para la visualización y seguimiento de las distintas cromatografías se usó luz UV a 365 nm y como reveladores vapores de amoníaco, reactivo de Neu (difenilborinato)<sup>17</sup>, reactivo de Lieberman y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etanólico al 20% y como patrones de isoflavonoides daizeina y genisteina, el flavonoide vitexina y para las soya saponinas se usó un extracto metanólico de semillas de soya desengrasada.

### Análisis cualitativo de flavonoides

Se utilizó como fase móvil el sistema Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua

(100:11:11:26)<sup>7</sup> y cloroformo: acetato de etilo (1:1)

### Análisis cualitativo de saponinas

Se utilizó como fase móvil cloroformo:metanol:agua (65:25:4)<sup>18,19</sup>

Otra, butanol:etanol:amoníaco 15N (7:2:5)<sup>18,19</sup>

### Análisis de flavonoides por espectrofotometría UV-visible

Se procedió a correr placas cromatográficas de 20 x 20 cm de silicagel G, en la que se sembró en banda el eluato metanol:H<sub>2</sub>O (80:20) de la extracción en fase sólida de la fracción butanólica del extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum*. El raspado de la banda que correspondería a isoflavonoides de la cromatografía en capa fina del extracto alcohólico, se eluyó con metanol grado HPLC, luego se investigó realizando los espectros de barrido en un espectrofotómetro UV de barrido con arreglo de diodos, usando como reactivos de desplazamiento AlCl<sub>3</sub> y metóxido de sodio según Mabry TJ<sup>20</sup>. El análisis de los flavonoides se basó en la comparación de los espectros de la muestra y de los picos principales con los valores reportados por Mabry TJ<sup>20</sup>.

## RESULTADOS

### Marcha Fitoquímica

En el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* se encontró metabolitos secundarios tal como se muestra en la Tabla 1

**Tabla 1.** Marcha fitoquímica de extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*

Reactivos	Resultados	Presencia
Tricloruro férrico	++	polifenoles
Shinoda	++	flavonoides
Draguendorff	+	alcaloides
Gelatina	++	taninos
Espuma	++	saponinas
Lieberman-Bouchard	++	saponinas

(-) no se evidencia presencia, (+) presencia de trazas, (++) presencia moderada, (+++) presencia abundante

### Análisis cromatográfico

Se halló flavonoides e isoflavonoides en el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum* tal como se muestra en la Figura 1. Por los colores observados<sup>21</sup> y los valores Rf se puede deducir la probable presencia de los isoflavonoides daizeína y genisteína y la flavona vitexina (Tabla 2).

Fase móvil Acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua (100:11:11:26) reveladores luz UV 366nm, luz UV

+ vapores de NH<sub>3</sub>, reactivo de Neu (difenilborinato etanolamina al 1% metanólico + PEG) y luz UV 366 nm

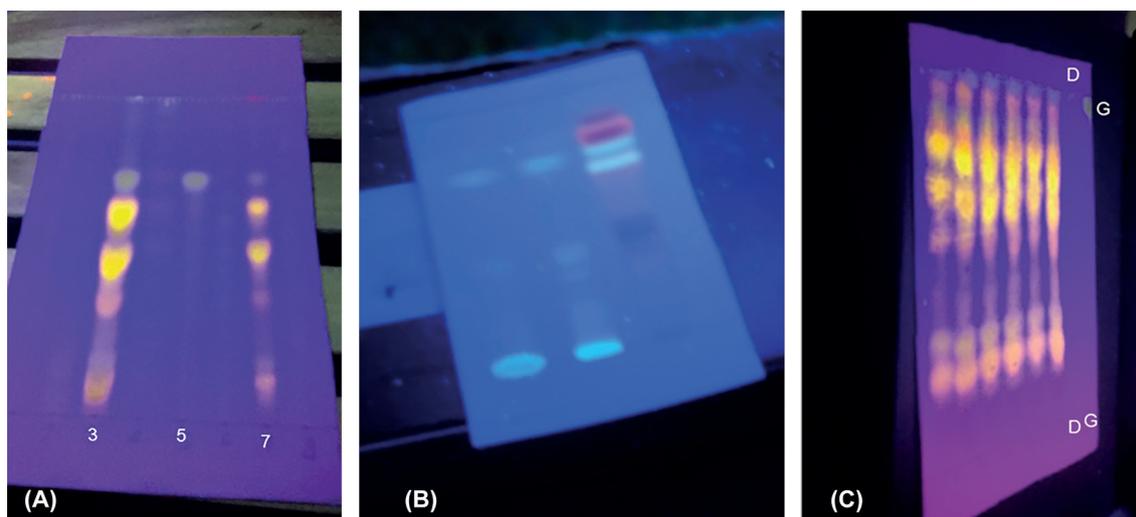
Por comparación de color y posición de las manchas originadas en el cromatograma de extractos de *D. molliculum* con extractos de semillas de *G. max* y al revelar con reactivo de Lieberman- Bouchard y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se comprobó la presencia de soyasaponinas tal como se muestran en los cromatogramas de la Figura 2.

### Espectrofotometría UV

El análisis de dos fracciones de la cromatografía en capa fina preparativa mediante el espectrofotómetro UV de barrido nos muestra la presencia de dos isoflavonas 4',5,7-trihidroxi-isoflavona (genisteína) y la 5-O-metilgenisteína (Tabla 3).

### DISCUSIÓN

Los resultados de la marcha fitoquímica permiten confirmar que el extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* posee flavonoides y saponinas entre otros, lo que concuerda con investigaciones hechas anteriormente en las partes aéreas de esta planta<sup>3,4</sup>. El análisis cromatográ-



**Figura 1. Identificación de flavonoides:** Foto A carril 3 y 7 extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum*, carril 5 vitexina estándar. Foto B donde (1) y (2) son fracción n-BuOH del extracto metanólico de harina de soja, (3) es extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*. Fase móvil CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10:1) Foto C Carril de 1-6 extracto alcohólico de *D. molliculum*, (D= daizeína), (G= genisteína) estándar. En ambas placas la fase móvil fue acetato de etilo:ácido fórmico:ácido acético:agua (100:11:11:26) (placas en A, y C reveladas con reactivo de Neu + PEG (polietilenglicol) y bajo luz UV 366 nm). Foto B, carril 1 y 2 extracto metanólico de semillas de *G. max* (soya), carril 3 extracto alcohólico de hojas de *D. molliculum* fracción acetato de etilo. La fase móvil usada en placa B fue: cloroformo:metanol (10:1), revelador luz UV 366 nm.

**Tabla 2.** Detección de flavonoides por CCF<sup>21</sup>

Extracto	UV 366nm		UV 366nm + NH <sub>3</sub>		Rvo Neu + UV 366nm		Posible flavonoide
	Rf	color	Rf	Color	Rf	color	
Alcohólico	0,98	blanco	0,98	blanco	0,98	celeste	isoflavonoide
fracción AcOEt	0,95	blanco	0,95	blanco	0,95	celeste verde	isoflavonoide
Alcohólico	0,95	blanco violeta	0,98	blanco	0,98	Celeste	isoflavonoide
Fracción n-BuOH	0,75		0,75	Azul	0,75	verde	flavona
Soja fracción n-BuOH	0,98	blanco	0,98	blanco	0,98	Celeste	isoflavonoide
	0,95	blanco	0,95	blanco	0,95	celeste	isoflavonoide
Daizeína	0,98	blanco	0,98	blanco	0,98	celeste	isoflavonoide
Genisteína	0,95	blanco	0,95	blanco	0,95	celeste verde	isoflavonoide
Vitexina	0,75	azul	0,75	violeta	0,75	verde	flavona

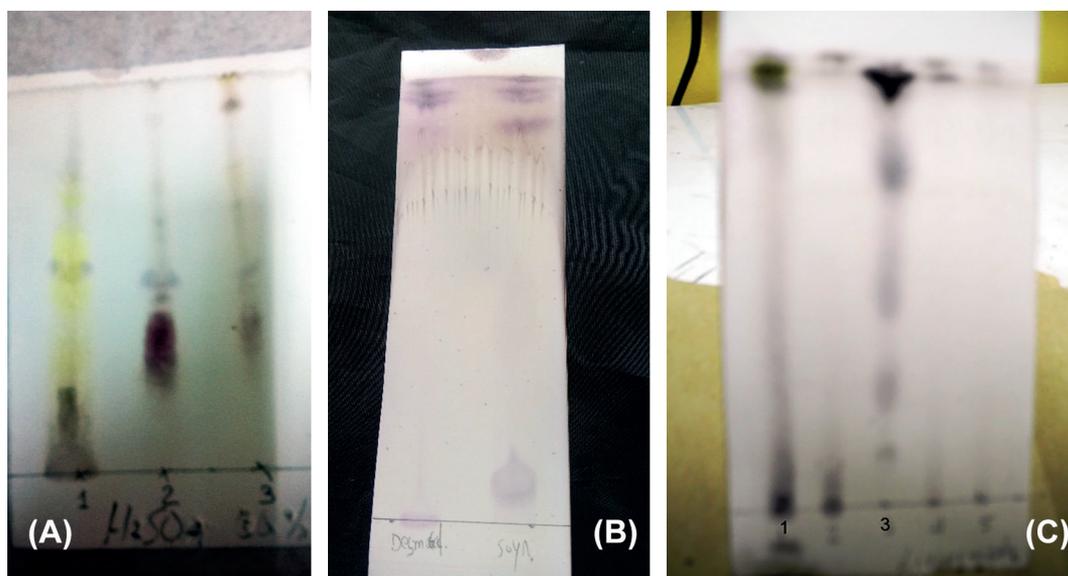
fico en capa fina nos muestra la presencia de flavonoides y también de isoflavonoides, lo cual concuerda con los análisis cromatográficos realizados en otras especies del género *Desmodium*<sup>7,9,14</sup>, esto fue corroborado por comparación con patrones de los isoflavonoides daizeina y genisteína y del flavonoide vitexina, mostrando valores  $R_f$  similares según tabla 2, también se observó un comportamiento similar frente a la luz UV y al revelador difenilborinato + polietilenglicol. La elección de estos patrones se hizo tomando en cuenta investigaciones de la bibliografía internacional realizadas sobre otras especies del género *Desmodium*<sup>7,9,21</sup> y otras especies de la familia *Fabaceae* a la que pertenecen el género *Desmodium* y *Glycine max* (Soya), en ésta última especie se ha reportado que los flavonoides que contiene son exclusivamente isoflavonoides<sup>22</sup>. El análisis por espectrofotometría UV del eluato correspondiente a isoflavonas de la cromatografía preparativa nos muestra picos que por comparación con las tablas de Mabry T<sup>20</sup> corresponden a los del isoflavonoide 4',5,7-trihidroxiisoflavona (genisteína). Adicionalmente se logró identificar la presencia de sa-

poninas las que al parecer podrían ser de tipo soyasaponinas que ya han sido reportadas en especies como *D. ascendens*<sup>7</sup>, *D. canadense*<sup>10</sup>, *D. styracifolium*<sup>14</sup> de la familia *Fabaceae*, esto se deduce a partir de la evaluación del cromatograma cuando se compara con extractos de semillas de *Glycine max* (soya), que es la especie donde inicialmente se caracterizó este tipo de saponinas<sup>18,19</sup> y que también pertenece a la familia *Fabaceae*.

## CONCLUSIONES

El análisis cromatográfico y la espectroscopía de barrido UV-visible indican la presencia del isoflavonoide 4',5,7-trihidroxiisoflavona (genisteína) y de la 5-O-metil-genisteína en el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*.

El estudio fitoquímico y el análisis cromatográfico muestran la presencia de saponinas triterpenoides del tipo soyasaponinas en el extracto etanólico de hojas de *D. molliculum*.



**Figura 2.** Investigación de saponinas, de la fracción n-butanol de extracto etanólico de hojas *D. molliculum* vs fracción n-butanol del extracto metanólico de semillas *G. max*. Foto A. carril 1, extracto *D. molliculum*, carril 2 y 3 extracto alcohólico de *G. max*. fase móvil = butanol: etanol:amoníaco 15N (7:2:5). Foto B. carril 1, extracto *D. molliculum*, carril 2, extracto de *G. max*. fase móvil = cloroformo:metanol:agua (65:25:4) (1 corrida) Foto C. carril 1, extracto *D. molliculum*, carril 3, extracto de *G. max*. fase móvil = cloroformo:metanol:agua (65:25:4) (5 corridas), revelado con reactivo Lieberman-Bouchard y ácido sulfúrico al 20% en etanol y calor 105°C.

**Tabla 3.** Longitudes de onda máximas de compuesto aislado de fracción isoflavona de la cromatografía preparativa de extracto alcohólico de *D. molliculum*.

Fraciones de la cromatografía preparativa	Desplazamientos (en nm)	Genisteína (según Mabry T) (en nm)	5-O-metil-genisteína (según Mabry T) (en nm)
Fracción isoflavona ( $R_f = 0,66$ )	$\lambda^{\text{MeOH}}$ 259, 328	$\lambda^{\text{MeOH}}$ 261, 328 sh	
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ 274, 326	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ 276, 327 sh	
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ 272, 305, 370	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$ 272, 307 sh	
Fracción isoflavona ( $R_f = 0,96$ )	$\lambda^{\text{MeOH}}$ 255		$\lambda^{\text{MeOH}}$ 256
	$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ 265,95		$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$ 266

$\lambda^{\text{MeOH}}$  en metanol

$\lambda^{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$  en metanol con metóxido de sodio

$\lambda^{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$  en metanol con  $\text{AlCl}_3$

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hammond G, Fernández I, Villegas L, Vaisberg A. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, 1998 61:17 – 30.
- Lozano N, Bonilla P, Arroyo J, Arias G, Córdova A, Baldoceña F. Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa). *Revista Ciencia e Investigación* 2001 Vol. IV(2).
- Acaro F. Efecto anticonceptivo y post-coital del extracto etanólico del *Desmodium molliculum* (HBK). DC. "Manayupa" en ratas hembras cepa Holtzmann. Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Farmacología con mención en Farmacología Experimental. UNMSM 2010.
- Aicardi G, Alvarez J, De La Peña O, Delfino R, D'uniani M. Efecto diurético del extracto de *Desmodium molliculum* "Manayupa" en ratas albinas. *Revista del Instituto de Investigación FMH USMP* art. 54 2008.
- Chang A, Klinar S, Castillo P, Peralta K. Screening fitoquímico de *Gentianella alborosea*, *Tichilia paronychioides* y *Desmodium* sp. *Fitoica* año 4 N°1 Enero-Abril 2009 : 7-11.
- Tsai Jen-Chie, Huang Guan-Jong, Chiu Tai-Hui, Huang Shyh-Shyun. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* April 2011 Vol. (54): 468-476. Disponible en <http://www.academicjournals.org/ajpp>
- Galand N, Ragot J, Dollet J, Pothier J. et al. Planar Chromatographic Study of Flavonoids and Soyasaponins for Validation of Fingerprints of *Desmodium ascendens* of Different Origin. *Journal of Planar Chromatography*, 2006 19: 191 – 193.
- Konan K , Mamyrbékova-Békro J, Békro Y. Quantification of total phenols and flavonoids of *Desmodium ascendens* (Sw.) DC. (Papilionaceae) and projection of their antioxidant capacity. *J. Appl. Biosci.* 2012 49: 3355-3362. Disponible en [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org)
- Ingham J, Dewick P. The Structure of Desmocarpin, a Pterocarpan Phytoalexin from *Desmodium gangeticum* (Osbeck) Merr. *Z Naturforsch.* 1984 39c: 531-534.
- Taylor W, Sutherland D, Richards K. Soyasaponins and Related Glycosides of *Desmodium canadense* and *Desmodium illinoense*. *The Open Natural Products Journal* 2, 2009: 59-67.
- Kubo T, Hamada S, Nohara T, Wang Z, Yasukawa K, Takeda M. Study on the constituents of *Desmodium styracifolium*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1989 37(8): 2229-2231. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2598326>
- Baiocchi C, Medana C, Giancotti V, Aigotti R, Dal Bello F, Massolino C. et al. Qualitative characterization of *Desmodium adscendens* constituents by high-performance liquid chromatography-diode array ultraviolet-electrospray ionization multistage mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2013 19: 1–15. doi: 10.1255/ejems.1214.
- Kang J, Thomas M, Badger M, Ronis J, Wu X. Non-isoflavone Phytochemicals in Soy and Their Health Effects *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58: 8119–8133. doi: 10.1021/jf100901b.
- Ma X , Zheng C , Hu C, Rahman K , Quin L. The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in chinese medicine, phytochemistry and pharmacology *Journal Ethnopharmacol* 2011 Nov 18;138(2):314-32. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004895>
- Soto M, Conde E, González-López N. Recovery and Concentration of Antioxidants from Winery Wastes. *Molecules* 2012, 17: 3008-3024. [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules)
- Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. 2° edición PUCP 1994.
- Matteini P, Agati G, Pinelli P, Goti A. Modes of complexation of rutin with the flavonoid reagent diphenylborinic acid 2-aminoethyl ester. *Monatsh Chem* 2011 DOI 10.1007/s00706-011-0545-z.
- Wolf W, Thomas B. Thin layer and Anion Exchange Chromatography of Soybean Saponins. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1969 Vol 47 N° 3: 86-90. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02612943.pdf>
- Fenwick D, Oakenfull D. Saponin content of Soya Bean and Some Commercial Products 1981 *J. Sci. Food Agric.* 32: 273 – 278. Disponible en [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740320311/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740320311/pdf).
- Mabry T, Markham K, Thomas M. The systematic Identification of Flavonoids Springer Verlag 1970.
- Mamyrbékova-Békro J, Koffi K, Békro Y, Djié Bi M, Zomi B, Mambo V. et al Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Cote D'Ivoire and Assesment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography *European Journal of Scientific Research* 2008 Vol 24 N°2 : 219-228. Disponible en <http://www.eurojournals.com/ejsr.htm>
- Costa C, Castro Braga F, Vianna-Soares D. et al. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2007 17(4): 616-625.

