



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Tema: Extracción y caracterización de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) obtenidos a partir de Pujín (*Hesperomeles ferruginea*) planta nativa del cerro Teligote.

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención de Título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Investigación realizada como parte del proyecto “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usadas en el Ecuador”. Proyecto de investigación asociado al proyecto de canje de deuda Ecuador- España llevado a cabo en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigaciones de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0206-CU-P-2018.

Autora: Karina Alexandra Rodríguez Barriga

Tutora: PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador

Agosto – 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por tanto, autorizo la presentación de este trabajo de titulación, modalidad: Proyecto de investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 3 de agosto 2020

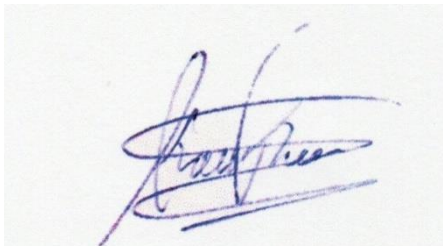
PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I. 180413557-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Karina Alexandra Rodríguez Barriga, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Karina Alexandra Rodríguez Barriga

C.I. 180439251-0

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos, profesores Calificadores, aprueban el presente trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad a las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. Jacqueline De Las Mercedes Ortiz Escobar

CI: 1802171353

Mg. Liliana Patricia Acurio Arcos

CI: 1804067088

Ambato, 14 agosto del 2020.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este 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 Trabajo, 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Karina', is centered on a light gray rectangular background. The signature is fluid and cursive.

Karina Alexandra Rodríguez Barriga

C.I. 180439251-0

AUTORA

DEDICATORIA

**“Mi misión en la vida no es simplemente sobrevivir, sino prosperar, y hacerlo con algo de pasión, algo de compasión, un poco de humor y una pizca de estilo”
Maya Angelou.**

Con mucho amor y agradecimiento infinito a mis padres Rosa y Julio, quienes con su sacrificio constante y su amor incondicional siempre estuvieron a mi lado, por ser el empuje y motor de mis aspiraciones, sueños y anhelos a lo largo de mi vida, son la razón por la que luche tanto para conseguir este sacrificado pero hermoso sueño que ahora es una realidad.

A mis hermanos Jazmina, Carlos, Rocio, Jaqueline, Nixon, Marlene y Washington que han permanecido junto a mí en los buenos y malos momentos alentándome a cumplir mi meta, gracias por sus consejos, su optimismo, su apoyo constante, pero sobre todo por su amor y cariño incondicional en el transcurso de ver cristalizado nuestro sueño, este es nuestro triunfo hermanos, los amo infinitamente a todos.

Karina Rodríguez

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme vivir y contar con esta experiencia universitaria, gracias a lo cual he podido enriquecer mi alma, mi corazón y sobre todo mi conocimiento. Gracias por las caídas, los obstáculos, pero también por los aprendizajes y bendiciones a lo largo del camino.

A toda mi familia, mis padres y hermanos, que son mi ejemplo de unión, amor incondicional, perseverancia, trabajo y esfuerzo para llegar a lograr lo que anhelemos en la vida, y que de una u otra manera han estado al pendiente de mí, apoyándome cada vez que lo he necesitado, Dios los bendiga.

A mi tutora PhD. Dayana Morales por ser un ejemplo de profesionalismo y sobre todo un ser humano extraordinario, que ha compartido no solo su conocimiento y el amor por la investigación; sino que también su amistad sincera y sus consejos, sus palabras apropiadas en momentos adecuados donde he necesitado de una mano amiga, Dios bendiga su camino, gracias por todo.

A mis maestros de la Facultad que confiaron en mi capacidad, dieron todo su mejor esfuerzo y han dejado una huella imborrable en mi vida, Dra. Jaqueline Ortiz, Mg. Liliana Acurio, Dr. Freddy del Pozo, Mg. Joel Hernández, Mg. Diego Salazar, Dra. Cecilia Carpio, Dr. Milton Ramos, Mg. Liliana Cerda, Ing. Jorge Briseño, Ing. Silvia Sánchez, Dra. Dolores Robalino, gracias por orientarme y potencializar mis habilidades durante la carrera.

A mis queridas amigas Cris, Dulce y Estefany y sus respectivas familias que se han convertido en parte de mi familia, gracias por tantos momentos bonitos y el apoyo que me han dado a lo largo de este camino.

A mis compañeros y amigos entrañables que he tenido la oportunidad de conocer a lo largo de esta etapa universitaria y con quienes he compartido momentos inolvidables a Cristian, Jhoa, Sol, Diana, Fernanda, Myriam, Ximena, Tannia, Jhoana, Karen y Andrés.

Al grupo Polifenoles Xime, Jeny, André, Melani, Dianita y Alex por su amistad, risas y apoyo constante en el desarrollo de esta investigación.

A la comunidad del Cerro Teligote por permitirme acceder a la muestra de este estudio (Pujín) y al Dr. Walter Simbaña que ayudó en la identificación y recolección de la muestra.

Al proyecto Canje de Deuda Ecuador – España y de forma especial a los ingenieros Mario y Mónica que permitieron la utilización del laboratorio para el desarrollo de la fase experimental.

A todos muchas gracias.

Karina Rodríguez

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|------------|
| RESUMEN | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| CAPITULO I | 1 |
| MARCO TEORICO | 1 |
| 1.1 Antecedentes Investigativos | 1 |
| 1.1.1 Aporte ancestral de las culturas en el Ecuador | 1 |
| 1.1.2 Reserva ecológica Teligote..... | 1 |
| 1.1.3 Pujín (<i>Hesperomeles ferruginea</i>) | 3 |
| 1.1.4 Metabolitos secundarios | 5 |
| 1.1.5 Caracterización de metabolitos secundarios | 6 |
| 1.2 OBJETIVOS | 8 |
| 1.2.1 Objetivo General..... | 8 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos..... | 8 |
| 1.3 Hipótesis | 8 |
| 1.3.1 Hipótesis nula (H_0)..... | 8 |
| 1.3.2 Hipótesis alternativa (H_1) | 8 |
| 1.4 Señalamiento de variables | 9 |
| 1.4.1 Variable independiente..... | 9 |
| 1.4.2 Variable dependiente..... | 9 |
| CAPITULO II | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 10 |
| 2.1 Materiales | 10 |
| 2.1.1 Materia prima..... | 10 |
| 2.1.2 Materiales de laboratorio..... | 10 |
| 2.1.3 Reactivos | 11 |
| 2.1.4 Equipos..... | 12 |
| 2.2 Métodos | 12 |
| 2.2.1 Recolección y preparación de la muestra | 12 |
| 2.2.2 Optimización del proceso de extracción | 12 |
| 2.2.3 Cuantificación de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides)..... | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.4 Caracterización de los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC) | 14 |
| CAPITULO III | 16 |
| RESULTADOS Y DISCUSION | 16 |
| 3.1 Optimización del proceso de extracción..... | 16 |
| 3.2 Optimización de Disolvente..... | 16 |
| 3.3 Optimización de la temperatura | 19 |
| 3.4 Optimización del tiempo..... | 22 |
| 3.5 Agotamiento del material vegetal..... | 24 |
| 3.6 Caracterización de metabolitos secundarios mediante Cromatografía de capa fina (TLC) 26 | |
| 3.7 Caracterización de metabolitos secundarios mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 30 |
| 3.8 Verificación de las hipótesis | 35 |
| CAPITULO IV..... | 36 |
| CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES | 36 |
| 4.1 Conclusiones | 36 |
| 4.2 Recomendaciones | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |
| Anexo A | 43 |
| A 1. Curva de calibración de catequina para extracción de flavonoides..... | 44 |
| A 2. Curva de calibración de ácido gálico para extracción de polifenoles..... | 44 |
| A 3. Optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de flavonoides..... | 45 |
| A 4. Datos de la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de polifenoles. | 46 |
| A 5. Datos de la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de flavonoides. | 47 |
| A 6. Datos de la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de polifenoles. | 48 |
| A 7. Datos de la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de flavonoides. | 49 |
| A 8. Datos de la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de polifenoles. | 50 |

| | |
|---|-----------|
| A 9. Datos de la optimización de desgaste vegetal para la determinación de flavonoides. | 51 |
| A 10. Datos de la optimización de desgaste vegetal para la determinación de polifenoles..... | 52 |
| ANEXO B..... | 53 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 53 |
| B 1. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de flavonoides. | 54 |
| B 2. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de flavonoides. | 54 |
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 54 |
| B 3. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de polifenoles. | 55 |
| B 4. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de polifenoles. | 55 |
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 55 |
| B 5. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de flavonoides..... | 56 |
| B 6. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de flavonoides..... | 56 |
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 56 |
| B 7. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de polifenoles. | 57 |
| B 8. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de polifenoles. | 57 |
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 57 |
| B 9. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de flavonoides. | 58 |
| B 10. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de flavonoides. | 58 |
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 58 |
| B 11. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de polifenoles. | 59 |
| B 12. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de polifenoles. | 59 |

| | |
|--|-----------|
| Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%..... | 59 |
| ANEXO C..... | 60 |
| FOTOGRAFÍAS | 60 |
| C1. Ascenso, identificación y recolección de las hojas de Pujín | 61 |
| C2. Secado y triturado de las hojas secas de Pujín | 61 |
| C3. Estandarización de proceso de extracción. a: Polifenoles b: Flavonoides. | 62 |
| C4. Obtención y liofilización de la muestra. | 62 |
| C5. Caracterización de metabolitos secundarios mediante HPLC..... | 63 |
| C6. Caracterización de metabolitos secundarios mediante TLC. | 63 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Taxonomía del Pujín | 3 |
| Tabla 2. Equipos | 12 |
| Tabla 3. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados con diferentes disolventes y concentraciones | 18 |
| Tabla 4. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados a diferentes temperaturas de extracción | 21 |
| Tabla 5. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados a diferentes tiempos | 23 |
| Tabla 6. Agotamiento de material vegetal | 25 |
| Tabla 7. Bandas establecidas con TLC y valores de Rf (Prueba 1)..... | 28 |
| Tabla 8. Bandas establecidas con TLC y valores de Rf (Prueba 2)..... | 30 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Reserva Teligote (GAD Pelileo-Dirección de Planificación) | 2 |
| Figura 2. Cerro Teligote (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Salasaca-PDOT) | 2 |
| Figura 3. Género <i>H. ferruginea</i> en el Ecuador (Vargas, 2002)..... | 4 |
| Figura 4. Extracciones consecutivas y recuperación de metabolitos secundarios a: polifenoles b: flavonoides | 26 |
| Figura 5. Cromatograma correspondiente a muestras de Pujín, para caracterización de flavonoides y polifenoles-prueba 1 a: λ 254 nm b: λ 366 nm | 27 |
| Figura 6. Cromatograma correspondiente a muestras de Pujín, para caracterización de flavonoides y polifenoles-prueba 2 a: λ 254 nm b: λ 366 nm | 29 |
| Figura 7. Cromatograma correspondiente a los estándares, longitud de onda A:214 B:254 C:280 D:320 E:360 F:366. | 31 |
| Figura 8. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 214 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 32 |
| Figura 9. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 254 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 32 |
| Figura 10. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 280 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 33 |
| Figura 11. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 320 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 33 |
| Figura 12. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 360 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 34 |
| Figura 13. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 366 nm. A: flavonoides B: Polifenoles..... | 34 |

RESUMEN

En el cantón Pelileo perteneciente a la provincia de Tungurahua se encuentra el cerro Teligote, cuya biodiversidad que ha sido preservada durante décadas por la cultura Salasaca.

Una de las especies representativas, es el Pujín (*Hesperomeles ferruginea*), planta nativa del cerro y base del estudio. En la presente se optimizó el proceso de extracción de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides totales), evaluando factores como el tipo de disolvente, temperatura, tiempo y número de extracciones sucesivas.

Para la cuantificación de polifenoles se aplicó el método de Folin-Ciocalteu y curva de calibración con ácido gálico, las condiciones establecidas para la extracción fueron metanol al 50 por ciento, 50 grados centígrados por 5 min con 4 extracciones, obteniendo como resultado 79,541mg EAG sobre g de ms. Mientras para la cuantificación de flavonoides se aplicó el método de cloruro de aluminio y curva de calibración de catequina, resultando las condiciones óptimas para la extracción, metanol al 25 por ciento a 50 grados centígrados, 5 min con 3 extracciones, obteniendo 49,751 mg ECQ sobre g de ms., en los dos casos alcanzando un rendimiento mayor al 95 por ciento; se comprobó que la matriz vegetal tiene una alta cantidad de polifenoles y flavonoides en relación a otras matrices.

Complementario a esto la caracterización de metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante métodos cromatográficos (HPLC y TLC), obteniendo cromatogramas que permitieron verificar la presencia de polifenoles y flavonoides, además observar que la matriz vegetal contiene un espectro amplio de compuestos de interés a diferentes longitudes de onda.

Palabras Clave: Pujín, *Heperomeles ferruginea*, metabolitos secundarios, polifenoles, flavonoides, extracción, caracterización.

ABSTRACT

In the Pelileo canton belonging to the province of Tungurahua is the Teligote hill, whose biodiversity has been preserved for decades by the Salasaca culture.

One of the representative species is the Pujín (*Hesperomeles ferruginea*), native plant of the hill and base of the study. In the present, the extraction process of secondary metabolites (polyphenols and total flavonoids) was optimized, evaluating factors such as the type of solvent, temperature, time and number of successive extractions.

For the quantification of polyphenols, the Folin-Ciocalteu method and calibration curve with gallic acid were applied, the conditions established for the extraction were methanol at 50 percent, 50 degrees centigrade for 5 min with 4 extractions, obtaining as a result 79.541mg EAG about g of more. While for the quantification of flavonoids, the aluminum chloride method and catechin calibration curve were applied, resulting in the optimal conditions for the extraction, 25 percent methanol at 50 degrees centigrade, 5 min with 3 extractions, obtaining 49.751 mg ECQ on g of more., in both cases reaching a yield greater than 95 percent; It was found that the plant matrix has a high amount of polyphenols and flavonoids in relation to other matrices.

Complementary to this, the characterization of secondary metabolites was carried out using chromatographic methods (HPLC and TLC), obtaining chromatograms that allowed verifying the presence of polyphenols and flavonoids, in addition to observing that the plant matrix contains a wide spectrum of compounds of interest at different wavelengths.

Keywords: Pujín, *Heperomeles ferruginea*, secondary metabolites, polyphenols, flavonoids, extraction, characterizat.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Aporte ancestral de las culturas en el Ecuador

El Ecuador posee gran cantidad de recursos vegetales los cuales han sido utilizados como fuente medicinal, alimenticia y maderable; que desde tiempos inmemorables contribuyen al avance y desarrollo de diversas culturas en el país. Las plantas por su parte se han utilizado a lo largo del tiempo como base para ritos y creencias ancestrales **(De la Torre, Muriel y Balslev, 2006)**. Basado en el conocimiento ancestral acumulado durante años por las culturas indígenas, se resalta la estrecha relación salud-naturaleza que ha ido evolucionando durante décadas siendo la base de estudios e investigaciones para lograr potencializar el uso de plantas medicinales **(Ríos, 2008)**.

Dado que las culturas ancestrales poseen este conocimiento invaluable, es de rescatar que la región andina se caracteriza por encontrarse poblada de gente mestiza, afroamericana y Quechua, esta última constituida por doce pueblos como son los Natabuelas, Puruhaes, Quitus, Guarangas, Panzaleos, Caranquis, Cañaris, Saraguros, Otavalos, Chibuleos, Cayambis y Salasacas **(Rendón, 2005)**.

De todos estos se destaca el pueblo Salasaca que se caracteriza por ser una de las etnias que ha conservado sus tradiciones, idioma, economía, vestimenta y costumbres en general que se han transferido de padres a hijos durante generaciones. Se encuentran ubicados en el cantón de Pelileo perteneciente a la provincia de Tungurahua; se los considera mitimaes posiblemente de Bolivia, ya que en la época de la conquista, la población fue desplazada al pie de la montaña Teligote **(Rodríguez, 2013)**.

1.1.2 Reserva ecológica Teligote

En la provincia de Tungurahua, el cantón Pelileo se encuentra a 2900 msnm de altitud promedio; en el cual se encuentra ubicado uno de los bosques nativos más representativos en biodiversidad de flora, conocido como Teligote. Esta reserva ecológica es considerada

como el punto más alto del cantón con 3400 msnm, además se encuentra entre la latitud de 01°22'22" al Sur y longitud 78°34'15" al Oeste constando de una superficie de 407.40 hectáreas que alberga alrededor de 160 plantas medicinales (**figura 1**). Se caracteriza por tener un clima semi nublado lluvioso con temperaturas que fluctúan los 7 a 15°C (**Guilcatoma, 2010**).

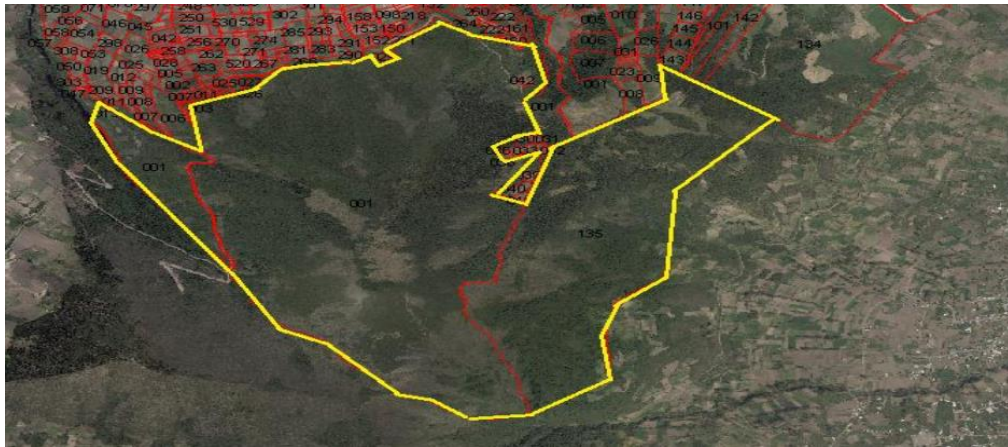


Figura 1. Reserva Teligote (GAD Pelileo-Dirección de Planificación)

El cerro Teligote (**Figura 2**) es considerado por la cultura Salasaca como el protector de la buena producción., es así que cada mes de noviembre visitan el cerro para realizar sus rituales de protección para sus sembríos; además para recolectar la cochinilla, hemíptero del cual se extrae uno de los colorantes naturales más utilizados en las industrias (**Choque, 1992**).

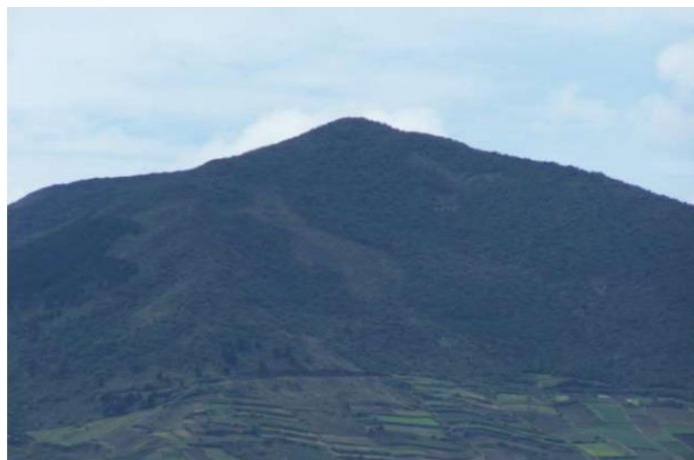


Figura 2. Cerro Teligote (Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Salasaca-PDOT)

Este cerro también se caracteriza por la presencia de un sin número de plantas medicinales que han sido utilizadas por los lugareños como base para remedios naturales desde hace generaciones, aliviando así padecimientos musculares, malestares o dolores. Entre estas se destaca el Tipo (*Minthostachys mollis*) que sirve para tratar problemas respiratorios, la Chilca (*Baccharis macrantha*) empleada para aliviar golpes y torceduras y el Pujín (*Hesperomeles ferruginea*) utilizado como antiinflamatorio en problemas con los riñones.

1.1.3 Pujín (*Hesperomeles ferruginea*)

Las especies vegetales pertenecientes a las familias *Arecaceae* y *Rosaceae* (a la cual pertenece el Pujín) son las más utilizadas con fines maderables, comestibles (formando parte de los sabores ancestrales) o en las prácticas religiosas y ritos. Sin embargo, el más representativo de sus aportes es en la medicina tradicional, aprovechando hojas, raíces y tallos como parte de brebajes para prevenir o curar problemas de salud. A la familia *Rosaceae* pertenece el género *Hesperomeles* (Figura 1) (Balslev et al., 2008).

Tabla 1. Taxonomía del Pujín

| Taxonomía | |
|-------------------|--|
| Nombre científico | <i>Hesperomeles ferruginea</i> (Pers.) |
| Clase: | Equisetopsida |
| Subclase: | Magnoliidae |
| Superorden: | Rosanae |
| Orden: | Rosales |
| Familia: | Rosaceae |
| Género: | <i>Hesperomeles</i> Lindl |

Fuente: Bentham (2019).

Sterling (1964), indica que el género *Hesperomeles* se encuentra exclusivamente en Sudamérica y Centroamérica. **Romoleroux (1996)**, considera el registro de dos especies representativas del género *Hesperomeles* en el Ecuador, las cuales son *H. ferruginea* (Pers.) Benth y *H. obtusifolia* (Pers.) Lindl (**Ponce, 201508**).

Los árboles de la especie *H. ferruginea* (**Figura 3**), suelen encontrarse en alturas a partir de los 2900 metros, son medianos, extensamente ramificados, poseen hojas con

pubescencia ferrugínea, coriáceas, elípticas, oblongo-elípticas u ovaladas con un aspecto característico entre amarillento y rojizo; además están conformados por flores de color blanco-rosáceo y pétalos caducos, el fruto es pomoide con un diámetro aproximado entre los 0,5 a 0,8 centímetros (**Vargas, 2002**)



Figura 3. Género *H. ferruginea* en el Ecuador (**Vargas, 2002**)

La especie *H. ferruginea* presenta varios nombres, en kichwa se la llama kashapuhin o pakarkar mientras que en castellano es conocida como quique o Pujín. Se caracteriza por sus usos variados, siendo empleada en la apicultura, en carpintería y para elaborar puyas, astas y lanzas en provincias como Azuay, Pichincha, Chimborazo, Cotopaxi, Cañar y Bolívar gracias a su tallo maderable (**Balslev et al., 2008**). Esta y otras especies de la familia *Rosaceae* han servido como la base de diferentes estudios buscando de esta forma relacionar la tradición y la ciencia para el beneficio de la sociedad.

Aún no se registran investigaciones acerca de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) en el Pujín; sin embargo, se reportan estudios en *H. goudotiana* en la que se encontró flavonoides, esteroides, taninos y triterpenoides (**Ponce, 2015**). Además, estudios indican que las hojas y frutos de *H. cuneata* Lindl y *H. obtusifolia* (Pers.) Lindl, presentarían capacidad antiinflamatoria sobre el hígado y riñones (**Ramón y Vergara, 2008**),

Existen análisis acerca de la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos vegetales y aceite esencial obtenidos a partir de 4 especies entre las que se utilizó el Pujín (*H. ferrugínea*), *Valeriana pilosa*, *Passiflora manicata* y *Myrcianthes rhopaloides*, frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos; dichas especies fueron utilizadas debido a que presentan principios activos fungicidas y bactericidas. La técnica utilizada fue difusión de disco en Agar Kirby-Bauer, los resultados fueron obtenidos mediante la medición de los halos de inhibición donde *H. ferrugínea* y *Valeriana pilosa* presentaron menor potencial antimicrobiano frente a *Passiflora manicata* (**Jiménez Pesántez, 2013**), (**Lizcano y Vergara, 2008**).

Todas las especies estudiadas tienen en común que pertenecen a una misma familia y género, de tal forma que es posible asegurar que varios de los metabolitos secundarios podrían estar presentes en el Pujín, además por la coloración de sus pequeños frutos, dicha especie presente antocianinas que comúnmente son utilizadas como colorante en la industria de los alimentos (**Arboleda, Tombe y Velasco, 2013**). No se registran estudios específicos sobre actividad biológica en Pujín, sin embargo, al tener en cuenta que el efecto biológico de una planta se encuentra relacionado con los compuestos fenólicos, el interés sobre el estudio incrementa.

1.1.4 Metabolitos secundarios

En la actualidad los metabolitos secundarios son la base de estudios trascendentales en la medicina, industria alimentaria y cosmética. Se encuentran distribuidos restringidamente en las plantas y cumplen funciones de defensa y protección ante patógenos, microorganismos u otros agentes infecciosos que afecten su desarrollo y crecimiento óptimo, sumado a esto se los atribuye como responsables del color, olor y sabor característico de cada planta. Por otra parte, la cantidad de metabolitos secundarios está íntimamente relacionada con el tipo de planta, de ahí el hecho de que los pastos se regeneren a sí mismos anualmente se tiene un contenido menor de metabolitos en comparación a los árboles y arbustos perennes en cuya categoría se encuentra el Pujín. Dentro de este grupo denominado metabolitos secundarios se destacan los compuestos fenólicos en donde se contemplan tanto polifenoles como flavonoides (**Velez, Campos y Sánchez, 2014**) (**Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003**).

Los compuestos fenólicos resaltan debido a su capacidad antioxidante, de estos el grupo de los flavonoides son los más comunes en la naturaleza y se les atribuye un papel protector en las enfermedades cardiovasculares reduciendo la tasa de colesterol (**Gimeno, 2004**)

A un antioxidante se lo conoce como un compuesto químico, el cual encontrándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato, es así que se los conoce como protectores del sistema celular ante efectos perjudiciales que puedan causar una oxidación excesiva (**Posada et al., 2003**).

1.1.5 Caracterización de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser caracterizados y cuantificados a través de diversos métodos y técnicas analíticas. De manera general estos métodos se basan en la reacción del metabolito con diferentes reactantes para obtener productos coloreados que son medidos por espectrofotometría en la región visible del espectro electromagnético, uno de ellos la espectrofotometría de absorción molecular, en el cual las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas, y la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de su concentración (**Gutiérrez, Montaña, Bracho, Rodríguez y Chang, 2009**).

Una de las técnicas espectrofotométricas para la cuantificación de metabolitos secundarios se basa en la reacción colorimétrica de óxido reducción, entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin Ciocalteu, que posee un color característico amarillo debido a su composición de molibdato y wolframio sódicos. A través de la reacción de óxido reducción se obtiene un complejo de color azul intenso, el cual es posible medir espectrofotométricamente a longitud de onda de 760nm. Para ello se utiliza una curva estándar que emplea ácido gálico por ser el polifenol más representativo de este grupo, en cuanto al resultado obtenido se lo expresa en mg equivalentes de ácido gálico/g material seco (**Ricco, Wagner y Gurni, 2011**).

También los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos los cuales son posibles de determinar por el método colorimétrico de cloruro de aluminio (AlCl_3), el cual se basa

en la formación de complejos estables coloridos obtenidos a partir de la combinación del cloruro junto al nitrito de sodio (NaNO_2) que son medidos posteriormente en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510nm obteniendo así el valor de absorbancia. Para la cuantificación se elabora una curva de calibración de catequina, y el contenido de flavonoides totales se expresa en mg equivalentes de catequina/g de muestra (**Pérez, 2017**).

Otras técnicas para el análisis de compuestos fenólicos incluyen las cromatográficas o técnicas de recuperación, entre las que se destacan la cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) (**Gutiérrez, Montaña, Bracho, Rodríguez y Chang, 2009**).

La cromatografía de capa fina o también conocida como cromatografía plana, es una de las técnicas más sencillas y rápidas para la separación de componentes de una mezcla, mediante la utilización de una fase estacionaria que comúnmente es sílica gel la misma que retiene o retrasa el paso de los diferentes compuestos. Por otro lado la fase móvil constituida por uno o varios disolventes en proporciones adecuadas permite el transporte de la mezcla según la afinidad con la fase estacionaria, es así que la fase móvil asciende a través de la fase estacionaria mediante un proceso de capilaridad y mediante un cromatograma es posible la identificación de distintos compuestos (**Prada, 2015**).

Por otra parte, la cromatografía líquida de alta resolución, ha permitido un avance importante en el análisis de muestras medioambientales, farmacéuticas, alimentos etc. gracias a su alta eficiencia y velocidad de trabajo. Es un tipo de cromatografía donde existe una fase móvil en la cual pasa el analito fluyendo a través de una columna que contiene la fase estacionaria obteniendo como resultados la separación de compuestos específicos en base a su diferente afinidad por estas dos fases (**Pacheco, 2004**).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- Extraer y caracterizar metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) obtenidos a partir de Pujín (*H. ferruginea*) planta nativa del cerro Teligote.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de la temperatura, tiempo y tipo de disolvente en el proceso de extracción de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides).
- Identificar el mejor de los tratamientos para la extracción de compuestos polifenólicos y flavonoides.
- Aplicar dos métodos de análisis (Cromatografía líquida de alta resolución HPLC y cromatografía en capa fina TLC), para la caracterización de los extractos obtenidos con las condiciones optimizadas.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula (H_0)

H_0 : El tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo, no afectan en la concentración y el tipo de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) obtenidos a partir de Pujín (*H. ferruginea*).

1.3.2 Hipótesis alternativa (H_1)

H_1 : El tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo, afectan en la concentración y el tipo de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) obtenidos a partir de Pujín (*H. ferruginea*).

1.4 Señalamiento de variables

1.4.1 Variable independiente

| | |
|----------------------|---------|
| | Metanol |
| Tipo de disolvente | Etanol |
| | Agua |
| | 30°C |
| Temperatura | 40°C |
| | 50°C |
| | 60°C |
| | 5 min |
| Tiempo de extracción | 10 min |
| | 20 min |

1.4.2 Variable dependiente

Contenido de polifenoles totales

Contenido de flavonoides totales

Número de compuestos obtenidos

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Materia prima

- Hojas de Pujín (*Hesperomeles ferruginea*)

2.1.2 Materiales de laboratorio

- Probetas (5,10,50,100 ml)
- Micropipetas (20-200 μ l; 100-1000 μ l)
- Puntas para micropipetas (20-200 μ l; 100-1000 μ l)
- Vasos de precipitación (50, 100 y 250 ml)
- Balones de aforo (5, 10, 25, 50, 100 y 250 ml)
- Refrigerador 2°C
- Congelador (-80°C, -23°C)
- Varilla de agitación de vidrio
- Papel aluminio
- Agitadores magnéticos pequeños y medianos
- Placas cromatográficas (Camag 10x10cm sílica gel 60 F 254 - TLC)
- Viales (10 ml)
- Viales (HPLC Wicom de 2 ml con tapa 12x 32 mm)
- Columna HPLC eclipse XDB-C18 4.6 x 250 mm, 5 μ m (Agilent Technologies)
- Gradillas de distintos tamaños
- Microfiltros (0,45 μ m)
- Frascos pequeños con tapa (20ml)
- Molino
- Tubos eppendorf (2 ml)
- Bandejas
- Rotuladores
- Escritorio

- Cinta
- Marcadores

1.2.3 Reactivos

- Agua Mili-Q
- Agua HPLC
- Hidróxido de sodio (Merck, 99%)
- Etanol (Applichem Panreac, 99,8%)
- Metanol (Applichem Panreac, 99,8%)
- Folin Ciocalteu (Sigma, 2N)
- Carbonato de sodio (Merck, 99%)
- Nitrito de sodio (Lobachemie, 98%)
- Cloruro de aluminio (Lobachemie)
- Catequina hidrato grado HPLC (Sigma, 98%)
- Metanol HPLC (Merck, 99%)
- Ácido gálico (Sigma, 97,5%)
- Acetato de etilo (Applichem Panreac, 99%)
- Ácido fórmico (Sigma, 98%)
- Ácido acético (Sigma, 99,8%)
- Metanol (Merck, 99%)

2.1.4 Equipos

Tabla 2. Equipos

| Equipo | Marca | Modelo |
|---|----------------------|-----------------|
| Espectrofotómetro | Termocientific | Evolution 201 |
| Balanza analítica | Mettler Toledo | XPE204 |
| Placa de agitación | IKAC-MAGH57 | ET278 |
| Vortex | VWR | S0200 |
| Baño de ultrasonido | BRANSON 2800 | CPXR800H |
| Centrífuga | Bansen | Finsen |
| Rotavapor | SUELA | R53000V |
| Liofilizador | Labconco | REIU87 |
| Equipo de cromatografía de líquidos | Agilent Technologies | 1260 Infinity |
| Equipo de Cromatografía de capa fina | CAMAG | A754 Y 022.9180 |

Fuente: Karina Rodríguez, 2020.

2.2 Métodos

2.2.1 Recolección y preparación de la muestra

Las muestras de Pujín empleadas para el presente estudio se obtuvieron en base a un muestreo no probabilístico, es decir hojas que se encontraron al azar sin ningún juicio en específico, recolectadas en el cerro Teligote ubicado en la provincia de Tungurahua, cantón Pelileo en la comunidad del mismo nombre a una altura de 3422 msnm cuyas coordenadas establecidas fueron 01°22'12.5" S y 78°33'55.5" O. La muestra vegetal fue trasladada al laboratorio de canje de deuda de la FCIAB, donde previo a un proceso de limpieza y selección, fueron secadas a 40°C por 72 horas, y trituradas hasta alcanzar un fino polvo, el cual se almacenó en bolsas ziploc hasta su posterior análisis.

2.2.2 Optimización del proceso de extracción

El proceso de extracción para la obtención de metabolitos secundarios se optimizó a partir de tres factores de estudio que influyeron en la concentración y tipo de compuestos obtenidos.

1. Se evaluó 3 disolventes a diferentes concentraciones agua, metanol y etanol a 25, 50, 75% y puro, ya que las diferencias de solubilidad de los componentes hacen que se facilite la extracción.

2. Se trabajó a 4 temperaturas diferentes 30, 40, 50 y 60°C, dado que en muchos casos la solubilidad de los componentes activos aumenta al incrementar la temperatura, de forma que se favorece la extracción.

3. Se ensayó con 3 tiempos 5, 10 y 20 min, ya que el valor óptimo de contacto con el disolvente logrará obtener el mayor rendimiento de producto.

Se consideró un factor a la vez trabajando mediante la siguiente metodología.

2.2.2.1 Extracción de la muestra

Para la extracción se colocó en tubos eppendorf 0,1g de muestra y 1ml de disolvente, inmediatamente se llevó a baño de ultrasonido durante 5 min, se centrifugó por 10 min a 10°C y 4900 rpm, se recolectó el sobrenadante con el cuidado pertinente y se dejó reposar en la estufa a 40°C por 2 horas 30 minutos, finalmente se aforó a 5 ml.

Para la selección del mejor tratamiento en cada uno de los ensayos se consideró el mayor rendimiento en la cuantificación de polifenoles totales y flavonoides totales.

2.2.3 Cuantificación de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides)

Para la cuantificación de polifenoles y flavonoides se empleó dos métodos colorimétricos el método de Folin Ciocalteu y el método del cloruro respectivamente.

2.2.3.1 Determinación de polifenoles (Método de Folin Ciocalteu)

Para la cuantificación de compuestos polifenólicos se trabajó con el extracto obtenido a partir de la muestra de Pujín; se colocó 50µl de extracto junto con 100µl de reactivo de Folin se agitó por 3 min y se colocó 2ml de carbonato de sodio, se aforó a 5ml, y se dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente por 2 horas, una vez transcurrido este lapso de tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 760nm de longitud de onda (Vasco et al., 2008).

2.2.3.2 Determinación de flavonoides (Método del cloruro)

Se tomó 250µl de extracto y 1,25 ml de agua Milli-Q, después se colocó 75 µl de nitrato de sodio, se agitó y esperó 6 min, seguidamente se colocó 150 µl de cloruro de aluminio y se esperó 5 min, transcurrido este tiempo se colocó 500 µl de hidróxido de sodio, y se aforó a 5 ml, finalmente se midió la absorbancia a 500 nm y 510 nm de longitud de onda (Dewanto et al., 2002).

2.2.4 Caracterización de los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC)

2.2.4.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

Para la caracterización de los extractos se utilizó la muestra obtenida en condiciones óptimas una vez congelada a -80°C y posteriormente liofilizada, de la cual se tomó 5mg y se disolvió en 1ml de metanol al 50%; de dicha disolución se inyectó 12 µl en placas cromatográficas de capa fina pre-cubiertas con sílica gel 60 F₂₅₄ y previamente activadas, estas placas fueron colocadas en una cámara cromatográfica con una fase móvil compuesta por AcOEt: Ac. fórmico: Ac. Acético: agua en proporciones 100:10:8:22, también en otra fase móvil de AcOEt: Metanol: Ac. fórmico en proporciones 80:15:3. Finalmente las placas se rebelaron bajo luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm de longitud de onda (Knezevic et al., 2011).

2.2.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución en modo gradiente, se utilizó como fase móvil metanol HPLC y agua, además como fase estacionaria una columna XDB_C18. Se tomó 1,5 mg de muestra liofilizada y se llevó a un volumen de 5 ml con metanol HPLC 50%, se filtró con la ayuda de un microfiltro de 0,45 µm; el flujo fue de 0,8 ml/min, en cuanto a la temperatura del automuestreador y la columna se trabajó a 20°C; la muestra fue colocada en viales en el equipo cromatográfico donde fueron identificados los picos mediante la comparación con los estándares de ácido gálico y

catequina, se obtuvo así los tiempos de retención a longitudes de onda de 214, 254, 280, 320, 360 y 366 nm (**Guillarme et al., 2010**), (**Saénez et al., 2009**), (**Parets et al., 2016**).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Optimización del proceso de extracción

Los metabolitos secundarios son compuestos sintetizados a partir del metabolismo secundario de la planta, se encuentran en especies y géneros específicos relacionados taxonómicamente (**García y Carril, 2011**). Los metabolitos secundarios son el producto de reacciones químicas que se llevan a cabo en las células de la planta, obtenidos a partir de compuestos más simples, además cumplen con funciones ecológicas y de protección ante el medio donde se desarrolla la planta (**García, 2004**). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios, que al tener una distribución limitada su importancia va en aumento gracias a los beneficios que estos representan.

Es por ello que estos factores (tipo de disolvente, temperatura, tiempo y desgaste vegetal) fueron evaluados independientemente durante el proceso de extracción.

Existen diferentes técnicas para la extracción de compuestos fenólicos como la maceración, lixiviación, soxhlet, arrastre por vapor, ultrasonido; siendo este último uno de los más importantes debido a que es el más eficiente, económico y sencillo en relación a otras técnicas. En todos los métodos de extracción se debe tomar muy en cuenta aspectos como: la parte adecuada de la planta a utilizarse para el estudio, las proporciones idóneas de disolventes, el tiempo y la temperatura, dichos aspectos son realmente importantes de ser controlados debido a que permiten que las sustancias bibliológicamente activas de la planta sean extraídas de forma adecuada optimizando de esta manera el proceso y asegurando la calidad de los compuestos extraídos (**Meneses et al., 2008**)

3.2 Optimización de Disolvente

Arranz, (2010) menciona que tanto las condiciones de extracción como el tipo de disolvente escogido, dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos a ser extraídos.

La determinación del disolvente en proporciones adecuadas dependerá directamente de la concentración de los principios activos de la planta, asegurando de esta forma su acción

efectiva. Los resultados finales dependerán a su vez de la solubilidad y estabilidad que presentan las sustancias a ser extraídas frente al disolvente (**Amaya y Portillo, 2013**).

Ya que en base a la polaridad de los disolventes se pueden extraer compuestos de polaridad similar, las interacciones intermoleculares juegan un papel importante en el proceso de extracción.

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos o plantas son posible de extraerlos generalmente con disolventes acuoso-orgánicos (**Arranz, 2010**). Los antecedentes y estudios realizados acerca de la extracción de compuestos fenólicos a partir de extractos vegetales reportan la utilización de diferentes tipos de disolventes como: el agua, acetona, metanol y etanol entre los más utilizados (**Coavoy, 2015**). Es por ello que se trabajó con agua, metanol y etanol obteniendo la extracción de los compuestos polares (polifenoles y flavonoides). El agua es uno de los disolventes más utilizados gracias a la polaridad que presenta, el etanol es un compuesto orgánico no tóxico usado para procesos de extracciones y el metanol es considerado uno de los alcoholes más sencillos y altamente miscible con otros solventes (**Coavoy, 2015**).

Los datos obtenidos (**Tabla 3**) reflejan el proceso mediante el cual se determinó el mejor tratamiento tras un análisis estadístico, de esta forma se observó diferencias significativas entre los disolventes a diferentes concentraciones. Tomando como resultado óptimo el valor más alto de polifenoles y flavonoides respectivamente.

Tabla 3. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados con diferentes disolventes y concentraciones

| | DISOLVENTES | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Agua | Metanol | | | | Etanol | | | |
| Concentración de disolvente | pura | 25% | 50% | 75% | Puro | 25% | 50% | 75% | Puro |
| »CPF (mg E AG/g ms) | 22,244± 0,501 ^c | 29,897± 0,703 ^b | *33,637± 2,758 ^a | 23,805± 0,496 ^c | 24,135 ±0,703 ^c | 29,657± 2,222 ^b | 28,730± 2,888 ^b | 28,876± 2,586 ^b | 21,584± 1,673 ^c |
| »FLAV (mg E catequina/g ms) | 20,843± 2,215 ^{yz} | *31,765± 2,227 ^w | 28,637± 0,215 ^x | 22,794± 0,260 ^y | 28,637 ±0,687 ^x | 27,609± 0,867 ^x | 26,829± 3,136 ^x | 23,316± 2,056 ^y | 18,359± 1,321 ^z |

» Promedio ± desviación estándar de 3 réplicas para la cuantificación de compuestos polifenólicos (CPF) y flavonoides (FLV).

^{a,b,c} Promedio con distintas letras en una misma fila difieren estadísticamente entre disolventes para la cuantificación de compuestos polifenólicos a λ 760nm, ($p < 0,05$).

^{w,x,y,z} Promedio con distintas letras en una misma fila difieren estadísticamente entre disolventes para la cuantificación de flavonoides a λ 500nm, ($p < 0,05$).

*Promedio ± desviación estándar de los mejores disolventes para la cuantificación de compuestos polifenólicos y flavonoides.

Las muestras de extracto de Pujín fueron preparadas por triplicado y medidas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm para el caso de flavonoides y 760 nm para polifenoles. Los resultados fueron analizados en el programa estadístico statgraphics en el que se realizó un análisis de varianza y la interacción de las variables establecidas. Finalmente se evaluaron los resultados, determinando que la extracción de compuestos polifenólicos se ve favorecida por el metanol a una concentración de 50% con un valor de 33,637 mg EAG/g ms, mientras que para flavonoides el disolvente que permitió la mayor extracción de estos compuestos fue el metanol al 25% con un valor final de 31,765 mg E catequina/g ms.

En relación con estudios sobre la aplicación de diferentes solventes para la extracción de compuestos fenólicos, resalta que el agua incorporada al solvente a ser utilizado permite que aumente la solubilidad de los compuestos contenidos en la planta (**Sampietro, 2002**). Esto ha sido demostrado en la extracción de corteza de *Pinus radiata* donde el mayor rendimiento de extracto se obtuvo al disminuir la concentración de etanol, utilizando

temperatura de 40°C, mientras que en la extracción de *Pinus durangensis* sucede lo contrario a medida que la concentración de etanol disminuye también lo hace su rendimiento (**Soto y Rosales, 2016**).

Lo que sustenta el dato obtenido de metanol al 50% y 25% para polifenoles y flavonoides respectivamente, conteniendo un porcentaje significativo de agua en los disolventes utilizados en la extracción se deduce que los compuestos extraídos son altamente polares. Además **Castro, (2016)** indican que el rendimiento final de los compuestos fenólicos en diferentes materiales, depende especialmente de la estructura y naturaleza de los compuestos, también se ve relacionado con el grado de polaridad y su relación con el disolvente, constatando de esta forma que no existe un método específico para la extracción de compuestos fenólicos.

3.3 Optimización de la temperatura

Estudios indican que el aumento de temperatura propicia un movimiento vibratorio molecular permitiendo a su vez la división celular, el rompimiento de pared celular, la ruptura de fuerzas intermoleculares y enlaces establecidos entre los compuestos presentes en una matriz vegetal (**Rodríguez et al., 2014**).

El incremento de temperatura puede activar varias enzimas, las mismas que intervienen en la descomposición de los compuestos complejos que crean puentes de hidrógeno con los compuestos fenólicos, facilitando de esta forma el proceso de extracción (**Muñoz et al., 2015**).

Ante lo cual se debe tener en cuenta que las matrices vegetales abarcan una cantidad variada de compuestos, no solo fenólicos; al no ser los únicos presentes, pueden existir variedad de interacciones que afecten directamente al porcentaje obtenido al final de la extracción, de ahí la necesidad de evaluar este parámetro.

Si bien la temperatura puede favorecer la extracción, esta no debe ser extremadamente alta ya que los biocomponentes presentes en el extracto de interés podrían ser termolábiles. **Arranz, (2010), Araneda et al., (2014)** coinciden en estudios sobre la extracción de polifenoles a partir de matrices alimentarias, mencionando que la utilización de temperaturas elevadas puede favorecer el proceso de extracción de compuestos, no obstante se debe tomar en cuenta que tiempos y temperaturas extremadamente altas u otros

factores como la exposición a la luz o al oxígeno por tiempos muy largos, puede dar lugar a la oxidación o degradación de los compuestos. Consecuentemente para el estudio con muestras de Pujín se utilizó un rango de temperatura de 30 a 60°C.

Es importante mencionar que los procesos de extracción muchas de las veces han requerido de sofisticados equipos de alto costo o a su vez que causan daños al ambiente; ante lo cual el ultrasonido representa una ventaja, debido a que genera ondas sónicas que representan energía limpia y no contaminante, además de ser un equipo versátil, de bajo costo y que permite obtener mejores rendimientos.

Azuola y Vargas, (2007) mencionan que el ultrasonido favorece a la generación de una mayor concentración de compuestos fenólicos en comparación a otras técnicas convencionales.

El ultrasonido se basa en señales de alta frecuencia, dichas señales provocan una oscilación rápida a una presión determinada, el material con el que se trabaja se somete a compresiones y descompresiones sucesivas, esto a su vez provoca la generación de burbujas las cuales a una determinado tiempo y temperatura implosionan, todo este proceso se lo conoce como cavitación (**Guntero et al., 2015**).

Esto permite confirmar que la cavitación es un efecto hidrodinámico, que generó en la muestra vegetal de Pujín un cambio físico, químico y mecánico; es decir que la presión ejercida, provocó el rompimiento de partículas y membranas celulares, facilitando la entrada del disolvente y a su vez dando lugar a la liberación de los compuestos fenólicos en tiempos muy cortos.

Consecuentemente una vez seleccionado el disolvente y su concentración adecuada, se procedió a determinar la temperatura como siguiente variable de estudio, se trabajó a temperaturas de (30, 40, 50 y 60°C). La optimización de temperatura se obtuvo al alcanzar el mayor rendimiento para polifenoles y flavonoides respectivamente (**Tabla 1**).

Tabla 4. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados a diferentes temperaturas de extracción

| Temperaturas | Condiciones óptimas de disolvente | |
|--------------|-----------------------------------|--|
| | Metanol 50% | Metanol 25% |
| | »CPF (mg E AG/g muestra seca) | »FLAV (mg E catequina/g muestra seca) |
| 30°C | 21,752±0,540 ^c | 24,132±0,586 ^y |
| 40°C | 23,778±0,487 ^b | 22,465±1,048 ^{yz} |
| 50°C | *33,637±2,758 ^a | *28,496±2,299 ^x |
| 60°C | 21,887±0,810 ^c | 22,890±0,282 ^{yz} |

»Promedio ± desviación estándar de 3 réplicas para la cuantificación de compuestos polifenólicos (CPF) y flavonoides (FLV).

^{a,b,c} Promedio con distintas letras en una misma columna difieren estadísticamente entre las temperaturas para la cuantificación de compuestos polifenólicos a λ 760nm, ($p < 0,05$).

^{x,y,z} Promedio con distintas letras en una misma columna difieren estadísticamente entre las temperaturas para la cuantificación de flavonoides a λ 500nm, ($p < 0,05$).

*Promedio ± desviación estándar con las mejores temperaturas para la cuantificación de compuestos polifenólicos y flavonoides.

Tras el análisis estadístico se observó que el contenido de polifenoles y flavonoides totales en las hojas de Pujín tratados a diferentes temperaturas, tienen diferencia significativa entre sí, además resaltando que la temperatura de 50° C retiene mayor cantidad de polifenoles y flavonoides totales con respecto a los demás tratamientos.

El mejor de los tratamientos para el caso de polifenoles totales fue metanol al 50% a 50°C en el cual se reportó el valor de 33,637 mg EAG/g ms; mientras que para flavonoides totales fue metanol al 25% de igual forma a 50°C con un valor de 28,496 mg E catequina/g muestra seca (**Tabla 2**). Obteniendo de esta forma el mayor aprovechamiento de los compuestos.

Los valores obtenidos para polifenoles totales (**Tabla 3**) en esta investigación son más altos comparados con datos reportados por **Tovar, (2007)** para níspero (*Mespilus germánica L*) perteneciente a la familia *Rosaceae*, extraído a 40° C con un valor de 4,236 mg EAG/g ms, a 50° C con 4,605 y 60° C con 4,050 mg EAG/100g ms. Lo que indica una temperatura óptima para la extracción de polifenoles a 50°C, además cabe señalar que elevadas temperaturas pueden destruir compuestos presentes en la matriz vegetal debido a lo cual es importante controlar el factor de temperatura en el proceso de extracción.

Además, existen estudios de extracción de polifenoles a partir de hojas de *Capsicum annuum* comúnmente llamado chile serrano asistida por ultrasonido utilizando etanol al 70% a temperatura ambiente por 20 minutos en un equipo de ultrasonido, donde se obtuvo 19,48 mg EAG/g ms., y 55,44 mg E catequina/g ms (**López et al., 2007**).

La comparación con los estudios verifica que el método de extracción asistida por ultrasonido es una opción que permiten lograr cantidades altas de compuestos fenólicos.

3.4 Optimización del tiempo

El tiempo de extracción depende de las características de la matriz vegetal (dureza, grado de división) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros). El tiempo de extracción: los valores óptimos de este parámetro serán aquellos que logren extraer una mayor cantidad del producto, a mayor tiempo de contacto mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones (**Soto y Rosales, 2016**). Por otro lado, **Tituaña, (2016)** menciona que el tiempo de extracción además depende de la temperatura ambiente, tamaño de partícula del sólido y agitación.

La extracción de compuestos a partir de plantas, han requerido métodos tradicionales como maceración, arrastre por vapor, soxhlet y la extracción por reflujo entre los más utilizados, habitualmente estos métodos requieren de tiempos de extracción muy largos que llegan a representar un peligro en la estabilidad de fitoconstituyentes del material vegetal que podrían sufrir una degradación térmica, influyendo directamente en el porcentaje del producto obtenido de la extracción, ante lo cual **Acosta et al., (2016)** indica que debido a las desventajas que los métodos tradicionales representan en cuanto a técnicas y métodos de extracción, existen alternativas viables como la extracción por fluidos supercríticos, la asistida por microondas y la asistida por ultrasonido, los cual reduce considerablemente tiempos de extracción, evitando la degradación térmica de constituyentes termolábiles, también disminuye el consumo de disolvente y el costo de operación con rendimientos elevados.

Los datos obtenidos (**Tabla 5**) indican el resultado promedio de la cantidad de polifenoles y flavonoides a diferentes tiempos (5, 10 y 20 min). Una vez establecidos los factores óptimos de disolvente y temperatura se determinó el tiempo adecuado en el cual se obtuvo la mayor cantidad de polifenoles y flavonoides en el proceso de extracción.

Tabla 5. Contenido de polifenoles y flavonoides evaluados a diferentes tiempos

| Tiempos | Condiciones óptimas de disolvente y temperatura | |
|---------|---|--|
| | Metanol 50% a 50°C | Metanol 25% a 50°C |
| | »CPF (mg EAG/g muestra seca) | »FLAV (mg E catequina/g muestra seca) |
| 5 min | *33,637±2,758 ^a | *28,496±2,299 ^x |
| 10 min | 25,714±0,340 ^a | 20,158±0,342 ^y |
| 20 min | 22,968±0,357 ^b | 18,207±0,488 ^z |

»Promedio ± desviación estándar de 3 réplicas para la cuantificación de compuestos polifenólicos (CPF) y flavonoides (FLV).

^{a,b} Promedio con distintas letras en una misma columna difieren estadísticamente entre los tiempos para la cuantificación de compuestos polifenólicos a λ 760nm, ($p < 0,05$).

^{x,y,z} Promedio con distintas letras en una misma columna difieren estadísticamente entre los tiempos para la cuantificación de flavonoides a λ 500nm, ($p < 0,05$).

*Promedio ± desviación estándar con el mejor tiempo para la cuantificación de compuestos polifenólicos y flavonoides.

Tras realizar un análisis de varianza, se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar respectivamente para cada tratamiento, obteniendo de esta forma la mayor cantidad de extracción tanto para polifenoles como para flavonoides (**Tabla 5**). Se puede afirmar que la mayor cantidad de extracción se alcanza a los 5 min, comprobando que dicho tiempo fue suficiente para permitir que los compuestos fueran extraídos de forma eficiente.

Se obtuvo como resultado que el mejor tratamiento hasta este punto fue metanol al 50% a 50°C por 5min con un valor de 33,637 mg EAG/g ms para el caso de polifenoles, mientras que para flavonoides fue metanol al 25% a 50°C por 5min con un valor de 28,496 mg E catequina/g ms. Es así que se afirma que la cantidad de compuestos fenólicos en la muestra de Pujín es inversamente proporcional al tiempo de extracción.

Estudios realizados a cerca de extracciones de compuestos orgánicos aseguran que la calidad de la extracción depende del tiempo (**Restrepo, Narváez y Restrepo, 2009**). Considerándose esto, el tiempo claramente ya sea largo o corto dependerá de la matriz vegetal con el que se trabajó, de forma que el disolvente penetre en el tejido de la matriz y este a su vez determinó la capacidad del disolvente para aumentar la concentración de compuestos extraídos.

3.5 Agotamiento del material vegetal

Los compuestos presentes en una matriz vegetal inmersas en un fluido son posibles de ser extraídos y separados utilizando calor, mediante un rotaevaporador (**Pacheco, 2004**). Además la temperatura nuevamente es decisiva en el proceso como lo indica **Singleton, Orthofer y Lamuela, (1999)** que afirma que el vacío que se genera en el rotaevaporador reduce la temperatura necesaria para evaporar el disolvente.

Es decir que el calor actuó como agente energético que dio lugar a la generación de dos fases, una fase de vapor y una líquida, en la primera contenidos los compuestos más volátiles y en la segunda los menos volátiles, lo que concuerda con **González y Yáñez, (2012)** al evaporar total o parcialmente el disolvente, se logrará obtener extractos de distinta densidad.

Con la finalidad de conocer el número de extracciones consecutivas para alcanzar un rendimiento final mayor al 95%, Se trabajó sobre la misma matriz vegetal varios ciclos consecutivos, cuantificando en cada caso el contenido de polifenoles y flavonoides hasta verificar que en nuevas extracciones el contenido de estos metabolitos secundarios es prácticamente nulo. Los extractos obtenidos bajo óptimas condiciones de disolvente, temperatura y tiempo fueron colocados en un rotavapor el tiempo necesario para evaporar el disolvente orgánico. Los datos obtenidos (**Tabla 6**) registran la cantidad de compuestos con su respectivo porcentaje.

Tabla 6. Agotamiento de material vegetal

| # de extracciones | Condiciones óptimas de disolvente, temperatura y tiempo | | | | | |
|-------------------|---|-----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| | Metanol 50% a 50°C por 5min | | | Metanol 25% a 50°C por 5min | | |
| | »CPF (mg AG/g ms) | ∑ CPF (mg AG/g ms) | Rendimiento obtenido (%) | »FLAV (mg catequina/g ms) | ∑ FLAV (mg catequina/g ms) | Rendimiento obtenido (%) |
| 1 | 37,367 | 37,367 | 61,939 | 28,930 | 28,930 | 65,822 |
| 2 | 22,961 | 60,328 | 81,905 | 15,022 | 43,952 | 90,060 |
| 3 | 13,328 | 73,656 | 92,601 | 4,851 | 48,803 | 98,095 |
| 4 | 5,885 | 79,541 | 97,854 | 0,948 | 49,751 | 100 |
| 5 | 1,744 | 81,285 | 100 | -1,003 | 48,748 | 97,984 |

Se determinaron todos los parámetros considerados como óptimos para la extracción de tal forma que el proceso fue estandarizado, y se logró cuantificar los metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides totales), garantizando la seguridad, calidad, rendimiento y eficacia del producto final.

Se evaluó el efecto del número de extracciones sobre las variables de estudio (**Tabla 6**). Para la cuantificación de polifenoles totales con cuatro extracciones se obtuvo 79,541 mg EAG/g ms lo cual representó alrededor del 97% de rendimiento; entre tanto para flavonoides totales con tres extracciones se obtuvo 48,748 mg E catequina/g ms representando el 98%, además se observó que el valor negativo obtenido en la extracción cinco, indica que en este punto ya no se logró identificar flavonoides. Además, dichos resultados se evidencian en las curvas obtenidas (**figura 4**) para polifenoles y flavonoides respectivamente.

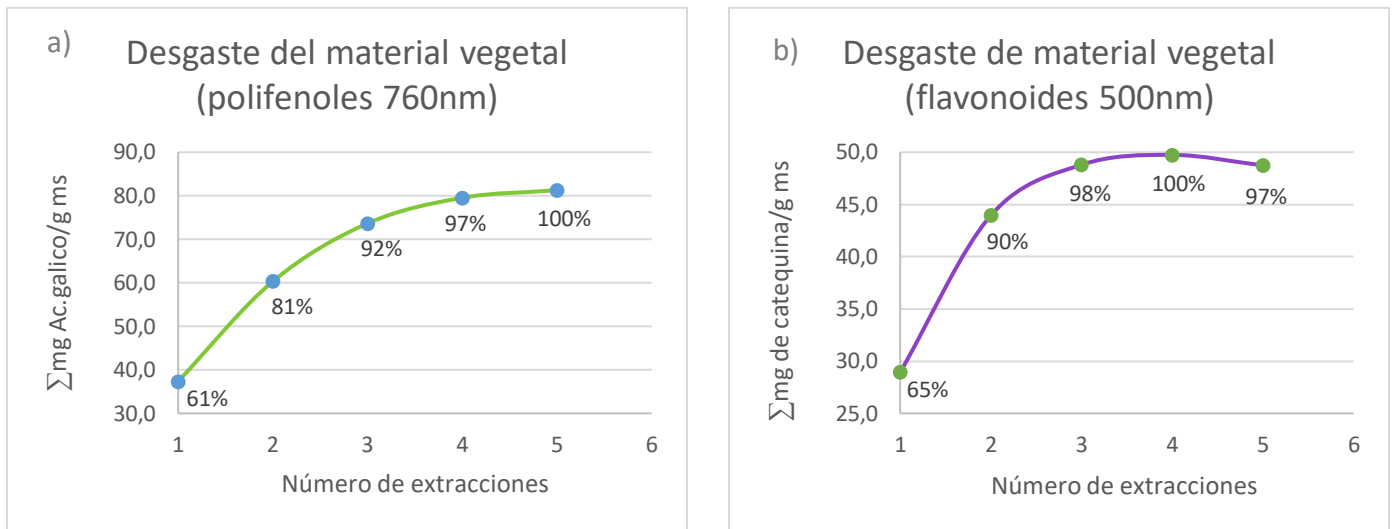


Figura 4. Extracciones consecutivas y recuperación de metabolitos secundarios **a:** polifenoles **b:** flavonoides

3.6 Caracterización de metabolitos secundarios mediante Cromatografía de capa fina (TLC)

TLC es una técnica cromatográfica versátil, común y rápida la cual requiere una fase estacionaria (placa de aluminio o vidrio) y una fase móvil compuesta de uno y varios disolventes conocidos como reveladores químicos adecuados que por medio de capilaridad los compuestos de interés eluyen (**De la Iglesia, 2018**).

En el estudio con las muestras de Pujín la fase estacionaria fue una placa de silica gel soportada sobre una superficie de vidrio, que actuó como adsorbente, ante lo cual **Acevedo et al., (2003)** indica que entre los adsorbentes más utilizados están el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar; es por eso que la función específica de la placa fue retener los compuestos, esto se debe a las interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo. **Casado, (2011)** aclara que las interacciones dipolo-dipolo son enlaces específicamente de hidrógeno que se generan entre el soluto y el adsorbente, este debe ser inerte y no interactuar o catalizar las reacciones.

Los eluyentes pueden ser miscibles entre sí y de distinta polaridad, la fuerza eluyente jugó un papel crucial en la separación de los compuestos. Un disolvente al ser más polar su fuerza de elución incrementa y al ser menos polar su fuerza disminuye. Entre los más

utilizados por orden creciente de fuerza eluyente están el hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol < metanol < agua (Gutiérrez, 2002).

Quintero y Chacón (2019) señala que el orden de elución de un compuesto aumenta al incrementar la polaridad de la fase móvil. Consecuentemente el análisis cualitativo por TLC a partir de extractos y liofilizados de la muestra de Pujín se llevó a cabo probando dos fases móviles diferentes; la primera fue AcOEt: Ac. Fórmico: Ac. Acético: Agua proporción 100:10:8:22; mientras que la segunda prueba fue AcOEt: Metanol: Agua proporción 80:15:3 para llegar a obtener los resultados (Figura 5) se aplicó la técnica del ensayo y error hasta visualizar la mejor separación de los compuestos presentes.

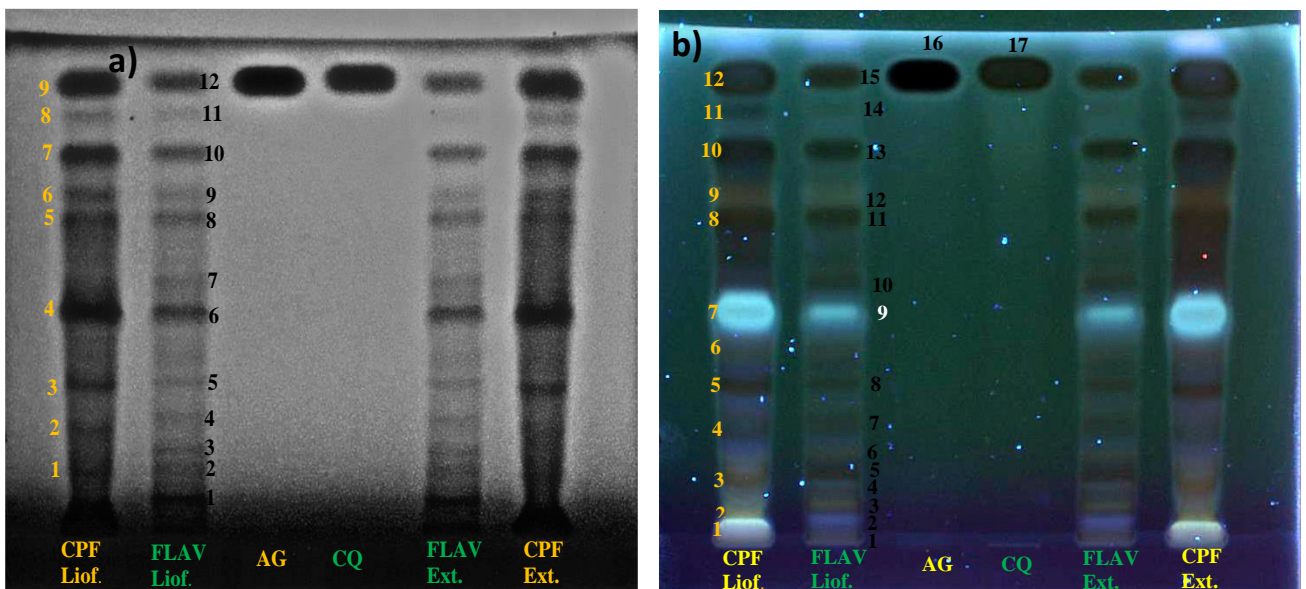


Figura 5. Cromatograma correspondiente a muestras de Pujín, para caracterización de flavonoides y polifenoles-prueba 1 **a:** λ 254 nm **b:** λ 366 nm

Tabla 7. Bandas establecidas con TLC y valores de Rf (Prueba 1)

| POLIFENOLES | | | | | FLAVONOIDES | | | | |
|-------------|------------|---------------------|---------------------|----------------|-------------|------------|---------------------|---------------------|----------------|
| # banda | Estándares | D _f (cm) | D _s (cm) | R _f | # Banda | Estándares | D _f (cm) | D _s (cm) | R _f |
| 1 | -- | 6,6 | 0,2 | 0,03 | 1 | -- | 6,6 | 0,1 | 0,02 |
| 2 | -- | 6,6 | 0,4 | 0,06 | 2 | -- | 6,6 | 0,3 | 0,05 |
| 3 | -- | 6,6 | 0,9 | 0,14 | 3 | -- | 6,6 | 0,5 | 0,08 |
| 4 | -- | 6,6 | 1,5 | 0,23 | 4 | -- | 6,6 | 0,8 | 0,12 |
| 5 | -- | 6,6 | 2,1 | 0,32 | 5 | -- | 6,6 | 1 | 0,15 |
| 6 | -- | 6,6 | 2,5 | 0,38 | 6 | -- | 6,6 | 1,1 | 0,17 |
| 7 | -- | 6,6 | 3 | 0,46 | 7 | -- | 6,6 | 1,5 | 0,23 |
| 8 | -- | 6,6 | 4,2 | 0,64 | 8 | -- | 6,6 | 2 | 0,30 |
| 9 | -- | 6,6 | 4,5 | 0,68 | 9 | -- | 6,6 | 2,9 | 0,44 |
| 10 | -- | 6,6 | 5,1 | 0,77 | 10 | -- | 6,6 | 3,3 | 0,50 |
| 11 | -- | 6,6 | 5,6 | 0,85 | 11 | -- | 6,6 | 4,2 | 0,64 |
| 12 | -- | 6,6 | 6 | 0,91 | 12 | -- | 6,6 | 4,5 | 0,68 |
| 16 | AG | 6,6 | 6 | 0,91 | 13 | -- | 6,6 | 5 | 0,76 |
| | | | | | 14 | -- | 6,6 | 5,5 | 0,83 |
| | | | | | 15 | -- | 6,6 | 6,1 | 0,92 |
| | | | | | 17 | CQ | 6,6 | 6,1 | 0,92 |

Número de bandas obtenidas por TLC. **R_f**: factor de retención **D_s**: distancia recorrida por la zona del soluto desde el origen **D_r**: distancia recorrida por la fase móvil desde el origen.

Los cromatogramas (**Figura 5**), (**Figura 6**) indica la separación de los compuestos a diferentes longitudes de onda **a**: λ 254 nm **b**: λ 366 nm para prueba 1 y 2 respectivamente; entre estos la mejor opción fue (**b**) y prueba 1, ya que esta longitud de onda permitió visualizar de mejor manera la separación de los compuestos y la mayor cantidad revelados por placa gracias a la presencia de varios colores e intensidades que permitieron calcular el factor de retención R_f para cada franja presente en el cromatograma. Además, se observó que la cantidad de flavonoides supera a la de polifenoles, es decir que esta constante es una forma de expresar la posición que los compuestos toman en el cromatograma (**Tabla 7**). El R_f se calculó dividiendo la distancia recorrida por la zona del soluto desde el origen (D_s) sobre la distancia recorrida por la fase móvil desde el origen (D_r).

Se debe tener en cuenta que para lograr que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones como el espesor de la placa de silica gel, fase móvil correspondiente previo estudio, fase estacionaria, cantidad de muestra a inyectarse. También el máximo valor de Rf puede ser 1 y no debe rebasar este valor debido a que la muestra inyectada no puede recorrer más distancia que la mezcla de solventes y no debe ser cero debido a que el compuesto debió haber recorrido un espacio determinado; lo recomendable es un Rf de 0,5 a 0,7. (Pérez, 2016).

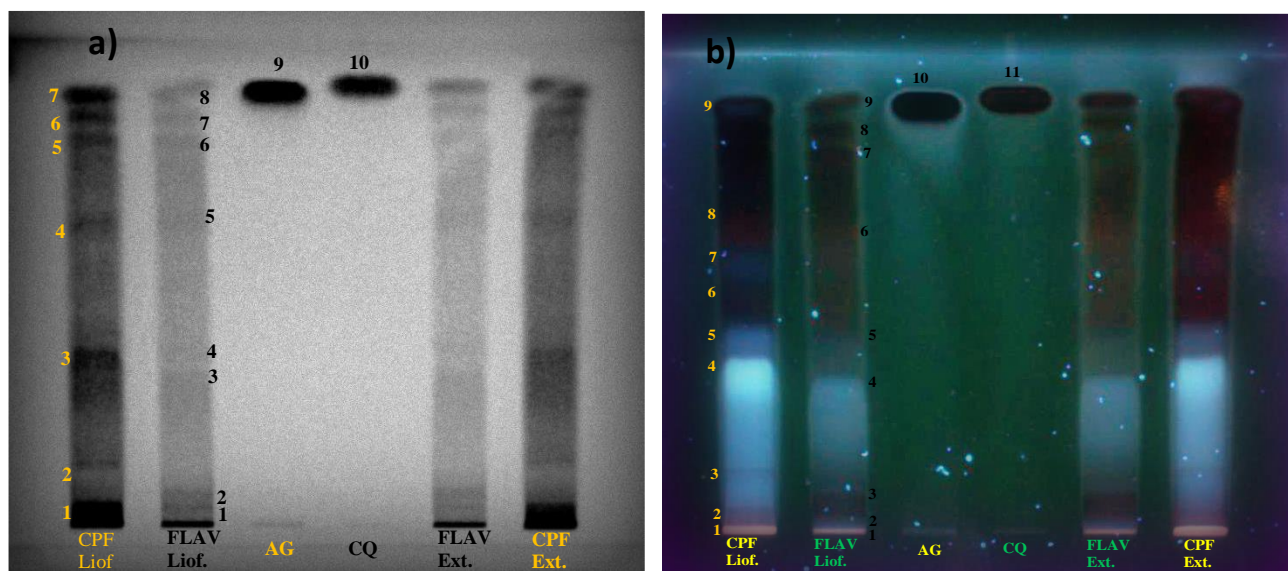


Figura 6. Cromatograma correspondiente a nuestras de Pujín, para caracterización de flavonoides y polifenoles-prueba 2 a: λ 254 nm b: λ 366 nm

Tabla 8. Bandas establecidas con TLC y valores de Rf (Prueba 2)

| POLIFENOLES | | | | | FLAVONOIDES | | | | |
|-------------|------------|------------------------|------------------------|----------------|-------------|------------|------------------------|------------------------|----------------|
| # banda | Estándares | D _s (cm) | D _f (cm) | R _f | # banda | Estándares | D _s (cm) | D _f (cm) | R _f |
| 1 | -- | 6,1 | 0,1 | 0,02 | 1 | -- | 6,1 | 0,1 | 0,02 |
| 2 | -- | 6,1 | 0,02 | 0,03 | 2 | -- | 6,1 | 0,2 | 0,03 |
| 3 | -- | 6,1 | 0,7 | 0,11 | 3 | -- | 6,1 | 0,4 | 0,07 |
| 4 | -- | 6,1 | 2 | 0,33 | 4 | -- | 6,1 | 1,5 | 0,25 |
| 5 | -- | 6,1 | 2,4 | 0,39 | 5 | -- | 6,1 | 2,5 | 0,41 |
| 6 | -- | 6,1 | 3 | 0,49 | 6 | -- | 6,1 | 3,8 | 0,62 |
| 7 | -- | 6,1 | 3,4 | 0,56 | 7 | -- | 6,1 | 4,8 | 0,79 |
| 8 | -- | 6,1 | 4 | 0,66 | 8 | -- | 6,1 | 5,1 | 0,84 |
| 9 | -- | 6,1 | 5,4 | 0,89 | 9 | -- | 6,1 | 5,5 | 0,90 |
| 10 | AG | 6,1 | 5,4 | 0,89 | 11 | CQ | 6,1 | 5,5 | 0,90 |

Número de bandas obtenidas por TLC. **R_f**: factor de retención **D_s**: distancia recorrida por la zona del soluto desde el origen **D_f**: distancia recorrida por la fase móvil desde el origen.

3.7 Caracterización de metabolitos secundarios mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la actualidad HPLC es una de las técnicas analíticas más utilizadas para caracterización de compuestos en matrices vegetales, basada en una serie de interacciones químicas entre la sustancia analizada y la columna cromatográfica, con el fin de separar y detectar compuestos, los cuales se distribuyen por afinidad entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria (Quirós, 2016). Es conocido también que la eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición y velocidad del efluente en este caso fue metanol grado HPLC 50%, así también de las características de la señal de transferida la cual permitió obtener picos a diferentes longitudes de onda.

Previo al análisis por HPLC, la identificación y cuantificación de los estándares fue el punto de partida, ya que se buscó la comparación de los espectros UV, áreas y tiempos de retención de los picos respecto al patrón estándar (Guillarme et al., 2010), (Saénz et al., 2009). (Parets et al., 2016).

De tal manera que se corrió los estándares en HPLC, con el fin de comparar estándares con extractos obtenidos a partir de Pujín y verificar la presencia de estos compuestos. El estándar para identificar polifenoles fue ácido gálico, mientras que para flavonoides fue catequina, además se realizó a varias longitudes de onda 214, 254, 280, 320, 360 y 366 nm (**Figura 7**).

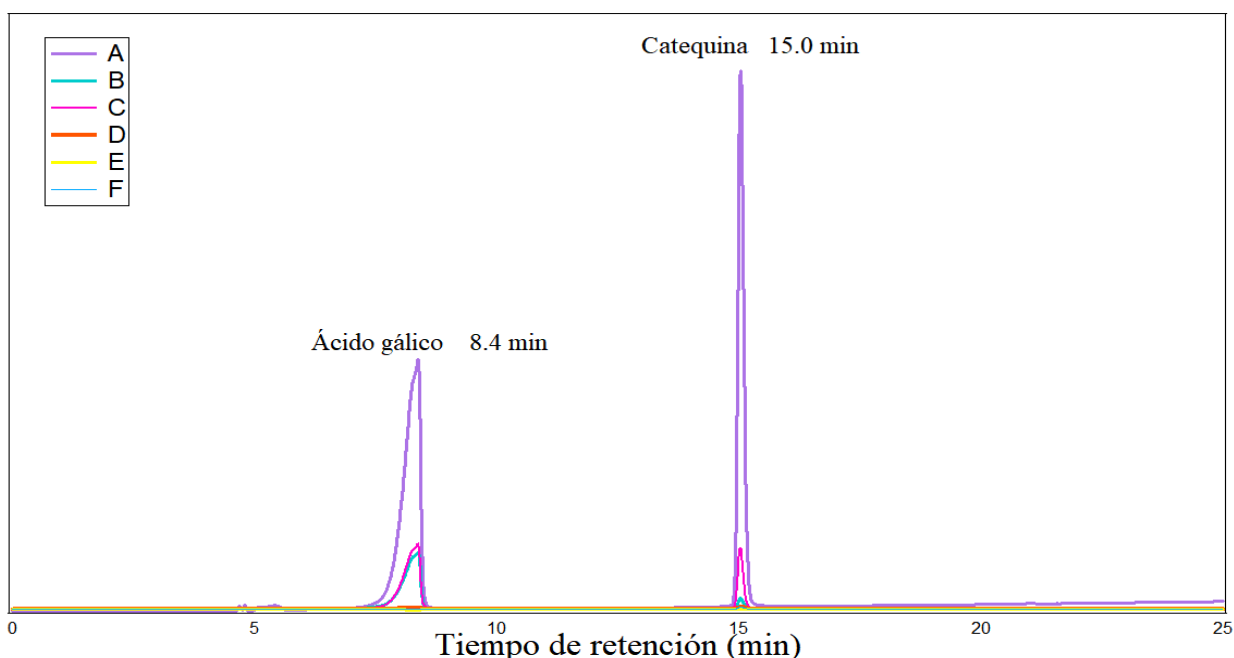


Figura 7. Cromatograma correspondiente a los estándares, longitud de onda **A**:214 **B**:254 **C**:280 **D**:320 **E**:360 **F**:366.

Se obtuvo un cromatograma (**figura 7**) a diferentes longitudes de onda resaltando que el pico más alto para ácido gálico y catequina se obtuvo a λ 214nm con un tiempo de retención de 8,4min y 15min respectivamente. Es decir, a dicha longitud de onda la intensidad de señal es captada y absorbida por los compuestos de interés.

Los extractos liofilizados de Pujín fueron pasados previamente por microfiltros de 0,45 μ m, de esta forma se aseguró que la muestra analizada estuviera libre de impurezas para que no alterase los resultados. Se dejó correr los extractos junto con los estándares y se obtuvo los cromatogramas para la caracterización de polifenoles y flavonoides a

longitudes de 214nm (**figura 4**), 254nm (**figura 5**), 280nm (**figura 6**), 320nm (**figura 7**), 360nm (**figura 8**) y 366nm (**figura 9**).

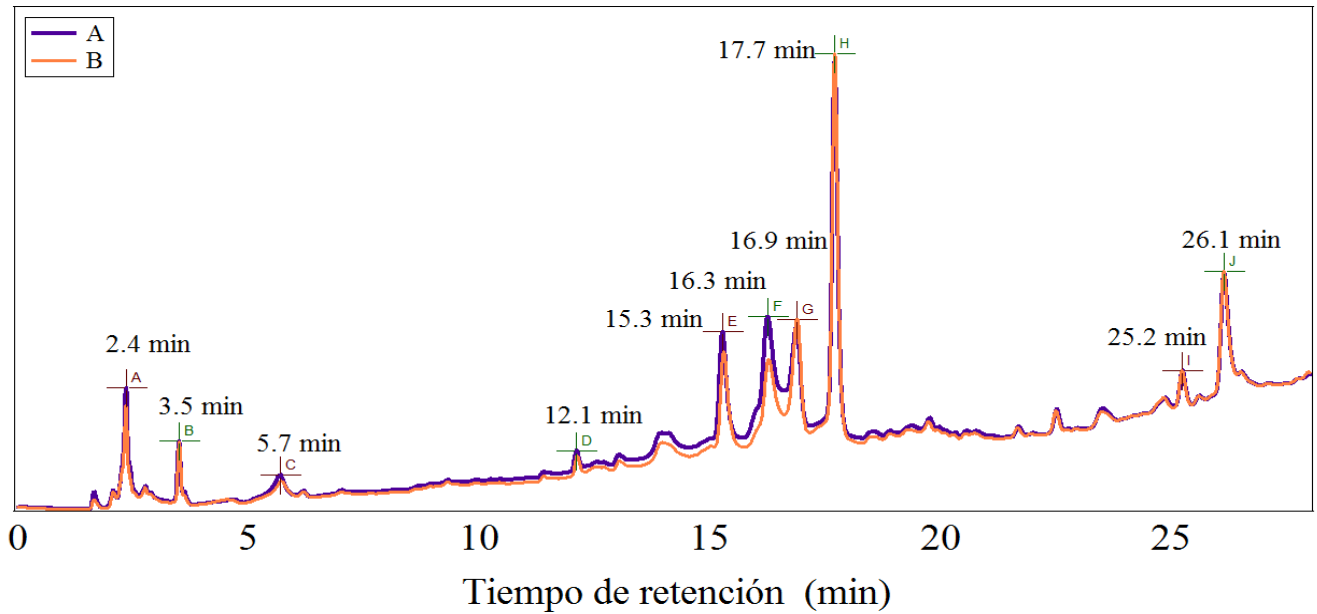


Figura 8. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 214 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles.

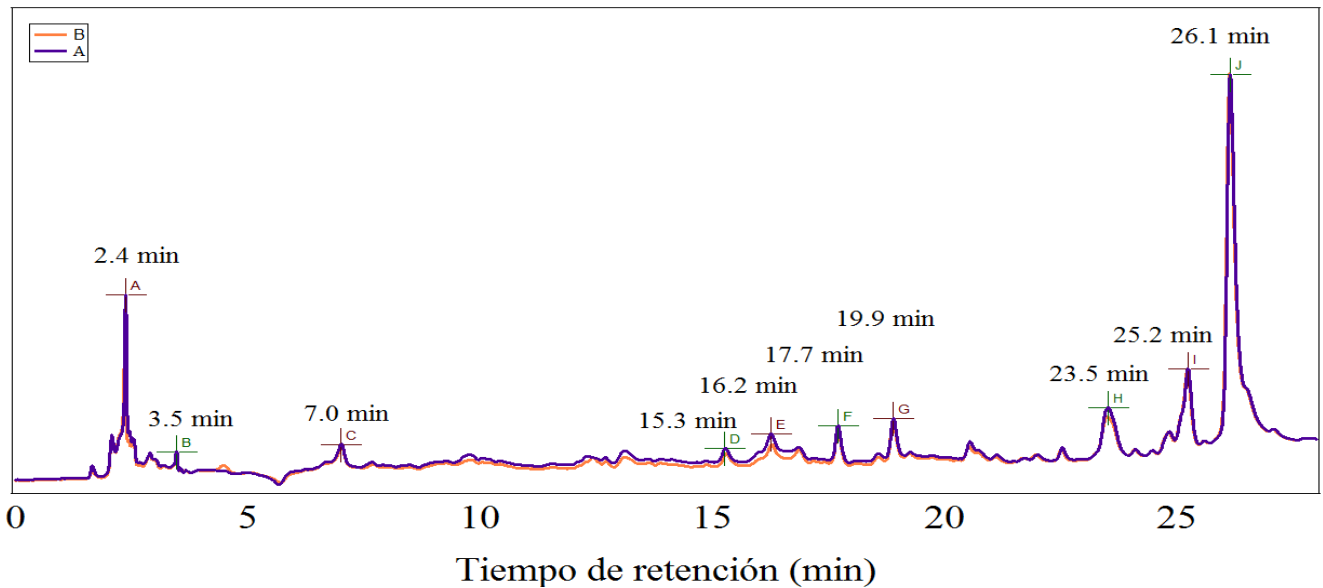


Figura 9. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 254 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles

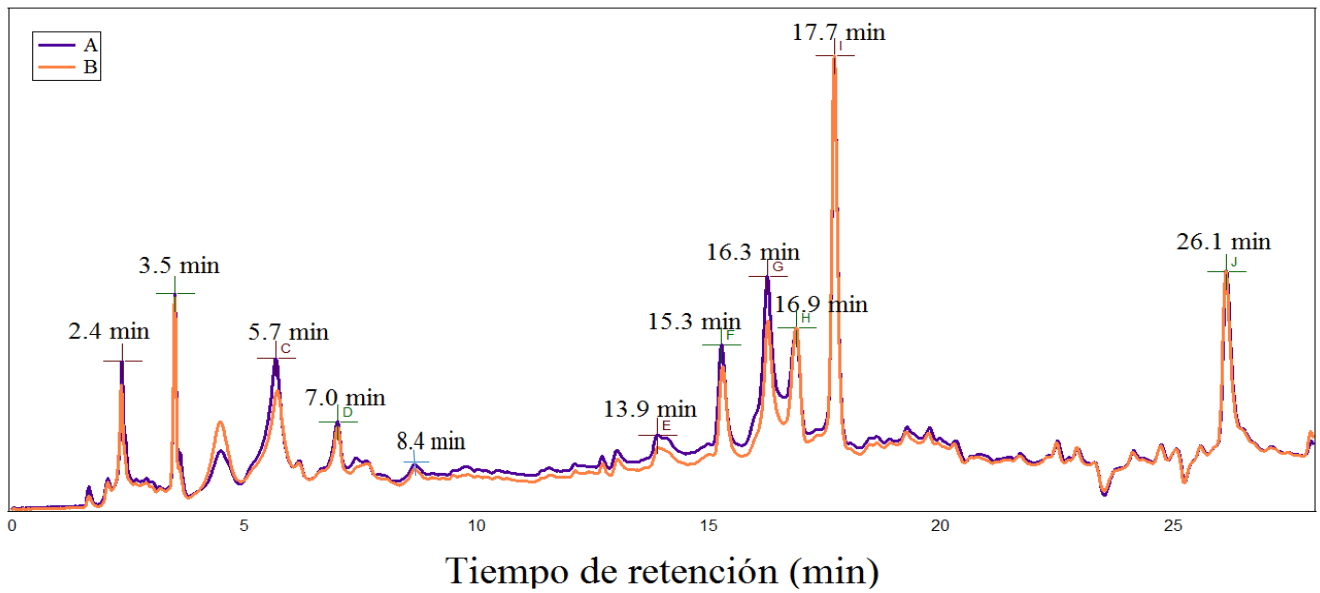


Figura 10. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 280 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles

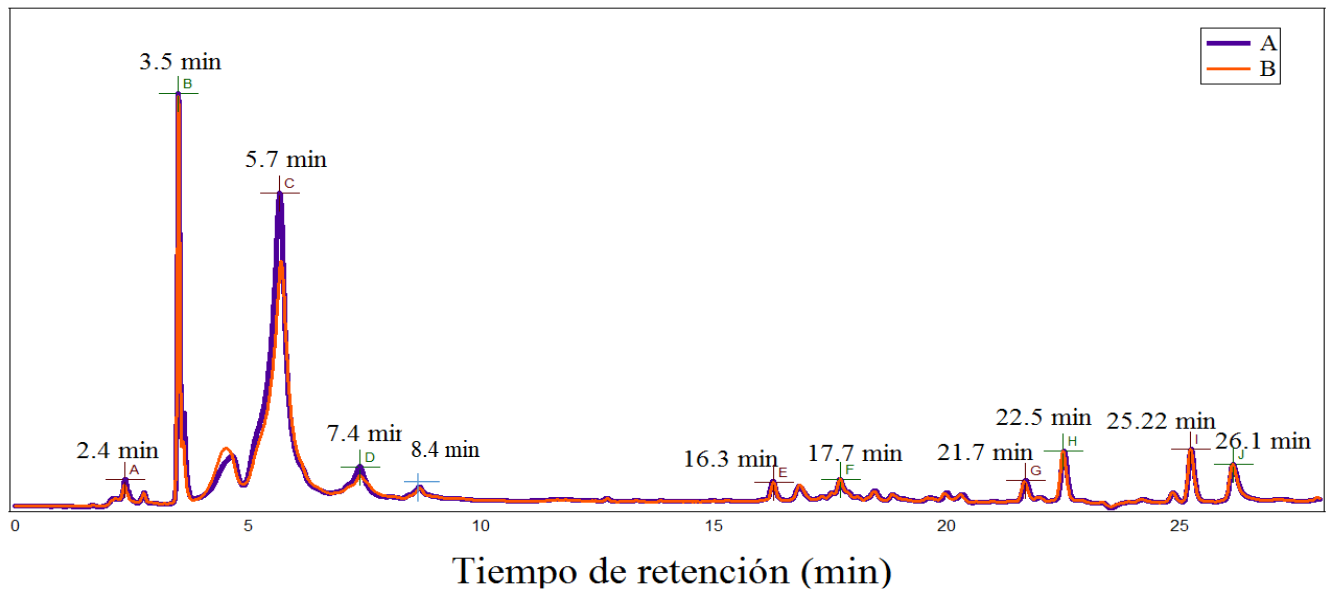


Figura 11. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 320 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles

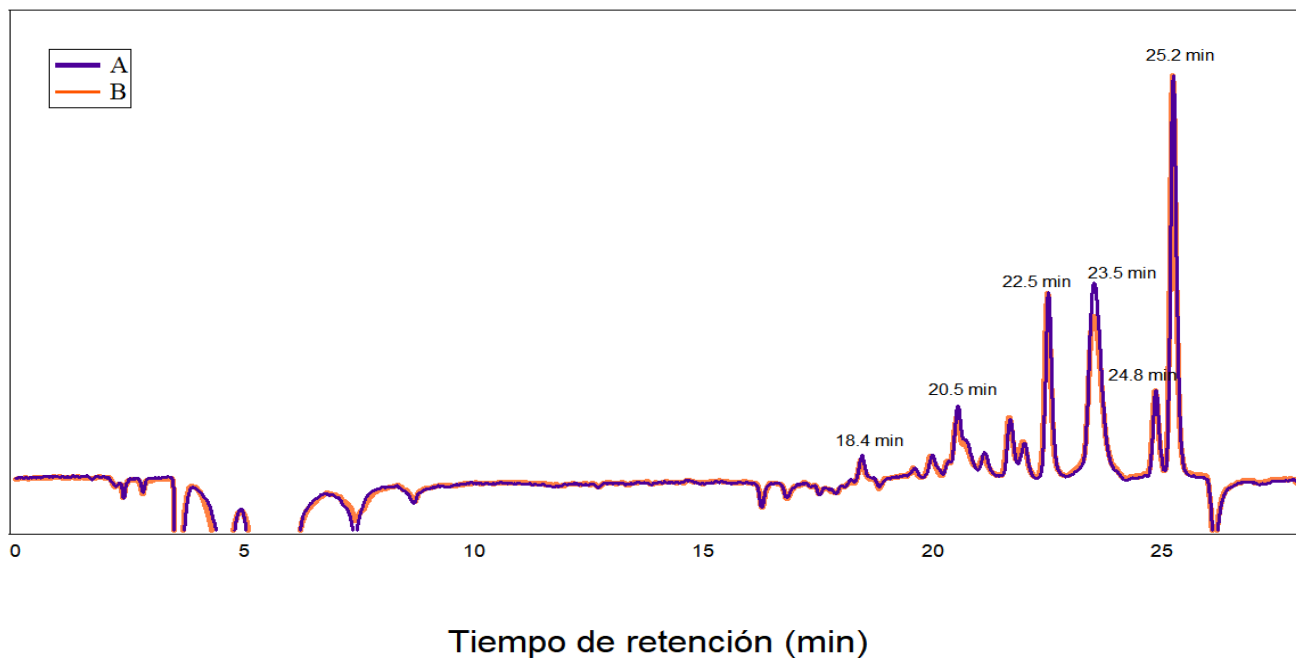


Figura 12. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 360 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles

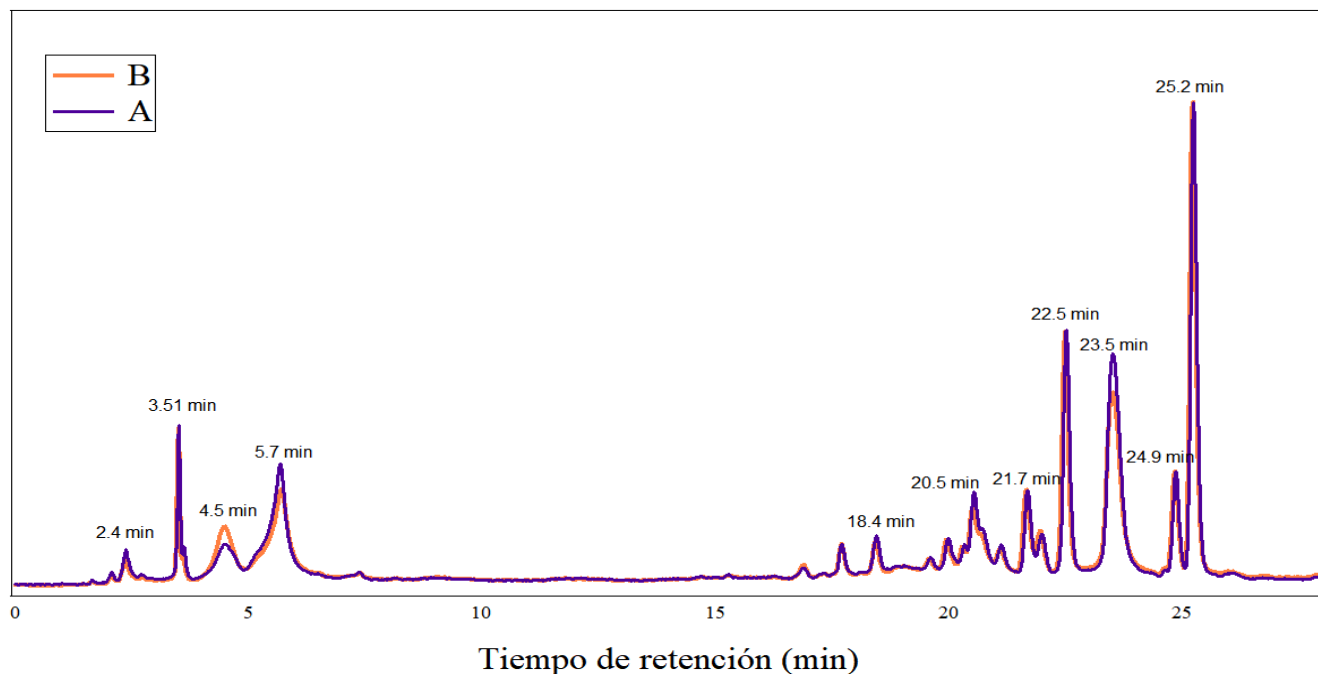


Figura 13. Cromatograma correspondiente a los extractos de Pujín analizados a una λ 366 nm.
A: flavonoides **B:** Polifenoles

En las figuras se diferencian una cantidad de picos considerables, es decir que la matriz vegetal contiene diversidad de compuestos que absorben la luz a diferentes longitudes de onda, la mayor parte de picos se repiten; siendo los picos más representativos aquellos que presentan tiempos de retención de 2,4min; 3,5min; 5,7min; 17,7min; 25,2min y 26,1min.

En base la comparación de los estándares frente a los extractos de Pujín, se comprobó que existe la presencia de catequina, estándar para la cuantificación de flavonoides, ya que se observó un pico a 15,3 min a λ 214 nm (**Figura 8**), de igual forma a λ 254 nm (**Figura 9**); en estos casos no se observó el pico correspondiente a ácido gálico, estándar seleccionado para cuantificar polifenoles. Por el contrario, a λ 280 y 320nm (**Figura 10**), (**Figura 11**) se observó la presencia de ácido gálico con picos con un tiempo de retención de 8,4min.

3.8 Verificación de las hipótesis

Mediante un análisis de varianza, se determinó que existen diferencias significativas entre las medias obtenidas de disolvente, temperatura y tiempo de extracción a un nivel de confianza del 95% para la caracterización de metabolitos secundarios, en decir el tipo de disolvente, temperatura y tiempo de extracción influye significativamente en la concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos a partir de Pujín. Consecuentemente, se rechaza la hipótesis nula H_0 , y se acepta la hipótesis alternativa H_1 .

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se realizó el proceso de extracción de metabolitos secundarios a partir de hojas de Pujín (*H. ferruginea*), identificando que las condiciones de extracción necesarias para conseguir el máximo rendimiento de polifenoles fueron metanol al 50%, 50°C por 5 min con 4 extracciones sucesivas; mientras que para flavonoides fue metanol al 25% a 50°C por 5 min con 3 extracciones consiguiendo un rendimiento > 95%, concluyendo que los factores establecidos definen la eficiencia del proceso.
- Se aplicó métodos colorimétricos como Folin Ciocalteu para determinar el contenido de polifenoles y para flavonoides el método de cloruro de aluminio (AlCl₃). Se contrastó los resultados en el caso de polifenoles, con una curva de calibración de ácido gálico, obteniendo como resultado 79,541mg EAG/g de m s.lo que representó 97,854%, con respecto a flavonoides el valor fue de 49,751 mg ECQ/g de m s. representando el 100% de material recuperado.
- Se aplicó métodos cromatográficos para la caracterización de los metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides); mediante cromatografía de capa fina (TLC) se probó con dos fases móviles, prueba 1 con acetato de etilo:ácido fórmico: ácido acético:agua proporciones 100:10:8:22 y prueba 2 con acetato de etilo:metanol:ácido fórmico 80:15:3; se evidenció que la prueba 1 permite observar de manera legible la separación y cantidad de compuestos, además de comprobar la presencia de polifenoles y flavonoides gracias al factor R_f se observó variedad de bandas que corresponderían a distintos compuestos.
- Se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en la cual se comprobó mediante cromatogramas a diferentes longitudes de onda que existe presencia de polifenoles en un tiempo de retención de 8,4min y para el caso de flavonoides a 15,3min; además resaltan picos representativos con tiempos de retención de 2,4min; 3,5min; 5,7min; 17,7min; 25,2min y 26,1min, es decir que a una longitud de onda específica los compuestos absorben con más intensidad.

4.2 Recomendaciones

- Realizar estudios de toxicidad y citotoxicidad validando de esta forma la aplicabilidad de extractos a partir de hojas de Pujín a la medicina tradicional o terapéutica.
- Ampliar la caracterización de metabolitos secundarios a partir del extracto de Pujín (*H. ferruginea*), con variedad de estándares para la identificación de los compuestos presentes.
- Evaluar diferentes actividades biológicas como capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y anticancerígena entre otras buscando resaltar las propiedades de la planta.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J., Salomón, S., Sevilla, I., y Nuevas, L. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 261-271.
- Amaya Rodríguez, L. M., y Portillo Membreño, C. E. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible* (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Araneda Durán, X., Quezada Mardones, I., Martínez Gutiérrez, M., y Morales Ulloa, D. (2014). Polifenoles totales en pan de abeja (*Apis mellifera* L.) de colmenas de la Región de La Araucanía. *Idesia (Arica)*, 32(1), 107-111.
- Arboleda, D., Tombe, A., y Velasco, S. M. (2013). Propuesta para el establecimiento de especies arbóreas y arbustivas con potencial forrajero: en sistemas de producción ganadera del trópico alto colombiano. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 11(1), 154-163.
- Arranz Martínez, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Azuola, R., y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología En Marcha*, 20(4).
https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/449
- Balslev, H., Navarrete, H., de la Torre, L., Macía, M. J., Macía, M. J., y Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (pp. 1–3).
- Bautista, J. (2009). *Caracterización de los compuestos fenólicos de plantas alimenticias nativas de la sierra ecuatoriana por métodos instrumentales*.
- Bentham, G. (2019). Tropicos Name - *Hesperomeles ferruginea* (Pers.) Benth. Retrieved November 28, 2019, from <http://tropicos.org/Name/27800532?langid=66>
- Cartaya, O., y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.

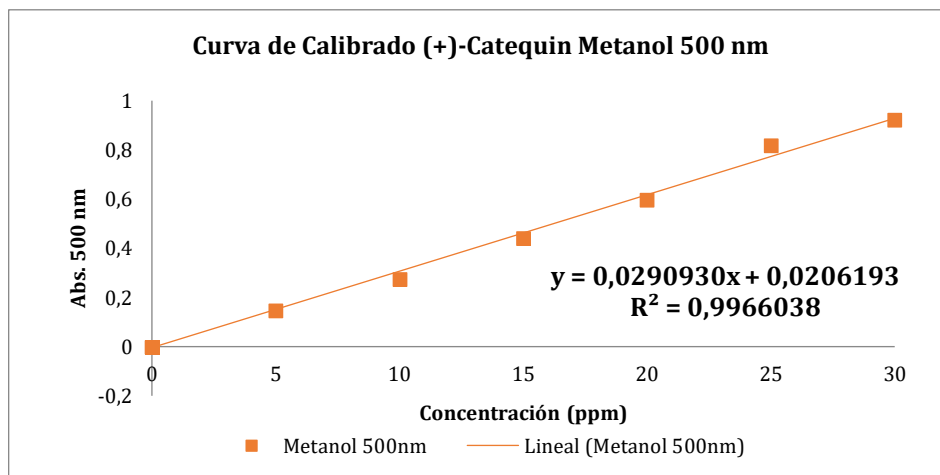
- Casado, N. (2002). *Propiedades magnéticas en compuestos de interés biológico: el rol de los puentes de hidrógeno en la transmisión de las interacciones de superintercambio*.
- Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*.
- Choque, M. (1992). *La estructura de poder en la comunidad originaria de Salasaca*. Quito: FLACSO sede Ecuador.
- Coavoy, I. (2015). Evaluación de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos de la tuna morada (*Opuntia ficus-indica*) del Distrito de San Bartolomé, Huarochirí, Lima.
- De la Torre, L., Muriel, P., y Balslev, H. (2006). *Etnobotánica en los Andes del Ecuador*, 246.
- De la Iglesia, L. (2018). *Trabajo fin de grado métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en olivas* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense).
- Dzul, L. (2015). Obtención de extractos polifenólicos con actividad biológica a partir de harinas elaboradas con subproductos de limón italiano.
- Elejalde, E. (1999). Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboración del txakoli tinto de Bizkaia.
- Enciso, J., Amiel, J., Guija, E., Fukusaki, A., Reátegui, O., Amiel, D., y Neyra, K. (2010). Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de cuatro plantas medicinales y estimulación de la proliferación de fibroblastos.
- García, A., y Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3)
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(1)
- García, E., Fernández, I., y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos Fenólicos un beneficio para la salud, 23.
- González, D., y Yáñez, M. (2012). *Diseño y Construcción de un Extractor Sólido-Líquido para la Obtención de Aceite de Semillas de Sambo y Zapallo*.
- Guilcatoma, E. (2010). *Inventario de las especies vegetales nativas del cerro Teligote cantón Pelileo, provincia del Tungurahua desde los 3 200 hasta los 3 420 msnm*.

- Guntero, V., Longo, M., Ciparicci, S., Martini, R. E., y Andreatta, A. E. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. CAIQ2015-VII Congreso Argentino de ingeniería química. 3ras. Jornadas Argentinas de seguridad de procesos.
- Gutiérrez, B. M. (2002). La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Gutiérrez, MC" La cromatografía líquida: aplicación de la TLC a la separación de colorantes". Boletín Intexter, juliol 2002, núm. 122, p. 29-34.*
- Gutiérrez, J., Montaña, K., Bracho, C., Rodríguez, J., y Chang, A. (2009). *Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la maca (Lepidium meyenii) mediante técnicas cromatográficas. Rev Soc Quím Perú (Vol. 75).*
- Huamantupa, I., y Caranqui, J. (n.d.). Plan piloto demostrativo de restauración en dos ecosistemas andinos equivalentes degradados.
- Jiménez Pesántez, M., (2013). *Dormancia y germinación en semillas de Hesperomeles ferruginea (Pers.) Benth (ROSACEAE) un árbol nativo con potencial para la Restauración Ecológica (Bachelor's thesis, Universidad del Azuay).*
- Lozano P., (20015). *Especies forestales arbóreas y arbustivas de los bosques montañosos de Ecuador.* Ecuador.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp, 17(6), 271–278.*
- Meneses, J. C., Soto-Hernández, R. M., Espinosa-Solares, T., y Ramírez-Guzmán, M. E. (2008). Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia, 42(4), 425-433.*
- Muñoz, C. W., Chavez, R. W., Pabón, L. C., Rendón, M. R., Patricia-Chaparro, M., y Otálvaro-Álvarez, Á. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC Ciencias Químicas, 46, 38-46.*
- López, L., Sánchez, D., Gallegos, D., y Valdés, J., (2007). Extracción de polifenoles de *Capsicum annuum* empleando Química Verde.
- Ordóñez, L. (2001). *Sitios de recolección de semillas forestales andinas del Ecuador.* Editorial Abya Yala.
- Pacheco, D. (2004). Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica Hplc. *Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile.*
- Paredes, D. (2016). *Estudio fitoquímico y actividad antioxidante in vitro de hojas y flores de Passiflora mixta.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

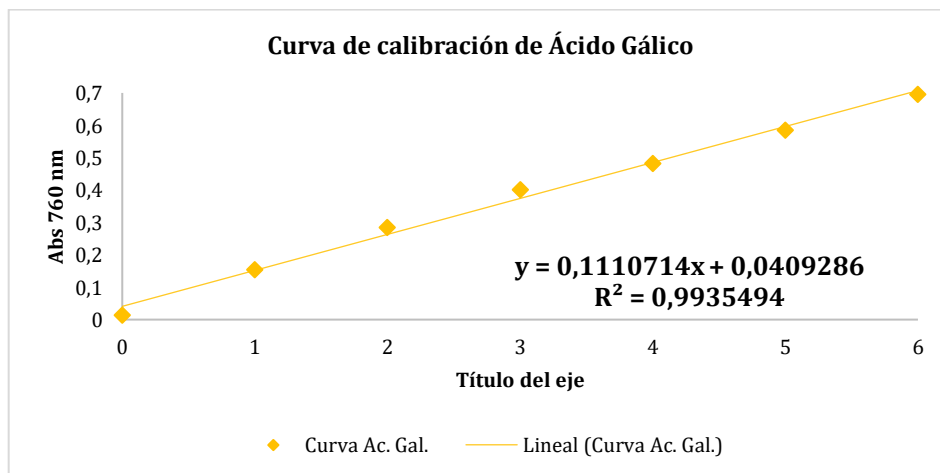
- Pérez Encalada, S. A. (2017). *Determinación de flavonoides y actividad antioxidante de cladodios de nopal (Opuntia ficus-indica)* (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).
- Ponce, A. (2015). *Análisis filogenéticos y morfométricos del género Hesperomeles Lindl.(Rosaceae) en el Ecuador* (Bachelor's thesis, PUCE).
- Prada, J. (2015). *Análisis metabolómico de la especie Baccharis latifolia (Asteraceae) en la sabana de bogotá. Facultad de ciencias basicas, departamento de biología.*
- Quintero, K. C., y Chacón, G. S. (2019). Evaluación del efecto de la fase móvil sobre la eficiencia de separación de la fracción de hidrocarburos aromáticos, obtenida mediante la técnica de análisis SARA. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 6(2 Dicbre.), 51-56.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición hospitalaria. SciELO Espana.*
- Quirós, A. M. (2016). Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora.
- Ramón, A., y Vergara, J., (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y aceites esenciales de especies vegetales. TESIS
- Rendón, J. G. (2005). *La media lengua de Imbabura. Encuentros y conflictos: bilinguismo y contacto de lenguas en el mundo andino. Frankfurt: Vervuert. Yala, Abya. Restrepo-Sánchez, D. C., Narváez-Cuenca, C. E.*
- Restrepo, L. P. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517-1522.
- Ricco, R., Wagner, M., y Gurni, A. (2011). Dinámica de polifenoles de "Cedrón"(Aloysia citrodora Palau-Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(1), 67-74.
- Ricco, R. A., Agudelo, I. J., y Wagner, M. L. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 161-174.
- Ríos, M. (2008). Conocimiento tradicional y plantas útiles del Ecuador: saberes y prácticas, 34.
- Ríos, M., Koziol, M. J., Pedersen, H. B., y Granda, G. (2007). Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas/Useful plants of Ecuador: applications, challenges, and perspectives. *Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador*, 652.

- Rodríguez, C. M. (2013). *Costumbres y tradiciones indígenas y su impacto en el turismo de la parroquia Salasaca, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua*.
- Rodríguez, Z., Robaina, M., Jáuregui, U., Blanco, A., y Rodríguez, J., (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, 139-147.
- Rowe, A. P., Miller, L. M., y Meisch, L. A. (2007). *Weaving and dyeing in highland Ecuador. Weaving and Dyeing in Highland Ecuador*. United States: Yala, Abya.
- Sampietro, D. A. (2002). Aleopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. *Cátedra de Fitoquímica. Instituto de Estudios Vegetales “Dr. Antonio R. Sampietro” Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán Ayacucho On line: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>. Última visita, 12.*
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Singleton, VL, Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, RM (1999). [14] Análisis de fenoles totales y otros sustratos de oxidación y antioxidantes por medio del reactivo folin-ciocalteu. En *Métodos en enzimología* (Vol. 299, pp. 152-178). Prensa académica
- Soto M., y Rosales M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714.
- Tituaña, G., (2013). *Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación tema: Flor de campo en la estancia y mushukwiñary en Tambalo de Pasa, para promover su desarrollo*.
- Tovar, S. P. (2018). Efecto de la temperatura de secado en los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante del nispero (*Mespilus germánica L.*).
- Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales*. Universidad de Caldas.
- Velez, M., Campos, R., y Sánchez, H. (2014). *Agroecosistemas tropicales y subtropicales*, 17(3), 489–499.

Anexo A



A 1. Curva de calibración de catequina para extracción de flavonoides.



A 2. Curva de calibración de ácido gálico para extracción de polifenoles.

A 3. Optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de flavonoides.

| FLAVONOIDES | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------|--------------------|---------------|------------------|------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|
| Agua | | | | | | | | | | Promedio | |
| Código | Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alicuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 500nm | Conc. 500 nm (mg/g muestra) | Abs 510nm | Conc. 510 nm (mg/g muestra) | Abs 500nm | Abs 510nm |
| PA1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.389 | 23.279 | 0.366 | 22.743 | 20.843 | 20.667 |
| PA2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.328 | 18.950 | 0.308 | 19.095 | | |
| PA3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.347 | 20.299 | 0.325 | 20.164 | | |
| Etanol 75% | | | | | | | | | | | |
| PE75.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.297 | 25.126 | 0.255 | 23.641 | 23.316 | 23.483 |
| PE75.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.284 | 23.742 | 0.265 | 24.584 | | |
| PE75.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.259 | 21.081 | 0.240 | 22.225 | | |
| Etanol 50% | | | | | | | | | | | |
| PE50.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.319 | 27.467 | 0.296 | 27.510 | 26.829 | 26.912 |
| PE50.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.281 | 23.423 | 0.261 | 24.207 | | |
| PE50.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.339 | 29.596 | 0.312 | 29.019 | | |
| Etanol 25% | | | | | | | | | | | |
| PE25.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.326 | 28.212 | 0.303 | 28.170 | 27.609 | 27.761 |
| PE25.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.324 | 28.000 | 0.304 | 28.264 | | |
| PE25.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.311 | 26.616 | 0.289 | 26.849 | | |
| Etanol puro | | | | | | | | | | | |
| PEP.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.337 | 19.589 | 0.315 | 19.535 | 18.359 | 18.969 |
| PEP.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.322 | 18.524 | 0.302 | 18.717 | | |
| PEP.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.300 | 16.963 | 0.301 | 18.654 | | |
| Metanol 25% | | | | | | | | | | | |
| PM25.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.349 | 33.862 | 0.328 | 32.014 | 31.765 | 30.923 |
| SM25.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.331 | 32.006 | 0.310 | 30.114 | | |
| SM25.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.306 | 29.428 | 0.315 | 30.642 | | |
| Metanol 50% | | | | | | | | | | | |
| PM50.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.296 | 28.397 | 0.275 | 26.419 | 28.637 | 27.158 |
| PM50.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.300 | 28.809 | 0.282 | 27.158 | | |
| PM50.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.299 | 28.706 | 0.289 | 27.897 | | |
| Metanol 75% | | | | | | | | | | | |
| PM75.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.242 | 22.828 | 0.226 | 21.247 | 22.794 | 21.388 |
| PM75.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.244 | 23.034 | 0.227 | 21.353 | | |
| PM75.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.239 | 22.519 | 0.229 | 21.564 | | |
| Metanol puro | | | | | | | | | | | |
| PMP.1 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.300 | 28.809 | 0.279 | 26.842 | 28.053 | 26.103 |
| PMP.2 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.291 | 27.881 | 0.270 | 25.892 | | |
| PMP.3 | 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.287 | 27.469 | 0.267 | 25.575 | | |

A 4. Datos de la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de polifenoles.

| POLIFENOLES | | | | | | | | |
|---------------------|-----------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------|------------------|------------------------------------|-----------------|
| Agua | | | | | | | | |
| Código | Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 760nm | Conc. 760 nm (mg/g muestra) | Promedio |
| PA1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.282 | 21.704 | 22.244 |
| PA2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.289 | 22.334 | |
| PA3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.293 | 22.695 | |
| Etanol 75% | | | | | | | | |
| PE75.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.329 | 25.936 | 28.877 |
| PE75.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.373 | 29.897 | |
| PE75.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.383 | 30.797 | |
| Etanol 50% | | | | | | | | |
| PE50.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.265 | 30.260 | 28.730 |
| PE50.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.267 | 30.531 | |
| PE50.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.229 | 25.399 | |
| Etanol 25% | | | | | | | | |
| PE25.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.343 | 27.196 | 29.657 |
| PE25.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.391 | 31.518 | |
| PE25.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.377 | 30.257 | |
| Etanol puro | | | | | | | | |
| PEP.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.260 | 19.723 | 21.584 |
| PEP.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.286 | 22.064 | |
| PEP.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.296 | 22.965 | |
| Metanol 25% | | | | | | | | |
| PM25.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.364 | 29.087 | 29.897 |
| SM25.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.377 | 30.257 | |
| SM25.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.378 | 30.347 | |
| Metanol 50% | | | | | | | | |
| PM50.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.313 | 36.743 | 33.637 |
| PM50.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.274 | 31.476 | |
| PM50.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.283 | 32.691 | |
| Metanol 75% | | | | | | | | |
| PM75.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.311 | 24.315 | 23.805 |
| PM75.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.305 | 23.775 | |
| PM75.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.300 | 23.325 | |
| Metanol puro | | | | | | | | |
| PMP.1 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.300 | 23.325 | 24.135 |
| PMP.2 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.313 | 24.495 | |
| PMP.3 | 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.314 | 24.585 | |

A 5. Datos de la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de flavonoides.

| FLAVONOIDES Metanol al 25% | | | | | | | | | Promedio | |
|--|--------------------|---------------|------------------|------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|
| Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 500nm | Conc. 500 nm (mg/g muestra) | Abs 510nm | Conc. 510 nm (mg/g muestra) | Abs 500nm | Abs 510nm |
| Metanol al (25%) Temperatura 30°C | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.282 | 23.529 | 0.261 | 24.207 | 24.132 | 24.773 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.288 | 24.168 | 0.267 | 24.773 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.293 | 24.700 | 0.273 | 25.339 | | |
| Metanol al (25%) Temperatura 40°C | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.275 | 22.784 | 0.257 | 23.829 | 22.465 | 23.609 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.280 | 23.316 | 0.263 | 24.396 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.261 | 21.294 | 0.244 | 22.603 | | |
| Metanol al (25%) Temperatura 50°C | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.349 | 30.661 | 0.328 | 30.529 | 28.496 | 29.554 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.331 | 28.745 | 0.310 | 28.831 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.306 | 26.084 | 0.315 | 29.302 | | |
| Metanol al (25%) Temperatura 60 | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.277 | 22.997 | 0.260 | 24.113 | 22.890 | 23.798 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.278 | 23.103 | 0.258 | 23.924 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.273 | 22.571 | 0.252 | 23.358 | | |

A 6. Datos de la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de polifenoles.

| POLIFENOLES metanol (50%) | | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------|------------------|------------------------------------|-----------------|
| Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 760nm | Conc. 760 nm (mg/g muestra) | Promedio |
| Metanol (50%) Temperatura 30°C | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.206 | 22.293 | 21.752 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.202 | 21.752 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.198 | 21.212 | |
| Metanol (50%) Temperatura 40°C | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.220 | 24.183 | 23.778 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.213 | 23.238 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.218 | 23.913 | |
| Metanol (50%) Temperatura 50°C | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.218 | 23.913 | 23.148 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.209 | 22.698 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.210 | 22.833 | |
| Metanol (50%) Temperatura 60°C | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.197 | 21.077 | 21.887 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.209 | 22.698 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.203 | 21.887 | |

A 7. Datos de la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de flavonoides.

| FLAVONOIDES | | | | | | | | | Promedio | |
|------------------------------------|--------------------|---------------|------------------|------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|
| Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 500nm | Conc. 500 nm (mg/g muestra) | Abs 510nm | Conc. 510 nm (mg/g muestra) | Abs 500nm | Abs 510nm |
| Agua a 50°C x 5 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.318 | 18.241 | 0.293 | 18.151 | 18.288 | 18.151 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.315 | 18.028 | 0.290 | 17.962 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.323 | 18.595 | 0.296 | 18.340 | | |
| Agua a 50°C x 10 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.300 | 16.963 | 0.283 | 17.522 | 17.720 | 17.690 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.310 | 17.673 | 0.285 | 17.648 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.322 | 18.524 | 0.289 | 17.899 | | |
| Agua a 50°C x 20 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.299 | 16.892 | 0.278 | 17.207 | 16.396 | 16.977 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.288 | 16.112 | 0.272 | 16.830 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 2 | 0.289 | 16.183 | 0.273 | 16.893 | | |
| Metanol 25% a 50°C x 5 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.267 | 21.932 | 0.242 | 22.414 | 28,496 | 29.554 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.262 | 21.400 | 0.240 | 22.225 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.259 | 21.081 | 0.244 | 22.603 | | |
| Metanol 25% a 50°C x 10 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.248 | 19.910 | 0.231 | 21.376 | 20.158 | 21.219 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.254 | 20.549 | 0.237 | 21.942 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.249 | 20.016 | 0.220 | 20.338 | | |
| Metanol 25% a 50°C x 20 min | | | | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.227 | 17.675 | 0.212 | 19.583 | 18.207 | 19.332 |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.236 | 18.633 | 0.191 | 17.602 | | |
| 0.1000 | 5 | 250 | 5 | 3 | 0.233 | 18.313 | 0.225 | 20.810 | | |

A 8. Datos de la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de polifenoles.

| POLIFENOLES | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------|------------------|------------------------------------|-----------------|
| Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota (ul) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 760nm | Conc. 760 nm (mg/g muestra) | Promedio |
| Agua a 50°C x 5 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.284 | 21.884 | 21.614 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.280 | 21.524 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.279 | 21.434 | |
| Agua a 50°C x 10 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.289 | 22.334 | 21.644 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.285 | 21.974 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.270 | 20.624 | |
| Agua a 50°C x 20 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.288 | 22.244 | 22.214 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.285 | 21.974 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 2 | 0.290 | 22.424 | |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.238 | 26.614 | 33.637 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.231 | 25.669 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.234 | 26.074 | |
| Metanol 50% a 50°C x 10 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.229 | 25.399 | 25.714 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.234 | 26.074 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.231 | 25.669 | |
| Metanol 50% a 50°C x 20 min | | | | | | | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.208 | 22.563 | 22.968 |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.212 | 23.103 | |
| 0.1000 | 5 | 50 | 5 | 3 | 0.213 | 23.238 | |

A 9. Datos de la optimización de desgaste vegetal para la determinación de flavonoides.

| FLAVONOIDES | | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|--------------------|-----------------------|------------------|------|-----------|-----------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------|-----------------------------|--------------------|
| Código | Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota muestra (µl) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 500nm | Conc. 500 nm (mg/g muestra) | Promedio conc. a 500nm | Desviación estándar | Coefficiente de variación | Abs 510nm | Conc. 510 nm (mg/g muestra) | Promedio Abs 510nm |
| Metanol 25% a 50°C x 5min. Extracción 1 | | | | | | | | | | | | | |
| P1.1 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,889 | 29,380 | 28,930 | 0,391 | 0,014 | 0,840 | 26,281 | 26,218 |
| P1.2 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,869 | 28,670 | | | | 0,839 | 26,249 | |
| P1.3 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,871 | 28,741 | | | | 0,835 | 26,123 | |
| Metanol 25% a 50°C x 5min. Extracción 2 | | | | | | | | | | | | | |
| P2.1 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,491 | 15,258 | 15,022 | 0,249 | 0,017 | 0,447 | 13,919 | 13,762 |
| P2.2 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,485 | 15,046 | | | | 0,439 | 13,668 | |
| P2.3 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,477 | 14,762 | | | | 0,440 | 13,699 | |
| Metanol 25% a 50°C x 5min. Extracción 3 | | | | | | | | | | | | | |
| P3.1 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,189 | 4,543 | 4,851 | 0,302 | 0,062 | 0,129 | 3,917 | 4,053 |
| P3.2 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,206 | 5,146 | | | | 0,135 | 4,106 | |
| P3.3 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,198 | 4,863 | | | | 0,136 | 4,137 | |
| Metanol 25% a 50°C x 5min. Extracción 4 | | | | | | | | | | | | | |
| P4.1 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,093 | 1,137 | 0,948 | 0,179 | 0,188 | 0,073 | 2,156 | 2,428 |
| P4.2 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,083 | 0,782 | | | | 0,084 | 2,502 | |
| P4.3 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,087 | 0,924 | | | | 0,088 | 2,627 | |
| Metanol 25% a 50°C x 5min. Extracción 5 | | | | | | | | | | | | | |
| P5.1 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,036 | -0,885 | -1,003 | 0,125 | -0,124 | 0,016 | 0,363 | 0,248 |
| P5.2 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,029 | -1,134 | | | | 0,010 | 0,174 | |
| P5.3 | 0,1000 | 5 | 250 | 5 | 1 | 0,033 | -0,992 | | | | 0,011 | 0,206 | |

A 10. Datos de la optimización de desgaste vegetal para la determinación de polifenoles.

| POLIFENOLES | | | | | | | | | | |
|--|----------|--------------------|-----------------------|------------------|------|------------|-----------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------|
| Código | Peso (g) | Aforo inicial (ml) | Alícuota muestra (µl) | Aforo final (ml) | F.D. | Abs 760 nm | Conc. 760 nm (mg/g muestra) | Promedio conc. a 760 nm | Desviación estándar | Coefficiente de variación |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min. <u>Extracción 1</u> | | | | | | | | | | |
| P1.1 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,875 | 37,547 | 37,367 | 0,434 | 0,012 |
| P1.2 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,860 | 36,871 | | | |
| P1.3 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,878 | 37,682 | | | |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min. <u>Extracción 2</u> | | | | | | | | | | |
| P2.1 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,506 | 20,936 | 22,961 | 1,905 | 0,083 |
| P2.2 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,557 | 23,232 | | | |
| P2.3 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,590 | 24,717 | | | |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min. <u>Extracción 3</u> | | | | | | | | | | |
| P3.1 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,328 | 12,923 | 13,328 | 1,505 | 0,113 |
| P3.2 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,374 | 14,994 | | | |
| P3.3 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,309 | 12,068 | | | |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min. <u>Extracción 4</u> | | | | | | | | | | |
| P4.1 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,172 | 5,900 | 5,885 | 0,113 | 0,019 |
| P4.2 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,169 | 5,765 | | | |
| P4.3 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,174 | 5,990 | | | |
| Metanol 50% a 50°C x 5 min. <u>Extracción 5</u> | | | | | | | | | | |
| P5.1 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,081 | 1,804 | 1,744 | 0,187 | 0,107 |
| P5.2 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,075 | 1,534 | | | |
| P5.3 | 0,1000 | 5 | 50 | 5 | 1 | 0,083 | 1,894 | | | |

ANEXO B

ANÁLISIS

ESTADÍSTICO

B 1. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de flavonoides.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 439,276 | 8 | 54,9095 | 18,30 | 0,0000 |
| Intra grupos | 54,0075 | 18 | 3,00042 | | |
| Total (Corr.) | 493,284 | 26 | | | |

B 2. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de flavonoides.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

| <i>Disolvente</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| etanol PURO | 3 | 18,3587 | X |
| agua | 3 | 20,8427 | XX |
| metanol 75% | 3 | 22,7937 | X |
| etanol 75% | 3 | 23,3163 | X |
| etanol 50% | 3 | 26,8287 | X |
| etanol 25% | 3 | 27,6093 | X |
| metanol PURO | 3 | 28,053 | X |
| metanol 50% | 3 | 28,6373 | X |
| metanol 25% | 3 | 31,7653 | X |

B 3. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de polifenoles.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 409,071 | 8 | 51,1339 | 14,44 | 0,0000 |
| Intra grupos | 63,72 | 18 | 3,54 | | |
| Total (Corr.) | 472,791 | 26 | | | |

B 4. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de disolvente para la determinación de polifenoles.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

Método: 95,0 porcentaje LSD

| <i>Disolvente</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| etanol PURO | 3 | 21,584 | X |
| agua | 3 | 22,2443 | X |
| metanol 75% | 3 | 23,805 | X |
| metanol PURO | 3 | 24,135 | X |
| etanol 50% | 3 | 28,73 | X |
| etanol 75% | 3 | 28,8767 | X |
| etanol 25% | 3 | 29,657 | X |
| metanol 25% | 3 | 29,897 | X |
| metanol 50% | 3 | 33,6367 | X |

B 5. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de flavonoides.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 18,2564 | 4 | 4,56409 | 3,49 | 0,0497 |
| Intra grupos | 13,0906 | 10 | 1,30906 | | |
| Total (Corr.) | 31,3469 | 14 | | | |

B 6. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de flavonoides.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

| <i>TEMPERATURA</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Agua | 3 | 20,8427 | XX |
| Metanol 25% 50°C | 3 | 28,496 | X |
| Metanol 25% 40°C | 3 | 22,4647 | XX |
| Metanol 25% 60°C | 3 | 22,8903 | XX |
| Metanol 25% 30°C | 3 | 24,1323 | X |

B 7. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de polifenoles.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 9,1011 | 4 | 2,27527 | 6,05 | 0,0097 |
| Intra grupos | 3,762 | 10 | 0,3762 | | |
| Total (Corr.) | 12,8631 | 14 | | | |

B 8. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización de temperatura para la determinación de polifenoles.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

| <i>TEMPERATURA</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Metanol 50% 30°C | 3 | 21,7523 | X |
| Metanol 50% 60°C | 3 | 21,8873 | X |
| Agua | 3 | 22,2443 | XX |
| Metanol 50% 50°C | 3 | 33,637 | X |
| Metanol 50% 40°C | 3 | 23,778 | XX |

B 9. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de flavonoides.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 49,4642 | 5 | 9,89283 | 41,83 | 0,0000 |
| Intra grupos | 2,83772 | 12 | 0,236477 | | |
| Total (Corr.) | 52,3019 | 17 | | | |

B 10. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de flavonoides.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

| <i>TIEMPOS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Agua 20min | 3 | 16,3957 | X |
| Agua 10min | 3 | 17,72 | X |
| Metanol 25% 50°C 20min | 3 | 18,207 | X |
| Agua 5min | 3 | 18,288 | X |
| Metanol 25% 50°C 10min | 3 | 20,1583 | X |
| Metanol 25% 50°C 5min | 3 | 28,496 | X |

B 11. Datos del análisis de varianza (ANOVA) obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de polifenoles.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 61,8343 | 5 | 12,3669 | 53,44 | 0,0000 |
| Intra grupos | 2,77695 | 12 | 0,231413 | | |
| Total (Corr.) | 64,6112 | 17 | | | |

B 12. Pruebas de múltiples rangos para datos obtenidos a partir de la optimización del tiempo para la determinación de polifenoles.

Método: (LSD) Diferencia mínima significativa a un nivel de confianza del 95%.

| <i>TIEMPOS</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Agua 5min | 3 | 21,614 | X |
| Agua 10min | 3 | 21,644 | X |
| Agua 20min | 3 | 22,214 | XX |
| Metanol 50% 50°C 20min | 3 | 22,968 | X |
| Metanol 50% 50°C 10min | 3 | 25,714 | X |
| Metanol 50% 50°C 5min | 3 | 33,637 | X |

ANEXO C

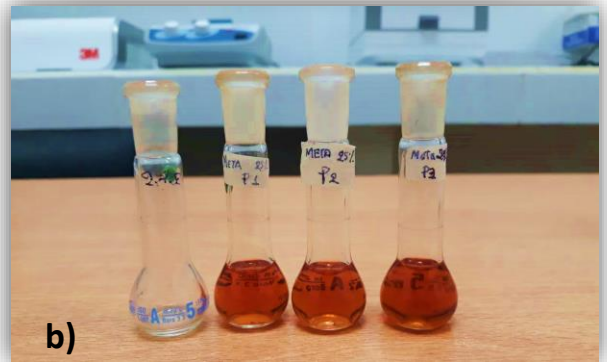
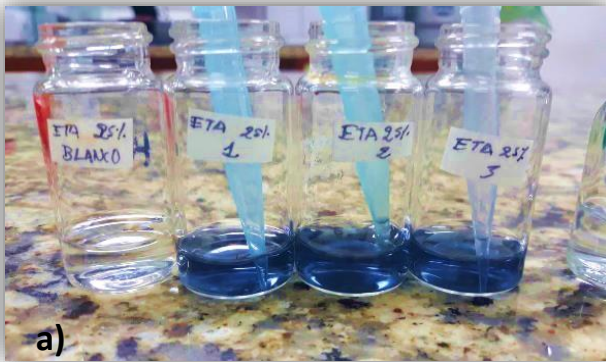
FOTOGRAFÍAS



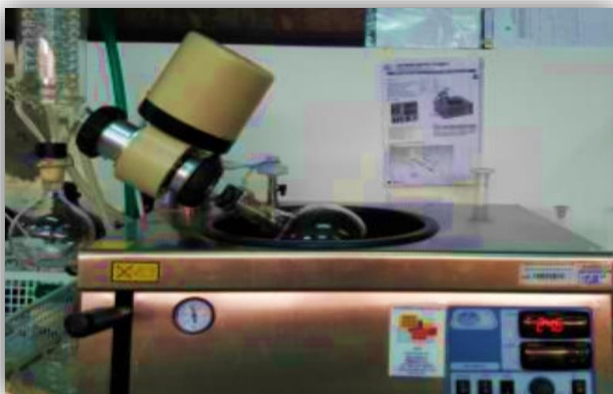
C1. Ascenso, identificación y recolección de las hojas de Pujín



C2. Secado y triturado de las hojas secas de Pujín



C3. Estandarización de proceso de extracción. a: Polifenoles b: Flavonoides.



C4. Obtención y liofilización de la muestra.



C5. Caracterización de metabolitos secundarios mediante HPLC.



C6. Caracterización de metabolitos secundarios mediante TLC.