UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA ENALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la actividad biológica de los compuestos bioactivos fenólicos del extracto etanólico de Anís *(Pimpinella anisum)*.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnigca de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Articulado al proyecto de Prácticas de Servicio Comunitario, "Extracción y transformación de principios activos de plantas medicinales con propiedades terapéuticas de la Asociación Flor Andina-Deshidratación de Plantas. Parroquia Quisapincha", Resolución Nro. UTA-CONVISO-2024-009.

Autora: Diana Carolina Urbina Monroy

Tutor: Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

Ambato - Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 17 de enero de 2025

Firmado electrónicamente por:
LANDER VINICIO
PEREZ ALDAS

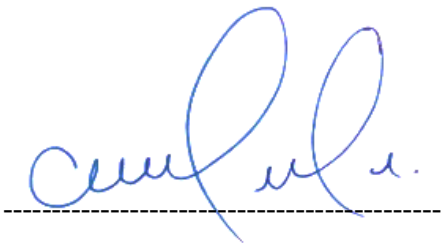
Mg. Lander Vinicio Pérez Aldás

1802706596

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Diana Carolina Urbina Monroy, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente e Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Diana Carolina Urbina Monroy

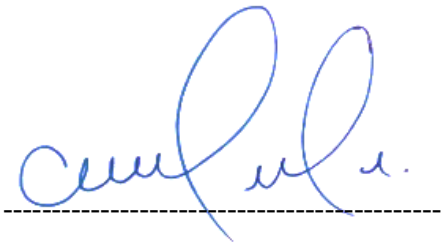
1716717226

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso de este informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Diana Carolina Urbina Monroy

1716717226

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
DIEGO MANOLO SALAZAR GARCES

Presidente del Triunal

Firmado electrónicamente por:
ORESTES DARIO LOPEZ HERNANDEZ

Dr. Orestes Darío López Hernández.

1754784864

Firmado electrónicamente por:
MARIA DANIELA GARCES MONCAYO

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

1803571585

Ambato, 02 de febrero del 2025

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y la luz que iluminó cada paso en este camino. Gracias por nunca soltar mi mano y mostrarme que todo es posible cuando se actúa con fe y perseverancia.

A mi madre, por su amor incondicional, su sacrificio incansable y por ser mi ejemplo de fortaleza. Tus palabras de aliento y tu fe en mí han sido mi mayor motor.

A mi padre, por enseñarme el valor del esfuerzo, la disciplina y la honestidad. Gracias por tus consejos, tu paciencia y por siempre creer en mi capacidad de alcanzar mis sueños.

A mis hermanos, quienes con su cariño y apoyo incondicional me han acompañado en cada etapa de este proceso. Ustedes son mi inspiración para seguir adelante.

A mis amigos, por estar a mi lado en los momentos buenos y en los difíciles, por sus palabras de aliento y por recordarme que las metas se logran mejor en compañía. Gracias por su apoyo, su confianza y por ser parte de esta etapa tan especial.

A todos ustedes, dedico este logro con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por llenarme de fuerza y disciplina para alcanzar este objetivo que con tanto empeño me propuse. A mis abuelitos Elenita y Fernando, quienes desde el cielo celebran cada uno de mis triunfos y me acompañan en los momentos difíciles. A mi madre, que con lágrimas o con risas, pero siempre con amor, ha estado a mi lado durante todo este proceso educativo. A mi padre y mis hermanos, por su constante apoyo y por estar presentes en todo lo que he necesitado.

Gracias también a Omar, por su incondicional apoyo. A mis facuamigos, por ser un pilar de ayuda y motivación, y por empujarme a convertirme en una mejor versión de mí mismo. Espero, de corazón, retribuir un poco de todo lo que he recibido de ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL viii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS xi
RESUMEN EJECUTIVO xii
ABSTRACT xiii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes Investigativos 1
1.1.1. Anís Verde (*Pimpinella anisum*) 1
1.1.2. Medicina tradicional en Ecuador 3
1.1.3. Importancia de las pantas medicinales 3
1.1.4. Componentes bioactivos de la planta 3
1.1.5. Estrés oxidativo 5
1.1.6. Extracción de compuestos bioactivos 5
1.1.7. Actividad antioxidante de compuestos bioactivos 7
1.1.8. Actividad antiinflamatoria 7
1.2. Objetivos 8
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 9
2.1. Materiales 9
2.2. Hipótesis 11
2.2.1. Hipótesis nula 11
2.2.2. Hipótesis alternativa 11
2.3. Métodos 11
2.3.1. Obtención del material vegetal 11
2.3.2. Obtención del extracto 11
2.3.3. Fenoles totales 12
2.3.4. Capacidad antioxidante 13
2.3.5. Capacidad antiinflamatoria 15

2.3.6. Análisis estadístico 16
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
3.1 Análisis y discusión de los resultados. 17
3.1.1. Fenoles 17
3.1.2. Capacidad Antioxidante 18
3.1.3. Capacidad Antiinflamatorio 21
3.2 Verificación de hipótesis 24
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 25
4.1 Conclusiones 25
4.2 Recomendaciones 26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26
ANEXO 32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de *Pimpinella anisum*..... 1

Tabla 2. Compuestos bioactivos presentes en *P. anisum* 4

Tabla 3. Materiales y recursos del proyecto de investigación. 9

Tabla 4. Capacidad antioxidante mediante DPPH. 18

Tabla 5. Capacidad Antioxidante mediante ABTS. 19

Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de *P. anisum* mediante desnaturalización de la albúmina de huevo. 21

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de *P. anisum* mediante desnaturalización de la albúmina bovina. 21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Pimpinella anisum* 1

Figura 2. Concentración de fenoles totales en el extracto de *P. anisum.* 17

Figura 3. Actividad Antioxidante de *P. anisum* mediante reducción del radical DPPH vs. el radical ABTS. 20

Figura 4. Actividad antiinflamatoria del *P. anisum* mediante desnaturalización de albúmina de huevo y albúmina bovina. 23

RESUMEN EJECUTIVO

Este estudio evaluó la actividad biológica de los compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *Pimpinella anisum* (anís verde). Se empleó el método de extracción Soxhlet utilizando etanol al 96 por ciento, obteniendo un rendimiento del 8 por ciento. Los resultados revelaron una concentración de fenoles totales de 76.2 mg GAE por ml. La capacidad antioxidante se evaluó mediante los métodos DPPH y ABTS, mostrando una inhibición máxima del 66.47 por ciento y 76.32 por ciento, respectivamente, lo cual indica que los extractos tienen potencial para neutralizar radicales libres. Además, se determinó la capacidad antiinflamatoria mediante la desnaturalización de albúmina de huevo y albúmina bovina, alcanzando inhibiciones máximas de 68 por ciento y 78.48 por ciento respectivamente. Estos resultados sugieren que los compuestos fenólicos de *P. anisum* poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria significativa, comparable con otros extractos vegetales. El análisis estadístico mediante ANOVA y la prueba de Tukey confirmó las diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Los hallazgos resaltan el potencial de *P. anisum* como fuente natural de compuestos bioactivos con aplicaciones en diversas industrias. Se recomienda realizar análisis más detallados para identificar los compuestos específicos responsables de estas actividades biológicas y validar estos resultados *in vivo*. Asimismo, se destaca la importancia de implementar prácticas sostenibles en el cultivo y recolección de la planta para preservar su calidad.

Palabras clave: *P. anisum*, antioxidantes, antiinflamatorios, fenoles, compuestos bioactivos, DPPH, ABTS.

ABSTRACT

This study evaluated the biological activity of phenolic compounds present in the ethanolic extract of *Pimpinella anisum* (green anise). The Soxhlet extraction method was used using 96 percent ethanol, obtaining a yield of 8 percent. The results revealed a total phenol concentration of 76.2 mg GAE per ml. The antioxidant capacity was evaluated by the DPPH and ABTS methods, showing a maximum inhibition of 66.47 percent and 76.32 percent, respectively, indicating that the extracts have the potential to neutralize free radicals. In addition, the anti-inflammatory capacity was determined by denaturation of egg albumin and bovine albumin, reaching maximum inhibitions of 68 percent and 78.48 percent respectively. These results suggest that the phenolic compounds of *P. anisum* possess significant antioxidant and anti-inflammatory activity, comparable with other plant extracts. Statistical analysis using ANOVA and Tukey's test confirmed significant differences between the tested concentrations. The findings highlight the potential of *P. anisum* as a natural source of bioactive compounds with applications in various industries. Further detailed analysis is recommended to identify the specific compounds responsible for these biological activities and validate these results in vivo. The importance of implementing sustainable practices in the cultivation and harvesting of the plant to preserve its quality is also highlighted.

Keywords: *P. anisum*, antioxidants, anti-inflammatories, phenols, bioactive compounds, DPPH, ABTS.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Anís Verde (*Pimpinella anisum*)

Tabla 1.

Taxonomía de Pimpinella anisum

Característica	Descripción
Nombre científico	*Pimpinella anisum L.*
Familia	Apiaceae (Umbeliferas)
División	Magnoliaphyta
Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Apiales
Género	Pimpinella

(De Oliveira et al., 2020)

Pimpinella anisum conocida comúnmente como anís verde pertenece a la familia herbarea Apiaceae siendo una planta de las más antiguas ubicada en Asia, Europa, América y África. Esta hierba herbácea contiene flores blancas cordiformes de 30 a 50cm de altura y sus semillas endémicas son de color verde tornándose un poco a amarillo, tiene un olor aromático y sabor dulce la cual crece en todos los continentes. El *P. anisum* contiene un porcentaje del 2 al 6% de aceite esencial el cual se encarga de su olor y sabor, ha sido usado en distintas industrias. Su principio activo se encuentra principalmente en los frutos de la planta **(Nassar et al., 2021)**.

Figura 1.

Pimpinella anisum



El componente más importante que contiene *P. anisum* es el anetol (75-90%), su rendimiento y contenido varía dependiendo de su gegggnotipo, las condiciones ambientales, específicamente por la manipulación agrícola como el riego, la cantidad de plantaciones, los fertilizantes y la época de siembra (Spinozzi et al., 2023)**.**

En Arabia Saudita se llevó a cabo una investigación utilizando extracto de *P. anisum* (PAE) para disminuir las contracciones uterinas en ratas preñadas de laboratorio. Los resultados obtenidos demostraron que la aplicación de PAE reprimió la actividad uterina dependiente de la concentración, logrando que las contracciones desaparecieron con la concentración más alta equivalente a 7mg/mL. Este estudio demuestra, por primera vez, el efecto tocolítico sobre las tiras uterinas aisladas en ratas preñadas, provocando relajación de manera dependiente de las concentraciones aplicadas (Alotaibi, 2019).

Irán ha investigado el extracto de *P. anisum* para el aumento del volumen de leche materna y del peso en el lactante prematuro en un ensayo clínico controlado aleatorizado en poblaciones humanas. Desde el día 4 hasta el 7 el volumen promedio de leche en el grupo de intervención fue significativamente relevante ante el grupo placebo y control, mientras que en el grupo del peso de los bebes prematuros no se evidencio un cambio significativo. Estos hallazgos obtenidos demuestran que *P. anisum* es un buen tratamiento ante la falta de leche materna que no reporta efectos secundarios específicos en su uso, puede integrarse en la dieta de la madre de manera fácil, económica y efectiva cuando sea apropiado, buscando el beneficio de la nutrición del bebé (Khalili et al., 2023)**.**

Es-safi et al., (2021), mencionan que los hallazgos encontrados en el extracto de *P. anisum* tienen un potencial prometedor como alternativa natural para el uso en tratamientos de depresión y ansiedad, el mecanismo de acción podría tener relación con los sistemas monoaminérgicos, lo cual es un resultado alentador al ser usado en tratamientos preclínicos presentando seguridad y eficacia para complemento o alternativa en tratamientos farmacológicos convencionales siendo un avance significativo en el campo de la farmacología

Desde la antigüedad *P. anisum* ha sido usado en la medicina tradicional como también en la convencional y la industria farmacéutica. Algunos de los compuestos más importantes que se encuentran son cumarinas, lípidos, flavonoides, proteínas y carbohidratos. Otros estudios recientes demuestran que el extracto de *P. anisum* contiene actividades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, anticonvulsivas, antiinflamatorias, analgésicas, antidiabéticas y antivirales (Sun et al., 2019).

1.1.2. Medicina tradicional en Ecuador

En el ecuador la práctica de medicina tradicional ha sido muy ancestral, la cual integra conocimientos y rituales de distintas culturas indígenas como en los pueblos andinos y amazónicos. La práctica de estas tradiciones intenta armonizar a las personas con la naturaleza, con toda la sabiduría que les han transmitido de generación en generación. En el 2008 la constitución ecuatoriana reconoce y protege en varios artículos el conocimiento y las prácticas de la medicina ancestral valorando la diversidad cultural del país **(Gallegos Zurita, 2016).**

Ecuador es multi biodiverso el cual dispone de un amplio rango de especies con potencial medicinal, muchas se encuentran amenazadas por la deforestación y el cambio climático. Estudiar la composición química es crucial para poder conservar las distintas especies y poder llegar a garantizar su uso sostenible.

1.1.3. Importancia de las pantas medicinales

Los recursos naturales como las plantas medicinales son utilizados ampliamente por la diversidad biológica y la riqueza en los compuestos que cada una de ellas contienen. Las plantas de las distintas regiones poseen propiedades terapéuticas que tratan enfermedades y promueven mejorar la salud. Las propiedades que tiene las plantas se deben gracias a los compuestos bioactivos que presentan como son los alcaloides, flavonoides, taninos, entre otros **(De Oliveira et al., 2020).**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) dice que el 80% de la población depende del uso de plantas medicinales mediante la medicina tradicional. Gracias a las practicas ancestrales realizadas en comunidades tradicionales que habitan en las zonas rurales. El estudio de estas prácticas ha demostrado que son usadas de manera terapéutica en forma de infusiones, aplicaciones tópicas, baños calientes, limpieza de heridas, todos estos usos no tienen dosis estandarizadas **(Tinitana et al., 2016).**

1.1.4. Componentes bioactivos de la planta

Todas las plantas generan componentes bioactivos que contienen de forma natural sustancias químicas activas en reducidas proporciones y con variación de concentraciones que están ubicadas en la matriz celular las cuales poseen efectos beneficiosos para la salud humana. Estos compuestos no cumplen un papel esencial para la supervivencia de la planta, pero si tiene funciones protectoras para defenderse contra depredadores, infecciones y estrés por el ambiente**(Diniz do Nascimento et al., 2020).**

Tabla 2.

Compuestos bioactivos presentes en P. anisum

Componente Bioactivo	Propiedades Principales
Alcaloides	Analgésicas, antiespasmódicas, sedantes, antimicrobianas
Flavonoides	Antioxidantes, antiinflamatorias, protectoras cardiovasculares
Terpenos	Antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas
Taninos	Astringentes, cicatrizantes, antimicrobianas
Saponinas	Expectorantes, inmunoestimulantes, hipocolesterolémicas
Aceites esenciales	Relajantes, antisépticos, antiinflamatorios
Glicósidos	Cardiotónicas, laxantes, antiinflamatorias
Fenoles	Antioxidantes, antisépticos, anticancerígenos
Ácidos orgánicos	Digestivos, antimicrobianos, desintoxicantes

(Shojaii & Abdollahi Fard, 2012)

Los componentes bioactivos descritos en la Tabla 2. al tener esta interacción en las plantas realiza un efecto sinérgico que ayuda aumentar su eficacia terapéutica, permitiendo que el uso en la medicina tradicional sea una herramienta valiosa para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades, es por ello que la industria farmacéutica se encuentra en una de las industrias más beneficiadas debido a las múltiples funciones fisiológicas de los metabolitos, los cuales podrían ser aprovechados para crear productos dirigidos a tratamientos para diversas patologías **(Kayanan & Sagum, 2021).**

1.1.5. Estrés oxidativo

Cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad del cuerpo para neutralizarlas mediante antioxidantes se puede decir que ocurre el estrés oxidativo en los seres humanos por la producción incontrolable de radicales libres de oxígeno que dañan las macromoléculas que hacen que los procesos celulares cambien **(Luna-Ortiz et al., 2024)**. Estas moléculas inestables que se generan mediante procesos metabólicos normales como en la respiración celular y pueden llegar a tener un aumento significativo debido a factores externos como el sedentarismo, la contaminación, los malos hábitos y la radiación ultravioleta. Cuando las especies reactivas de oxígeno se llegan a acumular empiezan a atacar componentes esenciales como los lípidos, proteínas y al ADN, lo que provoca un daño celular y disfunción en los tejidos **(Morais de Sousa et al., 2023).**

Las enfermedades degenerativas y crónicas como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson se encuentran vinculadas al daño asociado con el estrés oxidativo. El sistema del cuerpo humano tiene sistemas que contienen antioxidantes naturales, como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, como también tiene antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C y el glutatión. Considerando que el estrés oxidativo es capaz de superar estas defensas (Monteiro et al., 2023)**.**

1.1.6. Extracción de compuestos bioactivos

El proceso de extracción de compuestos bioactivos es esencial para obtener sustancias químicas que contienen propiedades beneficiosas como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, entre otros efectos terapéuticos. Estos compuestos pueden encontrarse en fuentes naturales como plantas, microorganismos, subproductos de origen animal. Tanto la extracción como la purificación de estos son fundamentales en varias industrias especialmente en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y agrícola, por lo que, los compuestos bioactivos pueden ser usados en la producción de medicamentos, suplementos nutricionales y productos de cuidado personal. Las técnicas de extracción que se pueden aplicar son diversas y varían dependiendo de las características del compuesto deseado y de la matriz en donde está ubicado **(Kaufmann & Christen, 2002).**

Para realizar la extracción de compuestos existen métodos convencionales y no convencionales, los métodos convencionales pueden ser por maceración, percolación y extracción Soxhlet, son eficaces

pero el proceso es más tardío y requiere de más solvente, por lo que se incrementa el costo y el impacto ambiental. Los métodos no convencionales con técnicas modernas como la extracción con ultrasonido, microondas, fluidos mega críticos necesitan mínimo consumo de disolvente son considerados con un alto índice de efectividad para compuestos bioactivos **(Majid et al., 2023).**

1.1.6.1 Maceración

Esta técnica es utilizada porque su extracción es sencilla y económica, pero de largo tiempo de proceso para la extracción de los compuestos bioactivos mediante la inmersión del material vegetal en un solvente como agua, alcohol, éter, etc. Algunos factores que influyen en la efectividad de este método es la materia prima, el solvente y el tiempo **(Tambun et al., 2021).**

1.1.6.2 Percolación

Este método ha sido usado más en las industrias específicamente para extraer compuestos solubles de materiales sólidos. En este extractor se usa un solvente que pasa por el material en forma continua, este método es eficiente, consume bajo solvente, es sencillo y económico, pero requiere de mucho tiempo para su proceso y puede ser afectado su proceso por la temperatura **(Shejawale et al., 2022).**

1.1.6.3 Extracción soxhlet

Esta técnica tradicional ha sido usada ampliamente para la obtención de compuestos bioactivos de fuentes naturales. Este método funciona por medio de reflujo y utiliza el disolvente caliente para que los componentes de interés se disuelvan. La extracción es eficiente y continua, la cantidad de disolvente a usar es moderada; requiere tiempo y supervisión durante su proceso **(Torres-Rodriguez et al., 2024)**.

1.1.6.4 Ultrasonido

Esta técnica moderna más conocida como extracción asistida por ultrasonido, usa la energía ultrasónica para incrementar el proceso de la extracción y obtención de compuestos bioactivos o químicos de la muestra analizar. Es una técnica rápida, eficiente y económica usada en industrias farmacéuticas, alimentarias y ambientales **(Kayanan & Sagum, 2021).**

1.1.6.5 Microondas

Este método de extracción ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales, para el método de microondas se aplica calor de forma directa a la muestra lo que permite que la extracción sea rápida y eficiente para su obtención mejorando la solubilidad y la difusión al obtener los compuestos deseados, por lo tanto, el volumen de disolvente será mínimo siendo una técnica considerada respetuosa para el medio ambiente **(Ferrara et al., 2023)**.

Todos los métodos de extracción permiten la separación, caracterización y evaluación de la actividad biológica de los compuestos químicos para etapas posteriores **(Chemat et al., 2012)**.

1.1.7. Actividad antioxidante de compuestos bioactivos

La actividad antioxidante contribuye a la neutralización de los radicales libres como también ha evitar o disminuir el daño oxidativo en los sistemas biológicos y productos generados de la reacción volátiles que podrían perjudicar a pacientes que tienen enfermedades metabólicas, evitando de esta forma una oxidación descontrolada, la eficacia antioxidante depende de algunos factores como la estructura química, las condiciones en el medio que interactúa (pH y temperatura), la presencia de otros compuestos y la interacción con especies reactivas específicas **(Diniz do Nascimento et al., 2020)**.

Por lo tanto, se utilizan métodos in vitro para evaluar la capacidad antioxidante de diversas sustancias biológicas. Estos métodos se fundamentan en ensayos colorimétricos que miden la interacción entre moléculas bioactivas y radicales libres, los cuales en el proceso son neutralizados **(Niki, 2021).**

El ensayo DPPH, basado en el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, es uno de los métodos usados más ampliamente para la determinación de la capacidad antioxidante. Este ensayo permite determinar la habilidad de los compuestos bioactivos presentes en una muestra biológica para neutralizar dicho radical por medio de la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno **(Sirivibulkovit et al., 2018)**. El radical DPPH es un compuesto orgánico nitrogenado caracterizado por su color purpura oscuro, este al interactuar con un compuesto antioxidante va a reducir el radical a su forma no reactiva, el cual va a producir un cambio de color a amarillo intenso. Este cambio es fácilmente detectable en la región visible del espectro, medible a una absorbancia de 515 nm **(Flieger & Flieger, 2020).**

Otro método ampliamente utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de diversos compuestos es el ensayo ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). Este procedimiento se basa por su capacidad de neutralizar un radical catiónico estable de color verde azulado, generado mediante la oxidación del ABTS en presencia de un agente oxidante **(Zou et al., 2019).**

1.1.8. Actividad antiinflamatoria

Los compuestos bioactivos, reconocidos por sus destacadas propiedades antinflamatorias, han captado un gran interés científico, lo que ha impulsado su investigación por parte de las industrias farmacéuticas y cosméticas. Estas propiedades, que se encuentran presentes en las plantas medicinales, desempeñan

un papel importante en la reducción de la inflamación asociada a diversas enfermedades. Esto se da mediante la interacción con múltiples vías y mediadores celulares, por medio de fitoquímicos como flavonoides, alcaloides, terpenoides, entre otros, que influyen en procesos celulares y moleculares específicos **(Azab et al., 2016).**

Por este motivo, se han desarrollado análisis in vitro para evaluar la capacidad antinflamatoria de sustancias biológicas de interés. Lo que se desea buscar con estos métodos determinar tanto la eficacia como la seguridad de dichas sustancias antes de avanzar a pruebas en modelos animales o ensayos clínicos en seres humanos. Los estudios in vitro permiten analizar cómo actúan las sustancias con células y tejidos a nivel molecular, originando información valiosa sobre su potencial terapéutico como también posibles efectos secundarios. Asimismo, estos análisis preliminares son fundamentales para encontrar las dosis optimas y comprender los mecanismos de acción, lo que contribuye al diseño de tratamientos más eficaces y seguros contra la inflamación.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de los compuestos bioactivos fenólicos del extracto etanólico de anís (*Pimpinella anisum*).

1.2.2 Objetivos específicos

- Cuantificar los compuestos bioactivos fenólicos del extracto etanólico de anís.
- Analizar la capacidad antioxidante existente en los compuestos bioactivos fenólicos del extracto etanólico de anís.
- Evaluar la capacidad antiinflamatoria en los compuestos bioactivos fenólicos del extracto etanólico de anís.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.

2.1. Materiales

Este trabajo de titulación tuvo un enfoque experimental y se desarrolló en los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la **Tabla 2**, se detalla los reactivos, material fungible y equipos empleados a lo largo de la investigación.

Tabla 3.

Materiales y recursos del proyecto de investigación.

Material	Cantidad
Reactivos	
Reactivo de Folin-Ciocalteu	50mL
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo o DPPH	1g
Acetato de potasio	4g
Metanol	1L
Etanol 96%	1L
PBS	100mL
Ácido gálico	1g
Solución tampón trolox	1g
Agua destilada	4L
BSA	1g
Materiales e insumos	
Matraces erlenmeyer (250mL)	5

Dedales	2
Matraces aforados (25mL)	4
Vaso de Precipitación (1000mL)	3
Papel filtro	1
Frascos ámbar	3
Tubos falcon (50mL)	6
Papel aluminio	1
Papel absorbente	1
Paquete de fundas ziploc	1
Plancha de calentamiento	1
Pipetas graduadas (5mL-25mL)	2
Caja de Puntas de micropipeta (100-1000uL)	1
Tubos eppendorf	7
Tubos falcon	5
Huevos frescos	2
Diclofenaco	1
Equipos	
Refrigerador (Indurama, Gm-r5056yvq, Cuenca, Ecuador)	1
Centrífuga (GEMMY, PLC05, Taiwán)	1
Espectrofotómetro (Fisher Scientific AccuSkan Go, España, Madrid)	1

Balanza analítica (Mettler Toledo, MS303SE, Canadá)	1
Soxhlet	1
Rotoevaporador (Eyela, OSB-2100, USA, NY)	1
Incubadora (Memmert, IN30, Alemania, Núremberg)	1

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

El extracto etanólico de *P. anisum* no presenta actividad biológica.

2.2.2. Hipótesis alternativa

El extracto etanólico de *P. anisum* presenta actividad biológica.

2.3. Métodos

2.3.1. Obtención del material vegetal

El material vegetal utilizado se obtuvo a través de la gestión del proyecto de vinculación con la sociedad. La Asociación Flor Andina, ubicada en Illagua Chaupiloma (N-1,219836, E-78,714378) a una altitud de 3460 m.s.n.m., en donde se realiza el procesamiento de la planta en etapa madura, luego de ello, la materia prima que es recolectada se sometió a un proceso de deshidratación a una temperatura de 35 °C durante tres días, una vez cumplida el proceso de deshidratación las muestras se trituraron usando un molino, obteniendo así la materia prima utilizada en la presente investigación.

2.3.2. Obtención del extracto

Se empleó el método de extracción Soxhlet para obtener el extracto. En el tubo extractor se colocaron 20 g del material vegetal; mientras que, 300mL de etanol al 97% (disolvente) se colocó en el balón de destilación junto con cuatro perlas de ebullición. Con ayuda de una plancha de calentamiento, se ajustó la temperatura de 70 °C para permitir el flujo del agua hacia el condensador, posteriormente, luego de un periodo de doce horas y diez etapas de extracto realizadas se recolectó el extracto. Posteriormente, para eliminar el etanol se usó un rotaevaporador a una temperatura entre 40 a 60 °C. Finalmente, las muestras obtenidas se almacenaron en frascos de vidrio ámbar y se conservaron bajo refrigeración. Para determinar el porcentaje de rendimiento se empleó la Ecuación 1 **(Bensaad et al., 2021).**

$$\%\ \boldsymbol{Rendimiento} = \frac{\boldsymbol{masa\ extracto}}{\boldsymbol{masa\ muestra}} * \mathbf{100}$$

Ecuación 1. Determinación del porcentaje de rendimiento.

Después de obtener el extracto de *P. anisum*, se preparó una solución madre disolviendo en 100 mL 1g del extracto puro en 100 mL de agua destilada. A partir de esta solución se procedió a mezclar 1 mL de extracto para preparar diluciones a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. Estas concentraciones se emplearon en todos los ensayos posteriores.

2.3.3. Fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales en el extracto obtenido, se utilizó una placa de micro titulación de 96 pocillos. Se mezclaron 100 µL de la muestra con 100 µL del reactivo Folin-Citocalceu al 10%. Tras dejar en repos durante 3 min, se añadieron 300 µL de carbonato de sodio al 2% y 4.5 mL de agua destilada. La mezcla de la placa fue colocada en un local oscuro a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm. La curva de calibración se realizó por triplicado usando ácido gálico como estándar, con concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 ppm. Como blanco, se preparó un tubo con la misma mezcla de reactivos, sustituyendo el extracto por agua destilada **(Barahona et al., 2015).**

2.3.4. Capacidad antioxidante

2.3.4.1. Método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Se preparó una solución madre del reactivo DPPH a una concentración de 150 μM, pesando 0.0059 g de DPPH y disolviéndolos en 100 mL de una solución metanol-agua 80/20 (%v/v). La mezcla fue agitada de 35 a 40 minutos para asegurar una disolución completa. Asimismo, se preparó una solución del reactivo Trolox a una concentración de 500 uM para generar una curva de calibración, disolviendo 0.0125 g de Trolox en 100 mL de una solución metanol-agua 80/20 (%v/v), seguido de un proceso de agitación **(Reyes et al., 2013)**. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 7.8, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. En una placa de 96 pocillos se distribuyeron el blanco, el control y el extracto según el siguiente esquema:

Blanco: 180 μL de solución metanol-agua 80/20 (diluyente del DPPH) + 20 μL agua destilada.

Extracto: 180 μL de solución DPPH + 20 μL extracto diluido.

Control: 180 μL de solución DPPH + 20 μL Trolox.

Las mezclas fueron agitadas vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante treinta minutos en una placa de 96 pocillos. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 517 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis **(Reyes et al., 2013)**. La actividad antioxidante fue calculada utilizando la Ecuación 2.

$$\%Inhibición\ dpph = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b}\right)\right] * 100$$

Ecuación 2. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH.

.

En donde:

$$A_m = Absorbancia\ de\ la\ muestra$$

$$A_c = Absorbancia\ del\ control$$

$$A_b = Absorbancia\ del\ blanco$$

2.3.4.2. Método de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).

Para este método se preparó una solución de ABTS a una concentración de 7 mM del reactivo en agua destilada, mezclando 0.0033 g de persulfato de potasio 2.45 mM con 0.0194 g de ABTS. La mezcla se dejó reposar durante 16 horas en un lugar oscuro a temperatura ambiente, con el objetivo de estabilizar los radicales. Para medir la capacidad antioxidante, la solución que estaba en reposo se diluyó etanol al 95% hasta alcanzar una absorbancia de 0.7, donde, la longitud de onda se midió a 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 180 uL de la solución ABTS con 20 uL del extracto de *P. anisum* y se incubaron en oscuridad por 30 minutos. Al término de este período, se registró la absorbancia de la muestra a 734 nm **(Gutiérrez et al., 2020).** La curva de calibración se realizó por triplicado con cada muestra a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. La actividad antioxidante fue calculada utilizando la Ecuación 3.

$$\%\ inhibición = \frac{A_c - A_m}{A_c} * 100$$

Ecuación 3. *Determinación del porcentaje de inhibición.*

En donde:

$$A_m = Absorbancia\ de\ la\ muestra$$

$$A_c = Absorbancia\ del\ control$$

2.3.5. Capacidad antiinflamatoria

2.3.5.1. Desnaturalización de albúmina de huevo.

Se seleccionó un huevo de gallina fresco y se sometió a un proceso de desinfección utilizando cloro al 0.1% y etanol al 97% para poder garantizar su uso adecuado **(Bensaad et al., 2021)**. La clara se separó cuidadosamente en un vaso de precipitación. Al que se le añadieron 100 mL de agua destilada, con ayuda de una varilla de agitación se obtuvo un precipitado de ovoalbúminas, que luego fueron centrifugadas en una centrífuga ROTINA 380 a 4000 r.p.m. durante 20 minutos guardando el sobrenadante que contenía ovoalbúmina el cual se conservó para su posterior uso.

En un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL de albúmina de huevo con 2.8 mL de la solución salina tamponada con fosfato (pH 6.4) y 2 mL del extracto a analizar, se empleó el agua destilada como control, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 15 minutos, tras lo cual se midió su absorbancia a 660 nm, posteriormente se indujo la desnaturalización de las proteínas mediante calentamiento en baño maría a 70 °C durante 5-10 minutos, permitiendo que las muestras se enfriaran al finalizar. La turbidez se midió en un espectrofotómetro a 660nm. De manera similar, se evaluó la absorbancia del control positivo diclofenaco a una concentración de (1mg/ml), con el fin de verificar la capacidad antiinflamatoria de las muestras con la Ecuación 4 **(Dharmadeva et al., 2018).**

$$\%Inhibición = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_{m2}}{A_c - A_{m2}}\right)\right] * 100$$

Ecuación 4. Determinación del porcentaje de inhibición.

En donde:

$$A_c = Absorbancia\ del\ control\ (albúmina\ desnaturalizada)$$

$$A_m = Absorbancia\ de\ la\ muestra\ desnaturalizada$$

$$A_{m2} = Absorbancia\ de\ la\ muestra\ \text{sin}\ desnaturalizar$$

2.3.5.2. Desnaturalización de la albúmina bovina (BSA).

En un tubo de ensayo se mezclaron 0.45 mL de albúmina bovina con 0.05 mL de solución salina tamponada con fosfato (pH 6.4) y 2 mL del extracto vegetal a analizar, como control se utilizó agua destilada. Las muestras fueron incubadas a 37 ° durante 15 minutos, posteriormente, se indujo la desnaturalización de las proteínas sometiéndolas a un baño maría a 70 °C durante 5-10 minutos, una vez culminado este proceso se dejaron enfriar **(Belahcene et al., 2023)**. Finalmente, la turbidez de la muestra se determinó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. De igual forma, el control positivo que contiene diclofenaco se evaluó con la absorbancia a una concentración de (1mg/ml), con el objetivo de verificar la capacidad antiinflamatoria de los extractos mediante la ecuación 5 **(Varghese et al., 2024)**.

$$\%Inhibición = \frac{A_c - A_t}{A_c} * 100$$

Ecuación 5. Determinación del porcentaje de inhibición.

En donde:

$$A_c = Absorbancia\ del\ control\ (albúmina)$$

$$A_t = Absorbancia\ en\ presencia\ de\ extracto/diclofenaco$$

2.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante el experimento se realizó utilizando el software InfoStat/L. Para ello, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de identificar la existencia de diferencias significativas entre los grupos de datos. Al identificar tales diferencias, se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, lo que permitió determinar con precisión entre que grupos se presentaban las discrepancias entre valores.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

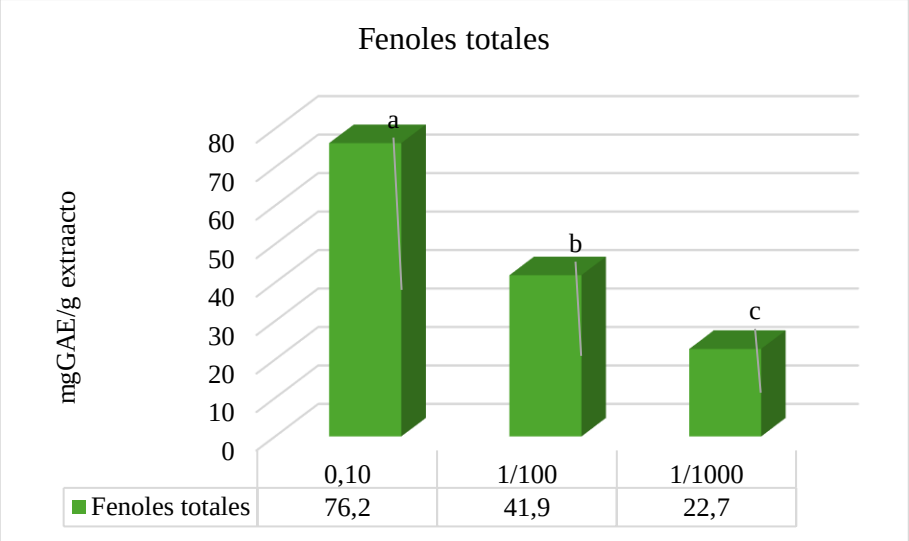
3.1 Análisis y discusión de los resultados.

3.1.1. Fenoles

La extracción de *P. anisum* se realizó utilizando etanol al 96% como solvente, empleando 20 gramos de muestra. El rendimiento obtenido fue calculado conforme a la Ecuación 1 descrita en la metodología, alcanzando un valor del 8 %; el cual fue comparado con el estudio realizado por **(Sukasri et al., 2023)**, donde se empleó un procedimiento similar con etanol al 90% y 100 g de muestra, obteniendo un rendimiento del 4,72%. Esta diferencia podría atribuirse a el tiempo de extracción y el número de ciclos dados en el equipo soxhlet por lo que en este estudio se realizó en 5 horas con 5 ciclos a diferencia del estudio realizado que se tomó un tiempo de duración de 12 horas con 10 ciclos. Además, factores ambientales como la temperatura, que influye en el desarrollo de la planta, o a la altitud de la región donde se recolectó la planta y la etapa de crecimiento en la que fue recolectada, ya que es sabido que las plantas cultivadas a mayores altitudes tienden a producir mayor cantidad de metabolitos secundarios, posiblemente como una estrategia de adaptación a condiciones ambientales más extremas.

Figura 2.

Concentración de fenoles totales en el extracto de P. anisum.



En la presente investigación se determinó la cantidad de fenoles totales presentes en el extracto obtenido de la planta *P. anisum* usando como estándar el ácido gálico. Este método ha sido usado en la literatura científica, ya que permite cuantificar los compuestos fenólicos por medio de la reacción de Folin-Ciocalteu, dando resultados en equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mgGAE/g) **(Pérez et al., 2023)**.

Los resultados obtenidos indican que el contenido fenólico de *P. anisum* se encuentra dentro de los rangos reportados en anteriores estudios. En su estudio, **Chaquilla Quilca et al., (2019)** mencionan que, el extracto obtenido mediante Soxhlet en una región de Irán presenta principalmente trans-anitol con un porcentaje entre el 80 y 90 %, además también se encontraron componentes de terpinol, metilcavicol y linalol con una proporción mínima, entre otros compuestos que pertenecen al grupo de los fenoles, por lo que la cantidad reportada por los autores fue de 73.50 mg GAE/mL, mientras que el valor obtenido en el de fenoles totales presente estudio es 76.2 mg GAE/ml.

Diversos factores han influenciado la cantidad de fenoles totales presentes en extractos vegetales, la variedad de la planta, la técnica de extracción y el método de análisis usado. El rendimiento puede ser negativo cuando se usa soluciones hidrofílicas, por lo que los compuestos fenólicos tienen una menor solubilidad en el agua, en un estudio de *Salvia tomentosa* se produjo un rendimiento de 275 y 200 mg de ácido gálico por gramo de muestra **(Cortazar et al., 2019).**

En comparación con el estudio de **Attia et al., (2022)** se utilizó una metodología similar a la utilizada en el presente estudio, pero con una variedad distinta de anís (*Illicium verum*), evidenciando un contenido fenólico mayor. Esto propone que factores como la composición genética de la planta, el estado de madurez al momento de la cosecha y las condiciones agroclimáticas pueden significativamente influir en la acumulación de los compuestos fenólicos.

3.1.2. Capacidad Antioxidante

Tabla 4.

Capacidad antioxidante mediante DPPH.

Concentraciones	mgTE/g de extracto	%Inhibición
1/10 mg/ml	$446{,}11^{a}$±1,64	$66{,}47^{a}$±0.70
1/100 mg/ml	$371{,}66^{b}$±1,35	$41{,}09^{b}$±0.65
1/1000 mg/ml	$295{,}55^{c}$±1,29	$15{,}15^{c}$±1.39

En cuanto a la actividad antioxidante, **Ghlissi et al. (2020)** mencionan que *P. anisum* posee una concentración rica en compuestos fenólicos, los cuales son potentes agentes antioxidantes gracias a su capacidad de donar electrones y eliminar los radicales libres de forma directa; es así, que en su investigación reportan una capacidad antioxidante del 69.4 % en su dosis más alta. Dicha actividad

antioxidante es comparada con lo obtenido en el presente estudio, como se observa en la **Tabla 4** se obtuvo una capacidad antioxidante del 66.47 % en la concentración más alta mediante el método de DPPH.

Por otro lado, **Basheer et al. (2023)** mencionan en su estudio que la actividad antioxidante del extracto de *P. anisum* es dependiente de su concentración, por lo cual, en sus resultaros reportan una actividad antioxidante del 84.9 % mediante la reducción de DPPH; la diferencia ligeramente mayor con lo reportado en la **Tabla 4** del presente estudio puede atribuirse al extracto usado, la cantidad de agentes antioxidantes presentes y la calidad de estos. Dicha actividad antioxidante puede suponer un complemento para reducir aquellas enfermedades causadas por los radicales libres.

También en su investigación **Amer & Aly (2019)** mencionan que el extracto etanólico de las semillas de *P. anisum* tiene una mayor actividad antioxidante, es así, que sus resultados obtenidos reflejan una capacidad antioxidante del 91.3 %, al comparar el resultado registrado por los investigadores y los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 4); se puede inferir que la dicha diferencia se debe a que tanto la semillas, hojas, tallo y flores de *P. anisum* presentan una actividad antioxidante variable, sin embargo, dicha capacidad de reducción de los radicales libres se encuentra presente en la especie vegetal estudiada.

Tabla 5.

Capacidad Antioxidante mediante ABTS.

Concentraciones	EQmgTrolox/g de extracto	% Inhibición
1/10 mg/ml	$702{,}75^{a}$±2,13	$76{,}32^{a}$±0,52
1/100 mg/ml	$328{,}84^{b}$±0,94	$32{,}83^{b}$±0,58
1/1000 mg/ml	$149{,}46^{c}$±1,53	$10{,}57^{c}$±0,73

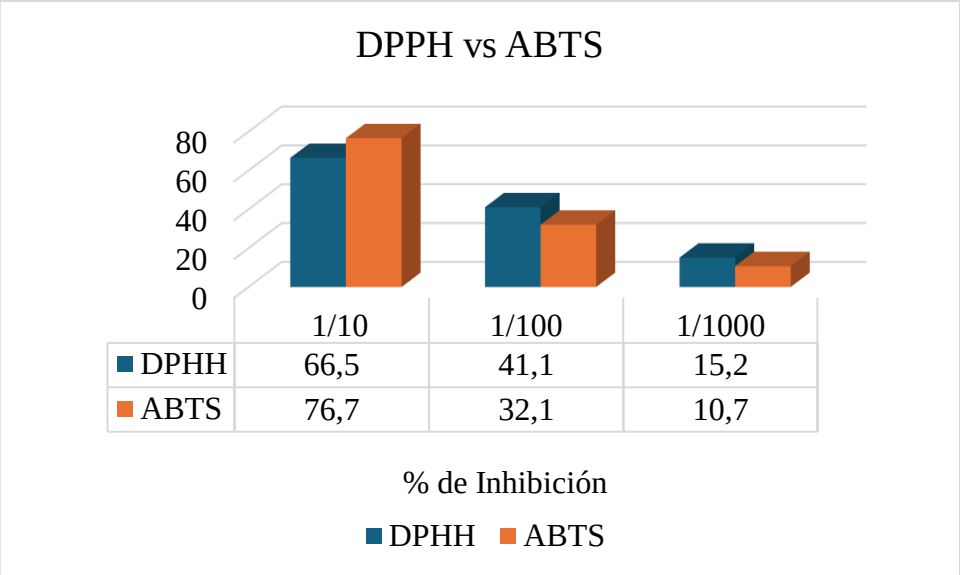
El ensayo con ABTS es un método ampliamente utilizado para evaluar la actividad antioxidante, basado en la eliminación del radical libre $ABTS^{+}$. Este enfoque combina mecanismos de transferencia de

hidrógeno (HAT) y transferencia de electrones (SET), lo que lo hace versátil y aplicable tanto para compuestos hidrofílicos como lipofílicos, ampliando su utilidad en el análisis de diversas matrices antioxidantes **(RI, 2018)**

En un estudio realizado en la República Checa, se obtuvo una inhibición del radical ABTS del 92.80%, lo que refuerza el destacado potencial antioxidante de *Pimpinella anisum*. En comparación, los valores obtenidos en el presente estudio, el cual mostró una inhibición del 76.32%. Estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales desempeñan un papel clave en la capacidad antioxidante de la planta. Estos compuestos tienen la capacidad comprobada de donar electrones o hidrógenos a los radicales libres, estabilizándolos y previniendo así el daño oxidativo asociado **(Topčagić et al., 2022)**.

Figura 3.

Actividad Antioxidante de P. anisum mediante reducción del radical DPPH vs. el radical ABTS.



La Figura 3 demuestra la actividad antioxidante, la cual, depende de la concentración del extracto. Esto implica que, a mayor concentración, se obtiene una actividad antioxidante más elevada. **Patrignani et al. (2023)** mencionan que, el método DPPH se utiliza principalmente para analizar la actividad antioxidante en sistemas lipofílicos, mientras que el método ABTS es más versátil y permite evaluar tanto sistemas lipofílicos como hidrofílicos. El ensayo de ABTS nos refleja un porcentaje de inhibición más alto (76,7%) en comparación con el DPPH (66,5%). La diferencia que se presenta puede ser atribuida a la influencia de los compuestos lipofílicos que actúan de manera distinta en cada uno de los métodos, llegando así a favorecer al ensayo ABTS.

3.1.3. Capacidad Antiinflamatorio

Desnaturalización de albumina de huevo (DAH)

Tabla 6.

Actividad antiinflamatoria de P. anisum mediante desnaturalización de la albúmina de huevo.

Concentración del extracto	% de Inhibición AH	% Inhibición del Diclofenaco
1/10 mg/ml	68.0^{a}± 0,54	$93,15^{a}$ ±0,05
1/100 mg/ml	43.3^{b}±1,63	$57,12^{b}$±1,39
1/1000 mg/ml	28.64^{c}±1,06	$39,03^{c}$±0,62

En el estudio de **Kpemissi et al. (2023)**, determinaron la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *C. micranthum* mediante un ensayo de estabilización de la membrana de glóbulos rojos, obteniendo una inhibición del 68.30%. Este método es comparable al ser también utilizado en el presente estudio, aunque aplicado a una planta diferente. Los resultados muestran similitud, ya que en el ensayo de desnaturalización de albúmina de huevo realizado con el extracto de *P. anisum*, se alcanzó una actividad antiinflamatoria del 76.20% como se indica en la tabla 6. Esto sugiere que la determinación de la actividad antiinflamatoria de la desnaturalización de la albumina de huevo es un método ampliamente utilizado en la investigación de plantas medicinales, lo cual le hacen un método confiable y altamente reproducible de los compuestos bioactivos presentes en ambas especies, al permitir identificar la capacidad de los compuestos para estabilizar proteínas frente a factores desnaturalizantes.

Tabla 7.

Actividad antiinflamatoria de P. anisum mediante desnaturalización de la albúmina bovina.

Concentración del extracto	% de Inhibición BSA	% Inhibición del Diclofenaco
1/10 mg/ml	$78,48^{a}$±0,97	$83,25^{a}$±0,66

1/100 mg/ml	$35{,}13^{b}\pm0{,}85$	$61{,}97^{b}\pm3{,}57$
1/1000 mg/ml	$14{,}82^{c}\pm1{,}14$	$22{,}29^{c}\pm0{,}39$

En la Tabla 7 se detalla los resultados obtenidos a distintas concentraciones a partir de la desnaturalización de la albumina de huevo en donde se muestra que en la concentración 1:10 se obtuvo un 78,48% con el porcentaje más alto mostrando que tiene capacidad antiinflamatoria, mientras que en un estudio realizado en la India en donde se utilizó el mismo método a concentraciones similares permitió obtener un 62,4 % de actividad antiinflamatoria en la concentración más alta **(Andallu, 2015)**. Además, en este estudio menciona que las moléculas que intervienen para que esta actividad se dé, son la tirosina y la treonina las cuales regulan las vías biológicas de transducción de señales para su acción biológica general.

En un estudio realizado por **(Obaid et al., 2009)**, se destaca que el método de desnaturalización de la albúmina de suero bovino no solo es útil para evaluar la capacidad antiinflamatoria, sino que también se emplea para determinar la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas. Esto evidencia que el uso de la albúmina de suero bovino representa una técnica versátil y eficaz para evaluar diversas propiedades biológicas.

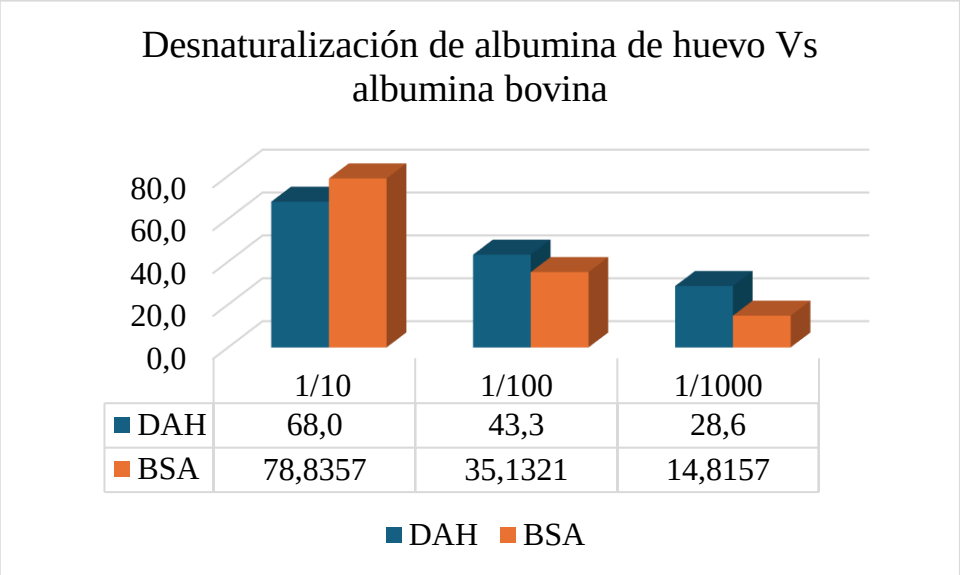
En un estudio realizado en Italia se evaluó la capacidad antiinflamatoria del aceite esencial de *P. anisum* sobre la secreción de mucina en células epiteliales HBEpC y HTEpC pertenecientes a las vías respiratorias primarias bronquiales y traqueales respectivamente, en un modelo de inflamación pulmonar inducida por lipopolisacárido en donde los niveles de expresión de las células epiteliales disminuyeron significativamente en un 40%; estos resultados proporcionan una nueva evidencia que apoya el uso etnobotánico de *P. anisum* en el tratamiento de enfermedades respiratorias **(Iannarelli et al., 2018).**

Por otro lado, **Dadkhah et al. (2024)** determinaron la capacidad antiinflamatoria con animales experimentales en donde se demostró que *P. anisum* posee efectos atribuidos a la inhibición de los

marcadores de estrés inflamatorio y oxidativo en el tejido ovárico. Además, mencionan que la composición química del anís revela una diversa gama de constituyentes, donde destaca la presencia de aceite esencial en concentraciones de 1,5 a 6% con trans-anetol como componente principal, además de ácidos grasos que representan entre 8-11% incluyendo ácido palmítico y oleico, un contenido proteico del 18% y carbohidratos al 4%. Cabe mencionar que el extracto de anís presenta un potencial terapéutico interesante debido a su rica composición en compuestos bioactivos. Sin embargo, se necesita más investigación científica rigurosa para confirmar sus beneficios y establecer recomendaciones claras sobre su uso.

Figura 4.

Actividad antiinflamatoria del P. anisum mediante desnaturalización de albúmina de huevo y albúmina bovina.



Los resultados de la evaluación de la capacidad antiinflamatoria mostraron que existe esta capacidad en las diferentes concentraciones estudiadas, como se puede observar en la figura 3. los valores obtenidos tanto para la desnaturalización de la albumina de huevo como para la desnaturalización de la albumina de suero bovino, por lo tanto, ambos métodos demuestran que la actividad antiinflamatoria se encuentra presente dentro los extractos de *P. anisum.*

El diclofenaco se utilizó como control positivo debido a que es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) ampliamente usado como estándar de referencia en estudios que evalúan la capacidad antiinflamatoria de compuestos naturales. Este medicamento actúa inhibiendo la peroxidación lipídica, un proceso clave en el daño oxidativo de las membranas celulares, y secuestrando especies reactivas de oxígeno (ROS) reduciendo la producción de prostaglandinas responsables del

dolor, inflamación y fiebre. Esto lo convierte en un estándar adecuado para comparar la eficacia de otros agentes antiinflamatorios **(Khankhel et al., 2024)**.

El uso de este fármaco como control permite establecer una línea de base confiable para comparar la eficacia antiinflamatorio del extracto estudiado y validar la robustez de la metodología experimental empleada. Como se muestra en la Tabla 5 y Tabla 6, el porcentaje de inhibición del extracto no muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo de diclofenaco cuando se evalúan a las mismas concentraciones. Este hallazgo destaca que el extracto posee una actividad antiinflmatoria similar a la del diclofenaco, lo que sugiere que podría ser una alternativa natural con beneficios adicionales, como menor toxicidad o efectos secundarios asociados a los AINE sintéticos.

3.2 Verificación de hipótesis

$H_o \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula

$H_1 = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa y se puede concluir que el extracto etanólico de *P. anisum* posee actividad biológica.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los compuestos bioactivos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *P. anisum* poseen una notable actividad biológica, evidenciada a través de su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. La actividad antioxidante, evaluada mediante el ensayo ABTS, destacó con un porcentaje de inhibición de 76.32% por su capacidad de inhibir radicales libres, mientras que la actividad antiinflamatoria, determinada por el método de desnaturalización de albúmina de huevo, mostró resultados comparables a otros extractos vegetales previamente estudiados. Estos hallazgos respaldan el potencial de *P. anisum* como una fuente natural de compuestos bioactivos con aplicaciones prometedoras en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Por lo tanto, este estudio contribuye a la valorización de los compuestos fenólicos del anís, estableciendo su relevancia en la búsqueda de alternativas naturales para el manejo del estrés oxidativo y la inflamación.
- El presente estudio nos permitió cuantificar los compuestos bioactivos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *P. anisum*. Los resultados obtenidos de fenoles totales fueron del 76.2% en la concentración más alta, destacando así la presencia significativa de dichos compuestos y confirmando la abundancia del extracto etanólico en compuestos con propiedades biológicas relevantes. Esta cuantificación es un paso esencial para comprender el valor funcional del anís como fuente natural de antioxidantes, sentando las bases para futuras investigaciones que exploren su potencial en aplicaciones terapéuticas, alimentarias y cosméticas. Además, los datos obtenidos contribuyen al desarrollo de productos basados en ingredientes naturales, reforzando la importancia de los compuestos fenólicos en la promoción de la salud.
- El análisis realizado demostró que los compuestos bioactivos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *P. anisum* poseen una notable capacidad antioxidante. Los resultados, evaluados mediante el ensayo ABTS, evidenciaron una alta eficacia en la eliminación de radicales libres en su concentración más alta con un porcentaje de inhibición del 76,32%, lo que resalta el potencial de estos compuestos para prevenir el daño oxidativo. Además, el estudio refuerza la importancia de los compuestos fenólicos como agentes protectores frente al estrés oxidativo, abriendo camino a futuras investigaciones sobre su impacto en la salud y su integración en productos naturales funcionales.
- En conclusión, este estudio permitió evaluar y confirmar la capacidad antiinflamatoria de los compuestos bioactivos fenólicos presentes en el extracto etanólico de *P. anisum*. Los resultados obtenidos, mediante el método de desnaturalización de albúmina de huevo en su concentración más alta fue de 68% frente al del control con diclofenaco que fue de 93,15% en su concentración más alta, demostraron una significativa actividad antiinflamatoria, comparable con estudios

previos de extractos de otras plantas medicinales. Esto resalta el potencial de *P. anisum* como una fuente natural de compuestos con propiedades terapéuticas, que pueden contribuir al desarrollo de alternativas seguras y eficaces para el manejo de la inflamación. La riqueza fenólica del extracto refuerza su valor funcional y su relevancia en la búsqueda de soluciones basadas en ingredientes naturales para combatir procesos inflamatorios.

4.2 Recomendaciones

- Realizar análisis cualitativos y cuantitativos más detallados, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para identificar y cuantificar compuestos específicos responsables de la actividad antiinflamatoria.
- Llevar a cabo estudios in vivo para validar la actividad antiinflamatoria observada in vitro y determinar la biodisponibilidad y seguridad de los compuestos fenólicos en sistemas biológicos.
- Implementar prácticas sostenibles en el cultivo y recolección de *P.* para garantizar la conservación de recursos y la calidad del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alotaibi, M. F. (2019). Pimpinella anisum extract attenuates spontaneous and agonist-induced uterine contraction in term-pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *254*, 112730. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112730

Amer, A., & Aly, U. (2019). Antioxidant and antibacterial properties of anise (Pimpinella anisum L.). *Egyptian Pharmaceutical Journal*, *18*(1), 68. https://doi.org/10.4103/epj.epj_44_18

Andallu, B. (2015). Phytoceutical and therapeutic evaluation of aniseeds pimpinella anisum l. *Sri Sathya Sai Institute of Higher Learning*, 1–202.

Attia, M. M., Alzahrani, A. M., Hanna, M. I., Salem, H. M., Abourehab, M. A. S., El-Saadony, M. T., & Thabit, H. (2022). The Biological Activity of Illicium verum (Star Anise) on Lernaea cyprinacea-Infested Carassius auratus (Goldfish): In Vivo Study. *Life*, *12*(12), 2054. https://doi.org/10.3390/life12122054

Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules*, *21*(10), 1321. https://doi.org/10.3390/molecules21101321

basheer, mostafa, Abdelshakour, A., Mohamed, M., Elshobky, A., Abdelmoneam, A., Makeen, F., Eissa, Z., Hossny, H., Elemam, S., Mahfouz, E., Saber, Y., Abdelhameed, B., Abdullah, T., O, M., & Elgindi, O. (2023). Mini review: Anise (Pimpinella anisum L.): phytohemical and Pharmacological activities. *ERU Research Journal*, *0*(0), 0–0. https://doi.org/10.21608/erurj.2023.215520.1039

Bello-Medina, P. C., Rodríguez-Martínez, E., Prado-Alcalá, R. A., & Rivas-Arancibia, S. (2022). Contaminación por ozono, estrés oxidativo, plasticidad sináptica y neurodegeneración. *Neurología*, *37*(4), 277–286. https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.10.003

Chaquilla Quilca, G., Escalante, W. D. E., Torres Muñoz, V., De, M., Casarrubias, L. B., Guadalupe, M., Franco, G., & Virginia Nevárez-Moorillón, G. (2019). *Composición química y contenido de fenoles totales en aceites esenciales de muña Minthostachys setosa Briq Epl y anís Pimpinella anísum L. Chemical composition and total phenols of essential oils from muña Minthostachys setosa Briq EPL and anise Pimpinella anisum L*.

Chemat, F., Vian, M., & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615–8627. https://doi.org/10.3390/ijms13078615

Dadkhah, M., Gholizadeh, N., Nasimi Doost Azgomi, R., Hosseinzadeh, S., Hamedeyazdan, S., Haghighat, K., Afshari, S., Salimi, M., & Moini Jazani, A. (2024). Therapeutic Effects of Pimpinella anisum Fruit Extract on Polycystic Ovary Syndrome in a Rat Model: Emerging Role of Inflammatory Responses and Oxidative Stress. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *23*(1). https://doi.org/10.5812/ijpr-143290

De Oliveira, E. B., Sartori Sampaio, B., Figueiredo Gomes Borges, A., & Noel dos Santos, F. (2020). Plantas medicinais como alternativa para o estudo de taxonomia e funções orgânicas no Ensino Médio. *Kiri-Kerê - Pesquisa Em Ensino*, *1*(9). https://doi.org/10.47456/krkr.v1i9.30333

Diniz do Nascimento, L., Moraes, A. A. B. de, Costa, K. S. da, Pereira Galúcio, J. M., Taube, P. S., Costa, C. M. L., Neves Cruz, J., de Aguiar Andrade, E. H., & Faria, L. J. G. de. (2020). Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications. *Biomolecules*, *10*(7), 988. https://doi.org/10.3390/biom10070988

Es-safi, I., Mechchate, H., Amaghnouje, A., Elbouzidi, A., Bouhrim, M., Bencheikh, N., Hano, C., & Bousta, D. (2021). Assessment of Antidepressant-like, Anxiolytic Effects and Impact on Memory of Pimpinella anisum L. Total Extract on Swiss Albino Mice. *Plants*, *10*(8), 1573. https://doi.org/10.3390/plants10081573

Ferrara, D., Beccaria, M., Cordero, C. E., & Purcaro, G. (2023). Microwave-assisted extraction in closed vessel in food analysis. *Journal of Separation Science*, *46*(20). https://doi.org/10.1002/jssc.202300390

Flieger, J., & Flieger, M. (2020). The [DPPH●/DPPH-H]-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (Aegopodium podagraria L.) Hydroalcoholic Extracts. *Molecules*, *25*(24), 6005. https://doi.org/10.3390/molecules25246005

Gallegos Zurita, 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), 327. https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647

Ghlissi, Z., Kallel, R., Krichen, F., Hakim, A., Zeghal, K., Boudawara, T., Bougatef, A., & Sahnoun, Z. (2020). Polysaccharide from Pimpinella anisum seeds: Structural characterization, anti-inflammatory and laser burn wound healing in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *156*, 1530–1538. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.201

Iannarelli, R., Marinelli, O., Morelli, M. B., Santoni, G., Amantini, C., Nabissi, M., & Maggi, F. (2018). Aniseed (Pimpinella anisum L.) essential oil reduces pro-inflammatory cytokines and stimulates mucus secretion in primary airway bronchial and tracheal epithelial cell lines. *Industrial Crops and Products*, *114*, 81–86. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.076

Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, *13*(2), 105–113. https://doi.org/10.1002/pca.631

Kayanan, B. U. R., & Sagum, R. S. (2021). Microwave and Ultrasound Pretreatment of <i>Moringa oleifera</i> Lam. Seeds: Effects on Oil Expression, Oil Quality, and Bioactive Component. *Journal of Oleo Science*, *70*(7), ess20357. https://doi.org/10.5650/jos.ess20357

Khalili, S., Amiri-Farahani, L., Haghani, S., Bordbar, A., Shojaii, A., & Pezaro, S. (2023). The effect of Pimpinella Anisum herbal tea on human milk volume and weight gain in the preterm infant: a randomized controlled clinical trial. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *23*(1), 19. https://doi.org/10.1186/s12906-023-03848-6

Khankhel, N., Friedman, B. W., Baer, J., Lopez, L., Feliciano, C., Lee, S., & Irizarry, E. (2024). Topical Diclofenac Versus Oral Ibuprofen Versus Diclofenac + Ibuprofen for Emergency Department Patients With Acute Low Back Pain: A Randomized Study. *Annals of Emergency Medicine*, *83*(6), 542–551. https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2024.01.037

Kpemissi, M., Kantati, Y. T., Veerapur, V. P., Eklu-Gadegbeku, K., & Hassan, Z. (2023). Anti-cholinesterase, anti-inflammatory and antioxidant properties of Combretum micranthum G. Don: Potential implications in neurodegenerative disease. *IBRO Neuroscience Reports*, *14*, 21–27. https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.12.001

Luna-Ortiz, P., Pilar-Báez, S., Lazcano-Vázquez, M. F., & Martínez-Rosas, M. (2024). El estrés oxidativo en el perioperatorio: implicaciones clínicas. *Revista Mexicana de Anestesiología*, *47*(1), 23–29. https://doi.org/10.35366/114093

Majid, I., Khan, S., Aladel, A., Dar, A. H., Adnan, M., Khan, M. I., Mahgoub Awadelkareem, A., & Ashraf, S. A. (2023). Recent insights into green extraction techniques as efficient methods for the extraction of bioactive components and essential oils from foods. *CyTA - Journal of Food*, *21*(1), 101–114. https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2157492

Monteiro, N. V. do nacimento, de Azevedo, M. A. F., Oliveira, I. K. F., Martins, M. do C. de C., & Freitas, B. de J. e S. de A. (2023). The impact of COVID-19 on vitamin E concentrations and oxidative stress markers in adult subjects: A systematic review. *Revista Chilena de Nutrición*, *50*(6), 673–681. https://doi.org/10.4067/s0717-75182023000600673

Morais de Sousa, D. J., Cardoso de Sousa, L. L., Oliveira Barrense, C., Cardoso de Araújo, D. S., Visgueira de Sousa, T. G., de Azevedo Paiva, A., & Silva de Almendra Freitas, B. de J. e. (2023). The effect of Vitamin E supplementation on inflammatory biomarkers and oxidative stress in patients with chronic kidney disease on hemodialysis: A systematic review. *Revista Chilena de Nutrición*, *50*(1), 117–126. https://doi.org/10.4067/S0717-75182023000100117

Niki, E. (2021). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(4), 503–515. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016

Obaid, A. J., Al-Janabi, J. K. A., & Redtha Taj-Aldin, W. (2009). *Chemical Composition and Bioactivity Characteristics of Pimpinella Anisum Essential Oil against Trichophyton rubrum*. www.jgpt.co.in

Patrignani, M., González-Forte, L. del S., Rufián-Henares, J. Á., & Conforti, P. A. (2023). Elucidating the structure of melanoidins derived from biscuits: A preliminary study. *Food Chemistry*, *419*, 136082. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136082

Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(46), 17543–17553. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022

RI, S. (2018). Antioxidant, Anti-Diabetic and Hypolipidemic Effects of Aniseeds (Pimpinella anisum L.): In vitro and in vivo Studies. *Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare*, *5*(2). https://doi.org/10.19080/JCMAH.2018.05.555656

Shejawale, D. D., Murugesh, C. S., Rastogi, N. K., & Subramanian, R. (2022). Effect of feed particle size and solvent flow rate on soybean oil extraction in a percolation type extractor. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(12), 4723–4730. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05554-6

Shojaii, A., & Abdollahi Fard, M. (2012). Review of Pharmacological Properties and Chemical Constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN Pharmaceutics*, *2012*, 1–8. https://doi.org/10.5402/2012/510795

Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, *34*(7), 795–800. https://doi.org/10.2116/analsci.18P014

Spinozzi, E., Zeni, V., Di Giovanni, F., Marmugi, M., Baldassarri, C., Mazzara, E., Ferrati, M., Ricciardi, R., Canale, A., Lucchi, A., Petrelli, R., Maggi, F., & Benelli, G. (2023). Aniseed, Pimpinella anisum, as a source of new agrochemicals: Phytochemistry and insights on insecticide and acaricide development. *Agriculture Communications*, *1*(1), 100003. https://doi.org/10.1016/j.agrcom.2023.100003

Sukasri, A., Utomo, W. B., Sjafruddin, R., & Nursam, M. (2023). The Use of Soxhlet Techniques in the Essential Oil Extraction from Anise Seeds (Pimpinella anisum). *Equilibrium Journal of Chemical Engineering*, *7*(1), 59. https://doi.org/10.20961/equilibrium.v7i1.73410

Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2019). Anise (*Pimpinella anisum L* .), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biology*, *5*(1), 1673688. https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1673688

Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y. (2021). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (Annona muricata): A review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *1122*(1), 012095. https://doi.org/10.1088/1757-899X/1122/1/012095

Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *12*(1), 29. https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4

Topčagić, A., Ćavar Zeljković, S., Kezić, M., & Sofić, E. (2022). Fatty acids and phenolic compounds composition of anise seed. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(10). https://doi.org/10.1111/jfpp.15872

Torres-Rodriguez, A., Darvishzadeh, R., Skidmore, A. K., Fränzel-Luiten, E., Knaken, B., & Schuur, B. (2024). High-throughput Soxhlet extraction method applied for analysis of leaf lignocellulose

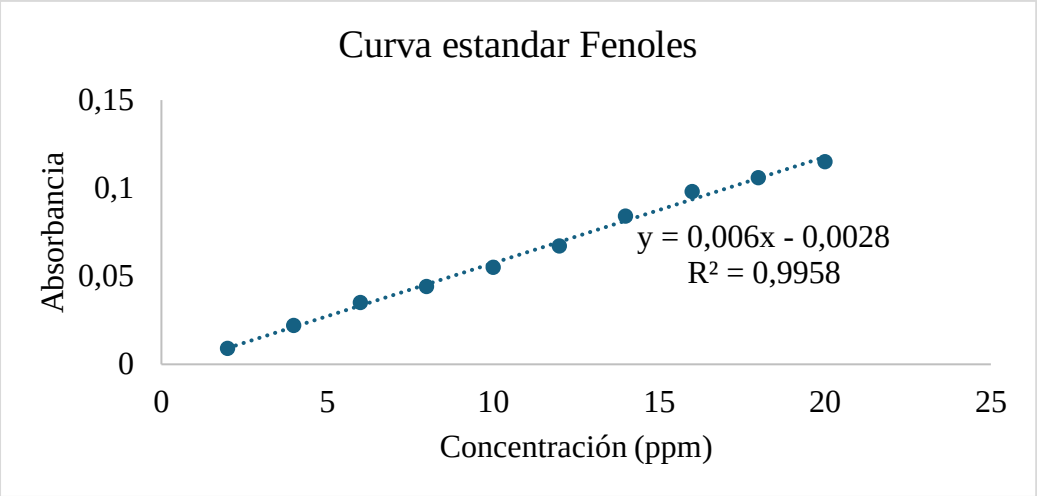
and non-structural substances. *MethodsX*, *12*, 102644. https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102644

Zou, J., Huang, Y., Zhu, L., Cui, Z., & Yuan, B. (2019). Multi-wavelength spectrophotometric measurement of persulfates using 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) as indicator. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *216*, 214–220. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.019

ANEXO

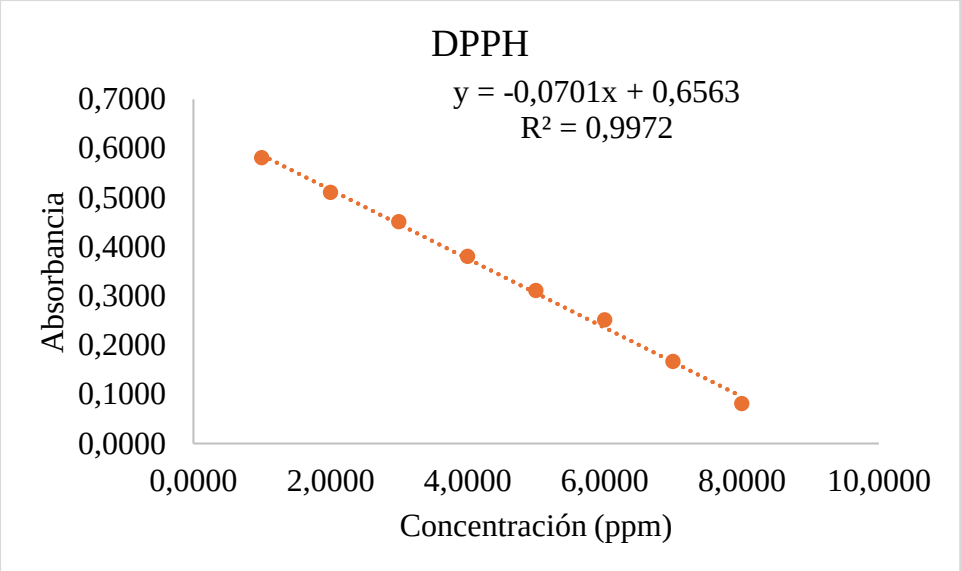
ANEXO 1.

Curva estándar de fenoles



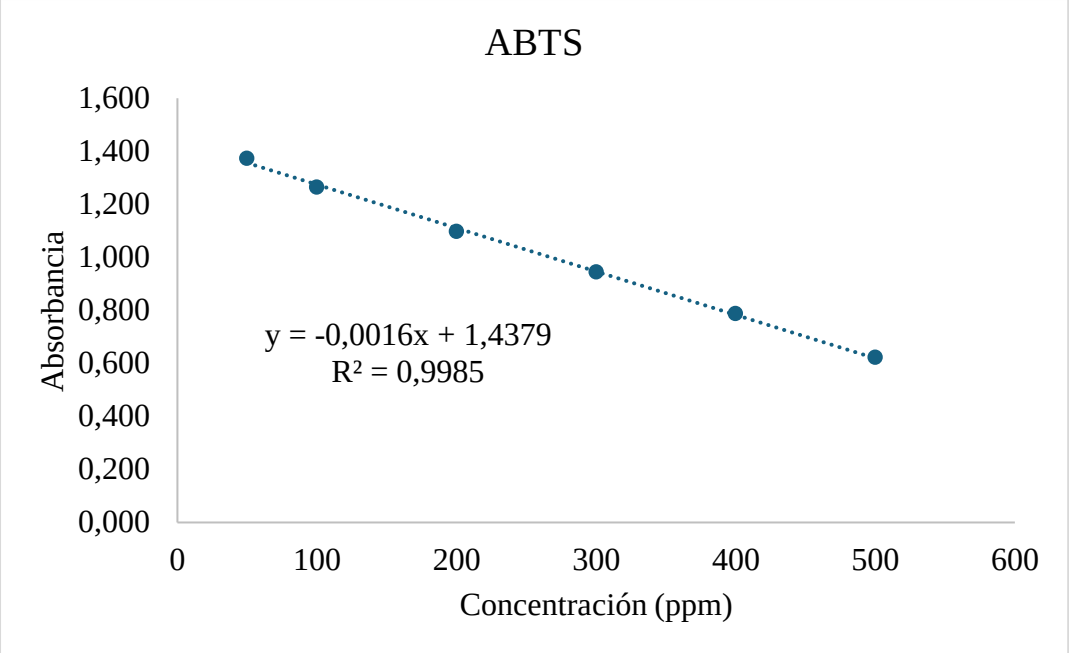
Anexo 2.

Curva estándar de DPPH



Anexo 3.

Curva estándar de ABTS



Anexo 4.

Extraccion por Soxhlet



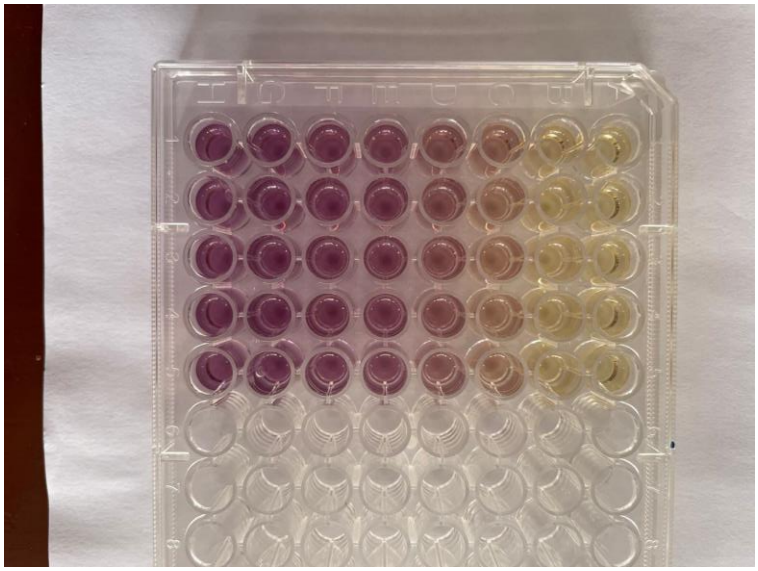
Anexo 5.

Diluciones extracto de *P. anisum*



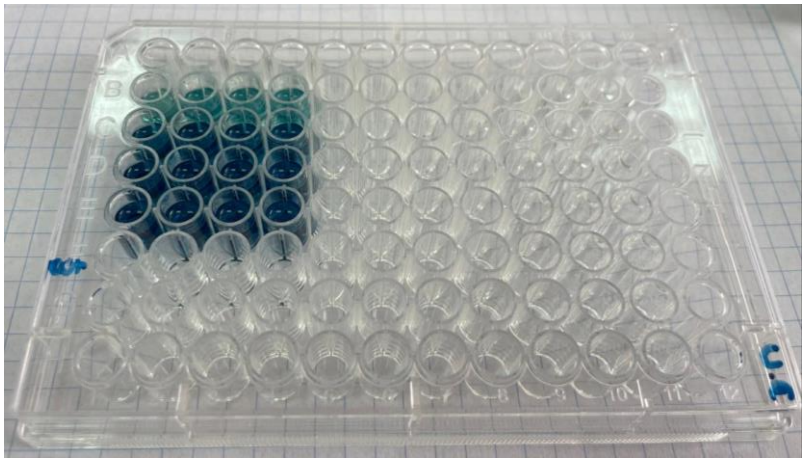
Anexo 6.

Reducción del radical DPPH mediante el extracto de *P. anisum*.



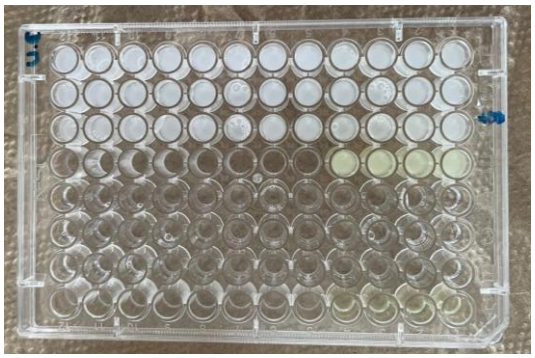
Anexo 7.

Reducción del radical ABTS mediante el extracto de *P. anisum*



Anexo 8.

Actividad antiinflamatoria mediante la desnaturalizacion de la albumina.



Anexo 9.

Análisis de las propiedades terapéuticas de *P. anisum*

