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

Desarrollo de formulaciones farmacéuticas microencapsuladas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes a partir de extractos de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn.

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

Autor: Jonathan Alexander Vásquez Calero
Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador
Diciembre 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes López Hernández
CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 7 de noviembre de 2018



PhD. Orestes López Hernández
C.I. 175478486-4
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jonathan Alexander Vásquez Calero manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jonathan Alexander Vásquez Calero

C.I. 180364360-8

AUTOR

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 con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman



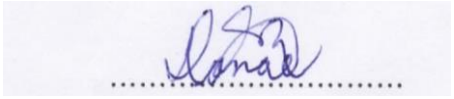
Presidente del tribunal



……

PhD. José Homero Vargas López.

C.I. 180197804-8



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

Ambato, 30 de noviembre de 2018

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.



……..

Jonathan Alexander Vásquez Calero

C.I. 180364360-8

AUTOR

DEDICATORIA

A mi madre, para quien está dedicada esta obra con amor y gratitud, *amare et sapere vix deo conceditur*. Aun así, tú lo lograste.

Excelsior!

Por siempre en nuestra memoria Stan Lee, 1922-2018

AGRADECIEMIENTOS

Esta obra no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi madre durante cada una de las etapas de mi vida, con quien siempre estaré profundamente agradecido.

Agradezco a mi padre cuya ayuda y soporte fueron fundamentales para mi formación universitaria. Agradezco también el interés y ánimo que proporcionaron una serie de personas y amigos durante mi formación y el desarrollo de esta obra. En especial, a mis amigos Diego Chaglla y Lucia Navas, con quienes comparto una profunda amistad. También a mis amigos y compañeros Henry Fiallos y Eliana Ramos, quienes estuvieron junto a mi durante el desarrollo universitario, una mención especial de gratitud para mi amiga y compañera la Ing. M. J. Barreno quien aporto con la idea principal de esta tesis.

Finalmente, mes es grato reconocer a mi tutor el Dr. Orestes López, quien fue una fuente invaluable de información y conocimiento.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS X
ÍNDICE DE TABLAS X
INDICE DE ECUACIONES X
INDICE DE ANEXOS XI
RESUMEN XII
ABSTRACT XIII
INTRODUCCIÓN XIV
CAPITULO I 15
EL PROBLEMA 15
1.1. Tema de investigación 15
1.2. Justificación 15
1.3. Objetivos 16
1.3.1. Objetivo general 16
1.3.2. Objetivos específicos 16
CAPÍTULO II 17
MARCO TEÓRICO 17
2.1. Antecedentes investigativos 17
2.1.1. Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meiss 17
2.1.2. Compuestos fitoquímicos en *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn 18
2.1.3. Proceso inflamatorio 18
2.1.4. Mecanismo de acción de un antiinflamatorio no esteroidal 19
2.1.5. Mecanismo antiinflamatorio de estabilización de membrana 19
2.1.6. Mecanismo antiinflamatorio por inhibición de desnaturalización 20
2.1.7. Importancia de antioxidantes de origen natural 20
2.2. Hipótesis 21
2.2.1. Hipótesis nula 21
2.2.2. Hipótesis alternativa 21
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis 21
2.3.1. Variables dependientes 21
2.3.2. Variables independientes 21
CAPÍTULO III 22
MATERIALES Y MÉTODOS 22
3.1. Materiales, equipos y reactivos 22
3.1.1. Materiales 22
3.1.2. Equipos 22
3.1.3. Reactivos 22

3.2. Métodos 23
3.2.1. Trabajo de campo 23
3.2.2. Preparación de materia vegetal 23
3.2.3. Obtención extractos líquidos 23
3.2.4. Determinación de sólidos totales 24
3.2.5. Determinación de flavonoides y fenoles totales 24
3.2.6. Microencapsulación 25
3.2.7. Evaluación de la actividad antioxidante 26
3.2.8. Evaluación de actividad antiinflamatoria por inhibición de desnaturalización de albumina 26
3.2.9. Evaluación de la actividad antinflamatoria por estabilización de membrana 27
CAPÍTULO IV 28
RESULTADOS Y DISCUCIÓN 28
4.1. Resultados 28
4.1.1. Extracción de metabolitos 28
4.1.2. Microencapsulados 33
4.1.3. Actividad antiinflamatoria in vitro por estabilización de membrana 34
4.1.3. Actividad antiinflamatoria in vitro por inhibición de desnaturalización de albúmina 35
4.1.4. Actividad antioxidante in vitro de microencapsulados de *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn 36
4.2. Verificación de la hipótesis 37
CAPITULO V 38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 38
5.1. Conclusiones 38
5.2. Recomendaciones 39
BIBLIOGRAFÍA 40
ANEXOS 44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hojas y frutos de Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meiss 17
Figura 2. Curvas estándar de ensayo en microplaca de contenido de flavonoides totales 28
Figura 3. Curvas estándar de ensayo en microplaca de contenido de fenoles totales 28
Figura 4. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta estimada para extracción de flavonoides totales EQ 29
Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado y diagrama de superficie de respuesta para la extracción de fenoles totales EAG 31
Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes de tiempo óptimo de extracción 32
Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes de porcentaje de inhibición de hemolisis de microencapsulados y fármacos de control 34
Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes de porcentaje de inhibición de desnaturalización de albúmina 35
Figura 9. Diagramas de cajas y bigotes: A) Porcentaje de Inhibición de DPPH; B) Concentración equivalente de Trolox ($mg.l^{-1}$) 36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meiss 18
Tabla 2. Composición de microencapsulados 33

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales 24
Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de DPPH 26
Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de desnaturalización 27
Ecuación 4. Porcentaje de inhibición de hemólisis 27

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Datos obtenidos en extracción de flavonoides totales para determinación de las condiciones óptimas de extracción..... 44
Anexo 2. Datos obtenidos de muestras en extracción de polifenoles totales para determinación de las condiciones óptimas de extracción 45
Anexo 3. Análisis de varianza y optimización para de extracción de flavonoides totales EQ 46
Anexo 4. Análisis de varianza y optimización para de extracción de fenoles totales EAG... 47
Anexo 5. Análisis de varianza de tiempo óptimo de extracción 48
Anexo 6. Porcentaje de inhibición de hemolisis de microencapsulados..... 48
Anexo 7. Porcentaje de inhibición de hemolisis de fármacos de control..... 49
Anexo 8. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de albumina obtenido con microencapsulados..... 49
Anexo 9. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de albumina obtenido con fármacos de control..... 50
Anexo 10. Curvas estándar de ensayo en microplaca para actividad antioxidante (DPPH) .. 50
Anexo 11. Porcentaje de inhibición de DPPH de microencapsulados..... 51
Anexo 12. Concentración equivalente en Trolox de microencapsulados 51

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se basó en la extracción de metabolitos secundarios de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn, se analizó y cuantificó flavonoides y fenoles totales por sus propiedades antinflamatorias y antioxidante. Para aprovechar las propiedades de los metabolitos se desarrolló dos microencapsulados del tipo microesfera que contenían como principio activo el extracto de *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn, utilizando dos polímeros de tipo sacárido maltodextrina y goma arábiga. Para verificar las propiedades de los microencapsulados se realizaron ensayos in vitro, se determinó la actividad antioxidante ensayo que presentó un porcentaje máximo de inhibición de DPPH de 74,69 % equivalente a 400,08 g l-1 de Trolox, se determinó la capacidad antiinflamatoria por estabilización de membrana eritrocitaria alcanzando un valor máximo de 80,39 % de inhibición hemolisis y su capacidad de inhibición de desnaturalización proteica logrando un porcentaje máximo de 54,82 % de inhibición de desnaturalización.

Palabras clave: flavonoides, fenoles totales, extracción, secado por aspersión.

ABSTRACT

The present research work was based on the extraction of secondary metabolites of the plant *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn, flavonoids and total phenols were analyzed and quantified for their anti-inflammatory and antioxidant properties. To take advantage of the properties of the metabolites, two microencapsulated microspheres were developed that contained the extract of *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn as an active ingredient, using two polymers of the saccharide type maltodextrin and gum arabic. To verify the properties of the microencapsulations, in vitro tests were carried out, the antioxidant activity was determined, which showed a maximum percentage of DPPH inhibition of 74.69% equivalent to 400.08 g l-1 of Trolox, the anti-inflammatory capacity was determined by stabilization of the erythrocyte membrane reaching a maximum value of 80.39% inhibition of hemolysis and its capacity to inhibit protein denaturation, achieving a maximum percentage of 54.82% inhibition of denaturation.

Key words: flavonoids, total phenols, extraction, spray drying.

INTRODUCCIÓN

Entre los diferentes compuestos producidos naturalmente por plantas están los metabolitos secundarios que tienen una función importante en la interacción entre una planta y su entorno, como pigmentos o compuestos defensivos, estos metabolitos incluyen a los flavonoides un grupo de compuestos importante para el ser humano por su valor nutricional y funcional en etnofarmacológica como sustitos de medicamentos convencionales (Ruiz- Cruz et al., 2017).

Una propiedad importante y ampliamente estudiada de los compuestos extraídos de plantas es su actividad antioxidante ya que no solo reducen la formación de radicales libres, sino que también los eliminan. Los flavonoides presentan también actividades biológicas importantes, como protectores cutáneos de la exposición a la luz UV, proteger el ADN del daño, el fortalecimiento de los capilares, poseen un efecto antiinflamatorio y acción antibiótica. Debido a estas propiedades, los flavonoides se pueden usar como ingredientes en la producción de cosméticos y formas farmacéuticas (Szalay, 2015).

La respuesta inflamatoria proceso que causa la inflamación ocurre cuando los tejidos son lesionados por bacterias, traumatismos, toxinas, agentes físicos como calor o frio o cualquier otra causa. Estos casos las células dañadas liberan sustancias químicas que incluyen histamina, bradiquinina y prostaglandinas. Estas sustancias hacen que los vasos sanguíneos derramen líquido en los tejidos, causando inflamación. Esto ayuda a aislar la sustancia extraña del contacto posterior con los tejidos corporales, sin embargo la respuesta inflamatoria debe ser controlada para evitar la aparición de inflamación aguda o crónica dañina para los tejidos afectados, por esta razón es importante buscar alternativas con principios activos de origen natural a partir de metabolitos vegetales que reemplacen los medicamentos convencionales que además sean compatibles y produzcan un impacto mínimo en el organismo humano (Medline Plus, 2018).

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación

DESARROLLO DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS MICROENCAPSULADAS CON PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS Y ANTIOXIDANTES A PARTIR DE EXTRACTOS DE LA PLANTA *Muehlenbeckia tamnifolia* (KUNTH) MEISN.

1.2. Justificación

Los tratamientos actuales contra la inflamación crónica causada por enfermedades como artritis, trastornos autoinmunes, cáncer, demencia, diabetes, neurodegeneración y enfermedades vasculares pueden causar efectos adversos junto con falta de eficacia en el tratamiento. La prescripción de drogas antinflamatorias consiste comúnmente en la aplicación de esteroides, los cuales tienen limitaciones particularmente con las altas dosis y el uso prolongado generando el problema de los graves efectos secundarios concomitantes de estos potentes fármacos antiinflamatorios que actúan sobre la principal hormona glucocorticoide humana, el cortisol (M.C. Recio, I. Andujar, & J.L. Rios, 2012). Debido a los problemas que pueden generar los medicamentos antiinflamatorios, surge la necesidad de encontrar nuevas formas de contrarrestar estos efectos, utilizando compuestos obtenidos de plantas de uso ancestral, los cuales produzcan un bajo impacto en el organismo humano.

La investigación de compuestos naturales de origen vegetal basados en su información etnofarmacológica y etnobotánica ha proporcionado importantes contribuciones al mejoramiento de medicamentos, apoyado con estudios de modelos *in vitro* e *in vivo* para la identificación de una variedad de metabolitos naturales con actividad antiinflamatoria comprobada. El análisis de estos compuestos a través de estudios bioquímicos, fitoquímicos y farmacológicos ya ha permitido la identificación y caracterización de una gran variedad de compuestos activos naturales capaces de contrarrestar los efectos inflamatorios (Maione, Russo, Khan, & Mascolo, 2016).

Estudios previos realizados al género de plantas *Muehlenbeckia*, han proporcionado resultados de cribado fitoquímico de extractos en etanol los cuales mostraron la presencia de diferentes tipos de componentes activos como flavonoides, terpenoides, esteroles, cumarinas, taninos, saponinas y aceites volátiles (Fagundes et al., 2010).

Como una alternativa en el tratamiento de la inflamación, los compuestos fenólicos junto con flavonoides, han sido probados siendo capaces de inhibir la producción o la acción de mediadores proinflamatorios, dando como resultado una capacidad antiinflamatoria (Ambriz-Pérez, Leyva-López, Gutierrez-Grijalva, & Heredia, 2016).

La microencapsulación se realiza para proteger las sustancias sensibles del entorno externo, como es el caso del principio activo de formulaciones farmacéuticas, también es utilizado para enmascarar las propiedades organolépticas como el color, sabor y olor de una sustancia, para obtener una liberación controlada de la sustancia farmacológica, para el manejo seguro de los materiales tóxicos, para obtener la liberación dirigida del fármaco y para evitar efectos adversos como la irritación gástrica causada por un medicamento. La tecnología de microencapsulación permite trabajar con diferentes tipos de materiales, como ingredientes farmacéuticos activos, proteínas, péptidos, aceites volátiles, materiales alimenticios, pigmentos, monómeros, catalizadores, pesticidas, etc., con diferentes tipos de materiales de revestimiento o corteza como maltodextrina, goma xantana, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, sodio carboximetil celulosa, alginato de sodio, ácido poliláctico co-glicólico, gelatina, poliésteres, quitosanos, etc (Jyothi et al., 2010).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Desarrollar formulaciones farmacéuticas microencapsuladas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes a partir de extractos de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de extracción de metabolitos foliares de Muehlenbeckia tamnifolia aplicando una metodología de diseño experimental de superficie de respuesta.
- Microencapsular los ingredientes activos farmacéuticos empleando diferentes polímeros.
- Determinar la actividad antiinflamatoria y potencial antioxidante *in vitro* de los ingredientes activos farmacéuticos microencapsulados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meiss

El género *Muehlenbeckia* perteneciente a la familia *Polygonaceae*, consta de 22 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del hemisferio sur, una de las especies más representativas es *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meiss., siendo esta una enredadera ampliamente distribuida en regiones frías, desde cerca de los 2000 msnm hasta el páramo 2700 msnm. Esta planta forma parte de trepadoras muy ramificadas, con partes terminales frecuentemente rojizas, hojas con la base cordada o sagitada, hasta de 8 centímetros, ócreas membranosas muy notorias, inflorescencias en espigas axilares y frutos de color oscuro al madurar; es frecuente en bordes de bosques, claros y en bordes de vías o carreteras, puede adaptar su crecimiento sobre rocas o de forma reptante (Vargas, 2002).

Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meiss. ha sido catalogada como planta medicinal de la zona andina ecuatoriana, siendo una especie común en mercados y plazas donde se expenden hierbas con propiedades etnofarmacológicas de uso común en medicina tradicional, entre sus usos registrados están el tratamiento para la inflamación, dolor de dientes, baños calientes y baño posparto (Cerón Martínez, 2006).



Figura 1. Hojas y frutos de *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meiss

Fuente: (Naturalista biodiversidad, 2018)

Tabla 1. Taxonomía *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meiss

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Polygonaceae
Género	Muehlenbeckia
Epíteto específico	tamnifolia
Autor del epíteto específico	(Kunth) Meisn.
Nombre científico	***Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn**

Fuente: (Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, 2018)

2.1.2. Compuestos fitoquímicos en *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn

Una investigación fitoquímica realizada a partir de extractos de *Muehlenbeckia tamnifolia*, permitió el aislamiento de compuestos conocidos identificados por medio de resonancia magnética nuclear como: acetato de lupeol, ácido cis-p-cumárico, lupeol β-sitosterol, ácido trans-p-cumárico, ácido linoleico, catequina, afzelina y quercitrina (Torres-Naranjo et al., 2016). Análisis de cromatografía de gases permitieron identificar también la presencia de gran variedad de metabolitos secundarios empleados a nivel medicinal como el benzoato de bencilo el cual controla y alivia las infecciones causadas por las escabiosis el alfa-tocoferol, pertenece a los nutrientes de la vitamina E y que posee la mayor actividad antioxidante y ayuda a prevenir el cáncer, el 1-Octacosanol que previene infartos y reduce el colesterol de la sangre, el estigmasterol precursor de la progesterona y de la vitamina D_3, el Ácido 12,15-octadecatrienoico, esencial de la serie Omega-3, importante para la nutrición y para disminuir enfermedades cardiovasculares (Rodríguez Aguirre, Torrenegra Guerrero, Beltran, Matulevich Pelaez, & Castrillón, 2014).

2.1.3. Proceso inflamatorio

El proceso de inflamación es una respuesta desencadenada por daño a los tejidos vivos, este es un mecanismo de defensa que se desarrolló en organismos superiores para protegerlos de infecciones y lesiones. Su objetivo es localizar y eliminar el agente nocivo y eliminar los componentes dañados del tejido para que el cuerpo pueda comenzar a sanar. La respuesta consiste en cambios en el flujo sanguíneo, un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la migración de líquidos, proteínas y glóbulos blancos (leucocitos) de la circulación al sitio de daño tisular. Una respuesta inflamatoria que dura solo unos días se llama inflamación aguda, mientras que una respuesta de mayor duración se conoce como inflamación crónica (Encyclopaedia Britannica, 2018).

2.1.4. Mecanismo de acción de un antiinflamatorio no esteroidal

Existe una evidencia abrumadora que apunta a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) como el mecanismo principal de las propiedades antiinflamatorias de los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). La inhibición de COX junto con la resultante inhibición de la prostaglandina y de eicosanoides atenúan el dolor, la fiebre y la inflamación. La enzima COX también conocida como prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS) existe en dos isoformas: PGHS-1 o COX-1 y PGHS-2 o COX-2. Hay una distinción estructural significativa entre los dos, con solo un 60 % de similitud, ambas isoformas son glicoproteínas unidas a la membrana que catalizan la formación de prostanoides a partir del ácido araquidónico. La COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células y tejidos de mamíferos, como la vesícula seminal, las plaquetas y el endotelio. En condiciones inflamatorias, los estudios moleculares han demostrado que el ARNm de COX-1 y la expresión de proteínas no cambian, en comparación con condiciones normales, confirmando su papel limitado en el proceso inflamatorio. La COX-1, sin embargo, sigue siendo experimental y clínicamente relevante debido a los efectos adversos desencadenados por la inhibición no selectiva de las enzimas ciclooxigenasas por algunos AINE (Osafo, Agyare, Obiri, & Antwi, 2017).

2.1.5. Mecanismo antiinflamatorio de estabilización de membrana

Posterior a una lesión o contusión ya sea causada por traumatismo o acción de agentes físicos externos como el calor o el frio, se presenta un efecto de vasoconstricción, junto con un aumento de histamina en el área afectada, seguido en el proceso inflamatorio la histamina actúa como vasodilatador aumentando el flujo sanguíneo a través de la zona dañada, produciendo enrojecimiento, hinchazón y aumento de temperatura (Lisset et al., 2016).

El efecto de la histamina no solo se limita a la inflación, causa también hipersensibilidad vasodilatación, edema, aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso (Benly, 2015), de ahí la importancia de controlar la liberación de este mediador de la inflación en fase aguda, la cual es secretada en presencia de proteínas lisosomales, siendo el proceso de estabilización de la membrana esencial para evitar la liberación de los componentes del lisosoma al medio extracelular iniciando la respuesta inflamatoria. En comparación con la membrana eritrocitaria la membrana lisosomal es semejante en su constitución, es por esta razón que el ensayo de estabilización de membrana en medio isotónico se puede tomar como una medida de la actividad antiinflamatoria de los compuestos microencapsulados (García, 2016).

2.1.6. Mecanismo antiinflamatorio por inhibición de desnaturalización

Las formulaciones farmacéuticas antinflamatorias capaces de inhibir la desnaturalización son importantes para el control de enfermedades degenerativas causadas por el deterioro de proteínas como la artritis reumatoide, la cual es una forma común de artritis que provoca inflamación en el revestimiento de las articulaciones, causando dolor, disminución en la movilidad de la articulación e hinchazón. Esta enfermedad degenerativa tiende a persistir por muchos años afectando a diferentes articulaciones del cuerpo, causando daño en huesos, tendones, ligamentos y cartílagos (Arthritis Foundation National Office, 2018).

Investigaciones realizadas recientemente han descubierto los mecanismos y componentes involucrados en los procesos inflamatorios de enfermedades autoinmunes. Respecto a la artritis reumatoide, se ha descubierto que la proteína conocida como TNF (tumor necrosis factor) tiene un rol fundamental en el proceso de incitación y perpetuación de la inflamación en articulaciones (Coordinadora Nacional de Artritis, 2014). La acumulación y posterior desnaturalización de estas proteínas intracelulares genera necrosis, la células necrosadas pierden la capacidad de mantener la integridad de la membrana liberando su contenido al medio extracelular, este proceso es el que inicia la inflamación en el tejido articular (Bazan, 2017). Debido a esto es necesario el desarrollo de fármacos basados en metabolitos vegetales, que contrarresten esta proteína inhibiendo su desnaturalización, mejorando de forma significativa el pronóstico de la artritis reumatoide.

2.1.7. Importancia de antioxidantes de origen natural

El tratamiento con antioxidantes para enfermedades causadas por radicales libres no ha sido totalmente efectivo en su aplicación práctica como terapia clínica, esto debido a causas como la ineficacia de los antioxidantes, una inadecuada farmacocinética, falta de selectividad, efectos secundarios adversos, toxicidad o ineficiencia en la forma del vehículo de administración de un antioxidante (Juranek, Rackova, & Stefek, 2012).

El desarrollo de formulaciones farmacéuticas antioxidantes microencapsulados tiene ventajas como son un consumo más bajo de medicamento manteniendo el mismo efecto terapéutico, también al estar formados por una matriz polimérica como son la maltodextrina y la goma arábiga permiten una dosificación de acción prolongada, protegiendo los principios activos de la acción degradante de ácidos del tracto digestivo y de la deshidratación (Kumar, 2011)

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

No se desarrollarán formulaciones farmacéuticas microencapsuladas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes a partir de extractos de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Se desarrollarán formulaciones farmacéuticas microencapsuladas con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes a partir de extractos de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn.

2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1. Variables dependientes

- Propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del extracto

2.3.2. Variables independientes

- Polímero microencapsulante y proporción disolvente de extracción

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales, equipos y reactivos

3.1.1. Materiales

El proceso requirió el uso de los siguientes materiales de laboratorio: balones de aforo de 10 y 100 ml, matraces Erlenmeyer de 100 y 1000 ml, probetas graduadas de 100 ml, núcleos para agitador magnético, espátulas, pipetas graduadas de 10 ml, micropipetas 10-1000 µl, pera de succión, tubos cónicos de polipropileno de 50 ml (Corning™), placas de 96 pocillos para espectrofotómetro (Corning® Costar®), botellas de vidrio color ámbar de 100 ml.

3.1.2. Equipos

Los procesos de obtención de extractos vegetales, cuantificación de flavonoides y fenoles totale, microencapsulación, determinación de actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante se requirieron el uso de los siguientes equipos: plancha de calentamiento (Corning PC-620D), centrifuga (Rotina 380), horno de secado (Gander MJN), balanza analítica (Ohaus PA-214), balanza analítica (Ohaus PA-113), balanza de humedad (Kern MLS 50-3), rotavapor (IKA-RV8), espectrofotómetro UV-VIS (Microplate Spectrophotometer Fisherbrand™ accuSkan™ GO), equipo mini spray dryer (BUCHI-B 290).

El análisis estadístico se realizó utilizando los siguientes equipos: computadora laptop HP Pavilion dv6 cargada con sistema operativo Windows 10, junto con el software de análisis de datos estadístico y gráfico Statgraphics Centurion XVIII.

3.1.3. Reactivos

El proceso de extracción de metabolitos (flavonoides y fenoles totales) foliares requirió los siguientes reactivos:

- Agua destilada y etanol 96 %

Para los procesos de análisis de flavonoides y fenoles totales por espectrofotometría se utilizó los siguientes reactivos:

- Agua destilada, reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (Merck), carbonato de sodio CO_3Na_2 (Merck), cloruro de aluminio $AlCl_3.6H_2O$ (Lobal Chemie), quercetina hidrato 95 % $C_{15}H_{10}O_7.H_2O$ (Acros organics), etanol 96 %, metanol 99,8 % (Lobal Chemie), acido gálico monohidratado $C_6H_2(OH)_3COOH.H_2O$ (Fisher Scientific) y acetato de sodio CH_3COONa (Lobal Chemie).

En el proceso de microencapsulación se utilizaron los siguientes polímeros:

- Maltodextrina y goma arábiga (Roig Pharma)

En el análisis de actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro se utilizó los siguientes reactivos:

- Agua destilada, tabletas buffer fosfato salino isotónico (Life technologies), albumina de huevo fresca, ibuprofeno, tabletas de aspirina 100 mg (Bayer), diclofenaco sódico, reactivo DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Aldrich chemistry) y reactivo Trolox 6-hydroxy-2 5 7 8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acido 97 % (Aldrich chemistry).

3.2. Métodos

3.2.1. Trabajo de campo

El proceso de recolección de la planta *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn, se realizó en las coordenadas 1°18'36.1"S y 78°38'38.5"W pertenecientes a la parroquia Huachi Grande, del cantón Ambato, en la provincia de Tungurahua. Para la recolección de la planta fresca se seleccionaron y cortaron aquellos tallos con abundante acumulación foliar de aproximadamente 1 m de longitud. Posteriormente el material vegetal recolectado fue almacenado en contenedores secos de plástico a temperatura ambiente.

3.2.2. Preparación de materia vegetal

Se lavó el material vegetal recolectado con agua destilada para eliminar partículas e impurezas, seguido se separaron las hojas del tallo, posteriormente las hojas fueron depositadas en un horno de secado a 60 °C de temperatura, durante 4 horas, hasta que se redujo la humedad al 9 %. Una vez seca la materia vegetal de las hojas, fue procesada en un molino hasta convertirlo en un polvo fino y conservada en un recipiente de vidrio con tapa hermética para protegerlo de la humedad del aire.

3.2.3. Obtención extractos líquidos

Para la obtención de extractos vegetales líquidos se utilizó el proceso de extracción sólido-líquido, utilizando como disolvente etanol en tres concentraciones diferentes de 30 % 50 % y 70 % en combinaciones con tres proporciones de masa distintas de 1:15, 1:20 y 1:25 de material vegetal seco con respecto al disolvente. Para la primera proporción de masas 1:15 se pesó por triplicado 6,67 g de material vegetal seco en una balanza analítica y se añadió 100 g de alcohol respectivamente de cada concentración 30 %, 50 % y 70 %. Para la proporción

de masas 1:20 se pesó por triplicado 5 g de material vegetal seco en una balanza analítica y se añadió 100 g de alcohol respectivamente de cada concentración 30 %, 50 % y 70 %. Para la proporción de masas 1:25 se pesó por triplicado 4 g de material vegetal seco en una balanza analítica y se añadió 100 g de alcohol respectivamente de cada concentración 30 %, 50 % y 70 %. Posteriormente se colocaron las muestras en matraces con capacidad de 100 ml con taponamiento, para ser calentadas en una plancha de calentamiento con agitación magnética a 400 min-1 hasta alcanzar la ebullición a 80 °C, las muestras se mantuvieron 30 minutos en ebullición hasta saturar el disolvente. A continuación, las muestras se sometieron a centrifugación a 4000 min-1 durante 10 minutos para separar los restos vegetales del extracto líquido, se conservó el sobrenadante resultado de la centrifugación. Los nueve extractos obtenidos se depositaron en botellas de vidrio color ámbar de 100 ml con tapa hermética.

3.2.4. Determinación de sólidos totales

Para determinar el porcentaje de sólidos totales de los extractos líquidos, se realizaron determinaciones por triplicado del contenido de humedad utilizando una balanza de humedad, aplicando la ecuación 1 se obtuvo el porcentaje de sólidos totales, basado en el porcentaje de humedad que contenían los extractos:

$$\%\ Sólidos\ totales = 100 - \%\ humedad$$

Ecuación 1. Determinación de sólidos totales

3.2.5. Determinación de flavonoides y fenoles totales

El análisis de flavonoides y fenoles se realizó de los extractos líquidos previamente obtenidos, realizando una dilución previa con un factor de 1:50 en agua destilada, para las mediciones se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS compatible con placas de 96 pocillos.

Se determino el contenido total de flavonoides con un ensayo colorimétrico con cloruro de aluminio, se prepararon soluciones estándar de quercetina en concentraciones de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg l^{-1}, utilizando como disolvente etanol al 96 %. En una placa de 96 pocillos para espectrofotómetro, se colocaron alícuotas 10 µl de solución de cloruro de aluminio al 10 %, seguido se adicionó 50 µl de los extractos diluidos y soluciones estándar por cuadruplicado, como blanco reactivo se utilizó etanol al 96 %, a continuación, se aplicó 150 µl de etanol al 96 %, como reactivo final se añadió 10 µl de acetato de sodio 1 mol l^{-1}.

Todos los reactivos se mezclaron por agitación dentro del espectrofotómetro durante 1 minuto y se conservó la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. La absorbancia se midió a 415 nm. Los contenidos totales de flavonoides se calcularon en base a la curva de calibración y se expresaron en g equivalentes de quercetina (EQ) por cada 100 g de extracto seco de planta (Sembiring, 2018). La determinación del contenido de fenoles totales se realizó con un ensayo basado en el método de Folin-Ciocalteu, junto con soluciones estándar de ácido gálico de 10, 20, 50, 100 y 200 mg l^{-1}. Se colocó en una placa de 96 pocillos para espectrofotómetro 20 µl de los extractos diluidos, estándares de ácido gálico y blanco por cuadruplicado. Se añadió 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu con dilución 1:4 y se agitó durante 60 s la placa dentro del espectrofotómetro, se dejó en reposo durante 240 s y se añadió 75 µl de solución de carbonato de sodio 100 mgl^{-1}, la mezcla se agitó durante 60 s dentro del espectrofotómetro y se conservó durante 2 h a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia a 750 nm. La curva de calibración de ácido gálico permitió obtener los valores de contenido total de fenoles de las muestras, valores que se expresaron en g equivalentes de ácido gálico (EAG) por cada 100 g de extracto seco de planta (Bobo-García et al., 2015).

3.2.6. Microencapsulación

Previo al proceso de microencapsulación se retiró el disolvente orgánico del extracto conservando la fase acuosa, se aplicó un proceso evaporación a 40 °C de temperatura y con presión de vacío utilizando un rotavapor, posterior a la recuperación del extracto acuoso se realizó mediciones por triplicado para determinar el contenido de humedad y calcular el valor de solidos totales presentes en la fase acuosa, aplicando la ecuación 1. El proceso de microencapsulación del extracto vegetal acuoso que contenía flavonoides y fenoles se realizó utilizando un mini Spray Dryer. Para preparar el primer microencapsulado se utilizó únicamente maltodextrina en relación 70:30 en peso con respecto al contenido de sólidos del extracto acuoso, se mezcló 100 ml de extracto que contenía 7,94 g de sólidos con 18,52 g de maltodextrina y se agitó en una plancha de calentamiento a 50 °C a 500 revoluciones min^{-1} para homogenizar la mezcla. El segundo microencapsulado se desarrolló utilizando una combinación de maltodextrina, goma arábiga y el extracto acuoso, combinando un 33,33 % de cada compuesto, se mezcló 100 ml de extracto que contenía 7,94 g de sólidos con 7,94 g de maltodextrina y 7,94 g de goma arábiga y se agitó en una plancha de calentamiento a 50 °C a 500 min^{-1} para homogenizar la mezcla. Posteriormente cada mezcla ingreso al Spray dryer para iniciar el proceso de microencapsulación en la cámara caliente a 160 °C, permitiendo que el material encapsulante se mezcle junto con las partículas del compuesto y su posterior solidificación (Jyothi et al., 2010).

3.2.7. Evaluación de la actividad antioxidante

La metodología que se usó para determinar el potencial antioxidante del extracto microencapsulado se basó en la reacción inhibitoria del complejo de radicales libres "DPPH" por parte del análogo de vitamina E "Trolox", compuesto con el cual se generó una curva de calibración con concentraciones de 50, 100, 200, 400 y 500 µmol l^{-1}. Previo a la medición se preparó la solución de DPPH de 150 µmol l^{-1} usando como disolvente una mezcla de metanol-agua en proporciones 80:20 de volumen, los estándares de Trolox se prepararon usando como disolvente una mezcla de etanol-agua en proporciones 50:50 de volumen. En una placa de 96 pocillos para espectrofotómetro se añadió el blanco formado por 20 µl agua destilada junto con 180 µl de la mezcla metanol-agua. Para la curva de calibración se añadieron 20 µl de cada uno de los estándares junto con 180 µl de solución de DPPH. En la placa se añadió 20 µl de las muestras junto con 180 µl de solución DPPH, por último, se añadió el control que consistió en 20 µl de agua destilada junto con 180 µl de solución DPPH. Se realizó 10 réplicas de las muestras, blanco, estándares y control. La placa se agitó por 60 s dentro del espectrofotómetro y se conservó por 40 min protegida de la luz a temperatura ambiente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 515 nm.

$$\% \, DPPH = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b}\right)\right] x100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de DPPH

Para generar la curva de calibración del porcentaje de DPPH inhibido respecto a la concentración de Trolox se trabajó con la ecuación 2, donde Am representa la absorbancia de la muestra o estándar, Ab representa la absorbancia del blanco y Ac representa la absorbancia del control, en base a la curva de calibración se obtuvieron valores de las muestras y se expresaron g equivalentes de Trolox (ET) por cada 100 g de extracto seco de planta (Bobo-García et al., 2015).

3.2.8. Evaluación de actividad antiinflamatoria por inhibición de desnaturalización de albumina

Se prepararon mezclas compuestas por 200 µl de albúmina de huevo fresca, 2800 µl de solución salina tamponada con fosfato y 2000 µl de solución de microencapsulado 5 mg ml^{-1} disuelto en agua destilada. Se usó un volumen igual de agua destilada como control. Se utilizó diclofenaco sódico 1 mg ml^{-1} como estándar de referencia y se trató de la misma forma que el microencapsulado para la determinación de la absorbancia. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 15 min y luego se calentaron a 70 °C durante 5 min. Después de enfriar a temperatura ambiente se leyó la absorbancia de las muestras a 660 nm, usando el polímero

microencapsulante como blanco (Sree Kumari, Yasmin, Hussain, & Babuselvam, 2015). El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%\ \text{inhibición de desnaturalización} = \left[\left(\frac{\text{Ac}-\text{Am}}{\text{Ac}}\right)\right] \text{x}100$$

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de desnaturalización

Donde: Am representa la absorbancia de la muestra de prueba o estándar y Ac representa la absorbancia de control.

3.2.9. Evaluación de la actividad antinflamatoria por estabilización de membrana

Recolección y preparación de suspensión de eritrocitos

Para la preparación de la suspensión de eritrocitos se recolectó 3 ml de sangre humana fresca en tubos heparinizados y se centrifugó a 3000 revoluciones min^{-1} durante 10 min. Se utilizó un volumen de suero fisiológico equivalente al del sobrenadante para realizar tres lavados consecutivos al precipitado de eritrocitos. El volumen de eritrocitos disueltos obtenidos se midió y se reconstituyó como una suspensión al 10 % v/v con solución tampón fosfato salino.

Inhibición de hemolisis inducida por calor

En tubos de propilenos de 25 ml se preparó 2 ml de mezcla de reacción, que consistió en 1 ml de muestra de prueba en diferentes concentraciones (1-5 $mg.ml^{-1}$) y 1 ml de suspensión de glóbulos rojos al 10 %, se preparó el control reemplazando la muestra de prueba por suero fisiológico. Se utilizó aspirina e ibuprofeno como fármacos de control en concentración de 0,5 mg ml^{-1}. Todos los tubos que contenían la mezcla de reacción y control se incubaron en un baño de agua a 56 ºC durante 30 min.

Al final de la incubación, los tubos se enfriaron con agua corriente. La mezcla de reacción se centrifugó a 2500 min^{-1} durante 5 min y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 560 nm. El ensayo se realizó con 10 réplicas para todas las muestras de prueba y control (Leelaprakash & Dass, 2009).

$$\%\ inhibición\ de\ hemolisis = \left[\left(\frac{Ac - Am}{Ac}\right)\right] x100$$

Ecuación 4. Porcentaje de inhibición de hemólisis

Donde: Ac representa la absorbancia del control y Am representa la absorbancia de la muestra.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUCIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción de metabolitos

La figura 2 y figura 3 muestran respectivamente las curvas estándar realizadas para la determinación de flavonoides totales y fenoles totales.

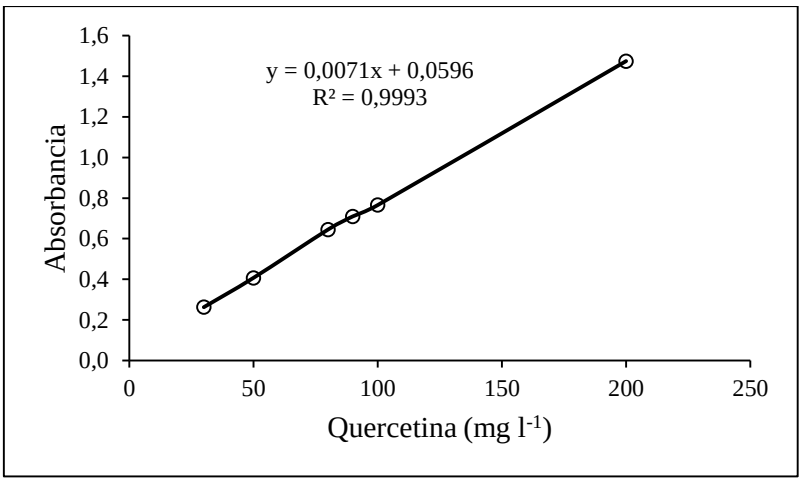


Figura 2. Curvas estándar de ensayo en microplaca de contenido de flavonoides totales

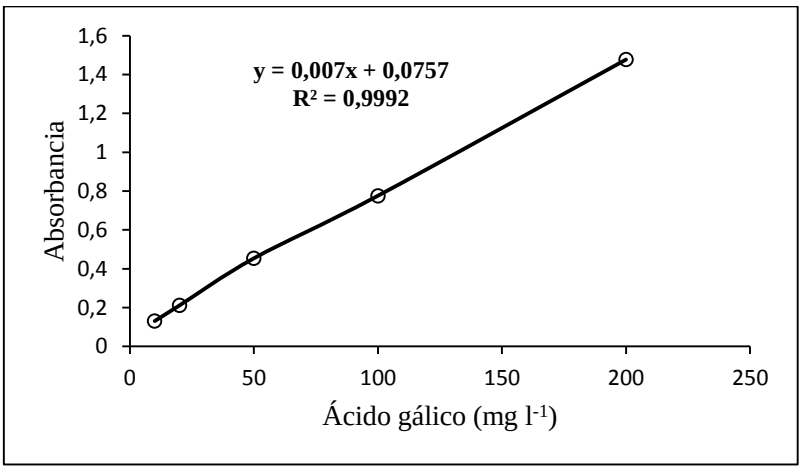


Figura 3. Curvas estándar de ensayo en microplaca de contenido de fenoles totales

En la curva estándar de flavonoides se logró un ajuste lineal R^2 de 0,9993 y en la curva estándar de fenoles totales se obtuvo un valor de R^2 de 0,9992 ambos valores están muy próximos a 1 lo que indica la representatividad de cada uno de los modelos lineales obtenidos, ya que en ambos casos la variación total de la variable "y" esta descrita por su respectivo modelo de regresión.

El proceso de extracción de metabolitos se basó en la determinación de flavonoides y fenoles totales extraídos de las hojas procesadas de *Muehlenbeckia tamnifolia*, esta determinación se realizó por medio de la construcción de dos curvas de calibración estándar figura 2 y figura 3 respectivamente, los datos generados por las curvas de calibración permitieron calcular el contenido de flavonoides totales como equivalentes de Quercetina (EQ) y el contenido de fenoles totales como equivalentes de ácido Gálico (EAG), mediante un cálculo basado en el porcentaje de sólidos totales se expresaron los valores obtenidos de masa de EQ y EAG por cada 100 g de extracto seco recuperado.

En la figura 4 se presentan los resultados del estudio del proceso de extracción de flavonoides.

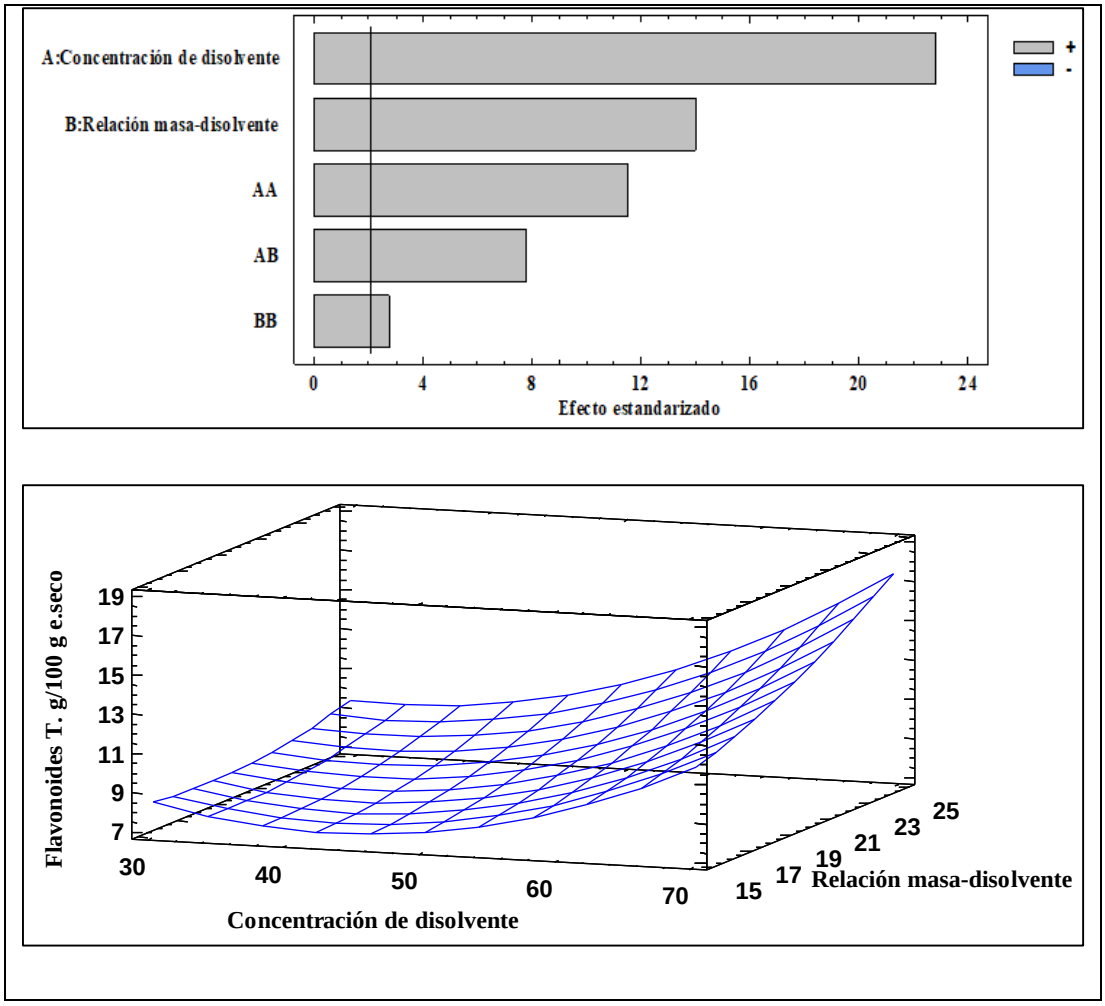


Figura 4. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta estimada para extracción de flavonoides totales EQ

Los resultados presentados en la figura 4, se corresponden con las condiciones óptimas de extracción de los metabolitos foliares que incluyen los dos principales tipos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de las plantas superiores que son flavonoides y fenoles

totales, el análisis estadístico determinó que la extracción por inmersión con etanol en una concentración del 70 % y en una relación de masa-disolvente de 1-25 produjeron las mejores condiciones para los tipos de metabolitos, obteniéndose un promedio de 17,97 g de flavonoides totales EQ y 41,10 g de fenoles totales EAG por cada 100 g de extracto seco. Estos resultados reflejan que se obtuvo una mayor solubilidad de los metabolitos presentes en las hojas en presencia de una concentración de disolvente relativamente alta 70 % a una temperatura estable de 80 °C, junto con el segundo factor que influenció la extracción que fue la proporción de masa vegetal, proporción que fue de 1 parte de masa vegetal junto con 25 partes en volumen de etanol, siendo esta la menor proporción analizada en él experimento, esta proporción especifica de masa disolvente permitió saturación elevada del disolvente transfiriendo los metabolitos de interés desde la fase sólida de la mezcla hasta el extracto líquido. Como se observa en el diagrama de Pareto, todos los factores estudiados tienen una influencia sobre la cantidad de flavonoides extraídos. La concentración de disolvente al 70 % es el factor que influenció mayoritariamente en la extracción de flavonoides totales, seguido por la relación masa-disolvente cuyo valor óptimo de extracción fue de 1 parte de masa vegetal por 25 partes de disolvente, la razón por la cual la extracción se vio afectada en mayor proporción por el disolvente es debido a que etanol en concentraciones altas favorece la extracción de flavonoides libres y en concentraciones que rondan el 70 % permite también la extracción de flavonoides unidos a grupos glucósidos, incrementando la cantidad y tipo de flavonoides presentes en la fase liquida del extracto (Feng, Hao, & Li, 2017).

La figura 5 presenta un diagrama de Pareto mostrando los factores que influenciaron de forma significativa la extracción de fenoles totales, representa un resumen gráfico del análisis de superficie de las condiciones en las cuales se logró la extracción de fenoles totales.

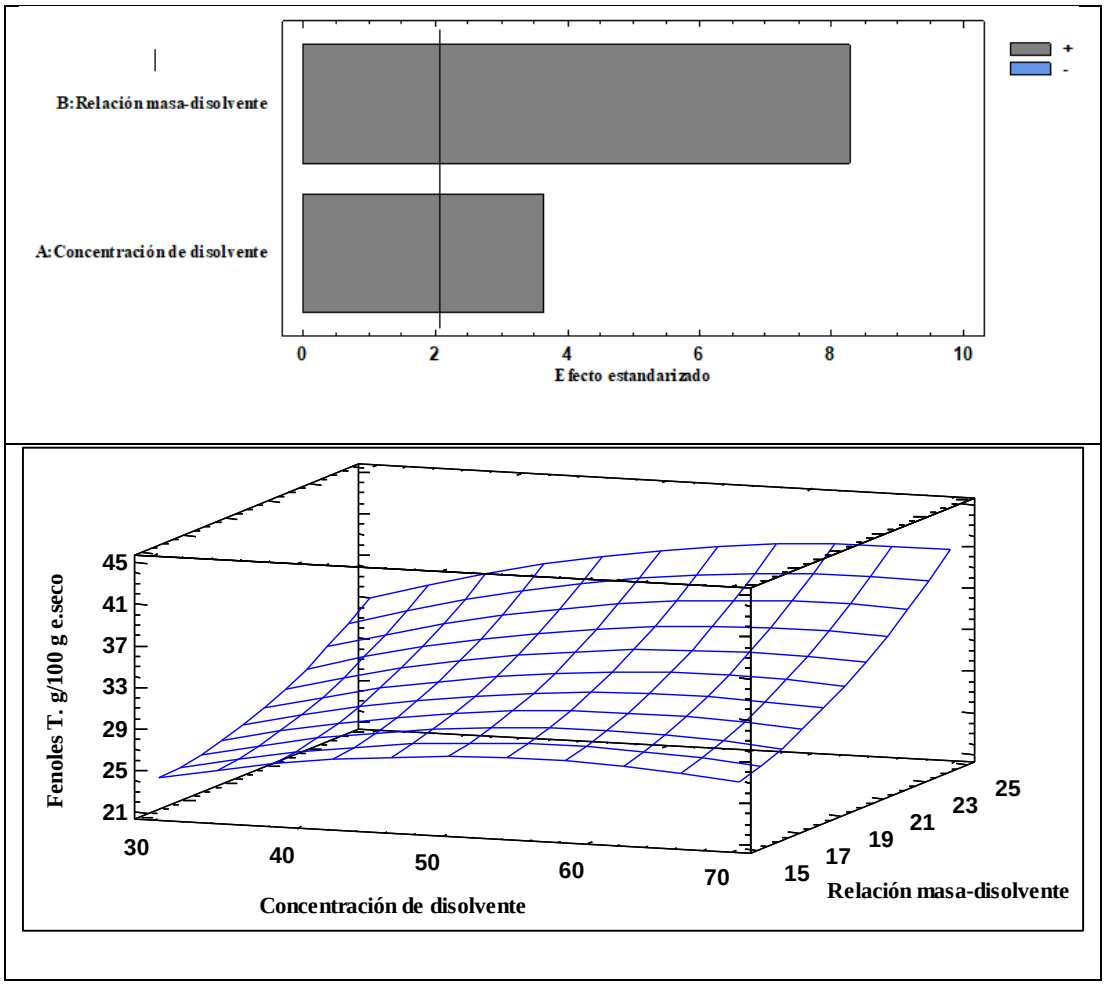


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado y diagrama de superficie de respuesta para la extracción de fenoles totales EAG

La extracción de fenoles totales estuvo influenciada mayormente por el factor relación masa-disolvente con una relación óptima de 1 parte de masa vegetal por cada 25 partes de disolvente figura 5, teniendo este factor un efecto significativo y mayor en comparación con la concentración de disolvente cuyo valor óptimo obtenido a partir del análisis de superficie de respuesta fue de 66,74 % (Anexo 4), esto se debe a que para potenciar una extracción de fenoles se requiere una mezcla de disolventes acidificada o hidrolisis ácida con ácido clorhídrico, en el caso del experimento se trabajó únicamente con etanol a una concentración del 70 % cuyo pH es cercano al neutro (Stalikas, 2007).

La figura 6 representa un diagrama de comparación de los tiempos de extracción analizados en comparación con el volumen de extracto obtenido.

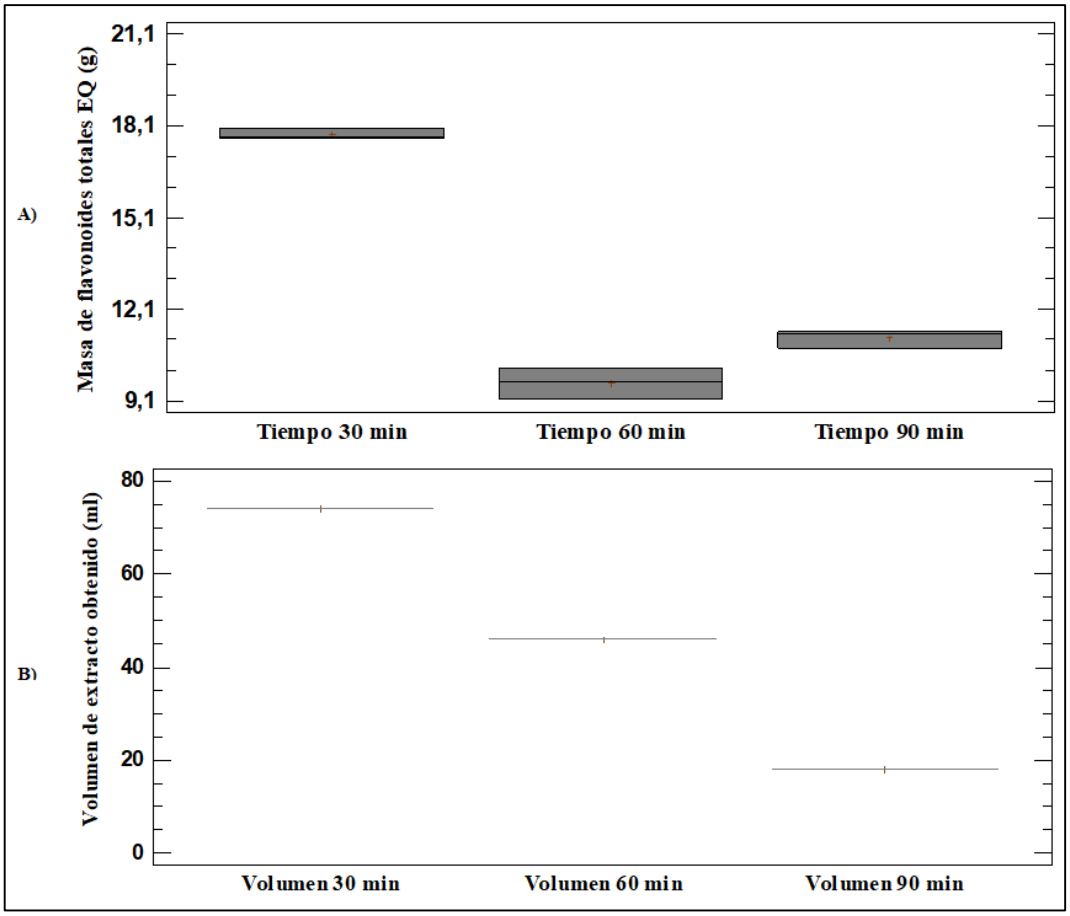


Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes de tiempo óptimo de extracción

El análisis estadístico por comparación de tiempos de extracción dio como resultado que el tiempo al cual se extrajeron mayor cantidad de flavonoides fue de 30 minutos, pese a ser el menor de los tres tiempos analizados se obtuvo un mayor volumen de extracto líquido como se observa en la Figura 6 B, esto se debió a una menor pérdida por evaporación del disolvente y compuestos volátiles extraídos de la materia vegetal debido a que el tiempo de ebullición fue menor, obteniéndose con este tratamiento el mayor valor posible de 18,1 g de flavonoides por 100 g de extracto seco en 30 minutos de extracción, Figura 6 A.

4.1.2. Microencapsulados

Como resultado del proceso de microencapsulación se obtuvo un polvo con estructura de tipo microesferas, esto se debió a que los dos polímeros utilizados maltodextrina y goma arábiga son moléculas de tipo sacárido y fue posible su solubilidad en el extracto líquido de *Muehlenbeckia tamnifolia* previo al secado por Spray-dryer, obteniéndose así microesferas formadas con una única matriz polimérica con los metabolitos dispersos en la misma (Shukla, 2018).

Tabla 2. Composición de microencapsulados

Microencapsulado	Polímeros	Masa previa a microencapsulación (g)	Proporción (%)	Rendimiento (%)
1	Goma arábiga	7,95	33,34	
	Maltodextrina	7,94	33,33	
	Extracto	7,94	33,33	75,65
	Total	23,83	100	
2	Maltodextrina	18,52	70	
	Extracto	7,94	30	42,36
	Total	26,46	100	

La tabla 2 muestra la composición de los dos tipos de microencapsulados desarrollados, el microencapsulado 1 formado por maltodextrina y goma arábiga presentó el mayor rendimiento de 75,65 %, en comparación con el compuesto 2 formado únicamente por maltodextrina cuyo rendimiento fue de 43,36 %. La diferencia en el rendimiento de los dos tipos de microencapsulados se debió a perdidas por adhesión a las paredes de la cámara caliente en el proceso de secado del Spray Dryer, el microencapsulado 2 compuesto por maltodextrina y extracto mostro mayor tendencia a adherirse a las paredes de cristal de la cámara caliente aumentando la superficie de contacto generando acumulación del microencapsulado y por tanto una pérdida del mismo.

4.1.3. Actividad antiinflamatoria in vitro por estabilización de membrana

En la figura 7 representa un diagrama de comparación del análisis estadístico de superficie de repuesta del porcentaje de inhibición de hemolisis de microencapsulados y de los fármacos que se utilizaron como control positivo.

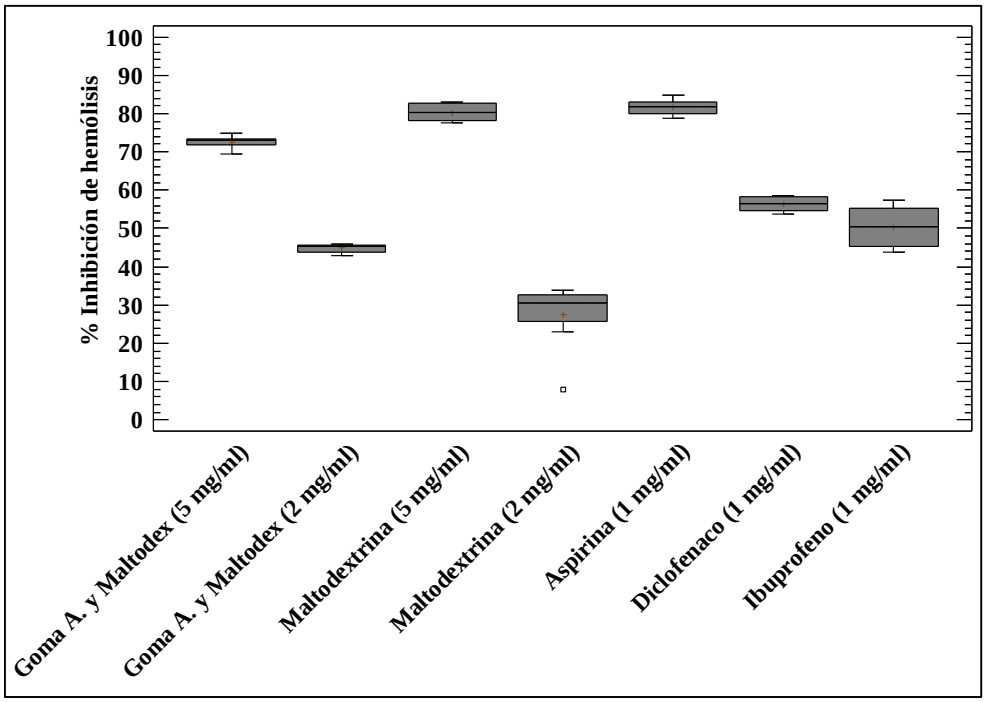


Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes de porcentaje de inhibición de hemolisis de microencapsulados y fármacos de control

El ensayo de estabilización de membrana en medio isotónico dio resultados positivos al inhibir la hemólisis inducida por calor en medio isotónico con los dos tipos de microencapsulados, el microencapsulado 2 mostró el mayor porcentaje de inhibición de hemólisis en una concentración de 5 mg ml^{-1} con un porcentaje de 80,39 % de inhibición, al estar formado solo por maltodextrina logró este microencapsulado logró una liberación mayor del principio activo al medio debido a que la solubilidad de la maltodextrina en medio acuoso es del 98%. El microencapsulado 1 logró un porcentaje menor siendo 72,58 % en la misma concentración de 5 mg ml^{-1} del microencapsulado 1, mostrando que la liberación de los ingredientes activos fue menor debido a los polímeros que forman la microcápsula. Según el análisis estadístico de comparación de resultados figura 7, se puede notar que el microencapsulado 2 en la concentración de 5 mg ml^{-1} tiene un efecto comparable con el de la aspirina en una concentración de 1 mg ml^{-1} y superior a la del diclofenaco e ibuprofeno a una concentración de 1 mg ml^{-1}, cuyos porcentajes de inhibición fueron 56,37 % y 50,51 % respectivamente. Por otra parte, el microencapsulado 1 mostró una actividad superior a la de diclofenaco e ibuprofeno en su concentración de 5 mg ml^{-1}.

4.1.3. Actividad antiinflamatoria in vitro por inhibición de desnaturalización de albúmina

La figura 8 muestra una representación gráfica del porcentaje de inhibición de desnaturalización de albúmina de los fármacos de control y de ambos microencapsulados.

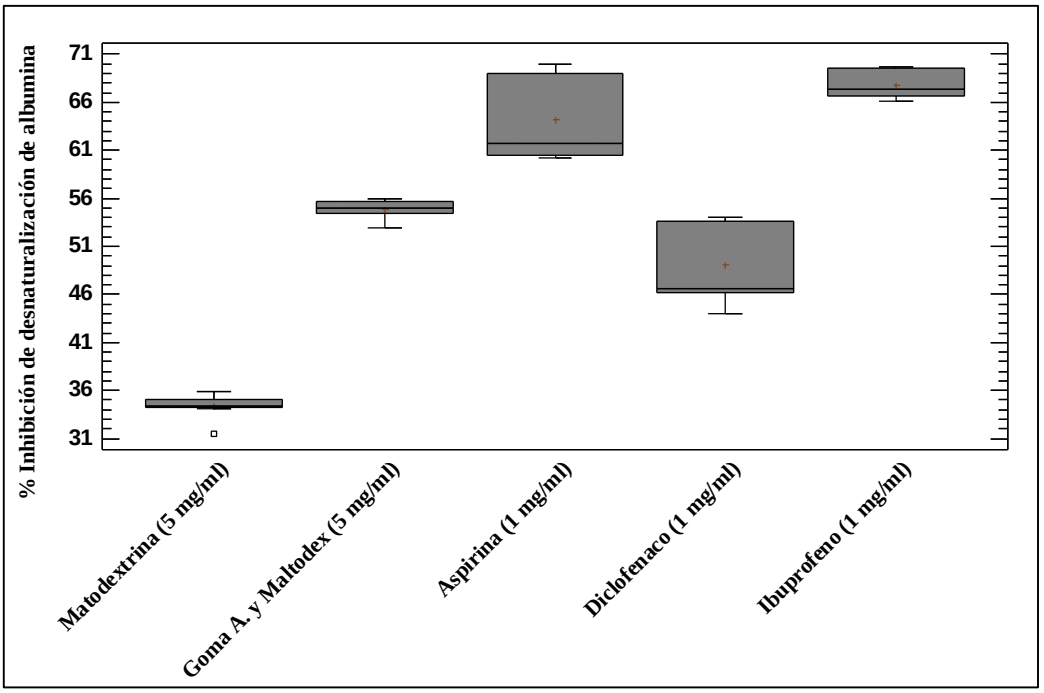


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes de porcentaje de inhibición de desnaturalización de albúmina

El ensayo de inhibición de desnaturalización de albúmina dio resultados positivos para ambos microencapsulados a una concentración de 5 mg ml^{-1}. El microencapsulado 1 tuvo el mayor porcentaje de inhibición logrando un 54,82 %, el microencapsulado 2 mostro un porcentaje menor 34,43 % de inhibición. El análisis de comparación con los fármacos de control figura 8, permitió observar que el microencapsulado 1 en concentración de 5 mg ml^{-1} logró un porcentaje de inhibición de desnaturalización albúmina similar al diclofenaco en concentración de 1 mg ml^{-1}.

4.1.4. Actividad antioxidante in vitro de microencapsulados de *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth) Meisn

Estudios previos en *Muehlenbeckia tamnifolia* demostraron la presencia de nueve compuestos flavonoides con potencial antioxidante entre los cuales se encuentran Lupeol Acetato, ácido cis-p-cumárico, Lupeol, β-sitosterol, ácido trans-p-cumárico, ácido Linoleico, Catequina, Afzelina y Quercitrina (Torres-Naranjo et al., 2016).

La figura 9 muestra una representación gráfica del análisis estadístico de comparación de los resultados de inhibición de DPPH y equivalencia de Trolox como ensayo de actividad antioxidante realizado a los dos microencapsulados.

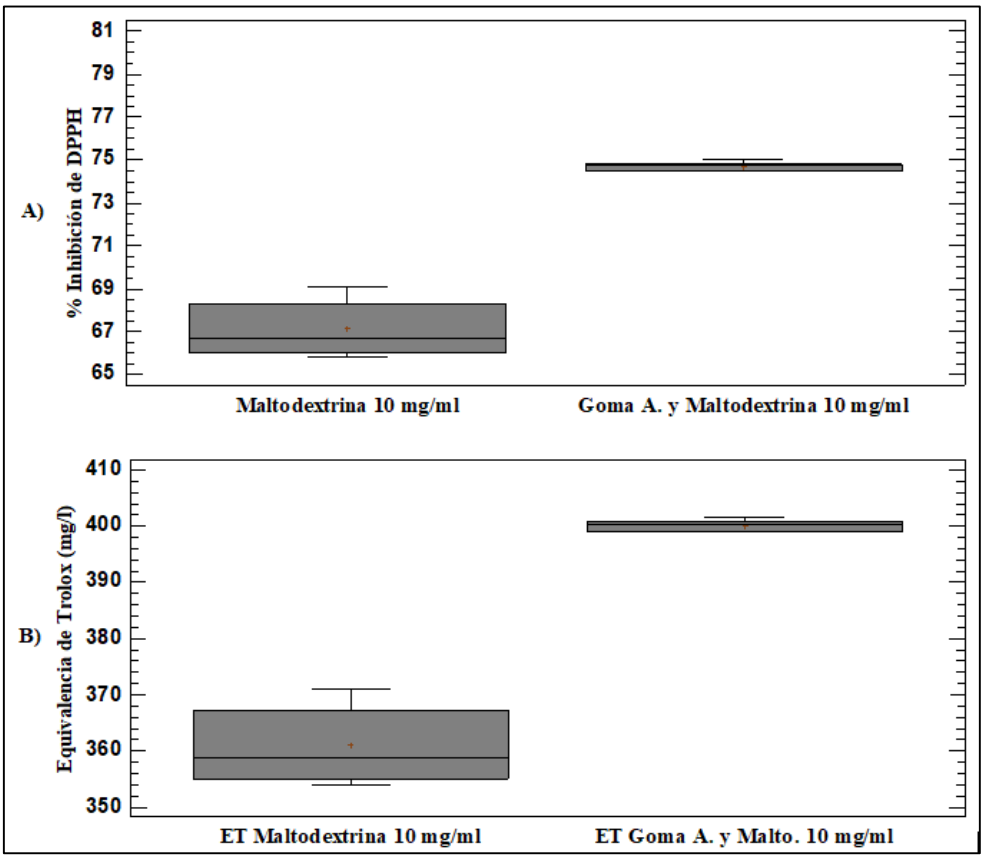


Figura 9. Diagramas de cajas y bigotes: A) Porcentaje de Inhibición de DPPH; B) Concentración equivalente de Trolox (mg.l^{-1})

El análisis de microencapsulados de *Muehlenbeckia tamnifolia*, determinó el potencial antioxidante y su concentración como equivalentes del compuesto ya conocido por su potencial antioxidante Trolox, en el ensayo de inhibición de DPPH ambos compuestos fueron puestos a prueba en la misma concentración de 10 mg ml^{-1} siendo el microencapsulado 1 formado por goma arábiga y maltodextrina el que presentó la mayor actividad antioxidante con un valor 74,69 % de inhibición de DPPH, este resultado se debe a que la goma arábiga es

casi totalmente soluble en soluciones alcohólicas de hasta el 60 %, ya que el ensayo DPPH se realizó en medio hidroalcohólico 50-50 esto facilitó la solubilidad y liberación del principio activo del microencapsulado 1. Seguido el microencapsulado 2 formado por maltodextrina logró un valor de 67,15 % de inhibición de DPPH, mostrando un potencial antioxidante positivo.

La concentración de 10 mg ml^{-1} del microencapsulado 1 es equivalente a 400,08 mg l^{-1} de Trolox, siendo este microencapsulado el que presento la mayor concentración equivalente y por ende el mayor porcentaje de inhibición del complejo de radicales libres DPPH. El microencapsulado 2 en una concertación de 10 $mg.ml^{-1}$ presento una equivalencia menor de 360,95 mg l^{-1} de Trolox, como se observa en el diagrama de comparación figura 9. También presentó el menor porcentaje de inhibición de DPPH.

4.2. Verificación de la hipótesis

Por medio del análisis de los datos obtenidos en los distintos ensayos realizados in vitro.

Ho $\neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

Ha=0 Se acepta la hipótesis alternativa por lo que se considera que los factores analizados si influyen en las actividades antiinflamatoria y antioxidante.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de metabolitos foliares de *Muehlenbeckia tamnifolia* aplicando una metodología de superficie de respuesta, a partir de este análisis estadístico se encontró que la combinación optima de factores para la extracción está formada por la concentración de disolvente etanol al 70 % y una relación de 1 parte de masa por cada 25 partes de disolvente, con un tiempo óptimo de extracción de 30 min a temperatura de ebullición de la mezcla, lo que permitió alcanzar un contenido de flavonoides y fenoles totales de 18.18 g y 41.43 g respectivamente por cada 100 gramos de extracto seco.
- Se obtuvieron dos microencapsulados del tipo microesfera a partir de los ingredientes activos farmacéuticos extraídos de *Muehlenbeckia tamnifolia*, obteniéndose un rendimiento de 75,65 % para el microencapsulado con la mezcla de maltodextrina y goma arábiga y un rendimiento de 42.36 % para el microencapsulado formado por maltodextrina.
- Se evaluó la actividad antiinflamatoria y potencial antioxidante *in vitro* de los ingredientes activos farmacéuticos microencapsulados, obtenido resultados positivos en los dos ensayos antinflamatorios y en el ensayo de actividad antioxidante. En el ensayo de estabilización de membrana eritrocitaria el microencapsulado formado por maltodextrina en su concentración de 5 mg ml^{-1} alcanzó el mayor porcentaje de inhibición de hemólisis con un valor de 80,39 %. En el ensayo de inhibición de desnaturalización de albúmina el microencapsulado formado por goma arábiga y maltodextrina en una concentración de 5 mg ml^{-1} presentó el mayor porcentaje de inhibición de desnaturalización. Finalmente, el microencapsulado formado por maltodextrina fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibición de DPPH logrando un potencial antioxidante comparable al de Trolox, con una concentración de 10 mg ml^{-1} de microencapsulado equivalente a 400,08 mg l^{-1} de Trolox.

5.2. Recomendaciones

- Realizar ensayos *in vivo* para evaluar la actividad antinflamatoria del extracto de *Muehlenbeckia tamnifolia* microencapsulado.
- Evaluar mediante ensayos *in vivo* la actividad antioxidante del extracto de *Muehlenbeckia tamnifolia* microencapsulado.
- Realizar estudios de toxicidad de los extractos de *Muehlenbeckia tamnifolia* microencapsulados.

BIBLIOGRAFÍA

Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*(2), 1131412–1131412. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1131412

Arthritis Foundation National Office. (2018). Artritis reumatoide. Retrieved November 7, 2018, from http://espanol.arthritis.org/espanol/disease-center/artritis-reumatoide/

Bazan, R. (2017). Necrosis Es Consecuencia de La Desnaturalización de Proteínas Intracelulares y La Digestión Enzimática de La Célula Con Daños Mortales. Retrieved November 7, 2018, from https://es.scribd.com/document/345934681/Necrosis-Es-Consecuencia-de-La-Desnaturalizacion-de-Proteinas-Intracelulares-y-La-Digestion-Enzimatica-de-La-Celula-Con-Danos-Mortales

Benly, P. (2015). *Role of Histamine in Acute Inflammation*. Retrieved from https://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol7Issue06/jpsr07061526.pdf

Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(1), 204–209. https://doi.org/10.1002/jsfa.6706

Cerón Martínez, C. E. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. Retrieved from http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/2926

Coordinadora Nacional de Artritis. (2014). 1. ¿Qué es la artritis reumatoide? | Asociación Coordinadora Nacional de Artritis. Retrieved November 7, 2018, from http://www.conartritis.org/todo-sobre-artritis/que-es-la-ar/que-es-la-artritis-reumatoide/#causas

Encyclopaedia Britannica. (2018). inflammation | Definition, Symptoms, Treatment, & Facts | Britannica.com. Retrieved July 29, 2018, from https://www.britannica.com/science/inflammation

Fagundes, L. L., Del-Vechio Vieira, G., De Pinho, J. de J. R. G., Yamamoto, C. H., Alves, M. S., Stringheta, P. C., & De Sousa, O. V. (2010). Pharmacological Proprieties of the Ethanol Extract of Muehlenbeckia platyclada (F. Muell.) Meisn. Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(10), 3942–3953. https://doi.org/10.3390/ijms11103942

Feng, W., Hao, Z., & Li, M. (2017). Isolation and Structure Identification of Flavonoids. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. InTech. https://doi.org/10.5772/67810

García, E. (2016). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE MACROALGAS DE BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO.* Retrieved from http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oacis/Medios/tesis/garcialop1.pdf

Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. (2018). Herbario JBB en línea :: Muehlenbeckia tamnifolia - JBB04207. Retrieved July 22, 2018, from http://colecciones.jbb.gov.co/herbario/especimen/7117

Juranek, I., Rackova, L., & Stefek, M. (2012). Stobadine – An Indole Type Alternative to the Phenolic Antioxidant Reference Trolox. In *Biochemistry*. InTech. https://doi.org/10.5772/32784

Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, *27*(3), 187–197. https://doi.org/10.3109/02652040903131301

Kumar, S. (2011). Microencapsulation techniques and its practices. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/279498086_Microencapsulation_techniques_and_its_practices

Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2009). *INVITRO ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT OF ENICOSTEMMA AXILLARE*. *International Journal of Drug Development and Research* (Vol. 3). International Journal of Drug Development & Research. Retrieved from http://www.ijddr.in/drug-development/invitro-antiinflammatory-activity-of-methanol-extractof-enicostemma-axillare.php?aid=5645

Lisset, M., Regal, L., Borges, A. A., Omar De Armas García, J., Alvarado, L. M., Antonio, J., … Sol, D. (2016). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares Inflammatory Acute Response. Biochemical and Cellular Considerations. Retrieved from http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v5n1/rf06105.pdf

M.C. Recio, I. Andujar, & J.L. Rios. (2012). Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(14), 2088–2103. https://doi.org/10.2174/092986712800229069

Maione, F., Russo, R., Khan, H., & Mascolo, N. (2016). Medicinal plants with anti-

inflammatory activities. *Natural Product Research*, *30*(12), 1343–1352. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1062761

Medline Plus. (2018). Respuesta inmune: MedlinePlus enciclopedia médica. Retrieved November 7, 2018, from https://medlineplus.gov/ency/article/000821.htm

Naturalista biodiversidad. (2018). Metabolitos de baja polaridad en hojas de Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meisn. Retrieved July 22, 2018, from http://naturalista.biodiversidad.co/taxa/286026-Muehlenbeckia-tamnifolia

Osafo, N., Agyare, C., Obiri, D. D., & Antwi, A. O. (2017). Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. In *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. InTech. https://doi.org/10.5772/68090

Rodríguez Aguirre, O. E., Torrenegra Guerrero, R. D., Beltran, S., Matulevich Pelaez, J. A., & Castrillón, W. (2014). *Metabolitos de baja polaridad en hojas de Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meisn*. *Revista de Tecnología, ISSN 1692-1399, Vol. 13, Nº. 3, 2014 (Ejemplar dedicado a: Producción y consumo sostenible), págs. 95-108* (Vol. 13). Universidad El Bosque. Retrieved from https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041508

Ruiz- Cruz, S., Chaparro- Hernández, S., Ruiz, K. L. H., Cira- Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ortega, L. E. G., … Mata, M. A. L. (2017). Flavonoids: Important Biocompounds in Food. In *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. InTech. https://doi.org/10.5772/67864

Sembiring, E. (2018). Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of Caesalpinia bonduc (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal Pharmacogn J*, *10*(101), 123–127. https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.22

Shukla, P. (2018). Microcapsules and Microspheres. Retrieved from http://www.venturecenter.co.in/techrx/pdfs/TechShowcase_Microsphere.pdf

Sree Kumari, C., Yasmin, N., Hussain, M. R., & Babuselvam, M. (2015). *INVITRO ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-ARTHRITIC PROPERTY OF RHIZOPORA MUCRONATA LEAVES*. Retrieved from http://www.ijpsr.info/docs/IJPSR15-06-03-052.pdf

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. https://doi.org/10.1002/jssc.200700261

Szalay, J. (2015). What Are Flavonoids? Retrieved November 7, 2018, from

https://www.livescience.com/52524-flavonoids.html

Torres-Naranjo, M., Suárez, A., Gilardoni, G., Cartuche, L., Flores, P., & Morocho, V. (2016). Chemical Constituents of Muehlenbeckia tamnifolia (Kunth) Meisn (Polygonaceae) and Its In Vitro α-Amilase and α-Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, *21*(11), 1461. https://doi.org/10.3390/molecules21111461

Vargas, W. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes centrales*. Editorial Universidad de Caldas. Retrieved from https://es.scribd.com/document/321006132/Guia-Ilustrada-Plantas-Del-Quindio

ANEXOS

Anexo 1. Datos obtenidos en extracción de flavonoides totales para determinación de las condiciones óptimas de extracción

Concentración de disolvente etanol (%)	**Relación de masa-disolvente**	**Porcentaje de humedad del extracto** (%)	**Porcentaje de sólidos del extracto** (%)	**Absorbancia (415 nm)**	**Masa de flavonoides totales por litro de extracto (g/l)**	**Volumen obtenido (ml)**	**Masa de extracto sólido (g)**	**Masa de flavonoides (g)**	**Masa de flavonoides totales en gramos por cada 100 gamos de extracto seco** (g/g)
70	1-25	98,75	1,25	0,463	2,27	74	0,93	0,17	18,18
70	1-25	98,74	1,26	0,460	2,26	74	0,93	0,17	17,90
70	1-25	98,77	1,23	0,449	2,19	74	0,91	0,16	17,84
70	1-20	98,12	1,88	0,503	2,50	70	1,32	0,17	13,29
70	1-20	98,16	1,84	0,498	2,47	70	1,29	0,17	13,42
70	1-20	98,19	1,81	0,487	2,41	70	1,27	0,17	13,30
70	1-15	97,76	2,24	0,536	2,68	64	1,43	0,17	11,98
70	1-15	97,73	2,27	0,536	2,68	64	1,45	0,17	11,82
70	1-15	97,70	2,30	0,539	2,70	64	1,47	0,17	11,74
50	1-25	98,69	1,31	0,309	1,41	71	0,93	0,10	10,73
50	1-25	98,70	1,30	0,308	1,40	71	0,92	0,10	10,76
50	1-25	98,70	1,30	0,304	1,38	71	0,92	0,10	10,59
50	1-20	98,13	1,87	0,344	1,60	66	1,24	0,11	8,55
50	1-20	98,12	1,88	0,344	1,60	66	1,24	0,11	8,52
50	1-20	98,12	1,88	0,374	1,77	66	1,24	0,12	9,42
50	1-15	97,11	2,89	0,464	2,28	63	1,82	0,14	7,88
50	1-15	97,16	2,84	0,465	2,28	63	1,79	0,14	8,04
50	1-15	97,13	2,87	0,464	2,28	63	1,81	0,14	7,94
30	1-25	98,53	1,47	0,307	1,39	73	1,07	0,10	9,48
30	1-25	98,53	1,47	0,308	1,40	73	1,07	0,10	9,52
30	1-25	98,54	1,46	0,300	1,35	73	1,07	0,10	9,28
30	1-20	97,99	2,01	0,378	1,79	68	1,37	0,12	8,92
30	1-20	98,01	1,99	0,378	1,79	68	1,35	0,12	9,01
30	1-20	98,04	1,96	0,374	1,77	68	1,33	0,12	9,04
30	1-15	96,95	3,05	0,491	2,43	63	1,92	0,15	7,97
30	1-15	96,93	3,07	0,494	2,45	63	1,93	0,15	7,97
30	1-15	96,94	3,06	0,495	2,45	63	1,93	0,15	8,02

Anexo 2. Datos obtenidos de muestras en extracción de polifenoles totales para determinación de las condiciones óptimas de extracción

Concentración de disolvente etanol (%)	Relación de masa-disolvente	Porcentaje de humedad del extracto (%)	Porcentaje de sólidos del extracto (%)	Absorbancia (750 nm)	Masa de fenoles totales por litro de extracto (g/l)	Volumen obtenido (ml)	Masa de extracto sólido (g)	Masa de fenoles totales (g)	Masa de fenoles totales en gramos por cada 100 gamos de extracto seco
70	1-25	98,75	1,25	0,982	5,18	74	0,93	0,38	41,43
70	1-25	98,74	1,26	0,977	5,15	74	0,93	0,38	40,88
70	1-25	98,77	1,23	0,958	5,04	74	0,91	0,37	40,99
70	1-20	98,12	1,88	1,041	5,52	70	1,32	0,39	29,34
70	1-20	98,16	1,84	1,045	5,54	70	1,29	0,39	30,10
70	1-20	98,19	1,81	1,045	5,54	70	1,27	0,39	30,60
70	1-15	97,76	2,24	1,136	6,06	64	1,43	0,39	27,05
70	1-15	97,73	2,27	1,217	6,52	64	1,45	0,42	28,73
70	1-15	97,70	2,30	1,247	6,69	64	1,47	0,43	29,10
50	1-25	98,69	1,31	1,019	5,39	71	0,93	0,38	41,15
50	1-25	98,70	1,30	1,024	5,42	71	0,92	0,38	41,68
50	1-25	98,70	1,30	1,027	5,44	71	0,92	0,39	41,82
50	1-20	98,13	1,87	1,008	5,33	66	1,24	0,35	28,43
50	1-20	98,12	1,88	1,009	5,33	66	1,24	0,35	28,35
50	1-20	98,12	1,88	1,148	6,13	66	1,24	0,40	32,59
50	1-15	97,11	2,89	1,440	7,80	63	1,82	0,49	26,98
50	1-15	97,16	2,84	1,443	7,81	63	1,79	0,49	27,51
50	1-15	97,13	2,87	1,444	7,82	63	1,81	0,49	27,24
30	1-25	98,53	1,47	0,830	4,31	73	1,07	0,31	29,32
30	1-25	98,53	1,47	0,834	4,33	73	1,07	0,32	29,48
30	1-25	98,54	1,46	0,928	4,87	73	1,07	0,36	33,36
30	1-20	97,99	2,01	1,125	6,00	68	1,37	0,41	29,83
30	1-20	98,01	1,99	1,134	6,05	68	1,35	0,41	30,39
30	1-20	98,04	1,96	1,140	6,08	68	1,33	0,41	31,03
30	1-15	96,95	3,05	1,246	6,69	63	1,92	0,42	21,93
30	1-15	96,93	3,07	1,250	6,71	63	1,93	0,42	21,86
30	1-15	96,94	3,06	1,418	7,67	63	1,93	0,48	25,07

Anexo 3. Análisis de varianza y optimización para de extracción de flavonoides totales EQ

Fuente	***Suma de Cuadrados***	**Grados de libertad**	***Cuadrado Medio***	***Razón-F***	***Valor-P***
A: Concentración de disolvente	140,896	1	140,896	521,52	0,0000
B: Relación masa-disolvente	53,1137	1	53,1137	196,60	0,0000
AA	35,7216	1	35,7216	132,22	0,0000
AB	16,4736	1	16,4736	60,98	0,0000
BB	2,04167	1	2,04167	7,56	0,0128
bloques	0,00246667	2	0,00123333	0,00	0,9954
Error total	5,13312	19	0,270164		
Total (corr.)	253,382	26			
R-cuadrada	97,9742 %				
Coeficiente de regresión para flavonoides totales EQ extraídos	Flavonoides totales EQ = 31,2044 - 0,704444*Concentración de disolvente - 1,17561*Relación masa-disolvente + 0,0061*Concentración de disolvente^2 + 0,0117167*Concentración de disolvente*Relación masa-disolvente + 0,0233333*Relación masa-disolvente^2				
Optimizar Respuesta	Meta: maximizar extracción de flavonoides totales EQ Valor óptimo = 17,4806 g				
Factor	*Bajo*	*Alto*	***Óptimo***		
Concentración de disolvente	30%	70%	**70 %**		
Relación masa-disolvente	1-15	1-25	**1-25**		

Anexo 4. Análisis de varianza y optimización para de extracción de fenoles totales EAG

Fuente	*Suma de Cuadrados*	Grados de libertad	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
A: Concentración de disolvente	117,3	1	117,3	18,07	0,0004
B: Relación masa-disolvente	608,307	1	608,307	93,69	0,0000
AA	31,1448	1	31,1448	4,80	0,0412
AB	19,0512	1	19,0512	2,93	0,1030
BB	21,7361	1	21,7361	3,35	0,0830
bloques	16,4348	2	8,21738	1,27	0,3048
Error total	123,359	19	6,49256		
Total (corr.)	937,333	26			
R-cuadrada	86,8394 %				
Coeficiente de regresión para extracción de fenoles totales EQ extraídos	Fenoles totales EAG = 30,7707 + 0,445222*Concentración de disolvente - 2,51267*Relación masa-disolvente - 0,00569583*Concentración de disolvente^2 + 0,0126*Concentración de disolvente*Relación masa-disolvente + 0,0761333*Relación masa-disolvente^2				
Optimizar Respuesta	Meta: maximizar extracción de fenoles totales EAG Valor óptimo = 40,9041 g				
Factor	*Bajo*		*Alto*	***Óptimo***	
Concentración de disolvente	30%		70%	**66,7369%**	
Relación masa-disolvente	1-15		1-25	**1-25**	

Anexo 5. Análisis de varianza de tiempo óptimo de extracción

Fuente	*Suma de Cuadrados*	*Grados de libertad*	*Cuadrado Medio*	*Razón-F*	*Valor-P*
Entre grupos	112,643	2	56,3214	472,67	0,0000
Intra grupos	0,714933	6	0,119156		
Total (Corr.)	113,358	8			
	Pruebas de Múltiple Rangos				
Método: 95,0 porcentaje LSD	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*		
Tiempo 60 min	3	9,6866	X		
Tiempo 90 min	3	11,163	X		
Tiempo 30 min	3	17,82	X		
Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*		
Tiempo 30 min - Tiempo 60 min	*	8,1333	0,689654		
Tiempo 30 min - Tiempo 90 min	*	6,6566	0,689654		
Tiempo 60 min - Tiempo 90 min	*	-1,4766	0,689654		

Anexo 6. Porcentaje de inhibición de hemolisis de microencapsulados

Microencapsulado	**1**	**1**	**2**	**2**
Polímeros	Goma arábiga y maltodextrina	Goma arábiga y maltodextrina	Maltodextrina	Maltodextrina
Concentración	5 $mg.ml^{-1}$	2 $mg.ml^{-1}$	5 $mg.ml^{-1}$	2 $mg.ml^{-1}$
Muestra #	**% inhibición de hemólisis**	**% inhibición de hemólisis**	**% inhibición de hemólisis**	**% inhibición de hemólisis**
1	74,881	46,046	83,106	33,725
2	74,722	45,252	81,264	32,721
3	69,292	43,714	80,724	30,271
4	72,985	42,908	77,644	33,206
5	72,824	45,111	77,937	25,651
6	71,683	45,587	80,032	26,381
7	73,270	45,397	78,222	31,651
8	73,460	45,619	82,921	33.721
9	70,603	45,841	82,730	22,952
10	72,095	43,873	79,397	30,794
x	72,582	44,935	80,398	30.107
σ	1,736	1,055	2,095	4.029

Anexo 7. Porcentaje de inhibición de hemolisis de fármacos de control

Fármaco de control	**Aspirina**	**Diclofenaco**	**Ibuprofeno**
Concentración	1 $mg.ml^{-1}$	1 $mg.ml^{-1}$	1 $mg.ml^{-1}$
Muestra #	**% inhibición de hemólisis**	**% inhibición de hemólisis**	**% inhibición de hemólisis**
1	84,694	58,558	57,479
2	81,708	56,780	56,304
3	78,755	53,922	43,665
4	82,693	53,827	55,319
5	82,946	56,415	54,126
6	79,916	54,610	50,222
7	79,968	58,254	47,206
8	84,508	58,508	50,603
9	80,540	56,730	45,016
10	82,032	56,190	45,175
x	81,776	56,379	50,511
σ	1,990	1,789	5,108

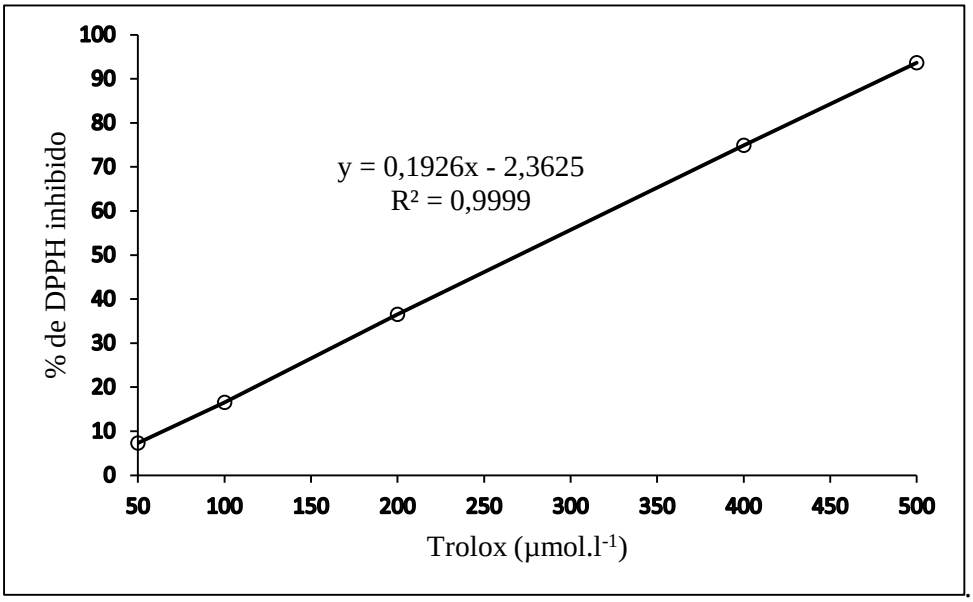
Anexo 8. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de albumina obtenido con microencapsulados

Microencapsulado	**1**	**2**
Polímeros	Goma arábiga y maltodextrina	Maltodextrina
Concentración	5 $mg.ml^{-1}$	5 $mg.ml^{-1}$
Muestra #	**% inhibición de desnaturalización**	**% inhibición de desnaturalización**
1	52,915	31,540
2	53,513	34,081
3	54,410	34,230
4	54,858	34,230
5	54,858	34,380
6	55,007	34,380
7	55,456	35,127
8	55,605	35,127
9	55,755	35,426
10	55,904	35,874
x	54,828	34,439
σ	0,978	1,184

Anexo 9. Porcentaje de inhibición de desnaturalización de albumina obtenido con fármacos de control

Fármaco de control	**Aspirina**	**Diclofenaco sódico**	**Ibuprofeno**
Concentración de fármaco de control	1 $mg.ml^{-1}$	1 $mg.ml^{-1}$	1 $mg.ml^{-1}$
Muestra #	**% de inhibición de desnaturalización**	**% de inhibición de desnaturalización**	**% de inhibición de desnaturalización**
1	60,239	43,946	66,069
2	60,389	45,291	66,218
3	60,538	46,188	66,667
4	60,538	46,338	67,115
5	61,584	46,487	67,265
6	61,734	46,637	67,564
7	68,161	53,662	67,713
8	69,058	53,662	69,507
9	69,357	53,961	69,656
10	69,955	53,961	69,656
x	64,155	49,013	67,743
σ	4,333	4,202	1,389

Anexo 10. Curvas estándar de ensayo en microplaca para actividad antioxidante (DPPH)



Anexo 11. Porcentaje de inhibición de DPPH de microencapsulados

Microencapsulado	**1**	**2**
Polímero	Goma arábiga y maltodextrina	Maltodextrina
Concentración de microencapsulado	10 mg ml^{-1}	10 mg ml^{-1}
Muestra #	**% de inhibición de DPPH**	**% de inhibición de DPPH**
1	74,460	65,827
2	74,460	66,007
3	74,460	66,007
4	74,640	66,187
5	74,640	66,727
6	74,820	66,727
7	74,820	67,806
8	74,820	68,345
9	74,820	68,885
10	75,000	69,065
x	74,694	67,158
σ	0,191	1,255

Anexo 12. Concentración equivalente en Trolox de microencapsulados

Microencapsulado	**1**	**2**
Polímero	Goma arábiga y maltodextrina	Maltodextrina
Concentración de microencapsulado	10 mg.ml^{-1}	10 mg.ml^{-1}
Muestra #	**Concentración equivalente de Trolox mg.l^{-1}**	**Concentración equivalente de Trolox mg.l^{-1}**
1	398,873	354,049
2	398,873	354,983
3	398,873	354,983
4	399,807	355,917
5	399,807	358,718
6	400,741	358,718
7	400,741	364,321
8	400,741	367,123
9	400,741	369,924
10	401,674	370,858
x	400,087	360,959
σ	0,989	6,518