



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



Tema: Estudio del contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto obtenido de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb)

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El estudio es 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: Diana Lizbeth Muñoz Jumbo

Tutora: PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador.

Enero – 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo 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, 30 de Octubre del 2019



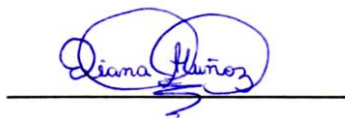
PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I.: 180413557-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Diana Lizbeth Muñoz Jumbo, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previamente a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Diana Lizbeth Muñoz Jumbo


C.I.: 180387925-1

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.

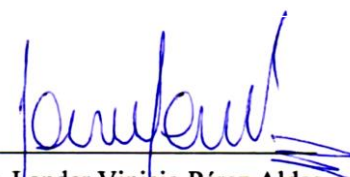
Para constancia firman:



Presidente del tribunal



Ing. Jeanette Verónica Carrera Cevallos, Mg.
C.I: 1716192271



Mg. Lander Vinicio Pérez Aldas
C.I: 1802706596

Ambato, 17 de diciembre de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación 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 Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor



Diana Lizbeth Muñoz Jumbo

180387925-1

AUTORA

DEDICATORIA

A mi madre Sofía Jumbo, por ser de gran ayuda para continuar con mis estudios, por su esfuerzo, dedicación y darme la gran oportunidad de cumplir una meta más en la vida. Gracias por ser mi apoyo incondicional y por guiarme en cada paso.

A mis hermanos Yadi y David Muñoz por estar siempre a mi lado, por brindarme todo su apoyo durante este proceso y por alentarme a seguir adelante.

A toda mi familia por confiar en mí y brindarme sus consejos y apoyo.

Dios les bendiga siempre

Diana Muñoz

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser el motor fundamental de mi vida, y por todo lo que ha hecho por mí a lo largo de mi vida estudiantil, ya que siempre ha bendecido mi caminar y también el de las personas que están junto a mí.

A mi tutora y docente PhD. Dayana Morales por guiarme durante este proceso y compartir conmigo todos sus conocimientos y experiencias, y también por compartir su amistad que han hecho que aprender sea mucho más sencillo.

*A la comunidad del **CERRO TELIGOTE**, por permitirme acceder a este lugar para la recolección de la muestra de tipo y así realizar este estudio y al Dr. Walter Simbaña por su ayuda en la identificación y recolección de esta planta.*

Al proyecto Canje de Deuda Ecuador – España y a los ingenieros Mario y Mónica a cargo del laboratorio por abrirme las puertas para el desarrollo de esta investigación

Al grupo Polifenoles: Melany, Xime, André y Alex por su amistad y apoyo durante el desarrollo de esta investigación

A mis maestros de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología que durante la carrera han impartido sus conocimientos para mi vida profesional

El principio de la sabiduría es el temor de Jehová

Proverbios 1:7

Diana Muñoz

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Plantas medicinales.....	1
1.1.2 Cerro Teligote	2
1.1.3 Planta tipo	2
1.1.3.1 Generalidades	2
1.1.3.2 Descripción botánica.....	3
1.1.3.3 Clasificación Taxonómica.....	4
1.1.3.4 Usos ancestrales	4
1.1.4 Metabolitos secundarios	4
1.1.4.1 Polifenoles.....	5
1.1.4.2 Flavonoides	6
1.1.5 Actividades biológicas	7
1.1.5.1 Actividad antioxidante	7
1.1.5.2 Actividad antiinflamatoria	8
1.2 OBJETIVOS.....	9
1.2.1 Objetivo general.....	9
1.2.2 Objetivos específicos	9
1.3 HIPÓTESIS	10

1.3.1 Hipótesis nula	10
1.3.2 Hipótesis alternativa	10
1.4 Señalamiento de variables	10
1.4.1 Variables independientes	10
1.4.2 Variables dependientes	10
CAPÍTULO II	11
METODOLOGÍA	11
2.1 MATERIALES	11
2.1.1 Materia prima.....	11
2.1.2 Materiales e insumos	11
2.1.3 Reactivos.....	13
2.1.4 Equipos	14
2.2 METODOLOGÍA	14
2.2.1 Recolección del material vegetal	14
2.2.2 Obtención de los extractos	15
2.2.2.1 Pre-tratamiento	15
2.2.2.2 Tratamiento	15
2.2.3 Cuantificación de polifenoles totales	16
2.2.4 Cuantificación de flavonoides	16
2.2.5 Caracterización de los extractos	17
2.2.6 Actividad antioxidante	18
2.2.7 Actividad antiinflamatoria	18
2.2.8 Determinación de minerales y metales pesados	20
2.2.9 Análisis estadístico	21
CAPÍTULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Análisis y discusión de resultados	22
3.1.1 Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides	22
3.1.1.1 Disolvente	23
3.1.1.2 Temperatura	25
3.1.1.3 Tiempo	26
3.1.1.4 Desgaste del material vegetal.....	28
3.1.2 Caracterización del extracto optimizado.....	30

3.1.2.1 TLC	30
3.1.2.2 HPLC	31
3.1.3 Actividades biológicas	34
3.1.3.1 Actividad antioxidante evaluada por el método TBARS	34
3.1.3.2 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de desnaturalización de proteínas	35
3.1.3.3 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC).....	36
3.1.4 Determinación de minerales	38
3.1.5 Verificación de hipótesis	41
CAPÍTULO IV	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
4.1 Conclusiones	42
4.2 Recomendaciones	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de las curvas de calibración de los metales analizados	21
Tabla 2. Contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos al variar el disolvente	24
Tabla 3. Contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos al variar la temperatura.....	25
Tabla 4. Contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos al variar el tiempo	27
Tabla 5. Contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos al variar el número de extracciones	28
Tabla 6. Contenido de polifenoles y flavonoides con factores optimizados.....	30
Tabla 7. Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de tipo.....	34
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina.....	36
Tabla 9. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por el método HRBC de la muestra tipo frente a diclofenaco.....	37
Tabla 10. Contenido de minerales y metales pesados presentes en las hojas de tipo	39
Tabla 11. Preparación de la solución stock de ácido gálico.....	58
Tabla 12. Preparación de las diferentes concentraciones para la curva de calibración de ácido gálico.....	58
Tabla 13. Optimización del disolvente para polifenoles	59
Tabla 14. Anova para el contenido de polifenoles por disolvente	60
Tabla 15. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por disolvente	60
Tabla 16. Optimización de la temperatura para polifenoles.....	61
Tabla 17. Anova para el contenido de polifenoles por temperatura.....	61
Tabla 18. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por temperatura (Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD).....	62
Tabla 19. Optimización del tiempo para polifenoles	62
Tabla 20. Anova para el contenido de polifenoles por tiempo.....	63
Tabla 21. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por tiempo.	63
Tabla 22. Optimización del número de extracciones para polifenoles	64
Tabla 23. Evaluación del número de extracciones	65

Tabla 24. Anova para el contenido de polifenoles por número de extracciones.....	65
Tabla 25. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por número de extracciones.....	66
Tabla 26. Preparación de la solución stock de catequina.....	67
Tabla 27. Preparación de las soluciones de la curva de calibración de catequina	67
Tabla 28. Datos de la curva de calibración de catequina en metanol.....	67
Tabla 29. Optimización del disolvente para flavonoides	68
Tabla 30. Anova para el contenido de flavonoides por disolvente	69
Tabla 31. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por disolvente	69
Tabla 32. Optimización de la temperatura para flavonoides.....	70
Tabla 33. Anova para el contenido de flavonoides por temperatura.....	70
Tabla 34. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por temperatura (Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD).....	71
Tabla 35. Optimización del tiempo para flavonoides	71
Tabla 36. Anova para el contenido de flavonoides por tiempo.....	72
Tabla 37. Prueba de rangos múltiples para la concentración de flavonoides por tiempo	72
Tabla 38. Optimización del número de extracciones para flavonoides.....	73
Tabla 39. Evaluación del número de extracciones.....	74
Tabla 40. Anova para el contenido de flavonoides por número de extracciones.....	74
Tabla 41. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por número de extracciones.....	75
Tabla 42. Datos obtenidos para la curva de calibración de ácido gálico y catequina	76
Tabla 43. Datos obtenidos de la absorbancia para la actividad antioxidante del extracto de tipo y BHT.....	77
Tabla 44. Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de tipo y BHT	77
Tabla 45. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de BHT	78
Tabla 46. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del BHT	78
Tabla 47. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo	78

Tabla 48. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo.....	79
Tabla 49. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras extracto de tipo y BHT.....	79
Tabla 50. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo.....	79
Tabla 51. Datos obtenidos de la absorbancia para la actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteínas	80
Tabla 52. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteínas del extracto de tipo y diclofenaco	80
Tabla 53. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de diclofenaco	81
Tabla 54. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración de diclofenaco.....	81
Tabla 55. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de tipo	81
Tabla 56. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo.....	82
Tabla 57. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras tipo y diclofenaco	82
Tabla 58. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras (extracto de tipo y diclofenaco).....	82
Tabla 59. Datos de absorbancia medidos 580 nm por el método HRBC.....	83
Tabla 60. Porcentaje de la actividad antiinflamatoria por el método HRBC del extracto de tipo frente al diclofenaco	83
Tabla 61. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de diclofenaco	84
Tabla 62. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración de diclofenaco	84
Tabla 63. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de tipo	84
Tabla 64. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración del extracto de tipo.....	85
Tabla 65. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de las muestras (tipo y diclofenaco) en las mejores condiciones	85

Tabla 66. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración de las muestras (tipo y diclofenaco) en las mejores condiciones	85
Tabla 67. Condiciones instrumentales para la lectura de minerales y metales pesados	86
Tabla 68. Datos de las curvas de calibración de los minerales y metales pesados medidos por espectrofotometría de absorción atómica.....	86
Tabla 69. Contenido de minerales y metales pesados en las hojas de tipo	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta tipo (<i>Minthostachys mollis</i> Griseb)	3
Figura 2. Planta tipo (<i>Minthostachys mollis</i> Griseb)	4
Figura 3. Estructura química de algunos ejemplos de compuestos fenólicos.....	5
Figura 4. Estructura química general de los flavonoides	6
Figura 5. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles	23
Figura 6. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de flavonoides .	23
Figura 7. Extracciones sucesivas para obtener el mayor contenido de polifenoles ..	29
Figura 8. Extracciones sucesivas para obtener el mayor contenido de flavonoides .	29
Figura 9. Cromatogramas TLC con los estándares (ácido gálico AG y catequina CQ) y el extracto de tipo (T1 y T2) reveladas a dos longitudes de onda: A) 254 nm y B) 366nm.....	31
Figura 10. Cromatograma de los patrones de ácido gálico (AG) y catequina (CQ) obtenido a 280 nm.....	32
Figura 11. Cromatogramas del extracto de tipo a diferentes longitudes de onda. A) 214 nm, B) 254 nm, C) 280 nm y D) 366 nm.	33
Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico en HPLC.....	76
Figura 13. Curva de calibración de catequina en HPLC.....	76
Figura 14. Material vegetal recolectado.....	88

Figura 15. Material vegetal pulverizado	88
Figura 16. Obtención del extracto sometido a los diferentes factores	88
Figura 17. Muestras para la determinación de polifenoles	88
Figura 18. Secado del material vegetal	88
Figura 19. Baño de ultrasonido	88
Figura 20. Evaporador rotativo RS 3000-V	88
Figura 21. Muestras para la determinación de flavonoides	88
Figura 22. Inyección de las muestras en la placa cromatográfica.....	89
Figura 23. Muestras de aceite oxidadas para medir actividad antioxidante.....	89
Figura 24 Solución sobrenadante del extracto para medir actividad antiinflamatoria	89
Figura 25. Espectrofotómetro de Absorción Atómica AA500	89
Figura 26. Equipo de cromatografía de HPLC	89
Figura 27. Muestras con albúmina para medir actividad antiinflamatoria	89
Figura 28. Pesaje y calcinación de las muestras de tipo después de 24 horas para determinar metales	89

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Datos y análisis estadístico de la cuantificación de fenoles totales	58
ANEXO B. Datos y análisis estadístico de la cuantificación de fenoles totales	66
ANEXO C. Caracterización del extracto – HPLC	76
ANEXO D. Actividad antioxidante.....	77
ANEXO E. Actividad antiinflamatoria – desnaturalización de proteínas.....	80
ANEXO F. Actividad antiinflamatoria – método HRBC.....	83
ANEXO G. Determinación de minerales y metales pesados	86
ANEXO H. Fotografías	88

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se enfoca en la extracción de metabolitos secundarios, específicamente compuestos fenólicos presentes en las hojas de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) y la evaluación de sus actividades biológicas. El extracto vegetal de tipo se optimizó mediante diferentes factores (disolvente, temperatura, tiempo y número de extracciones sucesivas), de estos: metanol 50%, 50 °C, 10 min con 4 extracciones sucesivas presentaron las condiciones óptimas para obtener el mayor contenido de polifenoles y flavonoides con un total de $70,115 \pm 0,440$ mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca y $64,967 \pm 0,858$ mg equivalente de catequina/ g muestra seca, respectivamente. Se evaluaron dos actividades biológicas, la actividad antioxidante por el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en donde se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del 68,987% a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. La actividad antiinflamatoria fue evaluada por dos métodos: a) desnaturalización de proteínas (43,413%) y b) estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) (94,398%) con ambos métodos se determinó una elevada actividad. Finalmente, se evaluó el contenido de minerales presentes en las hojas de tipo mediante espectrofotometría de absorción atómica y se obtuvo un alto contenido de Ca y Mg (13174,749 mg/kg base seca y 5771,208 mg/kg de base seca, respectivamente). Debido a la presencia de estas actividades biológicas, tipo se podría convertir en una alternativa natural que sustituya productos sintéticos y contribuya en el tratamiento de diversas patologías, además de proporcionar nutrientes esenciales al ser humano.

Palabras claves: *Minthostachys mollis* Griseb, polifenoles, flavonoides, actividades biológicas, minerales

ABSTRACT

The present research work is focused on the extraction of secondary metabolites, specifically phenolic compounds present in the tipo leaves (*Minthostachys mollis* Griseb) and the evaluation of their biological activities. Tipo plant extract was optimized by different factors (solvent, temperature, time and number of successive extractions) of these, methanol 50%, 50 °C, 10 min with 4 successive extractions presented the optimal conditions to obtain the highest polyphenol and flavonoids content which was $70,115 \pm 0.440$ mg gallic acid equivalents/g dry sample and 64.967 ± 0.858 mg catechin equivalents/g dry sample, respectively. Two biological activities were evaluated, the antioxidant activity by the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method where the highest percentage of inhibition 68.987% was obtained at 1000 µg/mL. The anti-inflammatory activity was evaluated by two methods: a) protein denaturation and b) human red blood cell membrane stabilization (HRBC) that presented an important percentage of protection (94.398%). Finally, the content of minerals present in tipo leaves was evaluated by atomic absorption spectrophotometry and a high content of Ca and Mg was obtained (13174.749 mg/kg dry base and 5771.208 mg/kg dry base, respectively). Due to the presence of these biological activities, tipo could become a natural alternative that substitutes synthetic products and contributes to the treatment of various pathologies, in addition to providing essential nutrients to the human being.

Keywords: *Minthostachys mollis* Griseb, polyphenols, flavonoids, biological activities, minerals

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son ampliamente conocidas por su valor cultural, pero sobre todo porque se han convertido en un gran aporte para la medicina natural, ya que poseen diversos componentes o principios activos que causan un efecto curativo en las personas que los consumen, reemplazando así a la medicina farmacéutica **(Cerón, 2006; Gallegos, 2016)**.

El uso de estas plantas se debe al conocimiento ancestral de los pueblos indígenas que se han dedicado a buscar los múltiples beneficios que estas poseen y a transmitirlo de generación en generación, con el fin de buscar soluciones para curar o aliviar numerosas enfermedades. **(Tinitana, Ríos, Romero, De la Cruz, & Pardo, 2016; Bussmann & Sharon, 2006; Ríos & Recio, 2005)**.

Ecuador cuenta con una gran variedad de plantas entre las cuales se destacan las plantas medicinales, siendo algunas de ellas endémicas y otras silvestres y que han sido empleadas desde hace muchos años por las comunidades indígenas **(Malagón, Vila, Iglesias, Zaragoza, & Cañigueral, 2003)**.

El estudio de estas plantas ha ayudado a conocer la tradición del pueblo ecuatoriano para resolver problemas referentes a la salud, tal es el caso del ajeno (*Artemisia absinthium* L.) utilizado para la inflamación, diabetes, presión, colesterol y buen aliento; la chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel.) empleada para aliviar dolores estomacales, dolor molar, inflamación y resfrío; la malva olorosa (*Pelargonium odoratissimum* L.) para tratar dolores estomacales, inflamación y nervios, entre otras plantas con gran potencial medicinal **(Cerón, 2006)**. Esta riqueza ancestral ha motivado el desarrollo de diversas investigaciones científicas que permitan conocer la

biodiversidad del país así como el cuidado que se debe tener para conservar las especies vegetales (Ríos, Koziol, Borgtoft, & Granda, 2007).

1.1.2 Cerro Teligote

Ecuador cuenta con varias zonas en donde aún se conserva la flora y fauna en su totalidad, uno de estos lugares es el cerro Teligote un bosque andino ubicado en la provincia de Tungurahua, cantón Pelileo, a una altitud que va desde los 3200 hasta los 3640 m.s.n.m aproximadamente y que cuenta con un clima andino (semi nublado – lluvioso) donde la temperatura fluctúa entre 7 – 15°C. En el 2007, este lugar fue reconocido por la red de socio bosque como un bosque protector por la gran variedad de especies que posee (Pineda, 2013).

El cerro Teligote cuenta con una gran diversidad de recursos naturales; el más característico es la flora, la cual presenta un sin número de plantas nativas y endémicas ampliamente utilizadas para el consumo humano, especialmente por la comunidad de Teligote (Aimacaña, 2010). Estas plantas y sus beneficios son parte del conocimiento ancestral; sin embargo, poca es la información científica acerca de ellas. Un ejemplo de ello lo constituye el tipo.

1.1.3 Planta tipo

1.1.3.1 Generalidades

El género *Minthostachys* pertenece a la familia *Lamiaceae*, se encuentra distribuido en elevaciones medias a lo largo de los Andes, que va desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, hasta el noroeste de Argentina (Ojeda, Arroyo, Borgogno, Biderbost, & Balzarini, 2004).

Este género fue descrito por primera vez en 1832 en una sección de *Bystropogon* L'Her por Bentham, en 1840 el género fue propuesto por Spach y su último estudio taxonómico fue en 1936 por Epling, el mismo que reconoció 12 especies de difícil delimitación (Schmidt, 2007). En 1963, Epling y Játiva proponen que el género

Minthostachys se compone de una sola especie *Minthostachys mollis* que forma un complejo poliploide, lo que complicaba su estudio taxonómico; sin embargo, en los últimos años y en contraste con este argumento se han identificado 17 especies morfológica y ecológicamente distintas (Schmidt, 2008).

Una de las especies identificadas en Ecuador es *Minthostachys mollis* Griseb, conocida como tipo, tipillo, poleo o muña, muy característica por su olor semejante a la menta, utilizado en medicina y gastronomía (Alkire, Tucker, & Maciarello, 1994).

1.1.3.2 Descripción botánica

El tipo (Figura 1 y 2) es una planta arbustiva aromática, ya que en sus ramas pueden trepar arbustos cercanos usándola como soporte, mide aproximadamente de 0.3 a 2 m de altura, se caracteriza por su frondosidad en la parte superior, presenta un tallo tetragonal, sus hojas son tupidas con bordes aserrados y presentan pelos en los peciolo, estas hojas cuentan con gran cantidad de aceite esencial, sus flores son pequeñas (aproximadamente hasta 3,5 mm de largo) y poseen un color blanco (Cano, 2007; Ojeda, Arroyo, Borgogno, Biderbost, & Balzarini, 2004).

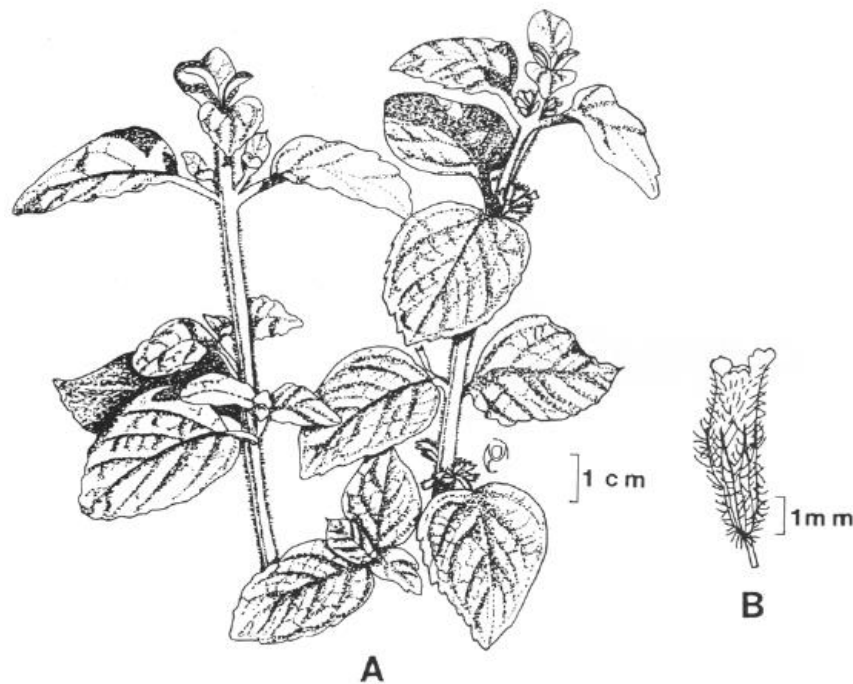


Figura 1. Planta tipo (*Minthostachys mollis* Griseb)

Fuente: Alkire, Tucker, & Maciarello, (1994)

1.1.3.3 Clasificación Taxonómica

Según **Cano, (2007)**, tipo presenta su ubicación taxonómica, según el sistema de clasificación de Engler y Prantil:

División	<i>Argiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Simpetaleae</i>
Orden	<i>Tubiflorales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Género	<i>Minthostachys</i>
Especie	<i>Minthostachys mollis</i> (Griseb)
Nombre común	Tipo, tipillo, poleo, muña



Figura 2. Planta tipo
(*Minthostachys mollis* Griseb)

1.1.3.4 Usos ancestrales

Tipo ha sido empleado desde la antigüedad con varias aplicaciones, entre las que se destacan: alivio de dolores y cólicos estomacales por gases, curación de heridas, problemas en las vías respiratorias y como sedante, son sus hojas y flores las más utilizadas a manera de infusión. En la actualidad también es empleado en el campo gastronómico como condimento y saborizante para la preparación de té y otros alimentos, ya que posee un olor característico muy parecido a la menta e incluso es utilizado como preservante de alimentos como la carne (**Torrenegra et al., 2016; Scandaliaris, Fuentes, & Lovey, 2007; Carhuapoma et al., 2009**).

1.1.4 Metabolitos secundarios

Las propiedades beneficiosas que poseen las plantas medicinales, se deben a la presencia de una serie de metabolitos secundarios, los cuales son importantes para la supervivencia de la planta y cuya función principal es de defensa (**Wink, 2003**). Estos metabolitos se encuentran distribuidos principalmente en grupos de terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos, estos últimos se caracterizan por su capacidad para actuar como conservantes naturales y ayudar en el tratamiento de alteraciones patológicas (**Yapuchura, 2010**).

1.1.4.1 Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos son considerados como uno de los principales grupos de metabolitos secundarios, ya que desempeñan un papel importante en la fisiología, morfología y taxonomía de las plantas. Además, son empleados en la industria con varios fines: medicinales, alimenticios y cosmetológicos (**Bravo, 1998**). Los polifenoles son compuestos bioactivos que se encuentran distribuidos según su estructura química (Figura 3) en: ácidos fenólicos, flavonoides, alcoholes fenólicos, entre otros (**Abbas et al., 2017**).

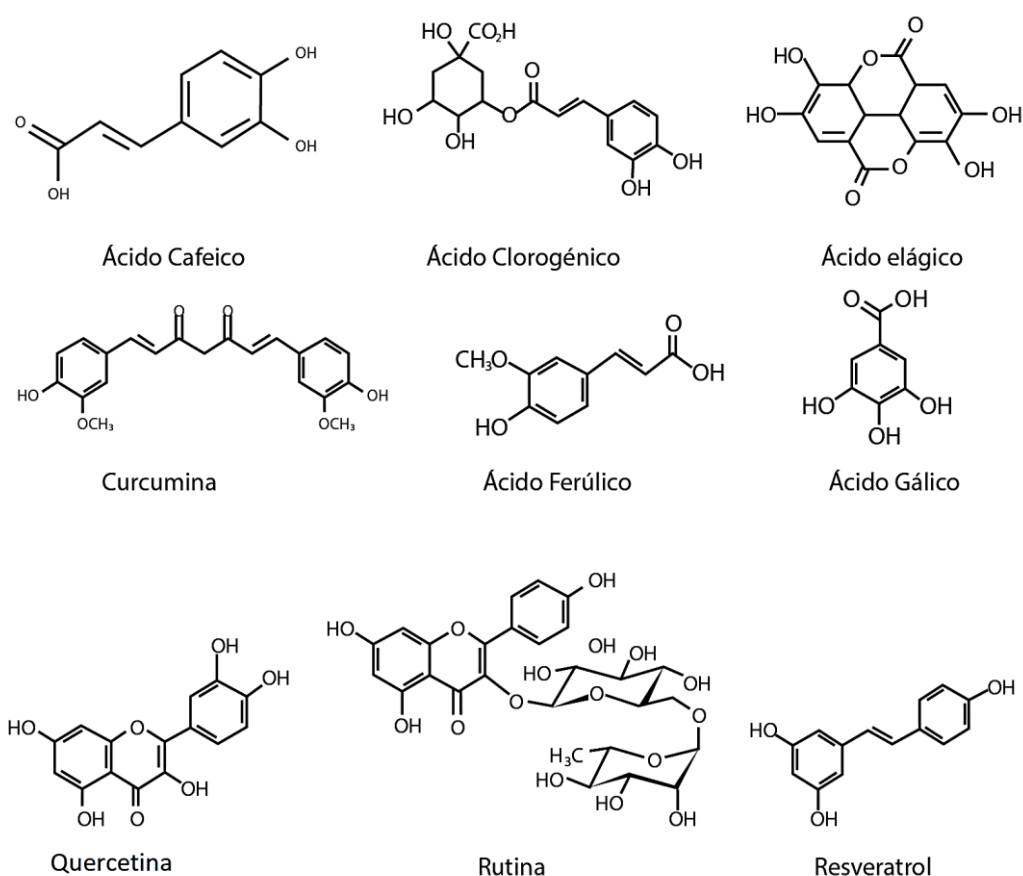


Figura 3. Estructura química de algunos ejemplos de compuestos fenólicos

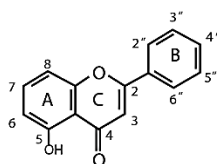
Fuente: Everette et al., (2010)

Para la determinación de polifenoles totales se utiliza el método de Folin-Ciocalteu cuyo mecanismo de reacción se basa en una reacción redox de compuestos fenólicos. El reactivo Folin-Ciocalteu está formado por una mezcla de heteropoliácidos, ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, en los que el molibdeno y el tungsteno están en el estado 6+ (**Ikawa, Schaper, Dollard, & Sasner, 2003**). Cuando se produce la reacción se forma un cromóforo azul constituido por un complejo de fosfomolibdico-

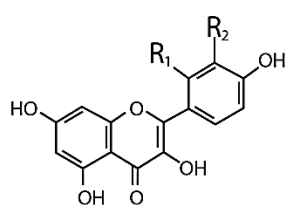
fosfotúngstico que se puede medir ópticamente en un espectrofotómetro a 760 nm en base a un patrón de ácido gálico, donde la absorción máxima de los cromóforos depende de la solución alcalina (ajustada con carbonato de sodio) y la concentración de compuestos fenólicos (Blainski, López, & Palazzo de Mello, 2013; Chen, Cheng, & Liang, 2015; Huang, Ou, & Prior, 2005; García, Fernández, & Fuentes, 2015).

1.1.4.2 Flavonoides

Los flavonoides también son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas y cumplen varias funciones importantes en el crecimiento, desarrollo y defensa de estas. Se encuentran en varios frutos y vegetales y se caracterizan por sus diversas propiedades usadas para el beneficio de la salud, entre ellas se destaca la capacidad antioxidante y la prevención de enfermedades cardiovasculares y coronarias (Nijveldt et al., 2001; Sellapan & Akoh, 2002).

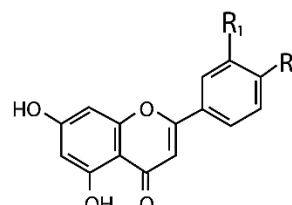


Estructura básica de los flavonoides



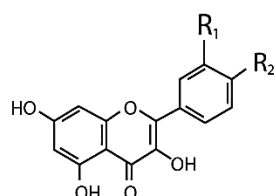
Flavonoles

Quercetina, $R_1 = H, R_2 = OH$
Morin, $R_1 = OH, R_2 = H$



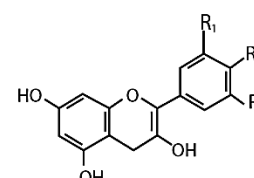
Flavonos

Crisina, $R_1, R_2 = H$
Apigenina, $R_1 = H, R_2 = OH$



Flavanonas

Naringenina, $R_1 = H, R_2 = OH$
Hesperetina, $R_1 = OH, R_2 = OCH_3$



Flavan-3-oles

Catequina, $R = OH, R_2 = OH, R_3 = H$
Epicatequina, $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OH$

Figura 4. Estructura química general de los flavonoides

Fuente: Pekal & Pyrzynska, (2014)

Para la determinación de flavonoides se emplea el método colorimétrico con cloruro de aluminio, el cual se lleva a cabo en presencia de NaNO_2 en medio alcalino. Este método se basa en la nitración de cualquier anillo aromático que lleve en su estructura un grupo catecol con sus tres o cuatro posiciones no sustituidas estéricamente. Cuando se adiciona Al (III) , se forma un complejo amarillo, que se convierte en rojo después de la adición de NaOH , el cual se cuantifica en un espectrofotómetro a 510 nm en base a un patrón de catequina o quercetina **(Pekal & Pyrzynska, 2014)**.

1.1.5 Actividades biológicas

Los metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides pueden presentar diversas actividades biológicas, entre las cuales se destacan: propiedades antiinflamatorias, antidiarreicas, antioxidantes, antivirales y anticancerígenas, que pueden ser aprovechadas en beneficio de la salud humana **(Jiménez, García, & Rojas, 2014; García, Martínez, Ortega, & Castro, 2010)**.

1.1.5.1 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos vegetales se debe a la presencia y estructura química de los compuestos fenólicos, los cuales se encargan de proteger a las células contra radicales libres o daños oxidativos que provocan enfermedades degenerativas al organismo, por lo que han sido considerados con fines terapéuticos y en la prevención de enfermedades como cardiovasculares **(Padilla, Rincón, & Bou-Rached, 2008; Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008)**.

En el organismo, los radicales libres se generan por causa de diversos procesos metabólicos endógenos y sustancias químicas exógenas, que al buscar estabilidad a través del emparejamiento de electrones con las biomoléculas, provocan que estas se oxiden, dañando células y/o tejidos; y causando diversos trastornos degenerativos **(Echavarría, Franco, & Martínez, 2009; Moualek, Aiche, Guechaoui, Lahcene, & Houali, 2016)**. Cuando los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares se inicia un proceso de peroxidación lipídica, lo que provoca la destrucción de su estructura y en casos extremos la muerte

celular. La peroxidación lipídica es responsable de la rancidez de los alimentos almacenados y resulta en la formación de hidroperóxidos lipídicos y aldehídos como el malondialdehído que pueden ser detectados en muestras biológicas y permiten evaluar el estrés oxidativo **(Lima & Abdalla, 2001)**.

Uno de los métodos empleados para determinar la actividad antioxidante de metabolitos secundarios es TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). En este caso el malondialdehído, un dialdehído formado como producto secundario en la oxidación lipídica reacciona con el ácido tiobarbitúrico para formar un cromógeno rosado en medio ácido y temperaturas elevadas que tiene una absorción máxima a 532 nm y que permite sobreestimar el grado de peroxidación lipídica **(Jardine, Antolovich, Prenzler, & Robards, 2002)**.

1.1.5.2 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria es una de las actividades biológicas que presentan los metabolitos secundarios y esto hace que las plantas sean empleadas en el ámbito medicinal para la curación de varias afecciones, contrarrestando el dolor y la inflamación que estas provocan **(Pino, Prieto, Pérez, & Molina, 2004)**. Se considera a la inflamación como una respuesta a estímulos perjudiciales, quemaduras y lesiones **(Acostupa, Chávez, Mejía, Pauta, & Tucunango, 2017)**. La función principal de la inflamación es eliminar los elementos que causan el daño celular y así iniciar un proceso de curación. Sin embargo, cuando la inflamación no es tratada adecuadamente puede provocar enfermedades crónicas **(Enciso & Arroyo, 2011)**.

Existen diferentes métodos que permiten evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos vegetales, entre los que se destaca: la inhibición de la desnaturalización de proteínas. La albúmina es una proteína que forma aproximadamente el 70% de las proteínas del plasma sanguíneo, se encarga de mantener la presión osmótica, transportar sustancias y neutralizar los radicales libres. La desnaturalización ocurre cuando la proteína pierde su estructura tridimensional provocando la pérdida de su actividad biológica, es así como este método utiliza el calor como fuente de desnaturalización para determinar si el compuesto a analizar presenta actividad

antiinflamatoria; midiendo la absorbancia del producto a una longitud de 660 nm (Rodrigues, 2016).

Otro método es la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC), análoga a la estabilización de la membrana lisosómica, la misma que es importante para limitar la respuesta inflamatoria al inhibir la liberación de constituyentes lisosomales que causan más inflamación y daño tisular. Este método es inducido por hipotonicidad que causa la lisis de la membrana, provocando que el contenido de hemoglobina sea expulsado al medio y pueda ser medido en un espectrofotómetro a 560 nm (Kota, Sharma, & Tahashildar, 2018). Se evaluó entonces el porcentaje de estabilización de la membrana frente a esta condición.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

- Estudiar el contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y antiinflamatoria del extracto obtenido de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb).

1.2.2 Objetivos específicos

- Cuantificar el contenido de polifenoles y flavonoides totales del extracto de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) mediante el método de Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio respectivamente.
- Caracterizar el extracto de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC).
- Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) mediante los métodos de desnaturalización de proteína y estabilización de la membrana de glóbulos rojos (HRBC).

- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) mediante el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis nula

Las condiciones de extracción de tipo no influyen en el contenido de polifenoles y flavonoides y en sus actividades biológicas: antioxidante y antiinflamatoria.

1.3.2 Hipótesis alternativa

Las condiciones de extracción de tipo influyen en el contenido de polifenoles y flavonoides y en sus actividades biológicas: antioxidante y antiinflamatoria.

1.4 Señalamiento de variables

1.4.1 Variables independientes

- Disolvente
- Temperatura
- Tiempo
- Concentración de los extractos

1.4.2 Variables dependientes

- Contenido de polifenoles y flavonoides totales
- Capacidad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

Las pruebas experimentales se realizaron en el laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto Canje de Deuda) y en el laboratorio de Alimentos funcionales BIO-PROPEPTI, de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materia prima

En esta investigación se empleó hojas frescas de tipo (*M. mollis*), recolectadas en el Cerro Teligote.

2.1.2 Materiales e insumos

- Balones de aforo de 5, 10, 25, 100, 250 y 500 mL
- Desecador
- Embudos de vidrio
- Matraces Erlenmeyer de 100 y 250 mL
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL
- Termómetro -10 a 110 °C
- Tubos capilares 75mm, TECNAN
- Tubos estériles de 10 mL
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 500 mL
- Crisoles de porcelana
- Mortero
- Pistilo

- Goteros
- Pera de succión
- Pissetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorff de 2 mL
- Tubos falcon de 50 mL
- Agitadores magnéticos
- Espátulas
- Gradillas metálicas
- Soporte Universal
- Micropipetas 20 – 200 y 100 – 1000 mL
- Columna Zorbax Eclipse XD8 - C18 (4,6 * 250 mm, 5 μ m), AGILENT TECHNOLOGIES
- Filtro de membrana de celulosa, AGILENT TECHNOLOGIES
- Filtros de 0,45 μ m, AGILENT CAPTIVA, ECONO FILTER
- HPTLC Sílica gel 60 F₂₅₄ (10 * 10 cm), MERCK
- Pre-columna Zorbax Eclipse Plus - C18 (2,1 * 12,5 mm, 5 μ m), AGILENT TECHNOLOGIES
- Viales HPLC 2mL, CRIMPSNAP
- Guantes de látex
- Jeringas de 1mL
- Olla de aluminio
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Parafilm
- Rotuladores
- Toallas absorbentes

2.1.3 Reactivos

- AguaMiliQ (resistividad 18,2 MΩ.cm)
- Ácido gálico 97,5 -102,5%, SIGMA
- Carbonato de sodio 99,5%, MERCK
- Catequina 98%, SIGMA
- Cloruro de aluminio 99%, LOBA CHEMIE
- Etanol 99,98%, SCHARLAU
- Folin – Ciocalteu 2N, SIGMA-ALDRICH
- Hidróxido de sodio 99%, MERCK
- Metanol 99,98%, PANREAC
- Nitrito de sodio 98%, LOBA CHEMIE
- Acetato de etilo, FISHER SCIENTIFIC
- Ácido fórmico 90%
- Metanol grado cromatográfico 99,9%, MERCK
- Tolueno, MERCK
- Aceite de oliva virgen, El Arbolito
- Ácido acético glacial, FISHER SCIENTIFIC
- Ácido cítrico grado reactivo
- Ácido tiobarbitúrico 98%, PANREAC
- Butil hidroxil tolueno (BHT) 99%, SIGMA ALDRICH
- Citrato de sodio 99,8%, MALLINCKRODT
- Cloruro de sodio grado reactivo
- Fosfato dibásico de sodio 99,1%, BAKER CHEMICAL
- Fosfato monobásico de sodio 99,1%, BAKER CHEMICAL
- Glucosa grado analítico
- Ácido clorhídrico 34-37%, FISHER SCIENTIFIC
- Ácido nítrico 67-70%, FISHER SCIENTIFIC
- Cloruro de Lantano 5%

2.1.4 Equipos

- Balanza analítica, METTLER TOLEDO XPE 204
- Bomba de vacío, THERMO SCIENTIFIC
- Baño de ultrasonido, BRANSON 2800
- Cromatógrafo HPLC, AGILENT TECHNOLOGIES A260
- Determinador de humedad, METTLER TOLEDO HX204
- Espectrofotómetro Thermo Scientific, EVOLUTION 201 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER
- Estufa, BINDER
- Equipo de absorción atómica con horno de grafito y lámparas para detección de minerales (PG Instruments Espectrofotómetro de Absorción Atómica AA500)
- Evaporador rotativo, RS 3000-V
- Liofilizador, BENCH TOP PRO WITH OMNITRONICS, BTP-3ES0VW
- Microcentrífuga refrigerada, BUNSEN FINSEN
- Mufla, NABER THERM 30-3000°C
- Plancha de calentamiento, IKA C-MAG HS7
- Refrigerador a -80 °C, BINDER
- Refrigerador, LG
- Sembrador automático para TLC, CAMAG ATS4
- Sistema de purificación de agua MilliQ, THERMO SCIENTIFIC
- Termobloque, ACCUBLOCK Digital Dry Bath Labnet
- TLC Scanner para cuantificación, CAMAG
- Vórtex, VORTEX MIXER LABNET

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Recolección del material vegetal

La recolección de las hojas de tipo se realizó a una altura de 3291 m.s.n.m en las coordenadas 01°22'0.50" S y 78°33'53.30" O del Cerro Teligote, perteneciente al cantón Pelileo, provincia de Tungurahua, en el mes de abril. En esta zona se presenta

tipo en mayor proporción por lo que se seleccionaron las plantas con mayor cantidad de hojas, las cuales fueron colocadas en fundas de papel y plástico para evitar que sufran posibles daños durante su transporte al laboratorio.

2.2.2 Obtención de los extractos

2.2.2.1 Pre-tratamiento

Una vez recolectado el material vegetal se limpió y se separó las hojas del tallo, estas se sometieron a un secado en la estufa BINDER a 40 °C hasta que el contenido de humedad fue constante (aprox. 72 horas). Las muestras secas fueron molidas para obtener un polvo fino que fue almacenado en contenedores herméticos hasta su uso.

2.2.2.2 Tratamiento

El tratamiento de la muestra se realizó según la metodología propuesta por **Vladimir-Knežević et al., (2011)**, con modificaciones, detallada a continuación:

Se probaron varios factores con el fin de conseguir los mejores resultados en el contenido de polifenoles y flavonoides. Los factores tomados en cuenta fueron: a) disolvente: agua ultrapura, etanol y metanol (25%, 50%, 75% y puro), b) temperatura: 30, 40, 50 y 60°C, c) tiempo: 5, 10 y 20 min y d) número de extracciones: 1, 2, 3, 4 y 5.

Para la optimización se probó un factor a la vez manteniendo constantes las demás condiciones, así para seleccionar el mejor disolvente se pesó 0,1 g de material vegetal seco y pulverizado, se lo extrajo con 1 mL de disolvente empleando un baño de ultrasonido BRANSON 2800 por 5 minutos y se centrifugó a 14900 rpm a 10°C por 10 min. Con mucho cuidado se recogió el sobrenadante y se lo llevó a la estufa a 40 °C por 2.5 horas para evaporar el disolvente orgánico, transcurrido ese tiempo se llevó el extracto líquido a un volumen de 5mL con agua MiliQ (resistividad 18,2 MΩ.cm), el cual fue utilizado posteriormente para la cuantificación de polifenoles y flavonoides. Una vez seleccionado el mejor disolvente se empezó a variar la temperatura y el tiempo de manera independiente.

El agotamiento del material vegetal se trabajó de forma análoga a lo descrito anteriormente y empleando el disolvente, la temperatura y el tiempo optimizados. En

cada extracción se regeneró el disolvente y se cuantificó polifenoles y flavonoides de manera independiente.

Finalmente, se determinó el número de extracciones necesarias para conseguir un rendimiento superior al 95%. El extracto obtenido con las mejores condiciones se concentró en un evaporador rotativo RS 3000-V a 40°C hasta eliminar el disolvente orgánico, mientras que el agua se retiró mediante liofilización.

2.2.3 Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación del contenido de polifenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología planteada por **Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, (2008)**, con modificaciones.

Se colocó una alícuota de 0,05 mL del extracto, del blanco o del estándar en un balón aforado de 5 mL, se añadió 0,10 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, y la mezcla se dejó reaccionar por 3 minutos bajo agitación continua. Luego se añadió 2mL de una solución de carbonato de sodio (75g/L) y se mezcló bien. El volumen se lo llevó a 5 mL con agua destilada y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente por 2 h en un lugar oscuro, este procedimiento se realizó por triplicado. La absorbancia se midió a 760 nm en el espectrofotómetro Thermos Scientific EVOLUTION 201 UV-VISIBLE y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE), usando una curva de calibración en el rango de 1 – 6 ppm.

2.2.4 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación del contenido de flavonoides se realizó según la metodología planteada por **Dewanto, Wu, Adom, & Liu, (2002)**, con modificaciones.

Se colocó en un frasco de 5 mL, una alícuota de 0,25 mL del extracto, del blanco o del estándar, se añadieron 1,25 mL de agua, y posterior a ello 0,075 mL de nitrito de sodio al 5%, la mezcla se dejó reaccionar por 6 min bajo agitación continua. Luego se agregaron 0,15 mL de cloruro de aluminio al 10% y se dejó reaccionar por 5 min con agitación. Finalmente, se añadieron 0,5 mL de hidróxido de sodio 1M y se mezcló bien. El volumen se lo llevó a 5 mL con agua destilada e inmediatamente se midió la absorbancia a 500 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina,

usando una curva de calibración en el rango de 5 – 30 ppm y todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones reducidas de luz.

2.2.5 Caracterización de los extractos

La caracterización de los extractos se realizó mediante técnicas analíticas de separación: cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés).

2.2.5.1 TLC

Se realizó en placas de cromatografía de capa fina pre-cubiertas con sílica gel 60 F₂₅₄, según la metodología descrita por **Vladimir-Knežević et al., (2011)**, con modificaciones.

Para ello, previamente se activó las placas a 120 °C por 2 horas y se preparó la fase móvil con una mezcla de disolventes: tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico en proporciones 40:32:4, respectivamente. Posteriormente, se preparó una solución del extracto liofilizado a una concentración de 5mg/mL utilizando como disolvente metanol al 50%. Mediante el sembrador automático del equipo de HPTLC, CAMAG ATS4 se inyectó 8µL de los estándares (ácido gálico y catequina, 5 mg/mL) y 6 µL del extracto, para luego revelar las placas con la fase móvil correspondiente. Las placas se secaron con una corriente de aire por pocos minutos y los compuestos se detectaron bajo luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm y con luz visible.

2.2.5.2 HPLC

Se realizó en el equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento AGILENT TECHNOLOGIES A260, según la metodología propuesta por **Saénz, Tapia, Chávez, & Robert, (2009); Guillarme, Casetta, Bicchi, & Veuthey, (2010); Parets et al., (2016)**, con modificaciones.

Se preparó los estándares (ácido gálico y catequina) y la muestra a una concentración de 1mg/mL en etanol al 50% y se filtraron con filtros de membranas (0,45 µm de tamaño de poro). Se utilizó como fase móvil agua (disolvente A) y metanol (disolvente B), como fase estacionaria una columna XD8-C18 (Agilent Technologies, 4,6 * 250

mm, 5 µm de tamaño de partícula) y se trabajó en condiciones de gradiente: 0 – 30 min 5% de B, 30 – 40 min 80% de B, 40 – 45 min 80% de B, 45 – 48 min 5% de B, con un flujo de 0,8 mL/minuto.

La identificación de los picos correspondientes a ácido gálico y catequina se la realizó comparando los tiempos de retención de los estándares en relación con los tiempos de retención de los picos del extracto, a partir de las curvas de calibrado correspondientes.

2.2.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos se midió mediante el método TBARS, siguiendo la metodología descrita por **Rojano, Gaviria, & Sáez, (2008)**, con modificaciones.

Se colocaron en tubos separados una solución del extracto liofilizado y BHT (butil hidroxil tolueno) a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 mg/mL) junto con aceite de oliva de la marca “El arbolito” (aceite virgen sin refinar), se agitó y se mantuvo los tubos a 100°C con agitación constante en un baño de aceite por 48h. Se dejó enfriar los tubos, se centrifugó (13000 rpm, 10min) y se colocó en tubos eppendorf 0,9 mL de las muestras de aceite oxidadas y sin oxidar juntamente con 0,9 mL de TBA recién preparado (ácido 2-tiobarbitúrico 1 mM en una mezcla 50:50 (V/V) de ácido acético glacial: agua destilada) y los tubos se incubaron a 100°C durante 1h.

Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 4°C por 15 min en la microcentrífuga refrigerada, BUNSEN FINSEN, se extrajo la capa de aceite y se tomó con mucho cuidado la solución acuosa coloreada y se midió la absorbancia a 532 nm en el espectrofotómetro, encerando con ácido acético : agua destilada (50:50 - %V/V).

2.2.7 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria de los extractos se evaluó mediante dos métodos: desnaturalización de proteínas y estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC).

2.2.7.1 Desnaturalización de proteína

Este método fue llevado a cabo según lo propuesto por **Alhakmani, Kumar, & Khan,**

(2013), con modificaciones. Se usó diclofenaco de sodio, un poderoso antiinflamatorio no esterooidal como fármaco estándar.

La mezcla de reacción consistió en 2 mL del extracto o del estándar a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL) y 2,8 mL de buffer fosfato salino (pH 7,4, 0,15M). Posteriormente se mezcló con 0,2 mL de albúmina de huevo (1mM), y se incubó a 37 °C por 15 min. La desnaturalización se indujo manteniendo la mezcla de reacción a 70 °C en un baño con agua por 10 min. Luego de enfriar, se midió la absorbancia a 660 nm en el espectrofotómetro, usando como blanco buffer a pH 7,4. Cada experimento se realizó por triplicado y se tomó el promedio. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la proteína se calculó a través de la Ecuación 1:

$$\% = \frac{|A_t - A_c|}{A_c} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: At es la absorbancia de la muestra de ensayo, Ac es la absorbancia del control

2.2.7.2 Método HRBC

El método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) se ejecutó según lo propuesto por **Kumar, Bhat, Kumar, Bohra, & Sheela, (2011)** y **Nagaharika, kalyani, Rasheed, & Ramadosskarthikeyan, (2013)**, con modificaciones.

La muestra de sangre se mezcló con un volumen equivalente de solución Alsever compuesto por: 2% de dextrosa, 0,8% de citrato de sodio, 0,5% de ácido cítrico, y 0,42% de cloruro de sodio y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Las células empaquetadas se lavaron 3 veces con una solución isosalina (0,85% w/v NaCl) y se realizó una suspensión al 10% v/v. Los eritrocitos no usados se dejaron en la solución Alsever (relación 1:1) para su mejor conservación.

Se prepararon diversas concentraciones del extracto (25, 50, 75, 100, 200, 500 y 1000 µg/mL), utilizando tampón fosfato (pH 7,4, 0,15 M). Se tomó 1mL del extracto a las diferentes concentraciones, se añadió 1mL de tampón fosfato, 2mL de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 mL de suspensión HRBC. Se incubó a 37°C por 30 min, se

centrifugó a 2000 rpm por 3 min y el contenido de hemoglobina obtenido de la solución sobrenadante se midió a 580 nm en el espectrofotómetro, usando diclofenaco (100, 200, 500 y 1000 µg/mL) como referencia y en lugar de solución hiposalina se utilizaron 2mL de agua destilada como control. El porcentaje de estabilización HRBC se calculó por medio de la Ecuación 2:

$$\% \text{ Protección} = 100 - \frac{\text{Densidad óptica muestra tratada con fármaco}}{\text{Densidad óptica del control}} * 100$$

Ecuación 2

2.2.8 Determinación de minerales y metales pesados

Para la determinación de los minerales presentes en las hojas de tipo se tomó como referencia el método de la AOAC 985,35 el cual se enfoca en el análisis de minerales mediante absorción atómica. Esto se realizó con la ayuda del Analytical Cookbook PG Instruments del Espectrofotómetro de Absorción Atómica AA500, que cuenta con información característica para la medición de cada mineral (**Mainasara, Sanusi, Maishanu, & Ismail, 2017**), (**Palombini et al., 2013**) y (**Kashmiri, Yasmin, Ahmad, & Mohy-ud-din, 2009**).

Se utilizaron crisoles de porcelana limpios y se llevaron a peso constante en una mufla a 550°C por 4 horas, se dejaron enfriar en un desecador por 30 min y se registró el peso de cada crisol vacío. En cada uno de ellos, se pesó entre 0,60 y 0,65 g de muestra, luego se incineraron las muestras en la mufla a 550°C por 24 horas hasta obtener cenizas blancas, se dejó enfriar en el desecador y se pesó el crisol con las cenizas.

A las cenizas obtenidas, se les añadió 1mL de ácido nítrico y 2mL de ácido clorhídrico, ambos concentrados, se dejó reposar por 15min, y se calentó a 75°C hasta que toda la materia orgánica se haya degradado, evitando que se evaporen los ácidos. La solución obtenida con la muestra y los ácidos se trasvasó a balones de aforo de 25 mL, utilizando jeringas de 1mL para tomar pequeñas alícuotas y haciendo pasar la solución a través de filtros de 0.45 µm, se aforó con ácido nítrico al 1% y se guardó en recipientes adecuados para su posterior uso.

En el espectrofotómetro de absorción atómica AA500 se midieron los minerales Zn, Cu, Fe, Ca, Mg y Mn mediante el método de la llama utilizando un mechero de aire/acetileno o N₂O/acetileno y los metales pesados Co, Pb y Ni mediante horno de grafito (ANEXO G). En primer lugar, se preparó las curvas de calibración, utilizando patrones comerciales (1000mg/L) para cada mineral.

Para la medición, se inyectaron las soluciones directamente con el capilar que presenta el equipo, se inició con la inyección del blanco (ácido nítrico 1% y LaCl₃ 5% solo para el Ca y Mg), luego las soluciones a las distintas concentraciones para construir la curva de calibración y finalmente las muestras (tabla 1). Se calculó la concentración de minerales en la muestra en mg/kg de base seca, tomando en cuenta la curva de calibración, diluciones y peso de la muestra.

Tabla 1. Parámetros de las curvas de calibración de los metales analizados

Mineral	Rango de curva de calibrado (ppm)	Longitud de onda (nm)
Zinc	0,00 – 2,00	213,90
Cobre	0,10 – 1,75	324,79
Hierro	0,00 – 3,00	248,30
Calcio	0,50 – 3,00	422,70
Magnesio	0,04 – 0,40	285,20
Manganeso	0,00 – 1,00	279,50
Cobalto	0,025 – 0,2	240,70
Plomo	0,05 – 0,60	283,32
Níquel	0,025 – 0,40	232,04

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

2.2.9 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza de un factor (ANOVA) en el software estadístico Statgraphics y se determinaron las diferencias significativas entre las medias con el test de Tukey con un nivel de confianza del 95%

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Cuantificación de polifenoles totales y flavonoides

Los metabolitos secundarios están presentes en la mayoría de las plantas medicinales, dentro de este grupo se destacan: a) los polifenoles que desempeñan un papel importante como antioxidantes y antiinflamatorios y contribuyen en la prevención de enfermedades cardiovasculares y coronarias (**Repo & Encina, 2008**) y b) los flavonoides, sintetizados únicamente en las plantas y que llevan a cabo funciones importantes en su crecimiento y desarrollo (**Sellapan & Akoh, 2002**).

El proceso de extracción de metabolitos secundarios se llevó a cabo a través de la optimización de diferentes factores: disolvente, temperatura, tiempo y número de extracciones y empleando hojas secas de tipo como material vegetal. Esta optimización permitió la extracción del mayor contenido de estos compuestos.

La extracción fue asistida por ultrasonido, una técnica empleada en la extracción de compuestos fenólicos presentes en las plantas, ya que produce una cavitación acústica en el disolvente por las ondas que se generan, provocando así una afectación en las paredes celulares de la matriz por el ingreso de este. Se produce entonces, la ruptura celular y la liberación de grandes cantidades del contenido intracelular al medio de extracción. Tanto el disolvente, la temperatura y el tiempo juegan un papel importante en la extracción de compuestos bioactivos puesto que afectan directamente sobre el rendimiento de la extracción, la calidad de los compuestos y el tiempo total del proceso (**Pham, Vuong, Bowyer, & Scarlett, 2017; Rocchetti et al., 2018**).

Se determinó el contenido de polifenoles y se expresó en términos de ácido gálico, el compuesto más representativo de este grupo, para ello se empleó el ensayo del reactivo de Folin – Ciocalteu y se realizó la curva de calibración con ácido gálico (Figura 5), que permitió mediante la recta de regresión cuantificar el contenido total de polifenoles.

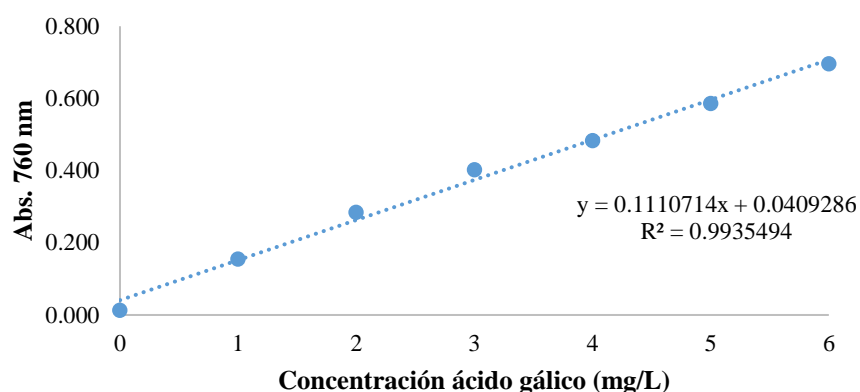


Figura 5. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de polifenoles

Por otra parte, se cuantificó el contenido de flavonoides totales mediante el ensayo de cloruro de aluminio, los resultados fueron expresados en términos de catequina, uno de los flavonoides más representativos (figura 6).

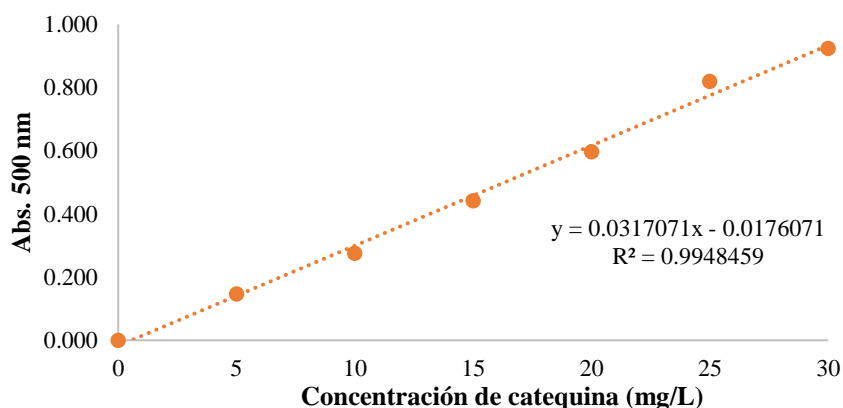


Figura 6. Curva de calibración de catequina para la cuantificación de flavonoides

3.1.1.1 Disolvente

Para la extracción de metabolitos secundarios a partir de matrices vegetales, se suelen emplear diversos disolventes que influyen directamente en su solubilidad. Los compuestos fenólicos suelen ser solubles en disolventes polares y por lo general se utiliza agua, metanol o etanol para extraerlos, sin embargo, el disolvente a utilizar dependerá de la composición total de los compuestos que se deseen extraer, de su capacidad para penetrar en las células vegetales y de las interacciones intermoleculares que genere con los metabolitos (Cerón, Higuira, & Cardona, 2010; Soto & Rosales, 2016; Rabelo, Machado, Martínez, & Hubinger, 2016).

En la tabla 2 se presenta el contenido de polifenoles (expresados en mg equivalente de ácido gálico/g de muestra seca) y de flavonoides (expresados en mg equivalente de catequina/g de muestra seca), medidos a una longitud de onda de 760 nm y 500 nm respectivamente. El menor contenido de estos metabolitos se obtuvo al trabajar con etanol puro, mientras que la mayor concentración se reportó con metanol al 50%. Estos datos son comparables con la investigación realizada por **Hatipoglu et al., (2013)**, donde se evaluó el contenido de compuestos fenólicos presentes en *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius* (familia *Lamiaceae*), la extracción se llevó a cabo con metanol 50%, obteniéndose un total de 42,60 mg equivalente de ácido gálico/ g muestra seca y 12,50 mg equivalente de catequina/ g muestra seca. El contenido de flavonoides en el extracto de tipo fue tres veces superior al reportado en dicho estudio.

Tabla 2. Contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos al variar el disolvente

Disolventes	Contenido de polifenoles (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca)	Contenido de flavonoides (mg equivalente de catequina/g muestra seca)
Agua	24,672 ^{cd} ± 0,737	24,848 ^w ± 0,471
Etanol 25%	23,337 ^{bc} ± 1,314	21,577 ^v ± 0,930
Etanol 50%	26,116 ^d ± 1,736	25,317 ^w ± 0,570
Etanol 75%	29,327 ^e ± 0,425	29,097 ^x ± 0,424
Etanol puro	3,064 ^a ± 0,715	4,645 ^u ± 0,581
Metanol 25%	23,126 ^{bc} ± 0,885	32,888 ^y ± 1,420
Metanol 50%	35,149 ^f ± 1,550	41,593 ^z ± 1,121
Metanol 75%	22,616 ^b ± 0,494	22,710 ^v ± 0,919
Metanol puro	25,482 ^d ± 1,214	24,644 ^w ± 1,097

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c, d, e, f} y ^{u, v, w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides extraídos con diferentes disolventes ($p < 0,05$, Tukey Test). El análisis se realizó de manera independiente para el contenido de polifenoles y flavonoides.

Una vez cuantificado el contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos se aplicó un análisis estadístico (Anexo A y B) que indicó la existencia de diferencia significativa entre los tratamientos utilizados, infiriéndose así su influencia en el

proceso de extracción de estos metabolitos. Se seleccionó entonces metanol 50% como el mejor disolvente para conseguir la máxima extracción de polifenoles y flavonoides.

La extracción con este disolvente implica un mayor cuidado en el proceso ya que podrían quedar trazas de metanol en el extracto, un compuesto tóxico que en elevadas concentraciones afecta a la salud (Roldán, Frauca, & Dueñas, 2003). Sin embargo, al trabajar a una concentración del 50% estos riesgos disminuyen así como también el costo de producción (Soto & Rosales, 2016; Sotelo, Casas, & Camelo, 2010).

3.1.1.2 Temperatura

La temperatura desempeña un papel importante en el proceso de extracción de metabolitos secundarios, ya que se encarga de acelerar y mejorar la extracción a través de la velocidad de difusión de los compuestos fenólicos y una mayor solubilidad de los analitos (Rabelo et al., 2016). Sin embargo, se debe buscar la temperatura adecuada que maximice el rendimiento y minimice la probabilidad de degradación de los compuestos de interés (Osorio & Meireles, 2013).

De manera análoga, se evaluó el contenido de polifenoles y flavonoides a cuatro temperaturas diferentes, manteniendo constante el disolvente optimizado (metanol 50%), a fin de obtener las máximas concentraciones posibles; los resultados se reportan en la tabla 3.

Tabla 3. Contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos al variar la temperatura

Temperatura (°C)	Contenido de polifenoles (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca)	Contenido de flavonoides (mg equivalente de catequina/g muestra seca)
30	26,566 ^a ± 1,482	32,110 ^x ± 0,861
40	33,648 ^b ± 0,528	37,535 ^y ± 0,359
50	35,149 ^b ± 1,550	40,731 ^z ± 0,657
60	40,431 ^c ± 0,868	39,553 ^z ± 0,852

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c} y ^{x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides extraídos con diferentes temperaturas ($p < 0,05$, Tukey Test). El análisis se realizó de manera independiente para el contenido de polifenoles y flavonoides.

Se aplicó un análisis estadístico y una prueba de rangos múltiples al contenido de polifenoles y flavonoides obtenidos a las diferentes temperaturas, los resultados indican que existe diferencia significativa entre las temperaturas empleadas (ANEXO A y B), excepto entre 40 y 50 °C para polifenoles y 50 y 60 °C para flavonoides. En general, se observa una relación directa entre la temperatura empleada y la concentración de los metabolitos extraídos. Sin embargo, al no existir una variación significativa en el contenido de flavonoides reportado a 50 y 60 °C, se continúa el proceso de optimización con el uso de estas dos temperaturas.

Los datos obtenidos del extracto de tipo son comparables con la investigación realizada por **Matkowski & Piotrowska, (2006)**, en la que se llevó a cabo la extracción de polifenoles de las hojas de *Leonurus cardiaca* (familia *Lamiaceae*) con metanol puro a 60 °C con un contenido total de 32,8 mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca, y la investigación de **Jovanovic et al., (2017)**, quienes evaluaron el contenido de flavonoides presentes en *Thymus serpyllum* (familia *Lamiaceae*), con etanol 50% a 25 °C y obtuvieron un contenido de 16,70 mg equivalente de catequina/ g muestra seca, valores que resultan inferiores a los valores obtenidos en el extracto de tipo por la variación de temperatura y el disolvente de extracción.

Cerón et al., (2010), indican que la temperatura de extracción de metabolitos secundarios está en el rango de 50 a 75°C, sin embargo, para aquellos metabolitos con capacidad antioxidante se debe trabajar con temperaturas menores a 60°C para evitar la degradación de los compuestos.

3.1.1.3 Tiempo

El tiempo de extracción está ligado con las condiciones de maceración y el tiempo de evaporación de los disolventes, por lo general, los tiempos de extracción de polifenoles y flavonoides varían entre 1 minuto y 24 horas, sin embargo, si estos se prolongan puede provocarse la oxidación de estos compuestos (**García, Morales, Segura, & Fernández, 2010; Naczk & Shahidi, 2006**). En la tabla 4 se presenta el contenido de polifenoles y flavonoides obtenidos con diferentes tiempos de extracción y manteniendo constante el disolvente (metanol 50%) y la temperatura (50 y 60 °C) optimizados.

Tabla 4. Contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos al variar el tiempo

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Contenido de polifenoles (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca)	Contenido de flavonoides (mg equivalente de catequina/g muestra seca)
50	5	35,089 ^a ± 1,480	40,731 ^y ± 0,657
	10	45,083 ^e ± 0,496	41,866 ^z ± 0,622
	20	39,921 ^c ± 0,364	40,605 ^{xy} ± 0,638
60	5	40,431 ^c ± 0,868	39,553 ^x ± 0,852
	10	42,171 ^d ± 0,613	39,764 ^{xy} ± 0,275
	20	36,770 ^b ± 1,089	37,493 ^w ± 0,621

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c, d, e} y ^{w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides extraídos con diferentes tiempos ($p < 0,05$, Tukey Test). El análisis se realizó de manera independiente para el contenido de polifenoles y flavonoides.

Se realizó el análisis estadístico y la prueba de rangos múltiples (ANEXO A y B) con el contenido de polifenoles y flavonoides el cual indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos empleados. Se observó que a los 20 min el contenido de compuestos fenólicos empezó a disminuir, lo cual podría estar relacionado con una posible degradación de los compuestos y con un estado de equilibrio alcanzado por estos metabolitos dentro y fuera de las células como consecuencia de un tiempo prolongado de extracción (Yu, Wang, Qi, Xin, & Li, 2019).

El mayor contenido de compuestos fenólicos en los extractos de tipo se obtuvieron a tiempos relativamente bajos, sin embargo, en la investigación realizada por Barros, Heleno, Carvalho, & Ferreira, (2010), se evaluó el contenido de compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Thymus mastichina* (familia *Lamiaceae*) con metanol puro a un tiempo de 12 horas de extracción y se obtuvo un contenido de 165,29 mg equivalente de ácido gálico/ g muestra seca para polifenoles y un contenido de 83,85 mg equivalente de catequina/ g muestra seca para flavonoides, lo que resulta relativamente superior comparado con los valores obtenidos para el extracto de tipo debido a la variación del disolvente y un mayor tiempo de extracción. En base al mayor

contenido de polifenoles y flavonoides reportados, se seleccionó como tiempo óptimo de extracción, 10 minutos.

3.1.1.4 Desgaste del material vegetal

Una vez optimizado el proceso de obtención de los extractos (disolvente, temperatura y tiempo) se trabajó el agotamiento del material vegetal realizando 5 extracciones consecutivas y evaluando el rendimiento acumulado. En la tabla 5 se presenta el contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos obtenidos de tipo para cinco extracciones sucesivas.

Tabla 5. Contenido de polifenoles y flavonoides de los extractos al variar el número de extracciones

Condiciones	Número de extracciones	Contenido de polifenoles (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca)	Contenido de flavonoides (mg equivalente de catequina/g muestra seca)
50 °C - 10 min	E1	45,083 ⁱ ± 0,496	41,866 ^z ± 0,622
	E2	23,622 ^g ± 0,570	29,491 ^x ± 1,088
	E3	10,762 ^f ± 0,724	13,805 ^v ± 0,179
	E4	2,629 ^d ± 0,248	5,227 ^t ± 0,131
	E5	0,483 ^b ± 0,248	1,737 ^t ± 0,203
60 °C - 10 min	E1	42,171 ^h ± 0,613	39,764 ^y ± 0,275
	E2	24,162 ^g ± 0,364	27,861 ^w ± 0,661
	E3	8,256 ^e ± 0,222	11,429 ^u ± 0,477
	E4	1,864 ^c ± 0,104	4,154 ^s ± 0,257
	E5	-0,672 ^a ± 0,090	1,348 ^r ± 0,111

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c, d, e, f, g, h, i y r, s, t, u, v, w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides extraídos con diferentes temperaturas ($p < 0,05$, Tukey Test). El análisis se realizó de manera independiente para el contenido de polifenoles y flavonoides.

Con los datos obtenidos del agotamiento del material vegetal se aplicó el análisis estadístico que indicó la existencia de diferencia significativa entre el contenido de polifenoles y flavonoides y el número de extracciones sucesivas sometidas a las dos temperaturas de ensayo (ANEXO A y B). En base a las figuras 7 y 8 se determinó que

para alcanzar un rendimiento superior al 95% tanto para polifenoles como para flavonoides, es necesario llevar a cabo cuatro extracciones sucesivas.

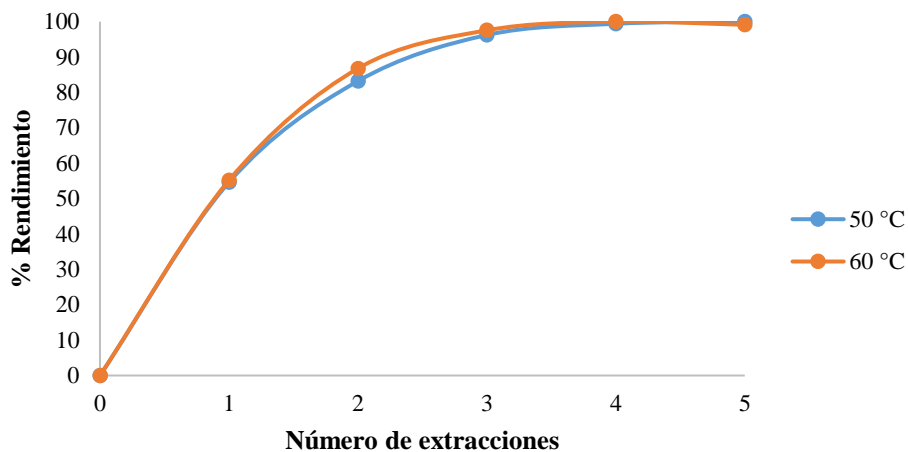


Figura 7. Extracciones sucesivas para obtener el mayor contenido de polifenoles

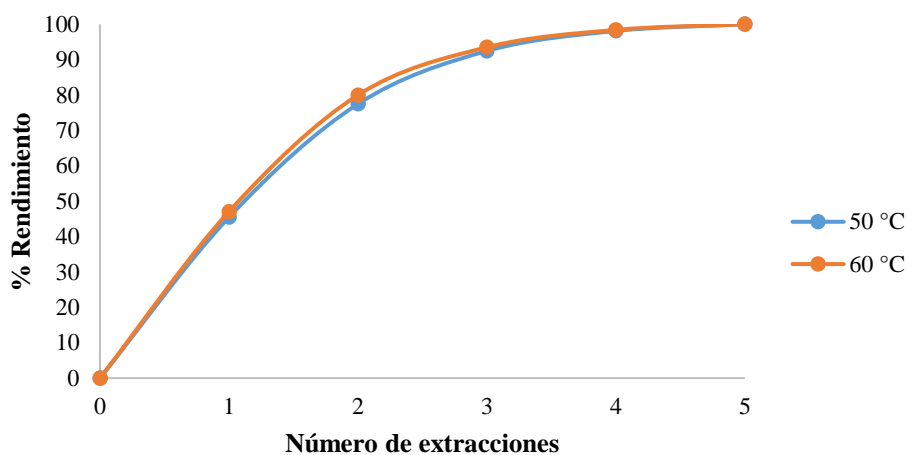


Figura 8. Extracciones sucesivas para obtener el mayor contenido de flavonoides

Por otra parte, se observó que al trabajar a 50 °C se obtiene una mayor concentración de estos metabolitos secundarios en las diferentes extracciones realizadas y la concentración acumulada de estos compuestos es prácticamente similar a las dos temperaturas evaluadas.

Por lo tanto, se determinó que las mejores condiciones de trabajo corresponden a: metanol 50%, 50 °C y 10 min con 4 extracciones sucesivas, obteniéndose un contenido

total de polifenoles de $70,115 \pm 0,440$ (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca) y un contenido de flavonoides de $64,967 \pm 0,858$ (mg equivalente de catequina/g muestra seca), al escalar el proceso y trabajar con 2,5 g de material vegetal y 25 mL de disolvente (tabla 6).

Tabla 6. Contenido de polifenoles y flavonoides con factores optimizados

Extracto de tipo	Contenido de polifenoles (mg equivalente de ácido gálico/g muestra seca)	Contenido de flavonoides (mg equivalente de catequina/g muestra seca)
R1	69,731	65,842
R2	70,596	64,126
R3	70,019	64,934
Promedio	$70,115 \pm 0,440$	$64,967 \pm 0,858$

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

3.1.2 Caracterización del extracto optimizado

Las plantas medicinales presentan en su composición diferentes metabolitos secundarios, que pueden ser identificados a través de una caracterización de los extractos vegetales para reconocer específicamente a que compuestos corresponden y las actividades biológicas que cada uno posee. Entre los métodos empleados para este fin se encuentra la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución (Iordache, Culea, Gherman, & Cozar, 2009).

3.1.2.1 TLC

La cromatografía de capa fina (TLC) es un método empleado para la identificación de compuestos bioactivos presentes en las plantas, permite un análisis rápido y requiere poca cantidad de muestra. Consiste en una fase estacionaria y una fase móvil que depende de la naturaleza de los componentes a separar y a través del cálculo del factor de retención (R_f) y comparando con el R_f de estándares apropiados puede identificarse el tipo de compuestos que se han separado (Cartaya & Reynaldo, 2001; Fonseca, 2017; Chandra, Pareta, Harwansh, & Kumar, 2010).

La caracterización del extracto llevado a cabo mediante esta técnica permitió la separación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos a partir de las hojas de tipo, los que presentaron una polaridad variable.

La fase móvil en la que se evidenció la mejor separación de los compuestos fenólicos fue tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (40: 32: 4), estos compuestos fueron observados a 254 y 366 nm, Los estándares empleados (ácido gálico y catequina) presentaron un Rf de 0,44 y 0,35 respectivamente y en el extracto de tipo se identificaron tres componentes de mayor concentración cuyos Rf fueron: 0,32, 0,46 y 0,53.

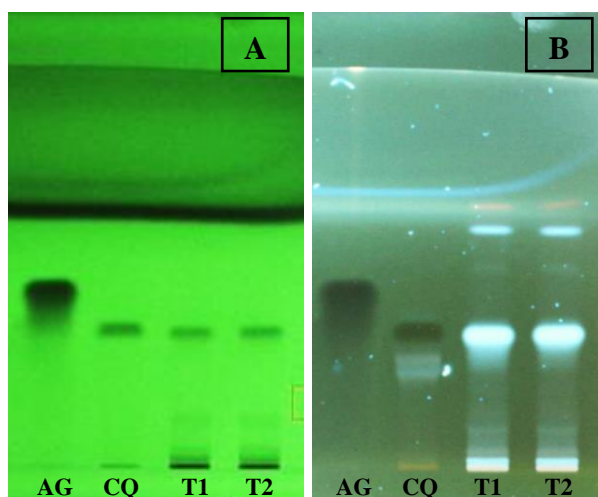


Figura 9. Cromatogramas TLC con los estándares (ácido gálico AG y catequina CQ) y el extracto de tipo (T1 y T2) reveladas a dos longitudes de onda: A) 254 nm y B) 366nm

En las placas cromatográficas se observó la presencia de compuestos con fluorescencia de color celeste (Figura 9B), los mismos que indican la presencia de compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos que corresponde a un grupo de ácidos fenólicos que se caracterizan por presentar una intensidad en sus bandas fluorescentes celestes (Ricco, Wagner, & Gurni, 2011; Rivero et al., 2018). No se evidenció la presencia de ácido gálico pero sí de catequina a 254 nm.

3.1.2.2 HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una técnica empleada para identificar y separar componentes presentes en diferentes matrices, esto depende de la

interacción entre la fase móvil y la fase estacionaria y las condiciones de separación. Esta técnica ha sido empleada para identificar compuestos fenólicos (ácido gálico, catequina, quercetina, cafeína, entre otros compuestos) presentes en plantas (Fernandes, Batista, Medeiros, Santos, & Medeiros, 2015; Susanti, Ratnawati, & Rudijanto, 2015).

Una mezcla de los patrones de ácido gálico y catequina fue analizada mediante HPLC para conocer los tiempos de retención que presentaba cada compuesto bajo las condiciones establecidas con un total de 28 min para ser eluidos. En la figura 10 se observa que el tiempo de retención para el ácido gálico fue de 8,3 min, mientras que para la catequina fue de 15 min, valores que fueron empleados para la identificación de estos compuestos en la muestra de tipo.

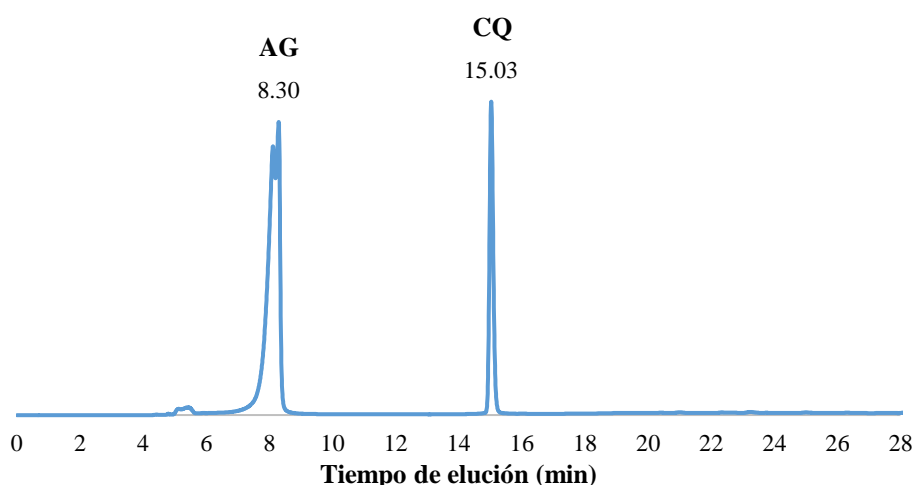


Figura 10. Cromatograma de los patrones de ácido gálico (AG) y catequina (CQ) obtenido a 280 nm.

En la investigación ejecutada por **Fernandes, Batista, Medeiros, Santos, & Medeiros, (2015)**, se determinó la presencia de ácido gálico en *Schinopsis brasiliensis* mediante HPLC, donde se obtuvo un tiempo de retención de 8,5 min para el ácido gálico utilizando como fase móvil ácido fosfórico: agua 0,05% (disolvente A) y metanol (disolvente B) con un flujo de 1 mL/min, además mencionan que el tiempo de retención del ácido gálico variará según la fase móvil utilizada y las condiciones de gradiente programadas, a pesar de esto, se obtuvo un tiempo de retención casi similar al obtenido en la mezcla de patrones utilizados.

En la figura 11, se observan los cromatogramas obtenidos del extracto de tipo registrados a diferentes longitudes de onda (214, 254, 280 y 366 nm), en ellos no se evidenció la presencia de ácido gálico ni de catequina lo cual se deduce de la ausencia de picos a 8,3 y 15 min, respectivamente. Sin embargo, se observó la presencia de otros compuestos fenólicos presentes en el extracto de tipo a los 5,6 y 22,1 min a 214 nm; 4,4, 22,1, 23,5 y 25,3 min a 254 nm; 22,1 a 280 nm y 22,1 y 25,3 a 366 nm, con intensidades relativas apreciables.

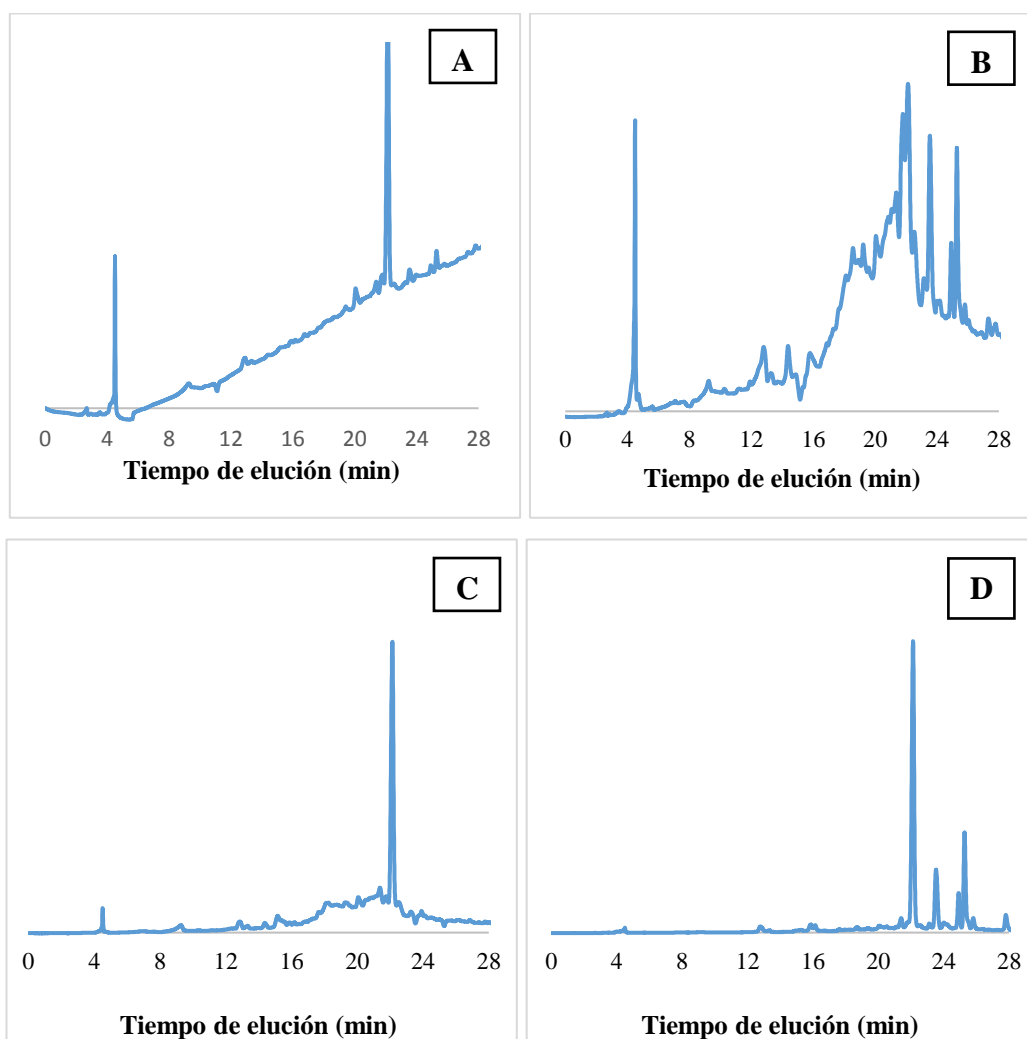


Figura 11. Cromatogramas del extracto de tipo a diferentes longitudes de onda. A) 214 nm, B) 254 nm, C) 280 nm y D) 366 nm.

3.1.3 Actividades biológicas

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales son los responsables de una gran variedad de propiedades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, entre otras), lo que ha permitido reemplazar varios productos sintéticos por productos naturales que desempeñen estos mismos efectos en el organismo de las personas que los consumen (Mbosso et al., 2018), sin los efectos colaterales que suelen estar asociados a los productos sintéticos.

3.1.3.1 Actividad antioxidante evaluada por el método TBARS

Las plantas medicinales suelen presentar propiedades antioxidantes por la presencia de metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides, los mismos que son considerados antioxidantes naturales que inhiben la oxidación lipídica y de esta manera pueden prevenir enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Kim et al., 2017).

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), empleando BHT, un antioxidante sintético, y el extracto de tipo a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL) (ANEXO D), también se realizó el análisis estadístico el cual indica que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras y el porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica, tal como se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de tipo

Muestra	Concentración (µg/mL)			
	100	200	500	1000
BHT	82,748 ^a ± 0,320	84,524 ^b ± 0,572	91,425 ^c ± 1,213	95,541 ^d ± 0,788
Tipo	34,208 ^w ± 1,332	50,262 ^x ± 2,558	52,482 ^y ± 0,641	68,987 ^z ± 0,806

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c, d} y ^{w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras (BHT y extracto de tipo) y el porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica ($p < 0,05$, Tukey Test)

El antioxidante sintético BHT fue utilizado como control positivo y al igual que el extracto presentó una relación dependiente de la concentración.

El mayor porcentaje de inhibición de la oxidación lipídica se registró a una concentración de 1000 µg/mL (95,541% para BHT y 68,987% para tipo), estos valores son comparables con la investigación realizada por **Adebiyi, Olayemi, Ning-hua, & Guang-zhi, (2017)**, con el extracto de las hojas de *Grewia carpinifolia* en el que se obtuvo una actividad del 84,56% a una concentración de 1000 µg/mL.

Almeida et al., (2017), indican que antioxidantes sintéticos entre los cuales se encuentra el butil hidroxitolueno (BHT) son utilizados en la industria alimentaria para inhibir la oxidación lipídica, sin embargo, estos compuestos presentan gran toxicidad, por este motivo se han buscado nuevas alternativas para sustituir estos compuestos por productos naturales a base de hierbas, plantas o frutas que desempeñen las mismas funciones de preservar los alimentos contra la oxidación sin afectar la salud de las personas que los consumen. En este sentido, el extracto de tipo podría convertirse en una buena alternativa para suplir antioxidantes sintéticos.

3.1.3.2 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de desnaturalización de proteínas

La inflamación es considerada como una respuesta biológica protectora a las lesiones del tejido vascular provocada por diversos agentes, es indispensable ya que si no se presentara no sería posible la cicatrización de heridas, por lo que elimina elementos nocivos e inicia un proceso de curación y recuperación del tejido (**Enciso & Arroyo, 2011**).

Una de las formas de aliviar el dolor y reducir la inflamación es a través del uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), entre los que se destaca al diclofenaco. Este fármaco se encuentra unido en un 99,5% a las proteínas séricas humanas particularmente a las albúminas que luego son eliminadas cuando ejercen su efecto antiinflamatorio, es por ello que se empleó albúmina de huevo para este modelo *in vitro* (**Zhai, Yu, Chen, & Lu, 2013; Mostafa et al., 2017; Martínez & Garrido, 2013**).

Se determinó el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina de huevo presentado por el extracto liofilizado de tipo y se lo comparó con la efectividad mostrada por el diclofenaco a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/mL) (tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina

Muestra	Concentración (µg/mL)			
	100	200	500	1000
Diclofenaco	41,908 ^a ± 0,559	66,349 ^b ± 0,745	88,037 ^c ± 2,704	100,00 ^d ± 0,908
Tipo	18,862 ^w ± 1,202	29,982 ^x ± 2,116	34,495 ^y ± 0,740	43,413 ^z ± 0,736

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b, c, d} y ^{w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras (diclofenaco y extracto de tipo) y el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina ($p < 0,05$, Tukey Test).

De acuerdo con el análisis estadístico (ANEXO E), se observa que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras (diclofenaco y extracto de tipo) y el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina respectivamente, además se observa que los valores obtenidos del extracto de tipo son menores a los valores del diclofenaco, ya que a una concentración de 1000 µg/mL el diclofenaco presentó un porcentaje de inhibición del 100%, mientras que el extracto de tipo a la misma concentración presentó un 43,41% de inhibición. Además, se observó que a medida que aumenta la concentración de las muestras también aumenta el porcentaje de actividad antiinflamatoria.

En el estudio realizado por **Moualek et al., (2016)** obtuvieron un porcentaje de inhibición por desnaturalización de proteínas de 74,28% a una concentración de 500 µg/mL para el extracto de *Arbutus unedo*, mientras que para el extracto de tipo se obtuvo un menor porcentaje de inhibición, lo cual podría estar relacionado con el tipo de compuestos extraídos en cada caso.

3.1.3.3 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC)

La lisis de los lisosomas y eritrocitos se produce durante la inflamación, en la que se liberan componentes que provocan diversos trastornos que impiden que se lleve a cabo el proceso de curación del tejido lesionado, por este motivo se emplean medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) cuyo efecto es estabilizar las membranas e inhibir la lisis de estas células (**Anosike, Obidoa, & Ezeanyika, 2012**).

Se evaluó la actividad antiinflamatoria tomando en consideración la protección de la membrana de los glóbulos rojos contra la lisis producida por hipotonicidad y calor. Este método se llevó a cabo con diclofenaco como control positivo y el extracto liofilizado de tipo a diferentes concentraciones, tal como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por el método HRBC de la muestra tipo frente a diclofenaco

Muestras	Concentración µg/mL	%Protección
Diclofenaco	25	96,982 ^b ± 0,695
	50	97,115 ^b ± 0,468
	75	96,882 ^b ± 0,601
	100	91,620 ^a ± 0,924
	200	92,947 ^a ± 3,473
Tipo	25	94,391 ^z ± 0,687
	50	94,398 ^z ± 0,116
	75	94,163 ^{yz} ± 0,044
	100	93,519 ^y ± 0,819
	200	91,937 ^x ± 0,376
	500	89,972 ^w ± 0,308
	1000	87,865 ^v ± 0,335

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar. Letras diferentes ^{a, b} y ^{v, w, x, y, z} indican que existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras (diclofenaco y extracto de tipo) y el porcentaje de protección ($p < 0,05$, Tukey Test)

De los valores obtenidos se observa que existe una relación inversa entre las concentraciones de las muestras (diclofenaco y extracto de tipo) y el porcentaje de actividad antiinflamatoria. Estos valores fueron aplicados a un análisis estadístico y prueba de rangos múltiples, los mismos que indican que existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas (ANEXO F), con excepción de las concentraciones de 25, 50 y 75 µg/mL para el caso del diclofenaco y 25 y 50 µg/mL para el extracto de tipo.

Se destaca el hecho de que a concentraciones bajas ($< 200 \mu\text{g/mL}$) el porcentaje de actividad antiinflamatoria del extracto de tipo resulta comparable con la del estándar lo cual indicaría que tipo presenta una alta actividad antiinflamatoria por este método, a diferencia de los valores obtenidos en la investigación de **Nagaharika & Rasheed, (2013)**, con las hojas de *Jatropha gossypifolia* ya que mediante el método de HRBC obtuvieron un porcentaje de protección del 56,8% utilizando el extracto acuoso a una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$, mientras que **Anosike, Obidoa, & Ezeanyika, (2012)**, obtuvieron un porcentaje de protección del 86,67% a una concentración de $800 \mu\text{g/mL}$ para el extracto de *Solanum aethiopicum*, en comparación con estas plantas el extracto de tipo presentó una actividad antiinflamatoria superior a una baja concentración.

Sacha, Faucon, Hamon, Ly, & Haltner, (2019), mencionan que el diclofenaco es ampliamente utilizado para reducir la inflamación, sin embargo, presenta efectos negativos en la salud de las personas después de su uso prolongado como problemas gastrointestinales, cardiovasculares y renales, por lo que se trata de buscar fuentes naturales que desempeñen el efecto antiinflamatorio deseado.

En este caso, el extracto de tipo presentó una elevada actividad antiinflamatoria por lo que se convierte en una alternativa natural a emplearse para contrarrestar diversas patologías humanas provocadas por este fenómeno.

3.1.4 Determinación de minerales

Las plantas medicinales presentan en su composición química diferentes minerales como Ca, Mg, Fe, Zn y otros que son importantes en el desarrollo y crecimiento de las plantas y de la misma manera son esenciales para la nutrición de las personas que las consumen ya que llevan a cabo diferentes funciones en el organismo (**Almeida, López, & Nogueira, 2002**). Sin embargo, las plantas pueden acumular metales pesados del medio ambiente por su capacidad de tolerar iones tóxicos, los mismos que pueden ingresar a la cadena alimentaria y provocar efectos adversos para la salud (**Street, 2012**).

Mediante espectrofotometría de absorción atómica por el método de la llama y horno de grafito se determinó el contenido de minerales y metales pesados presentes en las hojas de tipo y los resultados se expresaron en mg del mineral/kg base seca (Tabla 10).

Tabla 10. Contenido de minerales y metales pesados presentes en las hojas de tipo

Mineral	Concentración (mg/kg base seca)
Zn	39,862 ± 13,804
Cu	13,012 ± 2,639
Fe	91,542 ± 4,704
Ca	13174,749 ± 221,654
Mg	5771,208 ± 120,117
Mn	167,428 ± 5,592
Co	0,285 ± 0,042
Pb	0,276 ± 0,015
Ni	0,432 ± 0,028

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental (UODIDE – ICIA, Proyecto de Canje de Deuda)

Los valores representan la media de 3 mediciones con su respectiva desviación estándar

De los minerales analizados, se destaca la concentración de Ca y Mg, seguidos del Mn, Fe, Zn y Cu.

El calcio es un mineral esencial para las plantas puesto que se encarga de estabilizar la pared y membrana celular, participa en la división y equilibrio iónico (**Díaz, Cayón, & Mira, 2007**), de igual manera desempeña importantes funciones en el organismo de las personas que los consumen dado que es esencial para el crecimiento y fortalecimiento de huesos y dientes, entre otras funciones (**Pu, Chen, & Xue, 2016**). Las hojas de tipo presentaron una concentración de 13174,749 mg/kg base seca, valor que resulta inferior al detallado por **Yapuchura, (2010)** con una concentración de 22370 mg/kg base seca, esto se debe a las variaciones en las condiciones y composición del suelo donde creció tipo.

El magnesio es un nutriente esencial para las plantas ya que interviene en varias funciones celulares como la síntesis de proteínas y como cofactor de varias enzimas; del mismo modo es esencial para el ser humano dado que interviene en la conformación de macromoléculas (**Guo, Nazim, Liang, & Yang, 2015**). La concentración que presentó el magnesio en la muestra de tipo fue de 5771,208 mg/kg base seca.

El manganeso es un elemento importante en las plantas ya que interviene en la fotosíntesis y diversas reacciones redox (**Eisenhut et al., 2018**); en el ser humano es

indispensable en la formación de cartílagos y huesos; además, participa en varios sistemas enzimáticos (**Rajoriya, Brahmania, & Feld, 2019**). En la muestra de tipo se obtuvo una concentración de manganeso de 167,428 mg/kg base seca.

El hierro es un elemento importante en el crecimiento de la planta, interviene en varios procesos celulares entre ellos la fotosíntesis (**Kobayashi, Nozoye, & Nishizawa, 2019**). En el ser humano desempeña un papel importante en procesos celulares que involucran hemoglobina, proteínas, enzimas y para el desarrollo de tejidos (**Chuanusorn, Webb, Macey, Pootrakul, & Pierre, 1997; Blazewicz, Formanowicz, Formanowicz, Sackmann, & Sijkowski, 2009**). El hierro presentó una concentración de 91,542 mg/kg base seca en la muestra de tipo, valor superior al reportado por **Yapuchura, (2010)** (224 mg/kg base seca).

El zinc es un oligoelemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas; en el organismo humano interactúa con enzimas y proteínas y cumple un rol importante en el sistema inmunológico (**Trame, Wessels, Haase, & Rink, 2018**). Según **Noulas, Tziouvalekas, & Karyotis, (2018)**, el límite permisible de Zn en plantas es de 30 – 100 mg/kg base seca. La concentración determinada para este elemento en hojas de tipo (39,862 mg/kg base seca) se encuentra dentro del rango establecido.

El cobre es un elemento esencial en las plantas, principalmente para proteínas y enzimas, el exceso de este elemento puede ocasionar problemas en el crecimiento de la planta y el desarrollo de procesos celulares (**Yruela, 2005**). El cobre se presentó en la muestra de tipo con una concentración de 13,012 mg/kg base seca. La **Unión Europea, (2014)**, indica que el límite máximo permisible del cobre en plantas de consumo humano es de 10 mg/kg base seca, lo que indica que la muestra de tipo está ligeramente por encima del rango establecido.

Los metales pesados analizados fueron Pb, Co y Ni, los cuales en concentraciones superiores a 0,5 mg/kg base seca resultan perjudiciales para la salud de las personas.

El plomo es considerado un metal pesado debido a su maleabilidad y ductibilidad. Este metal es muy peligroso ya que puede ser inhalado, absorbido a través de la piel o por la ingesta de comida y aire, lo que provoca efectos adversos en la salud del ser humano (**Nava & Méndez, 2011**). Se obtuvo una concentración de plomo de 0,276 mg/kg base seca en la muestra de tipo y **Reyes, Vergara, Torres, Díaz, & González, (2016)**,

mencionan que el límite máximo permisible de concentración del Pb en plantas medicinales aptas para el consumo humano es de 0,3 mg/kg base seca, lo cual indica que la muestra de tipo está dentro del rango establecido.

Al igual que el plomo, el cobalto y el níquel son metales pesados que se encuentran en las plantas debido a que las absorben del suelo, sin embargo, una alta concentración de estos metales puede provocar graves daños en la salud de las personas. La concentración que presentó cobalto en la muestra de tipo fue de 0,285 mg/kg base seca, mientras que la concentración de níquel fue de 0,432 mg/kg base seca, que son valores relativamente bajos.

3.1.5 Verificación de hipótesis

Mediante el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples se evidenció que existe diferencias significativas entre las condiciones de extracción de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) y el contenido de polifenoles y flavonoides; además se comprobó que el extracto de tipo (*Minthostachys mollis* Griseb) presenta actividades biológicas las mismas que mostraron diferencias significativas a las diversas concentraciones probadas del extracto, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de tipo utilizando como patrón ácido gálico para el contenido total de polifenoles ($70,115 \pm 0,440$ mg equivalente de ácido gálico/ g muestra seca) analizado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu y el contenido de flavonoides evaluado por el método de cloruro de aluminio tomando como patrón catequina ($64,967 \pm 0,858$ mg equivalente de catequina/g muestra seca), estos valores se obtuvieron a través de un proceso de optimización de la extracción en hojas de tipo con diferentes factores (disolvente, temperatura, tiempo y número de extracciones), cuyas condiciones óptimas fueron metanol 50%, 50 °C y 10 min con 4 extracciones sucesivas para obtener el contenido máximo de estos compuestos.
- El porcentaje de actividad antiinflamatoria que presentó el extracto de tipo fue mayor en el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) con un $94,39\% \pm 0,116$ a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, en comparación a lo obtenido mediante el método de desnaturalización de proteínas con un porcentaje de $43,41\% \pm 0,74$ a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, al ser un porcentaje elevado tipo se convertiría en una alternativa natural para contrarrestar el efecto inflamatorio.
- Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto de tipo mediante el método de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) obteniéndose un porcentaje de inhibición del $68,99\% \pm 0,81$ a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, esta capacidad depende de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, especialmente los flavonoides que protegen a las células contra daños oxidativos por la presencia de radicales libres.

- Se determinó el contenido de minerales presentes en las hojas de tipo mediante espectrofotometría de absorción atómica, se obtuvo que tipo presentó Mn, Fe, Zn y Cu y en mayor concentración Ca y Mg que son minerales esenciales para el desempeño de funciones importantes en el organismo del ser humano. Se reportó además un bajo contenido de metales pesados (Pb, Co y Ni), los cuales se encuentran dentro de límite permisible, por lo que tipo se convierte en una fuente mineral apta para el consumo humano.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda ampliar la caracterización del extracto de tipo usando una variedad de estándares para polifenoles y flavonoides con la finalidad de identificar los compuestos presentes en el extracto y su respectiva concentración.
- Se recomienda realizar estudios *in vivo* de las actividades biológicas evaluadas: antioxidante y antiinflamatoria para comprobar los resultados obtenidos a partir del extracto de tipo.
- Se recomienda evaluar otras actividades biológicas como anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antidiarreica, entre otras, que podrían presentarse en el extracto de tipo para contrarrestar otras patologías.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, M., Saeed, F., Muhammad, F., Afzaal, M., Tufail, T., Shakeel, M., ... Razul, H. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Acostupa, F. D. M., Chávez, A., Mejía, S. E., Pauta, M. M., & Tucunango, J. L. (2017). Efecto antiinflamatorio in vitro de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(2), 79–85.
- Adebiyi, O., Olayemi, F., Ning-hua, T., & Guang-zhi, Z. (2017). In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.12.003>
- Aimacaña, V. (2010). *Inventario de las especies vegetales nativas del Cerro Teligote Cantón Pelileo, Provincia del Tungurahua desde los 3200 hasta los 3420 m.s.n.m. (Tesis de pregrado)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)
- Alkire, B. H., Tucker, A. O., & Maciarello, M. J. (1994). Tipo, *minthostachys mollis* (lamiaceae): an ecuadorian mint. *Economic Botany*, 48(1), 60–64. <https://doi.org/10.1007/BF02901380>
- Almeida, J., Soares, A., Serafini, L., Pereira, D., Bianchin, M., De Moura, C., ... Carpes, S. (2017). Lyophilized bee pollen extract : A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *Food Science and Technology*, 76, 299–235. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017>
- Almeida, M., López, M., & Nogueira, C. (2002). Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. *Ciencia, Tecnología y Alimentación*, 22(1), 94–97.

- Anosike, C., Obidoa, O., & Ezeanyika, L. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(76), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-76>
- Barros, L., Heleno, S., Carvalho, A., & Ferreira, I. (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants : Vitamins and phenolics. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.024>
- Blainski, A., López, G., & Palazzo de Mello, J. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18, 6852–6864. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Blazewicz, J., Formanowicz, D., Formanowicz, P., Sackmann, A., & Sijkowski, M. (2009). Modeling the process of human body iron homeostasis using a variant of timed petri nets. *Discrete Applied Mathematics*, 157(10), 2221–2231. <https://doi.org/10.1016/j.dam.2008.06.053>
- Bravo, L. (1998). Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Bussmann, R., & Sharon, D. (2006). Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(11), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-44>
- Cano, C. (2007). *Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. (Tesis de Posgrado)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú.
- Carhuapoma, M., López, S., Roque, M., Velapatiño, B., Bell, C., & Whu, D. (2009). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Ruyaq Muña,” 12(2), 83–89.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y

- aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293.
- Cerón, I., Higueta, J., & Cardona, C. (2010). Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*, 5, 17–26.
- Chandra, K., Pareta, S., Harwansh, R., & Kumar, J. (2010). Traditional approaches towards standardization of herbal medicines. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(11), 372–379.
- Chen, L., Cheng, C., & Liang, J. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin – Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Chua-anusorn, W., Webb, J., Macey, D., Pootrakul, P., & Pierre, T. (1997). The effect of histological processing on the form of iron in iron-loaded human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1360(3), 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00009-4)
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Liu, R. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Díaz, A., Cayón, G., & Mira, J. (2007). Metabolismo del calcio y su relación con la “mancha de madurez” del fruto de banano. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 280–287.
- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*, 16(1), 126–131.
- Eisenhut, M., Hoecker, N., Schmidt, S. B., Basgaran, R. M., Flachbart, S., Jahns, P., ... Schneider, A. (2018). The plastid envelope chloroplast manganese transporter is essential for manganese homeostasis in arabidopsis. *Molecular Plant*, 11(7),

955–969. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.04.008>

Enciso, E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas, 2(4), 231–237.

Europea, U. (2014). Metales pesados: contenidos máximos en metales pesados en productos alimenticios.

Everette, J., Bryant, Q., Green, A., Abbey, Y., Wangila, G., & Walker, R. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin - Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>

Fernandes, F., Batista, R., Medeiros, F., Santos, F., & Medeiros, A. (2015). Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(3), 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.006>

Fonseca, R. (2017). *Flavonoides y actividad antioxidante en la especie Ilex guayusa (Loes.)*. Tesis de pregrado. Universidad Politécnica Salesiana - Sede Quito.

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327–332.

García, C., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86–96.

García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu*. (Tesis de posgrado). Universidad Politécnica de Valencia.

García, P., Morales, A., Segura, A., & Fernández, A. (2010). Phenolic compound extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15, 8813–8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>

- Guillarme, D., Casetta, C., Bicchi, C., & Veuthey, J. L. (2010). High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6882–6890. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.060>
- Guo, W., Nazim, H., Liang, Z., & Yang, D. (2015). Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *The Crop Journal*, 4(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.11.003>
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal, 1–5.
- Hatipoglu, G., Sökmen, M., Bektas, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E., & Sahin, H. (2013). Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, 43, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.028>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Ikawa, M., Schaper, T., Dollard, C., & Sasner, J. (2003). Utilization of Folin – Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1811–1815. <https://doi.org/10.1021/jf021099r>
- Iordache, A., Culea, M., Gherman, C., & Cozar, O. (2009). Characterization of some plant extracts by GC – MS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B*, 267(2), 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2008.10.021>
- Jardine, D., Antolovich, M., Prenzler, P., & Robards, K. (2002). Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS) Investigation of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1720–1724. <https://doi.org/10.1021/jf011336a>

- Jiménez, M., García, I., & Rojas, S. (2014). Potencial biológico de especies medicinales del género *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(4).
- Jovanovic, A., Đorđević, V., Zdunic, G., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Godevac, D., & Bugarski, B. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat and ultrasound assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>
- Kashmiri, M. A., Yasmin, S., Ahmad, M., & Mohy-ud-din, A. (2009). Characterization, compositional studies, antioxidant and antibacterial activities of seeds of *Abutilon indicum* and *Abutilon muticum*, grown wild in Pakistan. *Acta Chim. Slov*, 56, 345–352.
- Kim, H., Park, C., Varghese, R., Yeon, J., Kim, Y., & Sung, G. (2017). In-vitro antioxidative, antiinflammatory properties of *Aurea helianthus* leaf extract a Korean traditional medicinal plant. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(8), 1943–1947. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.046>
- Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. (2019). Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439>
- Kota, K., Sharma, S., & Tahashildar, J. (2018). A scientific validation of In vitro anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. by human red blood cell membrane stabilization. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 6(7), 2430–2433. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20182830>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* Linn. var. *alba*. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(2), 176–179.
- Lima, É., & Abdalla, D. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37(3), 293–303.

- Mainasara, M. M., Sanusi, S. B., Maishanu, H. M., & Ismail, T. (2017). Antibacterial activity and nutritional content of fresh and dried date fruits (Phoenix Dactylifera). *International Journal of Science and Healthcare Research*, 2(March), 15–20.
- Malagón, O., Vila, R., Iglesias, J., Zaragoza, T., & Cañigüeral, S. (2003). Composition of the essential oils of four medicinal plants from Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6), 527–531. <https://doi.org/10.1002/ffj.1262>
- Martínez, E., & Garrido, O. (2013). Farmacocinética: antiulcerosos y antiinflamatorios. *Revista Del Hospital Juárez de México*, 80(1), 41–53.
- Matkowski, A., & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.04.004>
- Mbosso, J., Siwe, X., Laure, E., Meyer, F., Wintjens, R., Isaacs, M., ... Blaise, A. (2018). Biological activities of plant extracts from *Ficus elastica* and *Selaginella vogelli*: An antimalarial, antitrypanosomal and cytotoxicity evaluation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.002>
- Mostafa, E., Abdel-rahman, A. A., Mohamed, S., Kaed, F., Abdulazim, W., Abou-ouda, H. S., & Sakr, A. (2017). Formulation and pharmacokinetics of multi-layered matrix tablets: biphasic delivery of diclofenac. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(5), 688–695. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.10.004>
- Moualek, I., Aiche, G. I., Guechaoui, N. M., Lahcene, S., & Houali, K. (2016). Antioxiant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 937–944. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.002>
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523–1542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>

- Nagaharika, Y., kalyani, V., Rasheed, S., & Ramadoskarthikeyan. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60118-3)
- Nagaharika, Y., & Rasheed, S. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60118-3)
- Nava, C., & Méndez, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Neurociencia*, 16(3), 140–147.
- Nijveldt, R., Van Nood, E., Van Hoorn, D., Boelens, P., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and, 418–425.
- Noulas, C., Tziouvalekas, M., & Karyotis, T. (2018). Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.009>
- Ojeda, M., Arroyo, A., Borgogno, P., Biderbost, E., & Balzarini, M. (2004). Yield of peperina (*Mintostachys mollis* (Kunth.) Griseb.) populations in the year following planting: response to cropping. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2, 393–399.
- Osorio, F., & Meireles, A. (2013). Recent applications of pressurized fluid extraction: curcuminoids extraction with pressurized liquids. *Food and Public Health*, 3(6), 289–303. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20130306.05>
- Padilla, F., Rincón, A., & Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Scielo*, 58(1), 303–308.
- Palombini, S. V., Claus, T., Maruyama, S. A., Gohara, A. K., Henrique, A., Souza, P., ... Matsushita, M. (2013). Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science and Technology*, 33(June), 339–344.
- Parets, L., Alechaga, É., Núñez, O., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., & Puignou, L.

- (2016). Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural ext. *Analytical Methods*, 8(22), 4363–4378. <https://doi.org/10.1039/c6ay00929h>
- Pekal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal. Methods*, 7, 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Pineda, V. (2013). *Señalética turística y su contribución al desarrollo turístico de la comunidad teligote, del cantón Pelileo Provincia de Tungurahua. (Tesis de pregrado)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Pino, S., Prieto, S., Pérez, M., & Molina, J. (2004). Género Erythrina: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2), 252–258.
- Pu, F., Chen, N., & Xue, S. (2016). Calcium intake, calcium homeostasis and health. *Food Science and Human Wellness*, 5(1), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.01.001>
- Rabelo, R., Machado, M., Martínez, J., & Hubinger, M. (2016). Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes. *Journal of Food Engineering*, 178, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.018>
- Rajoriya, N., Brahmania, M., & Feld, J. J. (2019). Implications of manganese in chronic acquired hepatocerebral degeneration. *Annals of Hepatology*, 18(1), 274–278. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7938>
- Repo, R., & Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Rev. Soc. Quím. Perú*, 74(2), 85–99.

- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77.
- Ricco, R., Wagner, M., & 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.
- Ríos, J., & Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
- Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). Useful plants of Ecuador: applications, challenges and perspectives, 29.
- Rivero, C., Quiñones, J., Pérez, A., Carvajal, C., Rivas, M., Cid, G., ... Ruiz, K. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Biotecnología Vegetal*, 18(1), 47–56.
- Rochetti, B., Corrêa, M., Pacífico, M., Neves, R., Thimoteo, D., Martinez, J., & Rostagno, M. (2018). Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics - Sonochemistry*, 48(April), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>
- Rodrigues, L. (2016). *Síntese de ácidos e ésteres fosfónicos e avaliação das suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. (Tese mestrado)*. Universidade de Évora.
- Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*, 212–218.
- Roldán, J., Frauca, C., & Dueñas, A. (2003). Intoxicación por alcoholes. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(1), 129–139.

- Sacha, M., Faucon, L., Hamon, E., Ly, I., & Haltner, E. (2019). Biomedicine & pharmacotherapy ex vivo transdermal absorption of a liposome formulation of diclofenac. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 785–790. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.079>
- Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, *114*(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
- Scandaliaris, M., Fuentes, E., & Lovey, R. (2007). Dos especies de Lamiáceas comercializadas en Córdoba (Argentina) bajo el nombre de “peperina.” *Multequina*, *16*, 73–81.
- Schmidt, A. (2007). Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to unravel species relationships and delimitations in *Minthostachys* (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *153*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00588.x>
- Schmidt, A. (2008). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, *118*(3), 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.030>
- Sellapan, S., & Akoh, C. (2002). Flavonoids and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown *Vidalia* Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5338–5342. <https://doi.org/10.1021/jf020333a>
- Sotelo, I., Casas, N., & Camelo, G. (2010). Borojó (*Borojoa patinoi*): Fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae*, *17*(3), 329–336.
- Soto, M., & 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 sideroxylla*. *SciELO*, *18*(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Street, R. (2012). Heavy metals in medicinal plant products — An African perspective. *South African Journal of Botany*, *82*, 67–74.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.07.013>

Susanti, E., Ratnawati, R., & Rudijanto, A. (2015). Quantitative analyse of catechins from green tea GMB-4 clone using HPLC and LC-MS/MS. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1046–1050. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.013>

Tinitana, F., Ríos, M., Romero, J., De la Cruz, M., & Pardo, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(29), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>

Torrenegra, M., Granados, C., Durán, M., León, G., Yáñez, X., & Pájaro, N. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes leucoxylla* de Pamplona (Colombia), 20(1), 69–74.

Trame, S., Wessels, I., Haase, H., & Rink, L. (2018). A short 18 items food frequency questionnaire biochemically validated to estimate zinc status in humans. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.02.020>

Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Štefan, M. B., Alegro, A., Koszegi, T., & Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from croatia. *Molecules*, 16(2), 1454–1470. <https://doi.org/10.3390/molecules16021454>

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00300-5)

Yapuchura, R. (2010). *Estudio de los componentes antioxidante de las hojas de muña (Minthostachys mollis (Kunth) Griseb.) e inca muña (Clinopodium bolivianum (Benth.) Kuntze).* (Tesis de Posgrado). Universidad Nacional Agraria La Molina.

Lima - Perú. Retrieved from http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1700/TAL_15-124-TM.pdf?sequence=1

Yruela, I. (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(1), 145–156.

Yu, M., Wang, B., Qi, Z., Xin, G., & Li, W. (2019). Response surface method was used to optimize the ultrasonic assisted extraction of flavonoids from *Crinum asiaticum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 0–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.09.018>

Zhai, X., Yu, Y., Chen, F., & Lu, Y. (2013). Comparative bioavailability and tolerability of single and multiple doses of 2 diclofenac sodium sustained-release tablet formulations in fasting, healthy chinese male volunteers. *Current Therapeutic Research*, *75*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.curtheres.2013.09.001>

ANEXOS

**ANEXO A. DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN
DE POLIFENOLES TOTALES**

Curva de Calibración de ácido gálico

Tabla 11. Preparación de la solución stock de ácido gálico

Sol. ácido gálico		Cantidades	Unidades
Sol. stock	Concentración stock	4000	mg/L
	Volumen sol. stock	0,05	L
	mg de ácido gálico	200	mg
	PM ácido gálico	170,12	g/mol
	Volumen de muestra	0,0001	L
Sol. intermedia	Solución intermedia	200	mg/L
	Volumen de sol.	0,01	L
	Volumen de la stock	0,5	ml

Tabla 12. Preparación de las diferentes concentraciones para la curva de calibración
de ácido gálico

Concentración Ácido gálico (mg/L)	Volumen de aforo (L)	Cantidad de ácido (ml)	Cantidad de ácido (ul)	Volumen con Follin (L)	Abs. 760 nm
0	0,005	0,000	0	0,005	0,013
1	0,005	0,025	25	0,005	0,155
2	0,005	0,050	50	0,005	0,284
3	0,005	0,075	75	0,005	0,402
4	0,005	0,100	100	0,005	0,483
5	0,005	0,125	125	0,005	0,586
6	0,005	0,150	150	0,005	0,696

Optimización del Disolvente

Tabla 13. Optimización del disolvente para polifenoles

OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE						
Disolvente	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 760nm	Contenido polifenoles (mg GAE /g muestra)	Promedio (mg GAE /g muestra)
Agua	Tipo.R1	0,1000	1	0,585	24,492	24,672
	Tipo.R2	0,1000	1	0,575	24,042	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,607	25,482	
Etanol 75%	Tipo.R1	0,1000	2	0,372	29,807	29,327
	Tipo.R2	0,1000	2	0,365	29,177	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,363	28,997	
Etanol 50%	Tipo.R1	0,1000	2	0,339	26,836	26,116
	Tipo.R2	0,1000	2	0,309	24,135	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,345	27,376	
Etanol 25%	Tipo.R1	0,1000	1	0,593	24,852	23,337
	Tipo.R2	0,1000	1	0,544	22,646	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,541	22,511	
Etanol puro	Tipo.R1	0,1000	1	0,121	3,605	3,064
	Tipo.R2	0,1000	1	0,091	2,254	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,115	3,334	
Metanol 25%	Tipo.R1	0,1000	1	0,567	23,682	23,126
	Tipo.R2	0,1000	1	0,565	23,592	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,532	22,106	
Metanol 50%	Tipo.R1	0,1000	2	0,437	35,659	35,149
	Tipo.R2	0,1000	2	0,445	36,379	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,412	33,408	
Metanol 75%	Tipo.R1	0,1000	1	0,552	23,006	22,616
	Tipo.R2	0,1000	1	0,547	22,781	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,531	22,061	
Metanol puro	Tipo.R1	0,1000	1	0,620	26,068	25,482
	Tipo.R2	0,1000	1	0,576	24,087	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,625	26,293	

Influencia del disolvente sobre el contenido de polifenoles

Tabla 14. Anova para el contenido de polifenoles por disolvente

<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	1800,42	8	225,053	186,17	0,0000
Intra grupos	21,7595	18	1,20886		
Total (Corr.)	1822,18	26			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de polifenoles entre un nivel de disolvente y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 15. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por disolvente

<i>Disolvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TEP	3	3,06433	X
TM75%	3	22,616	X
TM25%	3	23,1267	XX
TE25%	3	23,3363	XX
TAgua	3	24,672	XX
TMP	3	25,4827	X
TE50%	3	26,1157	X
TE75%	3	29,327	X
TM50%	3	35,1487	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización de la Temperatura

Tabla 16. Optimización de la temperatura para polifenoles

OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 760nm	Contenido polifenoles (mg GAE/g muestra)	Promedio (mg GAE/g muestra)
Metanol 50% T: 30 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,345	27,376	25,566
	Tipo.R2	0,1000	2	0,346	27,466	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,317	24,855	
Metanol 50% T: 40 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,417	33,859	33,648
	Tipo.R2	0,1000	2	0,419	34,039	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,408	33,048	
Metanol 50% T: 50 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,437	35,659	35,149
	Tipo.R2	0,1000	2	0,445	36,379	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,412	33,408	
Metanol 50% T: 60 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,483	39,801	40,431
	Tipo.R2	0,1000	2	0,486	40,071	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,501	41,421	

Influencia de la temperatura sobre el contenido de polifenoles

Tabla 17. Anova para el contenido de polifenoles por temperatura

<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	294,178	3	98,0593	69,66	0,0000
Intra grupos	11,2617	8	1,40771		
Total (Corr.)	305,44	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de polifenoles entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 18. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por temperatura (Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD)

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TM30°C	3	26,5657	X
TM40°C	3	33,6487	X
TM50°C	3	35,1487	X
TM60°C	3	40,431	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización del Tiempo

Tabla 19. Optimización del tiempo para polifenoles

OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 760nm	Contenido polifenoles (mg GAE/g muestra)	Promedio (mg GAE/g muestra)
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 5 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,437	35,659	35,089
	Tipo.R2	0,1000	2	0,443	36,199	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,412	33,408	
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 10 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,539	44,842	45,083
	Tipo.R2	0,1000	2	0,548	45,653	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,538	44,752	
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 20 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,485	39,981	39,921
	Tipo.R2	0,1000	2	0,480	39,531	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,488	40,251	
Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 5 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,483	39,801	40,431
	Tipo.R2	0,1000	2	0,486	40,071	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,501	41,421	
Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 10 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,504	41,691	42,171
	Tipo.R2	0,1000	2	0,517	42,862	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,507	41,961	

Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 20 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,445	36,379	36,770
	Tipo.R2	0,1000	2	0,463	38,000	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,440	35,929	

Influencia del tiempo sobre el contenido de polifenoles

Tabla 20. Anova para el contenido de polifenoles por tiempo

<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	195,742	5	39,1484	48,08	0,0000
Intra grupos	9,77154	12	0,814295		
Total (Corr.)	205,513	17			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de polifenoles entre un nivel de tiempo y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 21. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por tiempo

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M50°C5min	3	35,0887	X
M60°C20min	3	36,7693	X
M50°C20min	3	39,921	X
M60°C5min	3	40,431	X
M60°C10min	3	42,1713	X
M50°C10min	3	45,0823	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización del Número de extracciones

Tabla 22. Optimización del número de extracciones para polifenoles

OPTIMIZACIÓN DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 500nm	Contenido polifenoles (mg GAE /g muestra)	Promedio (mg GAE/g muestra)
Metanol 50% - 50 °C - 10 min	Tipo1.E1	0,1000	2	0,539	44,842	45,083
	Tipo2.E1	0,1000	2	0,548	45,653	
	Tipo3.E1	0,1000	2	0,538	44,752	
	Tipo1.E2	0,1000	1	0,556	23,186	23,622
	Tipo2.E2	0,1000	1	0,561	23,412	
	Tipo3.E2	0,1000	1	0,58	24,267	
	Tipo1.E3	0,1000	1	0,275	10,537	10,762
	Tipo2.E3	0,1000	1	0,267	10,177	
	Tipo3.E3	0,1000	1	0,298	11,572	
	Tipo1.E4	0,1000	1	0,093	2,344	2,629
	Tipo2.E4	0,1000	1	0,103	2,794	
	Tipo3.E4	0,1000	1	0,102	2,749	
	Tipo1.E5	0,1000	1	0,052	0,498	0,483
	Tipo2.E5	0,1000	1	0,046	0,228	
	Tipo3.E5	0,1000	1	0,057	0,723	
Metanol 50% - 60 °C - 10 min	Tipo1.E1	0,1000	2	0,504	41,691	42,171
	Tipo2.E1	0,1000	2	0,517	42,862	
	Tipo3.E1	0,1000	2	0,507	41,961	
	Tipo1.E2	0,1000	1	0,569	23,772	24,162
	Tipo2.E2	0,1000	1	0,579	24,222	
	Tipo3.E2	0,1000	1	0,585	24,492	
	Tipo1.E3	0,1000	1	0,222	8,151	8,256
	Tipo2.E3	0,1000	1	0,221	8,106	
	Tipo3.E3	0,1000	1	0,23	8,511	
	Tipo1.E4	0,1000	1	0,081	1,804	1,864

	Tipo2.E4	0,1000	1	0,085	1,984	
	Tipo3.E4	0,1000	1	0,081	1,804	
	Tipo1.E5	0,1000	1	0,026	-0,672	-0,672
	Tipo2.E5	0,1000	1	0,028	-0,582	
	Tipo3.E5	0,1000	1	0,024	-0,762	

Tabla 23. Evaluación del número de extracciones

N° de extracción	50 °C – 10 min		60°C – 10 min	
	Cont. de polifenoles (mg ácido gálico equivalente/g muestra)	Σ [mg-CQ/g muestra]	Cont. de polifenoles (mg ácido gálico equivalente/g muestra)	Σ [mg-CQ/g muestra]
E1	45,083	45,083	42,171	42,171
E2	23,622	68,704	24,162	66,333
E3	10,762	79,466	8,256	74,590
E4	2,629	82,095	1,864	76,453
E5	0,483	82,579	-0,672	75,781

Influencia del número de disolventes sobre el contenido de polifenoles

Tabla 24. Anova para el contenido de polifenoles por número de extracciones

<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	7919,73	9	879,97	4901,87	0,0000
Intra grupos	3,59034	20	0,179517		
Total (Corr.)	7923,32	29			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de polifenoles entre un nivel de número de extracciones y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 25. Prueba de rangos múltiples para el contenido de polifenoles por número de extracciones

<i>Extracciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M60°C10min E5	3	-0,672	X
M50°C10min E5	3	0,483	X
M60°C10min E4	3	1,864	X
M50°C10min E4	3	2,629	X
M60°C10min E3	3	8,256	X
M50°C10min E3	3	10,762	X
M50°C10min E2	3	23,6217	X
M60°C10min E2	3	24,162	X
M60°C10min E1	3	42,1713	X
M50°C10min E1	3	45,0823	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

**ANEXO B. DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN
DE FLAVONOIDES TOTALES**

Curva de Calibración de catequina

Tabla 26. Preparación de la solución stock de catequina

Sol. catequina		Cantidades	Unidades
Sol. stock	Concentración stock	5000	mg/L
	Volumen sol. stock	0,01	L
	mg de catequina	50	mg
	PM catequina	290,26	g/mol

Tabla 27. Preparación de las soluciones de la curva de calibración de catequina

Concentración de catequina (mg/L)	Alícuota (µL)	Aforo (mL)
0	0	5
5	5	5
10	10	5
15	15	5
20	20	5
25	25	5
30	30	5

Tabla 28. Datos de la curva de calibración de catequina en metanol

Concentración de catequina (mg/L)	Catequina en Metanol Abs. 500nm
0	0,000
5	0,147
10	0,276
15	0,442
20	0,597
25	0,820
30	0,924

Optimización del Disolvente

Tabla 29. Optimización del disolvente para flavonoides

OPTIMIZACIÓN DEL DISOLVENTE						
Disolvente	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 500nm	Cont. flavonoides (mg eq catequina /g muestra)	Promedio (mg eq catequina/g muestra)
Agua	Tipo.R1	0,1000	1	0,756	24,973	24,848
	Tipo.R2	0,1000	1	0,737	24,327	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,764	25,244	
Etanol 75%	Tipo.R1	0,1000	2	0,442	28,622	29,097
	Tipo.R2	0,1000	2	0,451	29,233	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,454	29,437	
Etanol 50%	Tipo.R1	0,1000	2	0,388	24,955	25,317
	Tipo.R2	0,1000	2	0,389	25,023	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,403	25,973	
Etanol 25%	Tipo.R1	0,1000	1	0,687	22,630	21,577
	Tipo.R2	0,1000	1	0,646	21,238	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,635	20,864	
Etanol puro	Tipo.R1	0,1000	1	0,177	5,313	4,645
	Tipo.R2	0,1000	1	0,146	4,260	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,149	4,362	
Metanol 25%	Tipo.R1	0,1000	2	0,540	32,951	32,888
	Tipo.R2	0,1000	2	0,516	31,437	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,561	34,276	
Metanol 50%	Tipo.R1	0,1000	2	0,683	41,971	41,593
	Tipo.R2	0,1000	2	0,657	40,331	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,691	42,476	
Metanol 75%	Tipo.R1	0,1000	1	0,741	22,815	22,710
	Tipo.R2	0,1000	1	0,765	23,572	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,707	21,743	
Metanol puro	Tipo.R1	0,1000	1	0,831	25,653	24,644
	Tipo.R2	0,1000	1	0,762	23,477	
	Tipo.R3	0,1000	1	0,804	24,802	

Influencia del disolvente sobre el contenido de flavonoides

Tabla 30. Anova para el contenido de flavonoides por disolvente

<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	2355,79	8	294,474	365,47	0,0000
Intra grupos	14,5033	18	0,805738		
Total (Corr.)	2370,29	26			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de flavonoides entre un nivel de disolvente y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 31. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por disolvente

<i>Disolvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TEP	3	4,645	X
TE25%	3	21,5773	X
TM75%	3	22,71	X
TMP	3	24,644	X
TAgua	3	24,848	X
TE50%	3	25,317	X
TE75%	3	29,0973	X
TM25%	3	32,888	X
TM50%	3	41,5927	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización de la Temperatura

Tabla 32. Optimización de la temperatura para flavonoides

OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 500nm	Cont. flavonoides (mg eq catequina/g muestra)	Promedio (mg eq catequina /g muestra)
Metanol 50% T: 30 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,533	32,510	32,110
	Tipo.R2	0,1000	2	0,511	31,122	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,536	32,699	
Metanol 50% T: 40 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,608	37,240	37,535
	Tipo.R2	0,1000	2	0,619	37,934	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,611	37,430	
Metanol 50% T: 50 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,675	41,467	40,731
	Tipo.R2	0,1000	2	0,660	40,520	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,655	40,205	
Metanol 50% T: 60 °C	Tipo.R1	0,1000	2	0,631	38,691	39,553
	Tipo.R2	0,1000	2	0,645	39,574	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,658	40,394	

Influencia de la temperatura sobre el contenido de flavonoides

Tabla 33. Anova para el contenido de flavonoides por temperatura

<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	131,101	3	43,7005	86,24	0,0000
Intra grupos	4,05397	8	0,506747		
Total (Corr.)	135,155	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de flavonoides entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 34. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por temperatura (Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD)

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
TM30°C	3	32,1103	X
TM40°C	3	37,5347	X
TM60°C	3	39,553	X
TM50°C	3	40,7307	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización del Tiempo

Tabla 35. Optimización del tiempo para flavonoides

OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 500nm	Cont. flavonoides (mg eq catequina/g muestra)	Promedio (mg eq catequina/g muestra)
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 5 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,675	41,467	40,731
	Tipo.R2	0,1000	2	0,660	40,520	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,655	40,205	
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 10 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,686	42,160	41,866
	Tipo.R2	0,1000	2	0,688	42,287	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,670	41,151	
Metanol 50% T: 50 °C - Tiempo 20 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,655	40,205	40,605
	Tipo.R2	0,1000	2	0,673	41,340	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,656	40,268	
Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 5 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,631	38,691	39,553
	Tipo.R2	0,1000	2	0,645	39,574	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,658	40,394	

Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 10 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,653	40,079	39,764
	Tipo.R2	0,1000	2	0,645	39,574	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,646	39,637	
Metanol 50% T: 60 °C - Tiempo 20 min	Tipo.R1	0,1000	2	0,609	37,303	37,493
	Tipo.R2	0,1000	2	0,623	38,187	
	Tipo.R3	0,1000	2	0,604	36,988	

Influencia del tiempo sobre el contenido de flavonoides

Tabla 36. Anova para el contenido de flavonoides por tiempo

<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	32,7707	5	6,55414	16,30	0,0001
Intra grupos	4,82657	12	0,402214		
Total (Corr.)	37,5973	17			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de flavonoides entre un nivel de tiempo y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 37. Prueba de rangos múltiples para la concentración de flavonoides por tiempo

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M60°C20min	3	37,4927	X
M60°C5min	3	39,553	X
M60°C10min	3	39,7633	XX
M50°C20min	3	40,6043	XX
M50°C5min	3	40,7307	X
M50°C10min	3	41,866	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Optimización del Número de extracciones

Tabla 38. Optimización del número de extracciones para flavonoides

OPTIMIZACIÓN DEL NÚMERO DE EXTRACCIONES						
Condiciones	Código	Peso (g)	F.D.	Abs 500nm	Cont. flavonoides (mg catequina eq/g muestra)	Promedio (mg catequina eq/g muestra)
Metanol 50% - 50 °C - 10 min	Tipo1.E1	0,1000	2	0,686	42,160	41,866
	Tipo2.E1	0,1000	2	0,688	42,287	
	Tipo3.E1	0,1000	2	0,670	41,151	
	Tipo1.E2	0,1000	1	0,990	30,668	29,491
	Tipo2.E2	0,1000	1	0,946	29,280	
	Tipo3.E2	0,1000	1	0,922	28,523	
	Tipo1.E3	0,1000	1	0,449	13,606	13,805
	Tipo2.E3	0,1000	1	0,457	13,858	
	Tipo3.E3	0,1000	1	0,460	13,952	
	Tipo1.E4	0,1000	1	0,188	5,374	5,227
	Tipo2.E4	0,1000	1	0,182	5,185	
	Tipo3.E4	0,1000	1	0,180	5,122	
	Tipo1.E5	0,1000	1	0,070	1,652	1,737
	Tipo2.E5	0,1000	1	0,068	1,589	
	Tipo3.E5	0,1000	1	0,080	1,968	
Metanol 50% - 60 °C - 10 min	Tipo1.E1	0,1000	2	0,653	40,079	39,764
	Tipo2.E1	0,1000	2	0,645	39,574	
	Tipo3.E1	0,1000	2	0,646	39,637	
	Tipo1.E2	0,1000	1	0,906	28,019	27,861
	Tipo2.E2	0,1000	1	0,919	28,429	
	Tipo3.E2	0,1000	1	0,878	27,136	
	Tipo1.E3	0,1000	1	0,368	11,051	11,429
	Tipo2.E3	0,1000	1	0,375	11,272	
	Tipo3.E3	0,1000	1	0,397	11,966	

	Tipo1.E4	0,1000	1	0,155	4,333	4,154
	Tipo2.E4	0,1000	1	0,140	3,860	
	Tipo3.E4	0,1000	1	0,153	4,270	
	Tipo1.E5	0,1000	1	0,064	1,463	1,348
	Tipo2.E5	0,1000	1	0,060	1,337	
	Tipo3.E5	0,1000	1	0,057	1,242	

Tabla 39. Evaluación del número de extracciones

50 °C – 10 min			60 °C – 10 min		
N° de extracción	Conc. 500nm (mg/g muestra)	Σ[mg-CQ/g muestra]	N° de extracción	Conc. 500nm (mg/g muestra)	Σ[mg-CQ/g muestra]
E1	41,866	41,866	E1	39,764	39,764
E2	29,491	71,357	E2	27,861	67,625
E3	13,805	85,162	E3	11,429	79,054
E4	5,227	90,389	E4	4,154	83,208
E5	1,737	92,125	E5	1,348	84,556

Influencia del número de extracciones sobre el contenido de flavonoides

Tabla 40. Anova para el contenido de flavonoides por número de extracciones

<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	6686,51	9	742,945	2995,89	0,0000
Intra grupos	4,95976	20	0,247988		
Total (Corr.)	6691,47	29			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de flavonoides entre un nivel de número de extracciones y otro, con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 41. Prueba de rangos múltiples para el contenido de flavonoides por número de extracciones

<i>Extracciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
M60°C10min E5	3	1,34733	X
M50°C10min E5	3	1,73633	X
M60°C10min E4	3	4,15433	X
M50°C10min E4	3	5,227	X
M60°C10min E3	3	11,4297	X
M50°C10min E3	3	13,8053	X
M60°C10min E2	3	27,8613	X
M50°C10min E2	3	29,4903	X
M60°C10min E1	3	39,7633	X
M50°C10min E1	3	41,866	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

ANEXO C. CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO – HPLC

Tabla 42. Datos obtenidos para la curva de calibración de ácido gálico y catequina

Concentración mg/L	Ácido gálico Absorbancia	Catequina Absorbancia
10	72,197	82,324
25	173,500	178,710
50	400,630	375,870
75	692,180	573,080
100	896,040	767,990
200	2127,500	1378,600
300	3467,300	2241,500

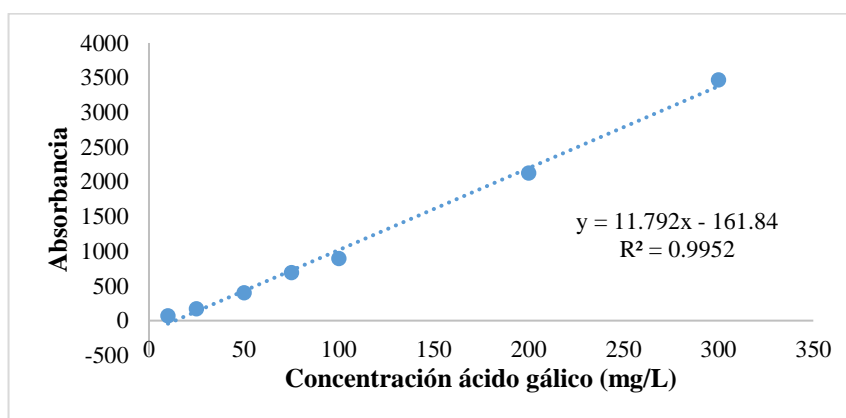


Figura 12. Curva de calibración de ácido gálico en HPLC

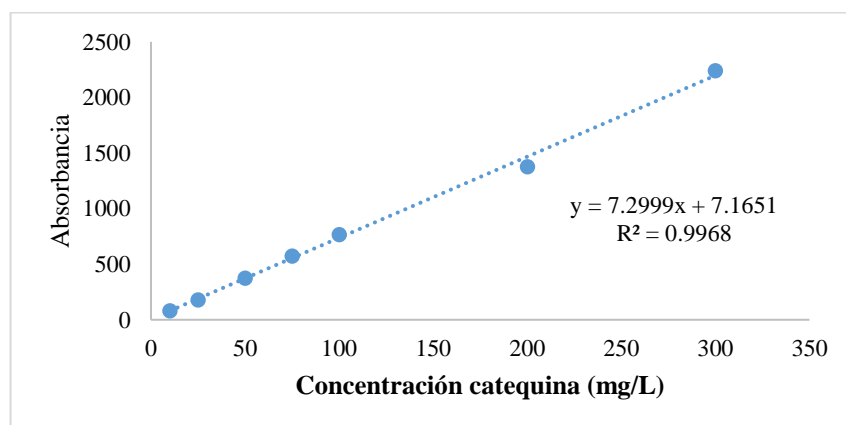


Figura 13. Curva de calibración de catequina en HPLC

ANEXO D. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla 43. Datos obtenidos de la absorbancia para la actividad antioxidante del extracto de tipo y BHT

Muestras	Absorbancia 532 nm		
	R1	R2	Promedio
Control (Aceite Oxidado)	0,977	0,928	0,953
Aceite sin oxidar	0,129	0,124	0,127
	R1	R2	R3
BHT100	0,268	0,267	0,272
BHT200	0,249	0,256	0,258
BHT500	0,205	0,186	0,201
BHT1000	0,163	0,170	0,157
T100	0,681	0,670	0,659
T200	0,557	0,540	0,515
T500	0,525	0,517	0,515
T1000	0,377	0,381	0,390

Tabla 44. Porcentaje de actividad antioxidante del extracto de tipo y BHT

Muestras	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
BHT100	82,869	82,990	82,385	82,748	0,320
BHT200	85,169	84,322	84,080	84,524	0,572
BHT500	90,496	92,797	90,981	91,425	1,213
BHT1000	95,581	94,734	96,308	95,541	0,788
T100	32,869	34,201	35,533	34,201	1,332
T200	47,881	49,939	52,966	50,262	2,558
T500	51,755	52,724	52,966	52,482	0,641
T1000	69,673	69,189	68,099	68,987	0,806

Tabla 45. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de BHT

<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	321,036	3	107,012	169,77	0,0000
Intra grupos	5,04264	8	0,63033		
Total (Corr.)	326,079	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración del BHT y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 46. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del BHT

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT100	3	82,748	X
BHT200	3	84,5237	X
BHT500	3	91,4247	X
BHT1000	3	95,541	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 47. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo

<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	1822,64	3	607,546	259,15	0,0000
Intra grupos	18,7548	8	2,34436		
Total (Corr.)	1841,39	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración del extracto de tipo y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 48. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T100	3	34,201	X
T200	3	50,262	X
T500	3	52,4817	X
T1000	3	68,987	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 49. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras extracto de tipo y BHT

<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	1057,67	1	1057,67	1664,92	0,0000
Intra grupos	2,54108	4	0,635271		
Total (Corr.)	1060,21	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración de las muestras (extracto de tipo y BHT) y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 50. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1000	3	68,987	X
B1000	3	95,541	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

**ANEXO E. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA – DESNATURALIZACIÓN
DE PROTEÍNAS**

Tabla 51. Datos obtenidos de la absorbancia para la actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteínas

Muestras	Absorbancia 660 nm		
	R1	R2	R3
Control	1,253	1,214	1,187
DF100	0,845	0,832	0,835
DF200	0,622	0,605	0,619
DF500	0,404	0,456	0,395
DF1000	0,320	0,311	0,298
T100	1,049	1,031	1,060
T200	0,950	0,918	0,969
T500	0,904	0,914	0,896
T1000	0,819	0,818	0,834

Tabla 52. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteínas del extracto de tipo y diclofenaco

Muestra	Concentración $\mu\text{g/mL}$	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar
Diclofenaco	100	30,624	31,691	31,445	31,253	0,559
	200	48,933	50,328	49,179	49,480	0,745
	500	66,831	62,562	67,570	65,654	2,704
	1000	73,727	74,466	75,534	74,576	0,908
Tipo	100	13,875	15,353	12,972	14,067	1,202
	200	22,003	24,631	20,443	22,359	2,116
	500	25,780	24,959	26,437	25,725	0,740
	1000	32,759	32,841	31,527	32,375	0,736

Tabla 53. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de diclofenaco

<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	3272,59	3	1090,86	484,81	0,0049
Intra grupos	18,0008	8	2,2501		
Total (Corr.)	3290,59	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración del diclofenaco y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 54. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración de diclofenaco

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	31,2533	X
200	3	49,48	X
500	3	65,6543	X
1000	3	74,5757	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 55. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de tipo

<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	521,85	3	173,95	99,19	0,0049
Intra grupos	14,0229	8	1,75374		
Total (Corr.)	535,88	11			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración del extracto de tipo y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 56. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración del extracto de tipo

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T100	3	14,0667	X
T200	3	22,359	X
T500	3	25,7253	X
T1000	3	32,3757	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 57. Anova para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras tipo y diclofenaco

<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	2671,26	1	2671,26	3907,67	0,0049
Intra grupos	2,73438	4	0,683595		
Total (Corr.)	2673,99	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición entre un nivel de la concentración de las muestras (extracto de tipo y diclofenaco) y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 58. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de inhibición por la concentración de las muestras (extracto de tipo y diclofenaco)

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1000	3	32,3757	X
DF1000	3	74,5757	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

ANEXO F. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA – MÉTODO HRBC

Tabla 59. Datos de absorbancia medidos 580 nm por el método HRBC

Muestras	Concentración µg/mL	Absorbancia 580 nm		
		R1	R2	R3
Control		1,313	1,350	1,158
Diclofenaco	25	0,050	0,037	0,029
	50	0,036	0,046	0,029
	75	0,035	0,039	0,044
	100	0,100	0,127	0,094
	200	0,057	0,079	0,127
Tipo	25	0,067	0,072	0,074
	50	0,075	0,074	0,065
	75	0,076	0,079	0,068
	100	0,079	0,081	0,086
	200	0,111	0,104	0,093
	500	0,127	0,138	0,118
	1000	0,157	0,161	0,145

Tabla 60. Porcentaje de la actividad antiinflamatoria por el método HRBC del extracto de tipo frente al diclofenaco

Muestras	Concentración µg/mL	%Protección			Promedio	Desviación estándar
		R1	R2	R3		
Diclofenaco	25	96,192	97,259	97,496	96,982	0,695
	50	97,258	96,593	97,496	97,115	0,468
	75	97,334	97,111	96,200	96,882	0,601
	100	92,384	90,593	91,883	91,620	0,924
	200	95,659	94,148	89,033	92,947	3,473
Tipo	25	94,897	94,667	93,610	94,391	0,687
	50	94,288	94,519	94,387	94,398	0,116
	75	94,212	94,148	94,128	94,163	0,044
	100	93,983	94,000	92,573	93,519	0,819
	200	91,546	92,296	91,969	91,937	0,376
	500	90,327	89,778	89,810	89,972	0,308
	1000	88,043	88,074	87,478	87,865	0,335

Tabla 61. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de diclofenaco

<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	82,5817	4	20,6454	7,39	0,0049
Intra grupos	27,9493	10	2,79493		
Total (Corr.)	110,531	14			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de protección entre un nivel de la concentración del diclofenaco y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 62. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración de diclofenaco

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
DF100	3	91,62	X
DF200	3	92,9467	X
DF75	3	96,8817	X
DF25	3	96,9823	X
DF50	3	97,1157	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 63. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de tipo

<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	116,847	6	19,4746	90,51	0,0000
Intra grupos	3,01228	14	0,215163		
Total (Corr.)	119,86	20			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de protección entre un nivel de concentración del extracto de tipo y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 64. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración del extracto de tipo

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1000	3	87,865	X
T500	3	89,9717	X
T200	3	91,937	X
T100	3	93,5187	X
T75	3	94,1627	XX
T25	3	94,3913	X
T50	3	94,398	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

Tabla 65. Anova para el porcentaje de protección por la concentración de las muestras (tipo y diclofenaco) en las mejores condiciones

<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	11,0786	1	11,0786	95,31	0,0006
Intra grupos	0,464955	4	0,116239		
Total (Corr.)	11,5435	5			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de protección entre un nivel de concentración de la muestra (extracto de tipo y diclofenaco) y otro, con un nivel de confianza del 95,0%

Tabla 66. Prueba de rangos múltiples para el porcentaje de protección por la concentración de las muestras (tipo y diclofenaco) en las mejores condiciones

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T50	3	94,398	X
DF50	3	97,1157	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de X.

ANEXO G. DETERMINACIÓN DE MINERALES Y METALES PESADOS

Tabla 67. Condiciones instrumentales para la lectura de minerales y metales pesados

Mineral	Parámetros de análisis				
	Línea analítica (nm)	Factor de filtro	Tipo de flama	Sensibilidad (mg/L)	Límite de detección (mg/L)
Zn	213,9	1,0	Aire/Acetileno	0,01	0,0030
Cu	324,7	1,0	Aire/Acetileno	0,03	0,0040
Fe	248,3	1,0	Aire/Acetileno	0,05	0,0046
Ca	422,7	1,0	N ₂ O/Acetileno	0,01	0,0042
Mg	285,2	1,0	Aire/Acetileno	0,003	0,0018
Mn	279,5	1,0	Aire/Acetileno	0,02	0,0020
Co	240,7	1,0	Aire/Acetileno	0,05	0,0100
Pb	217,0	1,0	Aire/Acetileno	0,08	0,0120
Ni	232,0	1,0	Aire/Acetileno	0,05	0,0080

Tabla 68. Datos de las curvas de calibración de los minerales y metales pesados medidos por espectrofotometría de absorción atómica

Mineral	Pendiente	Término independiente	R ²
Zn	0,553168	0,019928	0,993344
Cu	0,336494	0,007309	0,999338
Fe	0,206781	0,012718	0,995477
Ca	0,119000	0,005500	0,983120
Mg	1,689809	0,005904	0,999475
Mn	0,551178	-0,033917	0,992081
Co	3,477822	0,059730	0,997971
Pb	1,229245	0,034491	0,978655
Ni	2,217376	0,127288	0,995925

Tabla 69. Contenido de minerales y metales pesados en las hojas de tipo

Mineral	Concentración mg/Kg base seca				Desviación estándar	FD
	R1	R2	R3	Promedio		
Zn	52,281	42,305	25,000	39,862	13,804	5
Cu	12,037	11,000	16,000	13,012	2,639	1
Fe	86,626	92,000	96,000	91,542	4,704	2
Ca	13081,014	13015,362	13427,871	13174,749	221,654	100
Mg	5909,907	5701,859	5701,859	5771,208	120,117	600
Mn	164,199	173,885	164,199	167,428	5,592	7,5
Co	0,329	0,247	0,279	0,285	0,042	1
Pb	0,279	0,288	0,259	0,276	0,015	1
Ni	0,418	0,413	0,464	0,432	0,028	1

ANEXO H. FOTOGRAFÍAS



Figura 14. Material vegetal recolectado



Figura 18. Secado del material vegetal

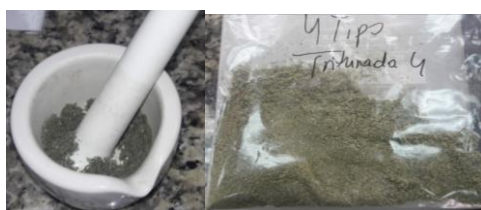


Figura 15. Material vegetal pulverizado



Figura 19. Baño de ultrasonido



Figura 16. Obtención del extracto sometido a los diferentes factores

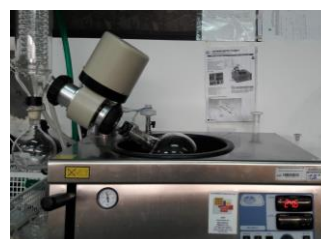


Figura 20. Evaporador rotativo RS 3000-V



Figura 17. Muestras para la determinación de polifenoles



Figura 21. Muestras para la determinación de flavonoides

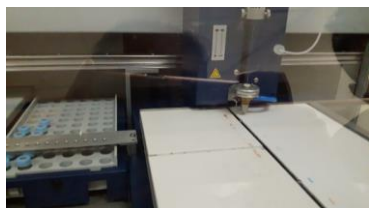


Figura 22. Inyección de las muestras en la placa cromatográfica



Figura 26. Equipo de cromatografía de HPLC



Figura 23. Muestras de aceite oxidadas para medir actividad antioxidante



Figura 27. Muestras con albúmina para medir actividad antiinflamatoria

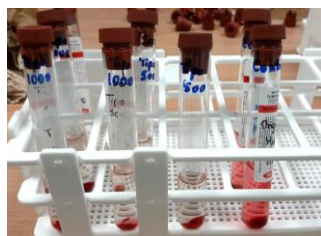


Figura 24 Solución sobrenadante del extracto para medir actividad antiinflamatoria



Figura 28. Pesaje y calcinación de las muestras de tipo después de 24 horas para determinar metales



Figura 25. Espectrofotómetro de Absorción Atómica AA500