



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



Estudio del potencial antiinflamatorio y citotóxico del extracto acuoso de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa 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.

Autora: Jhoana Maricela Tello Tello

Tutor: Ph. D. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Marzo 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph. D. Orestes Darío López Hernández

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, 15 de enero del 2018



Ph. D. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jhoana Maricela Tello Tello manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jhoana Maricela Tello Tello', with some decorative flourishes.

Srta. Jhoana Maricela Tello Tello

C.I. 050362456-1

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



MSc. Yunys Pérez Betancourt
C.I. 175647274-0



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero
C.I. 175718120-9

Ambato, 15 de febrero 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jhoana Maricela Tello Tello', with some decorative flourishes.

Srta. Jhoana Maricela Tello Tello

C.I. 050362456-1

AUTOR

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Al Ph. D. Orestes Darío López Hernández por su guía y apoyo durante todo este tiempo.

Al MSc. Yunys Pérez y a la Ing. Cecilia Carpio, gracias por el apoyo.

A mi familia y amigos.

Gracias a todos los que me apoyaron en esta etapa de mi vida.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

TRABAJO DE TITULACIÓN

MODALIDAD

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	xiii
CAPITULO I.....	1
1. EL PROBLEMA	1
1.1. Tema	1
1.2. Justificación	1
1.3. Objetivos	2
CAPITULO II.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes investigativos	3
2.1.1. Metabolitos vegetales y su importancia farmacológica	3
2.1.2. Diente de león	3
2.1.3. Secado por aspersion.....	7
2.2. Hipótesis	8
2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis	8
CAPITULO III	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Materiales.....	9
3.2. Equipos	9
3.3. Reactivos.....	10
3.4. Métodos.....	11
3.4.1. Preparación del material vegetal	11
3.4.2. Diseño experimental	11
3.4.3. Estudio de las condiciones de extracción.....	12
3.4.4. Obtención del extracto líquido	13
3.4.5. Secado por aspersion.....	14
3.4.6. Caracterización físico-química del extracto seco de las hojas de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>).....	14
3.4.7. Determinación de la actividad citotóxica del extracto seco	15
3.4.8. Determinación de la actividad antiinflamatorio del extracto seco de las hojas de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	17

CAPITULO IV	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Análisis y discusión de resultados	20
4.1.1. Determinación de sólidos solubles totales	20
4.1.2. Determinación del mejor tratamiento mediante análisis estadístico	22
4.1.3. Análisis del secado por aspersión del extracto acuoso de las hojas de diente de león.....	25
4.1.4. Análisis de las características físico-químicas del extracto seco de las hojas de diente de león	26
4.1.5. Actividad antiinflamatoria del extracto seco de las hojas de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>).....	28
4.1.6. Actividad citotóxica del extracto seco de las hojas de diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>).....	30
4.2. Verificación de hipótesis.....	31
CAPITULO V.....	32
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
5.1. CONCLUSIONES.....	32
5.2. RECOMENDACIONES.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	34
ANEXOS	41

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Diseño experimental 2^2 para el estudio de las condiciones de extracción ...	11
Tabla II. Cantidad de las soluciones y condiciones del ensayo de la actividad antiinflamatoria	18
Tabla III. Porcentaje de SST, masa sólida extraída y rendimiento de la extracción..	20
Tabla IV. Niveles óptimos de los factores para la obtención del mejor tratamiento.	23
Tabla V. Rendimiento del secado por aspersión del extracto	25
Tabla VI. Polifenoles presentes en el extracto seco de las hojas de diente de león...	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de la extracción de SST.....	22
Figura 2. Grafica de interacción para el rendimiento de extracción de SST	23
Figura 3. Superficie de respuesta estimada del rendimiento de extracción de SST..	24
Figura 4. Comparación de los promedios del porcentaje de la actividad antiinflamatoria del extracto seco del diente de león y la aspirina	28
Figura 5. Actividad citotóxica del extracto acuoso de las hojas de diente de león en células de cáncer de mama MCF-7	30

RESUMEN

Uno de los enfoques de la investigación es el desarrollo de fármacos de origen natural para el tratamiento de patologías. Las plantas por su gran biodiversidad y disponibilidad son una de las principales fuentes de principios activos con importancia farmacológica, el diente de león (*Taraxacum officinale*) es una mala hierba que por su gran contenido de principios activos ha sido utilizada tradicionalmente para la cura de patologías. En la presente investigación se estudió la capacidad del extracto acuoso de las hojas de diente de león, obtenido mediante secado por aspersión, como agente antiinflamatorio y citotóxico. La actividad antiinflamatoria se determinó empleando el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos humanos, mientras que la actividad citotóxica se evaluó empleando el método de bromuro de 3-(4-5dimetildiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) con la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto acuoso de las hojas de diente de león presentó actividad antiinflamatoria a partir de la concentración de 2,5 mg/ml y al emplear una concentración de 5,5 mg/ml presentó una actividad de 58,89 % que superó a la aspirina. En el caso de la actividad citotóxica el IC50 obtenido fue de 0,024, el extracto presentó un porcentaje de muerte celular del 87 % empleando una dilución 1,00E-01 partiendo de la solución madre de 50 mg/ml. En conclusión, el extracto acuoso de las hojas de diente de león presentó actividad antiinflamatoria y citotóxica al emplear concentraciones altas del extracto.

Palabras claves: actividad biológica, antiinflamatorio, citotóxico, extracto de diente de león, *Taraxacum officinale*.

ABSTRACT

One of the approaches of the research is the development of drugs of natural origin for the treatment of pathologies. Plants, due to their great biodiversity and availability, are one of the main sources of active ingredients with pharmacological importance, the dandelion (*Taraxacum officinale*) is a weed that for its great content of active ingredients has been traditionally used for the cure of pathologies. In the present investigation, the capacity of the aqueous extract of dandelion leaves, obtained by spray drying, was studied as an anti-inflammatory and cytotoxic agent. The antiinflammatory activity was determined using the method of stabilization of the membrane of human erythrocytes, while the cytotoxic activity was evaluated using the method of bromide of 3- (4-5-dimethyldiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole (MTT) with the breast cancer cell line MCF-7. The results obtained indicated that the aqueous extract of the leaves of dandelion presented anti-inflammatory activity from the concentration of 2.5 mg/ml and when using a concentration of 5.5 mg/ml presented an activity of 58.89 % that exceeded to aspirin. In the case of cytotoxic activity, the IC50 obtained was 0.024, the extract showed a cell death percentage of 87 % using a 1.00E-01 dilution starting from the 50 mg/ml stock solution. In conclusion, the aqueous extract of the dandelion leaves showed anti-inflammatory and cytotoxic activity when high concentrations of extract were used.

Keywords: biological activity, antiinflammatory, cytotoxic, extract of dandelion, *Taraxacum officinale*.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas opciones terapéuticas derivadas de la medicina tradicional se ha originado por adoptar modos de vida más sanos y por la insatisfacción en el tratamiento con la medicina convencional principalmente por la presencia de efectos secundarios (Torres, Ibarra Martínez, Martínez, & Díaz de Salas, 2016).

A lo largo del tiempo las plantas por la gran diversidad de componentes que poseen en su estructura han sido utilizadas como medicina tradicional para la curación de patologías, en base a ello, actualmente las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con principios activos de origen vegetal que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos (Villa-Ruano et al., 2011).

El diente de león (*Taraxacum officinale*), es una mala hierba que ha sido empleada por la medicina ancestral para el tratamiento de múltiples dolencias como afecciones de la vesícula biliar, estreñimiento, enfermedades cutáneas, como laxante, además presenta actividad colerética y diurética (Linares Gimeno, 2013). En la medicina tradicional china esta planta considerada como no tóxica ha sido utilizada como antiinflamatorio, antirreumática y anticancerígeno (Jinchun & Jie, 2011; Ovadje, Hamm, & Pandey, 2012).

El avance tecnológico y científico que se ha utilizado para la obtención de medicamentos, ha favorecido el desarrollo de la industria farmacológica (Torres et al., 2016). En el caso de la obtención de los principios activos de origen vegetal se han empleado tecnologías como el secado por aspersion que le proporciona al producto mayor estabilidad, largo tiempo de duración y mejor conservación de sus principios activos (LÓPEZ HERNÁNDEZ, MENÉNDEZ CASTILLO, GARCÍA PEÑA, GONZÁLEZ SANABIA, & NOGUEIRA MENDOZA, 2010).

Este trabajo se enfocó en el estudio del potencial del extracto de las hojas de diente de león, como agente antiinflamatorio y citotóxico, aplicando la tecnología de secado por aspersion para la obtención de los principios activos de la planta

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema

“ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO DEL
EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE DIENTE DE LEÓN (*Taraxacum
officinale*)”

1.2. Justificación

El desarrollo de nuevas investigaciones y tecnologías para el tratamiento de enfermedades, se ha enfocado en la búsqueda de metabolitos naturales provenientes de plantas medicinales que, por ser utilizadas desde tiempos remotos por nuestros ancestros para la curación de múltiples dolencias, actualmente han presentado gran importancia en el campo de la farmacología.

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad de plantas medicinales por lo que posee un gran potencial para la obtención de principios activos que mediante el empleo de nuevas tecnologías como el secado por aspersion mejoran la eficiencia de sus beneficios curativos. Por lo tanto, es necesario ampliar el campo de estudio de las plantas con actividad biológica, para proporcionar nuevas alternativas e información que sea el punto de partida para el desarrollo de fármacos de origen natural y que puedan ser utilizados a favor de la salud humana.

Una de las alternativas es la utilización del diente de león, que en el ámbito de la medicina tradicional ha sido empleada para la curación de múltiples dolencias, esta planta al ser considerada como una mala hierba no es utilizada como producto de primera necesidad, no requiere de condiciones estrictas para su crecimiento por lo que existe gran disponibilidad de material vegetal y en el ámbito económico generaría ventajas ya que no se producirían gastos en la obtención de la materia prima.

Estudios previos afirman que el extracto de raíz de diente de león posee actividad antiinflamatoria y citotóxica. Al igual que la raíz, las hojas presentan similar composición de principios activos tales como los polifenoles, por lo que se ha optado probar si su extracto posee los mismos efectos sobre dichas actividades, pero en este estudio se empleará la tecnología de secado por aspersión para la obtención de los principios activos hidrosolubles de esta planta, que permitirá obtener un producto estable con un tiempo de duración prolongado y un mejor aprovechamiento de sus principios activos. Los resultados de esta investigación permitirán proporcionar nueva información sobre los posibles usos de esta planta en el campo de la biotecnología y la medicina.

1.3. Objetivos

1.3.1. Generales

Estudiar el potencial antiinflamatorio y citotóxico del extracto acuoso de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

1.3.2. Específicos

- Extraer los componentes hidrosolubles de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*).
- Obtener un extracto seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) utilizando el método de secado por aspersión y evaluar sus características físico-químicas.
- Evaluar la actividad citotóxica en células de cáncer de mama *in vitro* con diferentes concentraciones del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) empleando el método de estabilización de membrana.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Metabolitos vegetales y su importancia farmacológica

El ser humano durante siglos ha empleado a las plantas por su composición y sus propiedades como remedio para curar múltiples dolencias. Las plantas han formado parte de la medicina ancestral y continúan formando parte esencial en la salud (Vila-Ruano, Pacheco-Hernández, Lara-Zaragoza, Monsreal, & Cardeña.Bazziere, 2011). Actualmente son motivo de investigación para validar su uso terapéutico y su posterior aplicabilidad farmacológica. La búsqueda de principios activos aislados de estas fuentes naturales tiene como objetivo obtener nuevos fármacos que después de ser sometidos a análisis clínicos que demuestren su efectividad, puedan incorporarse como nuevos agentes terapéuticos.

2.1.2. Diente de león

2.1.2.1. Generalidades

Nombre científico: *Taraxacum officinale* F.H. Wigg.

Nombres comunes: amargón, achicoria amarga, chicoria, diente de león, lechuguilla, taraxacón (Gómez & Jiménez, 2007).

El diente de león proveniente de Europa, es una planta que se ha propagado por todo el mundo, por lo que es considerada una mala hierba, pero es más abundante en subpáramo y climas fríos, esta hierba ha sido utilizada desde la antigüedad para curar enfermedades (Castro, Diaz, & Serna, 2013).

2.1.2.2. Descripción botánica.

Es una planta herbácea, perenne que no posee tallo, alcanza los 30 cm de altura. Su raíz es gruesa con pulpa lechosa y pueden llegar a medir los 30 cm. Contiene numerosas hojas, dentadas y lobuladas, dispuestas en roseta a nivel del suelo, sus flores son de color amarillo y su fruto posee un vilano que permite su propagación a través del viento (Gómez & Jiménez, 2007).

2.1.2.3. Clasificación taxonómica

Según la Organización Tropicos.org. (2017) y Asqui Lalón. (2012), la clasificación taxonómica para el diente de león es:

Reino:	Plantae
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Superorden:	Asteranae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Taraxacum</i> F.H. Wigg.
Especie:	<i>T. officinale</i>



2.1.2.4. Composición química

El diente de león presenta una compleja gama de principios activos con importancia farmacológica tales como lactonas sesquiterpénicas que son las responsables del sabor amargo de la planta, triterpenos, polifenoles, alcaloides y los esteroides, por su composición ha sido utilizada tradicionalmente como antiinflamatorio, antiviral, antioxidante y anticancerígeno. Las hojas y raíces de esta planta poseen varias propiedades que la convierten en una de las plantas con gran utilidad terapéutica (Asqui Lalón, 2012). Los polifenoles son el grupo de compuestos más abundantes presentes en las plantas, poseen importantes beneficios para la salud, que principalmente se deben a su capacidad antioxidante (Quiñones, Aleixandre, & Miguel, 2012). Entre la diversidad de polifenoles que posee el diente de león tanto en la raíz como en las hojas se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas (González, 2007).

2.1.2.5. Usos tradicionales

Antiguamente en la medicina tradicional china, la planta ha sido empleada para combatir la hepatitis, cirrosis, como un depurativo, laxante y para el estreñimiento (Asqui Lalón, 2012). Las hojas son utilizadas en infusiones por sus propiedades diuréticas y para dolores estomacales. En gastronomía especialmente en Francia las hojas de esta planta se utilizan para ensaladas por su sabor agradable (Castro et al., 2013). La leche o látex de la planta ha sido empleada para uso tópico, se la aplica en la piel para eliminar verrugas o cicatrizar heridas. La infusión de flores y hojas se utiliza para problemas de bronquios y hemorroides (Aquerreta, Calvo, & Cavero, 2013).

2.1.2.6. Propiedades Farmacológicas

2.1.2.6.1. Actividad antiinflamatoria

Según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (2015b), el proceso inflamatorio es una respuesta de nuestro organismo ante la presencia de heridas o de daño al tejido, que una vez reconstruido y reparado el tejido, la inflamación termina. En ocasiones la inflamación persiste por alteraciones inmunitarias o por una lesión que no desaparece en su totalidad, dando origen a inflamaciones crónicas que a su vez con llevan a la aparición de diversas patologías, por lo tanto, la utilización de agentes antiinflamatorios ha sido muy importante para evitar el desarrollo de las mismas.

Entre los estudios *in vitro* realizados Hu et al. (2017), afirman que el extracto acuoso de la raíz de *Taraxacum officinale* presenta efecto antiinflamatorio en células endoteliales, mientras que González. (2007), demostró que el ácido cafeico, un polifenol, presenta efecto modulador sobre la inflamación, además los extractos de flores de *Taraxacum officinale* presentaron respuesta antiinflamatoria actuando sobre macrófagos, se le atribuye la actividad a compuestos fenólicos como la luteolina y el ácido chicorico.

Los lisosomas juegan un papel importante en la defensa normal de nuestro organismo, en el caso de la inflamación los lisosomas acuden para eliminar, mediante un proceso de fagocitosis, a los agentes extraños que ingresan al cuerpo o las células dañadas por dicho proceso. En el caso de la inflamación aguda, como la denominada gota (una forma de artritis), este proceso se origina en las articulaciones por una alteración de los lisosomas, estos son afectados por la ingestión de cristales de ácido úrico, provocando la perforación de la membrana del lisosoma, lo que con lleva a la liberación de los cristales y de las enzimas hidrolíticas propias del lisosoma, estas enzimas tienen la capacidad de degradar los componentes que se encuentren en el medio extracelular agravando el proceso inflamatorio y en ocasiones produciendo daño tisular (Kelley, 1992).

Los eritrocitos o glóbulos rojos poseen una membrana similar a la de los lisosomas, que por su fácil obtención han sido utilizados en este estudio para el ensayo antiinflamatorio del extracto del diente de león.

2.1.2.6.2. Actividad citotóxica

En la actualidad el cáncer se encuentra entre las primeras causas de muerte en el mundo. El cáncer de mama constituye una problemática de la salud actual, el 95 % de los casos pueden ser tratados si se detecta en fase temprana, sin embargo, la mayoría de mujeres acuden a revisión en estadios avanzados que dificultan el tratamiento y aumentan la tasa de mortalidad. (Rodríguez-González, Rodríguez-González, Triana-Torres, & Mendoza-Taño, 2012). Al igual que la quimioterapia otros tipos de tratamiento como la radioterapia pueden dañar células sanas y presentar efectos secundarios o complicaciones en el tratamiento. Sin embargo, desde el punto de vista farmacológico un fármaco “ideal” para tratar el cáncer eliminaría células dañadas o cancerígenas y conservaría las células normales (Laza-Loaces, Rodríguez-Luis, & Sardiña-Cabrera, 2003), disminuyendo la manifestación de los efectos secundarios.

Estudios realizados por Ovadje, Hamm, & Pandey (2012), señalan que el extracto de la raíz de diente de león posee la capacidad de inducir la apoptosis en células de leucemia mielomonocítica crónica y células de melanoma. Pandey, Chatterjee, Ovadje, Mousa, & Hamm (2011), a través de su investigación confirman que el extracto de la raíz de esta planta induce apoptosis específicamente en melanoma quimiorresistente, sin toxicidad para las células sanas únicamente actúa sobre las células cancerígenas.

En el caso del cáncer de mama no existen estudios sobre la actividad citotóxica de las hojas del diente de león sobre el crecimiento de estas células, por lo que el aprovechamiento de sus cualidades medicinales y su gran disponibilidad, resulta una alternativa novedosa como agente citotóxico.

2.1.3. Secado por aspersión

Es una de las tecnologías más utilizadas en el campo de la industria alimentaria y farmacológica. El secado por aspersión se encarga de transformar un extracto líquido, emulsión o suspensión en un producto seco mediante el empleo de un gas caliente, generalmente aire (Mondragón, Julia, Barba, & Jarque, 2013). Según Coronel Delgado (2015), el secado por aspersión es una tecnología económica, flexible y genera productos de alta calidad, los parámetros más importantes que se deben controlar son la temperatura de entrada y salida del gas, el flujo de alimentación y el tiempo de residencia

En la obtención de principios activos de origen vegetal el secado por aspersión juega un papel importante ya que le proporciona al extracto seco un largo tiempo de vida útil, liberación controlada, fácil almacenamiento y conservación (LÓPEZ HERNÁNDEZ et al., 2010).

Actualmente en el Ecuador no se han realizado estudios sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica del extracto acuoso de esta planta con la aplicación del secado por aspersión, por lo que la presente investigación pretende proporcionar datos que demuestren que el extracto seco de las hojas de diente de león puede actuar como un agente antiinflamatorio y citotóxico.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

El extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) no presenta potencial como agente antiinflamatorio.

El extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) no presenta potencial como agente citotóxico.

2.2.2. Hipótesis alternativa

El extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) si presenta potencial como agente antiinflamatorio.

El extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) si presenta potencial como agente citotóxico.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1. Variable independiente

- Extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*).

2.3.2. Variable dependiente

- Efecto antiinflamatorio y citotóxico del extracto seco.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Vasos de precipitación 50, 100, 600, 1000 ml (Pyrex)
- Balones de aforo de 25, 200, 500 ml ($\pm 0,01$ ml)
- Probetas de 10, 100, 1000 ml (Glassco ± 1 ml)
- Tubos Eppendorf de 2 ml
- Micropipetas 100, 1000 μ l
- Puntas de micropipeta
- Tubos plásticos de centrifuga
- Tubos tapa rosca de 15 ml
- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro
- Filtros estériles de 0,22 μ m (MILLEX-GP, Syringe Filter Unit)
- Agitador magnético
- Papel aluminio
- Varilla de agitación
- Embudo
- Lienzo
- Jeringas de 5 ml

3.2. Equipos

- Secadero de bandejas (Gander MTN)
- Baño de ultrasonido (Branson)
- Balanza analítica (OHRUS, USA)
- Plancha de calentamiento con agitación (Thermo Scientific, USA)
- Plancha de calentamiento (Isotemp, USA)
- Agitador vertical (Thomas, USA)
- Balanza de humedad (IR KERN MLS 50-3)
- Mini Spray Dryer (BÜCHI, Switzerland)
- Microcentrífuga (Labnet)
- Vórtex (Fisher Scientific, USA)
- Centrifuga Rotina 380 (Hettich Zentrifugen, Germany)
- Baño María (IKA HB10, USA)
- Espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany)

- Microscopio óptico (Meiji Techno, Japón)
- Cámara de flujo laminar (Thermo Scientific Fisher, USA)
- Incubadora de CO₂ (Thermo Scientific Fisher, USA)
- Lector microplaca de ELISA (Victor X3, PerkinElmer)

3.3. Reactivos

Para la obtención del extracto y el secado por aspersión

- Agua destilada
- Maltodextrina

Para la determinación de polifenoles

- Reactivo Folin-Ciocalteu (FCR)
- Carbonato de sodio al 7,5 % (MERC, USA)

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria

- Eritrocitos de sangre humana
- Buffer fosfato salino (PBS pH 7,4)
- Aspirina 650/65 mg

Para la determinación de la actividad citotóxica

- Células de cáncer de mama (línea celular MCF-7)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)
- Docedil Sulfato de Sodio (SDS)-HCl al 0,01%
- Medio de cultivo RPMI 1640 (1X) (Roswell Park Memorial Institute), con rojo fenol

3.4. Métodos

3.4.1. Preparación del material vegetal

Las hojas de Diente de león (*Taraxacum officinale*) recolectadas, se lavaron con agua para retirar las impurezas. Una vez limpias se secaron de manera artificial en un secadero de bandejas (Gander MTN), a una temperatura de 60 °C durante 23 h. Las hojas secas se trituraron y se almacenaron en una bolsa hermética en un ambiente fresco y seco.

3.4.2. Diseño experimental

Para la extracción de los principios activos hidrosolubles de las hojas del diente de león se empleó el diseño experimental 2^2 y se trabajó con los siguientes factores:

Factor A: Relación material vegetal: volumen de disolvente (agua)

Nivel bajo (-) = 1:15

Nivel alto (+) = 1:20

Factor B: Tratamiento del material vegetal

Nivel bajo (-) = Sin ultrasonido

Nivel alto (+) = Con ultrasonido

Respuesta experimental: Rendimiento de extracción de sólidos solubles totales.

En la tabla I se muestra la combinación de factores del diseño experimental 2^2 .

Tabla I. Diseño experimental 2^2 para el estudio de las condiciones de extracción

Tratamiento	FACTOR 1	FACTOR 2	DETALLE
1	-	-	1:15 – sin ultrasonido
2	+	-	1:20 – sin ultrasonido
3	-	+	1:15 – con ultrasonido
4	+	+	1:20 – con ultrasonido

Factor 1. Relación material vegetal: volumen del disolvente, **factor 2.** Tratamiento del material vegetal, nivel bajo (-), nivel alto (+).

Cada tratamiento se realizó por duplicado y la mitad del material vegetal seco se sometió a ultrasonido por 2 min en el Baño de ultrasonido (BRANSON).

3.4.3. Estudio de las condiciones de extracción

3.4.3.1. Procedimiento de extracción

Para la extracción de los componentes hidrosolubles de la planta se realizó una decocción, que consistió en colocar en un vaso de precipitación (Pyrex) de 600 ml de capacidad, 10 g de las hojas secas de diente de león en 150 ml de agua destilada para la relación 1:15 y 10 g en 200 ml para la relación 1:20 (de acuerdo a los tratamientos establecidos en la tabla I), se dejó hervir en una plancha de calentamiento con agitación (Thermo Scientific, USA) a la temperatura de ebullición del agua por 30 min y 500 RPM, el recipiente se selló con papel aluminio para evitar la pérdida del agua por evaporación. Los extractos se filtraron empleando un embudo y un lienzo, se registró el volumen final de los extractos obtenidos y se almacenaron a 4 °C.

3.4.3.2. Determinación de sólidos solubles totales (SST) y de la masa de sólidos extraídos

El porcentaje de sólidos solubles totales (SST) de cada extracto se determinó empleando una balanza de humedad (IR KERN MLS 50-3) el resultado obtenido fue en porcentaje de humedad de la muestra, por lo que el porcentaje de sólidos se obtuvo de la siguiente manera.

$$\% \text{ SST} = 100\% - \% \text{ humedad} \quad [\text{Ec. 1}]$$

La masa de sólidos extraídos se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos extraídos (g)} = \text{Volumen del extracto} * \frac{\% \text{ SST}}{100} \quad [\text{Ec. 2}]$$

(Salomon Izquierdo, López Hernández, & González Sanabia, 2011)

Y para determinar el rendimiento de la extracción:

$$\% \text{ rendimiento de extracción} = \frac{\text{sólidos extraídos (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} * 100 \quad [\text{Ec. 3}]$$

3.4.3.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos sobre el rendimiento de la extracción de SST se analizaron con el *Software Statgraphics Centurion* versión XVI.I.

3.4.4. Obtención del extracto líquido

Con el análisis estadístico se eligió el mejor tratamiento, el cual se empleó para la obtención eficiente del extracto líquido a mayor escala, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.3.1., se utilizó una plancha de calentamiento (Isothermp, USA) y un agitador vertical (Thomas, USA) para la extracción de los principios activos. El tratamiento utilizado fue con aplicación de ultrasonido y una relación material vegetal: volumen de disolvente de 1:15 (90 g: 1350 ml), posteriormente se determinó el % SST y la masa sólida del extracto líquido (apartado 3.4.3.2).

El extracto se concentró en un 20 % mediante evaporación en una plancha de calentamiento con agitación (IR KERN MLS 50-3) a 500 RPM y a la temperatura de ebullición del agua, se empleó la siguiente fórmula para determinar el volumen del extracto concentrado al que se llegó:

$$V_c = \frac{C_d * V_d}{C_c} \quad \text{[Ec. 4]}$$

Donde:

V_c = Volumen del extracto concentrado

C_c = Concentración del extracto concentrado

C_d = Concentración del extracto diluido

V_d = Volumen del extracto diluido

3.4.5. Secado por aspersión

En una plancha de calentamiento con agitación (IR KERN MLS 50-3) se mezcló el extracto líquido concentrado con 7 g de maltodextrina (la cantidad de maltodextrina utilizada fue igual al 30 % de la masa sólida del extracto). La mezcla se secó en el equipo Mini Spray Dryer (BÜCHI B-290, Switzerland) a una temperatura de entrada de 120 °C y una temperatura de salida de 80 °C. Finalmente se determinó el rendimiento del secado del extracto con la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g extracto seco obtenido}}{(\text{g masa solida extraida} + \text{g maltodextrina})} * 100 \quad [\text{Ec. 5}]$$

3.4.6. Caracterización físico-química del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

3.4.6.1. Cuantificación de polifenoles del extracto seco

Para determinar la cantidad de polifenoles totales del extracto se empleó el Método de Folín-Ciocalteu modificado (Dewanto, Xianzhong, Kafui, & Rui, 2002), es un método colorimétrico que consiste en la reducción de un complejo de fosfowolframato-fosfomolibdato para formar un producto de coloración azul que indica la presencia de los polifenoles. Se utilizó una curva estándar de ácido gálico a concentraciones que van desde 50 a 200 mg/l (Anexos X, XI) a partir de la cual se calculó la cantidad de polifenoles totales.

3.4.6.1.1. Determinación de los polifenoles

Para el ensayo se partió con una solución del extracto al 5 % que se centrifugó a 13000 RPM durante 20 min en una microcentrifuga (Labnet), posteriormente se llevó el extracto a una dilución de 1/20.

Se hizo reaccionar 0,1 ml del extracto diluido con 0,1 ml del reactivo de Folín-Ciocalteu durante 2 min y con agitación en un vórtex (Fisher Scientific, USA), se agregó 2 ml de una solución de carbonato de sodio al 7,5 % y se aforó a 5 ml con agua destilada, se dejó reposar por 1 h y se midió la absorbancia a 750 nm (los valores de absorbancia deben encontrarse dentro de la curva estándar de ácido gálico). El blanco empleado fue agua destilada. El ensayo se realizó por triplicado y el contenido de polifenoles totales se calculó a partir de los valores de la curva estándar de ácido gálico y de la absorbancia obtenida, y con la siguiente formula:

$$\text{Polifenoles} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{\text{abs a 750 nm} - 0,0026}{0,0018} * \text{FD} \quad [\text{Ec. 6}]$$

Donde:

FD: factor de dilución

3.4.6.2. Determinación de la humedad del extracto seco

La humedad del extracto seco se determinó empleando una balanza de humedad (IR KERN MLS 50-3), donde se colocaron 3 g del extracto seco, el resultado se obtuvo como porcentaje de humedad.

3.4.7. Determinación de la actividad citotóxica del extracto seco

Para la determinación de la actividad citotóxica del extracto seco de hojas de diente de león se empleó el método de MTT (bromuro de 3-(4-5dimetildiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) con modificaciones (Carvajal et al., 2013). El ensayo consistió en la reducción del MTT por la presencia de la enzima succinato deshidrogenasa dando lugar a la formación de un compuesto de color azul o formazán, las células viables

tienen la capacidad de formar estos cristales de formazán, por lo tanto, mientras en el ensayo se presente menor coloración mayor será el efecto citotóxico de la planta.

3.4.7.1. Ensayo *in vitro* de la actividad citotóxica

Se preparó una solución madre del extracto a una concentración de 50 mg/ml en buffer fosfato salino o PBS (100 ml de PBS pH 7.4 (10X)/ 900 ml de agua destilada), se esterilizó la solución mediante filtración utilizando filtros estériles de 0,22 μm (MILLEX-GP, Syringe Filter Unit) y se realizaron diluciones seriadas del extracto desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-11} .

Se inocularon las células MCF-7 en placas de 96 pocillos (10000 cel/ pocillo) con medio RPMI 1640 (1X) y se dejaron en incubación durante 24 h a 37 °C, atmosfera húmeda y 5 % de CO₂ en una incubadora de CO₂ (Thermo Scientific Fisher, USA), para permitir que las células se adhieran a la pared de los pocillos. Una vez transcurrido las 24 h, se verificó la presencia de células vivas y se retiró el medio RPMI 1640 (1X) de los pocillos y se incorporaron 100 μl de las diluciones seriadas del extracto en cada pocillo a excepción de una columna que sirvió como control, se realizaron un total de 11 tratamientos con 8 réplicas de cada uno y se incubaron por 48 h a 37 °C, atmosfera húmeda y 5 % de CO₂, se retiró el tratamiento y se lavó las células con PBS 1X para eliminar restos celulares. Se mezclaron 10 ml de RPMI sin rojo fenol, 1 ml de PBS y 5 mg de MTT y se añadieron 100 μl de la mezcla en cada pocillo, se incubaron por 4 h en las mismas condiciones, en durante este tiempo las células vivas darán lugar a la formación de los cristales de formazán.

Finalmente para detener la reacción y disolver los cristales de formazán se añadieron 100 μl de dodecil sulfato de sodio (SDS-HCL al 0,01 %), se dejaron en incubación durante 12 h y se leyeron las absorbancias a 570 nm en el espectrofotómetro lector de microplacas (Victor X3, PerkinElmer). El blanco utilizado fueron las células MCF-7 sin tratamiento. Una regresión no lineal de la gráfica resultante indica la viabilidad celular en cada tratamiento, además se realizó la IC50 para determinar la efectividad del extracto.

3.4.8. Determinación de la actividad antiinflamatorio del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

La actividad antiinflamatoria del extracto hidrosoluble de las hojas de diente de león se realizó empleando el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos humanos (Fernández et al., 2007).

En un proceso inflamatorio se pueden ver afectados ciertos orgánulos como los lisosomas que están especializados en la digestión celular, estos pueden provocar o agravar un proceso inflamatorio si se produce la liberación de las enzimas hidrolíticas que poseen (Fernández et al., 2007). Los eritrocitos poseen una membrana similar a la membrana de los lisosomas (Acostupa, Chávez, Mejía, Pauta, & Tucunango, 2017), por lo que han sido utilizados para la determinación de la actividad antiinflamatoria en la presente investigación.

Para la inducción de la ruptura de la membrana de los glóbulos rojos, necesaria para la determinación de la actividad antiinflamatoria, se empleó el factor calor (temperatura de 54 °C). Makhro et al. (2016), reportaron que los eritrocitos se mantienen estables hasta una temperatura de 49 °C por lo que es necesario aumentar la temperatura para producir la lisis celular. Esta ruptura da lugar a la liberación de la hemoglobina contenida en el eritrocito, donde la coloración de la solución resultante permitió determinar mediante espectrofotometría la capacidad del extracto para proteger la membrana del eritrocito, la estabilización de la membrana puede representar la acción antiinflamatoria *in vitro* del extracto (García López, 2016).

3.4.8.1. Ensayo *in vitro* de la actividad antiinflamatorio del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

Se recolectaron 5 ml de sangre de una persona que no haya consumido ningún tipo de antiinflamatorio durante dos semanas, la sangre se centrifugó en una centrifuga Rotina 380 (Hettich Zentrifugen, Germany) a 3000 RPM por 10 min, se retiró el sobrenadante y se lavaron los eritrocitos (precipitado) con 3 ml de una solución de PBS (100 ml de PBS pH 7.4 (10X)/ 900 ml de agua destilada) a 3000 RPM por 5 min y se desechó el sobrenadante. El proceso de lavado se repitió 4 veces. Finalmente se realizó una solución de eritrocitos al 40 % v/v con solución de PBS.

Se preparó una solución madre de 40 mg/ml del extracto seco con la solución de PBS, a partir de la cual se realizaron soluciones de 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 y 5,5 mg/ml.

Una vez preparadas las soluciones se procedió a realizar los ensayos en tubos plásticos de centrifuga con una capacidad de 15 ml, el procedimiento se describe en la tabla II.

Tabla II. Cantidad de las soluciones y condiciones del ensayo de la actividad antiinflamatoria

Tubo	Sol. del extracto	Sol. Eritrocitos al 40 %	Sol. PBS	Condiciones
DO1	3 ml	30 µl	-	Sin calentar, reposo por 20 min
DO2	3 ml	30 µl	-	Calentar en baño maría a 54 °C por 20 min
DO3	-	30 µl	3 ml	Calentar en baño maría a 54 °C por 20 min

Nota. DO1. Representa el ensayo control, **DO2.** Permite determinar si el extracto protege la membrana de los eritrocitos de la lisis que produce el calor, **DO3.** Se utiliza la solución de PBS en lugar del extracto para demostrar que este no proporciona protección a la membrana de los eritrocitos ante la presencia de calor. El calor es el factor que se utilizó para provocar la lisis celular.

Una vez realizados los ensayos, los tubos se llevaron a centrifugación en la centrifuga Rotina 380 (Hettich Zentrifugen, Germany) a 3000 RPM por 20 min y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm en el espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany), los datos se registraron para la determinación de la actividad antiinflamatoria. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Se desarrolló el mismo procedimiento empleando una solución de aspirina (advanced 650/65 mg) en las mismas concentraciones que el extracto para realizar la comparación de actividad antiinflamatoria entre el extracto seco y la aspirina.

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad antiinflamatoria} = 100 * \left(1 - \frac{DO2-DO1}{DO3-DO1} \right) \quad [\text{Ec. 7}]$$

(Shinde et al., 1999)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Determinación de sólidos solubles totales

Para la obtención del porcentaje de sólidos solubles totales (SST), bajo el diseño experimental 2^2 , las hojas trituradas de diente de león se sometieron a diferentes tratamientos con los siguientes factores: con y sin aplicación de ultrasonido y relación material vegetal: volumen del disolvente. Los resultados se presentan en la tabla III.

Tabla III. Porcentaje de SST, masa sólida extraída y rendimiento de la extracción.

Ensayo	Replica	Tratamiento		Relación MV: D	SST (%)	Masa sólida extraída (g)	Rendimiento de extracción (%)
		MV					
1	1	S/U		1:15	2,23 ± 0,02	1,12 ± 0,01	11,18 ± 0,11
	2				2,01 ± 0,04	1,13 ± 0,02	11,28 ± 0,20
2	1	S/U		1:20	1,96 ± 0,01	1,90 ± 0,01	18,96 ± 0,07
	2				1,90 ± 0,01	2,21 ± 0,01	22,10 ± 0,08
3	1	C/U		1:15	2,67 ± 0,03	2,40 ± 0,01	24,03 ± 0,13
	2				2,59 ± 0,03	2,39 ± 0,01	23,87 ± 0,07
4	1	C/U		1:20	2,05 ± 0,04	2,30 ± 0,02	23,02 ± 0,24
	2				2,01 ± 0,02	2,29 ± 0,01	22,86 ± 0,08

Nota: MV. Material vegetal, MV: D. Material vegetal: volumen de disolvente, SST. Sólidos solubles totales, S/U. Sin aplicación de ultrasonido, C/U. Con aplicación de ultrasonido.

En la tabla III se observa que, el rendimiento de extracción de SST se presenta en un intervalo que va desde 11,18 % hasta 24,03 %. La réplica 1 del ensayo 3 con un 24,03 % representa el porcentaje de rendimiento de extracción mayor en comparación al resto de ensayos.

La extracción de los sólidos solubles totales está determinada por diversos factores. En este trabajo se ha estudiado la influencia de la relación material vegetal: volumen de disolvente y la aplicación de ultrasonido para la determinación del % SST. En la tabla III se observa que, se obtiene un mayor porcentaje de SST extraídos al aplicar la técnica de ultrasonido.

Rodríguez-Riera, Robaina-Mesa, Jáuregui-Haza, Rodríguez-Chanfrau, & Blanco-Gonzalez (2014), afirman que el proceso de extracción de metabolitos es mucho más eficiente al someter al material vegetal a ultrasonido por lo que se obtiene una mayor cantidad de sólidos solubles. Wang et al. (2016), explicaron en su estudio que la aplicación de ultrasonido permite la penetración del disolvente en las partículas del material vegetal obteniéndose la mayor cantidad posible de principios activos lo que proporciona un efecto beneficioso en cuanto al rendimiento de la extracción.

Acosta, Izquierdo, Sevilla, & Nuevas (2016), demostraron que la extracción asistida por ultrasonido en combinación con métodos convencionales como la extracción con solvente disminuye el tiempo de extracción de los metabolitos, por lo que se evita la degradación térmica de los componentes y se disminuye la cantidad de disolvente para la extracción, lo que fue comprobado en el presente estudio, ya que el rendimiento más alto se obtuvo con una relación de MV: D de 1:15 (Tabla IV).

4.1.2. Determinación del mejor tratamiento mediante análisis estadístico

Una vez obtenido el rendimiento de extracción de SST se empleó el *Software Statgraphics Centurion* versión XVII.I. para analizar y determinar el mejor tratamiento para la extracción eficiente de los principios activos hidrosolubles de las hojas de diente de león, el diagrama de Pareto de los resultados obtenidos se presenta en la siguiente figura.

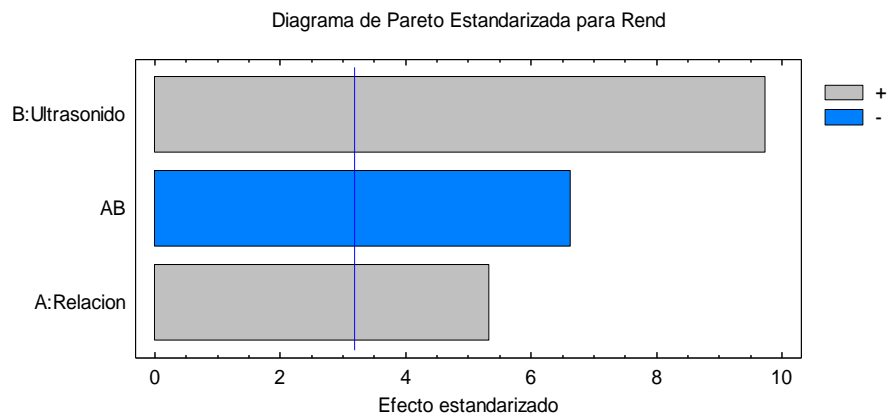


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de la extracción de SST

Fuente. *Software Statgraphics Centurion* versión XVII.I.

El diagrama de Pareto representado en la fig. 1 muestra que los factores (A y B), al igual que su interacción sobrepasan el efecto estandarizado, es decir que, los factores relación material vegetal: volumen de disolvente (A) y tratamiento del material vegetal (B) influyen significativamente en la obtención de los sólidos solubles del extracto.

Para la obtención del mejor tratamiento se empleó la “Optimización de respuesta experimental” del *Software*. El resultado se presenta en la siguiente tabla.

Tabla IV. Niveles óptimos de los factores para la obtención del mejor tratamiento.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Relación MV: D	1:15	1:20	1:15
Tratamiento del MV	SU	U	U

MV: D. Material vegetal: volumen del disolvente.

Fuente: *Software Statgraphics Centurion* versión XVII.I.

En la tabla IV se observa que el nivel óptimo de la relación material vegetal: volumen del disolvente fue la relación 1:15, mientras que para el tratamiento del material vegetal, el nivel óptimo fue la aplicación de ultrasonido (U). El mejor tratamiento bajo estas condiciones fue el tratamiento realizado en el ensayo 3 (tabla III) que proporcionó un valor promedio de rendimiento de extracción de SST de 23,95 %.

La interacción entre los niveles de los factores se analizó empleando la gráfica de interacción. Los resultados se muestran en la figura 2.

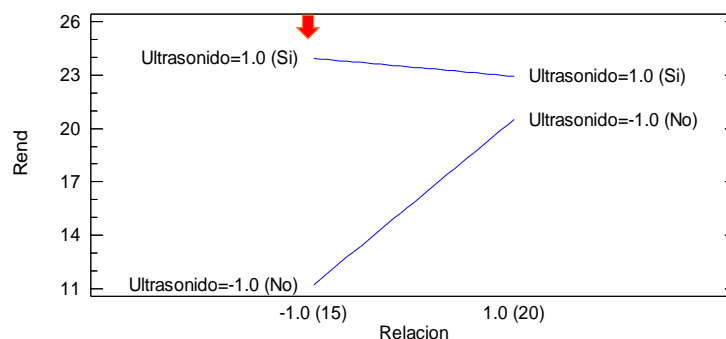


Figura 2. Gráfica de interacción para el rendimiento de extracción de SST

Fuente: *Software Statgraphics Centurion* versión XVII.I.

En la gráfica de interacción (figura 2) se observa que, la interacción entre la aplicación de ultrasonido y una relación 1:15 permite obtener el mayor rendimiento de extracción, seguida por el tratamiento con ultrasonido y una relación 1:20, es decir, que la aplicación de ultrasonido es necesaria para obtener valores altos de rendimiento. La aplicación de ondas de ultrasonido aumenta el rendimiento de extracción ya que permite que el solvente ingrese al interior de la célula y extraiga con mayor facilidad los componentes de la misma (Prieto, González, & Abella, 2011).

Por otro lado en la figura 3 se representa la gráfica de superficie de respuesta estimada.

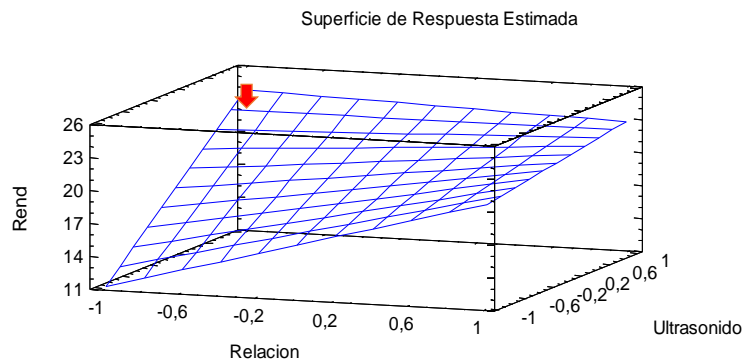


Figura 3. Superficie de respuesta estimada del rendimiento de extracción de SST.
Fuente: *Software Statgraphics Centurion* versión XVI.I.

El gráfico de la superficie de respuesta estimada proporciona una representación tridimensional de la respuesta experimental obtenida, que permite visualizar de manera más clara los niveles de los factores estudiados y el mejor tratamiento (Figura 3).

En el gráfico se observa que independientemente de la relación MV: D, existe una mayor expansión en la región que representa la utilización de ultrasonido y con base al empleo de la relación 1:15 y 1:20, el punto más alto se encontró en la relación 1:15, es decir que a partir de la aplicación de ultrasonido se puede determinar qué cantidad de MV: D se debe emplear.

4.1.3. Análisis del secado por aspersión del extracto acuoso de las hojas de diente de león

El rendimiento del proceso de secado por aspersión obtenido se representa en la tabla V.

Tabla V. Rendimiento del secado por aspersión del extracto

Extracto acuoso	Volumen (ml)	Peso teórico del extracto seco (g)	Peso obtenido del extracto seco (g)	Rendimiento (%)
Concentrado al 20 %	880	30,1	28,55	93,88

El rendimiento del secado depende de los parámetros utilizados en el proceso, entre ellos se encuentra la cantidad de maltodextrina y las temperaturas de entrada y salida. Estudios realizados por López Hernández, Torres Amaro, González Sanabia, & Rodríguez Ferradá (2008), indican que al utilizar maltodextrina en un 30 % se obtiene un rendimiento de secado del 70 %. La maltodextrina es un aditivo inerte que actúa como coadyuvante en el proceso de secado, evita la adherencia del producto en las paredes del equipo por lo que permite la fácil recuperación del producto al finalizar el proceso aumentando el rendimiento del mismo (López Hernández, Muñoz Cernada, Carmona Fernández, Torres Amaro, & González Sanabria, 2006).

López Hernández, Torres Amaro, Salomón Izquierdo, González Sanabia, & Chávez Figueredo (2008), mencionan que al emplear temperaturas de entrada y salida de 120 °C y 80 °C respectivamente el rendimiento aumenta al 90 %, por lo tanto, al haber tomado en cuenta estos dos parámetros para el desarrollo del presente estudio, el rendimiento del secado obtenido fue de 93,88 % (tabla V), valor que representa un proceso eficiente de secado.

Según Coronel Delgado (2015), el secado por aspersión permite preservar los componentes del extracto de la volatilización y oxidación por la presencia de los aditivos empleados para el secado. Además LÓPEZ HERNÁNDEZ et al. (2010), indican que el empleo de esta tecnología le proporciona al producto seco un largo tiempo de vida útil en comparación con los extractos líquidos, mayor estabilidad del producto y fácil almacenamiento.

4.1.4. Análisis de las características físico-químicas del extracto seco de las hojas de diente de león

4.1.4.1. Análisis de la humedad del extracto seco

Según Arrazola, Herazo, & Alvis (2014), la humedad de los productos obtenidos mediante secado por aspersion empleando maltodextrina, alcanzan valores de hasta 5,5 % de humedad, LÓPEZ HERNÁNDEZ et al. (2010), establecen que la humedad debe encontrarse por debajo del 10 % para asegurar la calidad del producto, es decir que el valor obtenido se encuentra dentro del límite máximo establecido, ya que el contenido de humedad del extracto seco de las hojas de diente de león fue de 2,86 %.

Por otro lado el extracto obtenido resulto ser higroscópico por lo que la determinación de la humedad es fundamental. Tee, Luqman Chuah, Pin, Abdull Rashih, & Yusof (2012), mencionan que en ciertos casos existe una relación inversamente proporcional entre la humedad y la higroscopicidad, ya que el polvo al poseer menor contenido de humedad absorbe con mayor facilidad la humedad del ambiente. Por lo tanto el extracto seco obtenido se almacenó al vacío para evitar la absorción de la humedad del ambiente y proteger los principios activos del mismo.

4.1.4.2. Análisis de la cantidad de polifenoles del extracto seco

En este estudio se realizó la determinación de la cantidad de polifenoles del extracto seco de las hojas de diente de león en base al método colorimétrico Folin–Ciolcateu. La oxidación de los polifenoles por la presencia del reactivo Folin–Ciolcateu da lugar a la formación de un color azul, que dependiendo de su intensidad muestra la cantidad de polifenoles presentes en la muestra (Valenzuela Bustamante, 2015). Los resultados obtenidos de la cantidad de polifenoles contenidos en el extracto seco se representan en la tabla VI.

Tabla VI. Polifenoles presentes en el extracto seco de las hojas de diente de león

	Polifenoles totales (mg/ L)*FD	Polifenoles totales (mg/ g de extracto seco)
Extracto seco	3104,44	62,08

FD. Factor de dilución

En el extracto seco de los principios activos hidrosolubles de las hojas de diente de león se encuentra una cantidad de 62,08 mg/g. Según Jaramillo Jaramillo, Jaramillo Espinoza, D'Armas, Troccoli, & Rojas de Astudillo (2016), la cantidad de polifenoles presentes en un extracto alcohólico de esta planta es de 22,3 mg/g, es decir que, el extracto hidrosoluble posee una mayor cantidad de polifenoles en comparación con el extracto alcohólico y que además la aplicación del secado por aspersion ayuda a preservar los principios activos de la planta. Gil Garzón, Alzate Tamayo, Sánchez-Camargo, & Millán Cardona (2011), afirman que además de los múltiples beneficios de emplear el secado por aspersion este permite la conservación de las propiedades bioactivas del producto.

Los polifenoles son compuestos que se originan en las plantas como producto de su metabolismo secundario, las plantas poseen una gran variedad de polifenoles, que por sus propiedades antioxidantes presentan diversas actividades biológicas beneficiosas para la salud (Quiñones et al., 2012).

Entre los compuestos hidrosolubles que presenta el diente de león se encuentran polifenoles tales como ácidos fenólicos; ácido cafeico y otros derivados del ácido cinámico, taninos (Ferraro, Martino, Bandoni, & Nadinic, 2015), hidroxycumarinas como la cichorina, esculina y flavonoides como apigenina, luteolina y sus derivados (Asqui Lalón, 2012; González, 2007), entre otros.

4.1.5. Actividad antiinflamatoria del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

En la figura 4 se presentan los resultados sobre el porcentaje de actividad antiinflamatoria del extracto seco en comparación al porcentaje de actividad de la aspirina, un antiinflamatorio comercial.

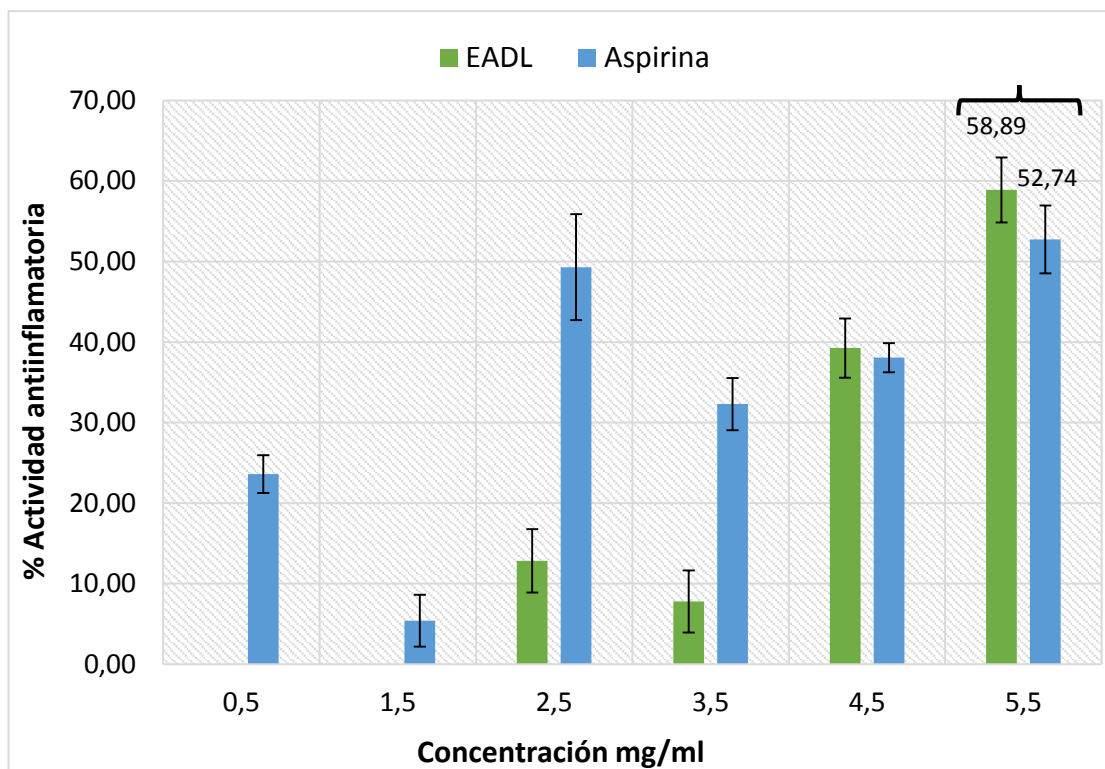


Figura 4. Comparación de los promedios del porcentaje de la actividad antiinflamatoria del extracto seco del diente de león y la aspirina. — muestra un mayor porcentaje de actividad por parte del extracto seco. **EADL:** extracto acuoso de diente de león.

En la figura 4 se observa que el extracto seco presentó actividad antiinflamatoria a partir de la concentración 2,5 mg/ml, la misma que va aumentando conforme aumenta la concentración del extracto, pero no en base a una relación directamente proporcional definida, debido a la sensibilidad del método. Sin embargo, a una concentración de 5,5 mg/ml la actividad del extracto seco del diente de león fue la más alta con un valor de 58,89 % y supera a la actividad de la aspirina que presentó un porcentaje de 52,74 %.

La actividad antiinflamatoria demostrada por el extracto puede deberse al contenido de polifenoles del mismo. Parvin et al. (2015), mencionan que se han mostrado efectos antiinflamatorios por parte de flavonoides y taninos, mientras que una investigación realizada por Modaresi & Resalatpour (2012), afirma que los compuestos fenólicos del diente de león actúan protegiendo la membrana de los glóbulos rojos de lesiones y previniendo su daño.

Oyedapo, Akinpelu, Akinwunmi, Adeyinka, & Sipeolu (2010), suponen que el efecto estabilizador de la membrana podría deberse a la unión, mediante cargas, de los componentes del extracto con la membrana del eritrocito, permitiendo proteger a la membrana de agentes que estén involucrados en la lisis de la misma. Se ha demostrado que los taninos y saponinas poseen la capacidad de enlazar cationes, por lo que podrían estabilizar la membrana de los eritrocitos, al igual que los flavonoides.

4.1.6. Actividad citotóxica del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)

Los resultados del análisis de actividad citotóxica del extracto acuoso de las hojas de diente de león mediante el ensayo de MTT se presenta en la siguiente figura.

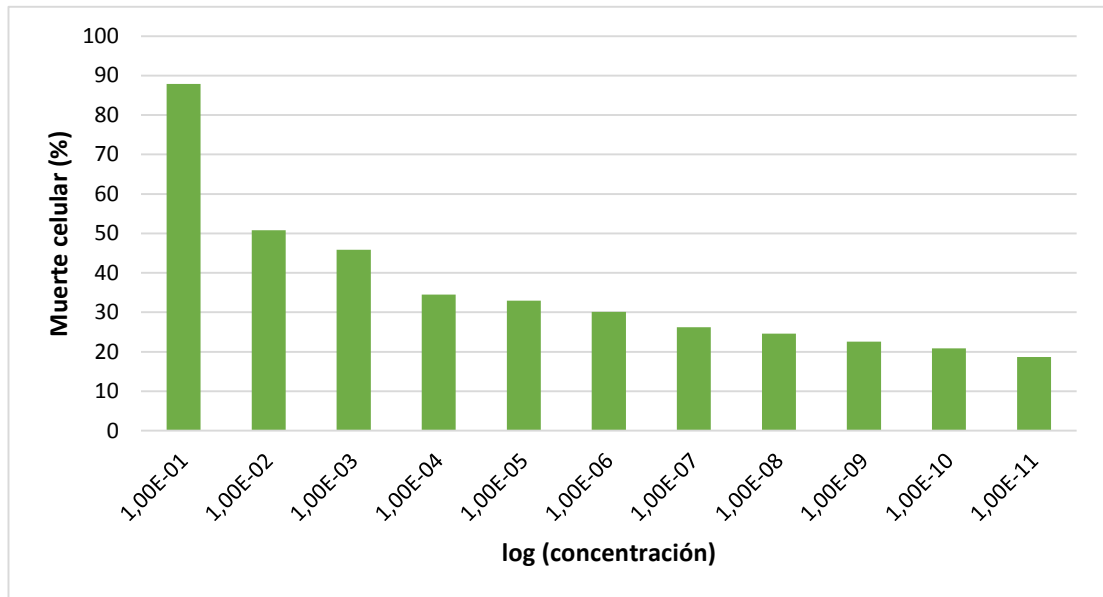


Figura 5. Actividad citotóxica del extracto acuoso de las hojas de diente de león en células de cáncer de mama MCF-7 empleando diluciones seriadas desde 1,00E-01 hasta 1,00E-11. La concentración del extracto fue de 50 mg/ml.

En base a los resultados de la figura 5 el extracto acuoso presentó actividad citotóxica sobre las células de cáncer de mama MCF-7, el mayor porcentaje de muerte celular se alcanzó al emplear una dilución de 1,00E-01, cuyo valor fue de 87 %, mientras que, en la dilución de 1,00E-11 se obtuvo una muerte celular solo del 18,7 %. Además, el IC50 obtenido fue de 0,024, lo que indica que es un extracto activo para inhibir este proceso biológico empleando la concentración de 50 mg/ml

Estudios celulares *in vitro* han demostrado actividad citotóxica por parte de los polifenoles, los cuales interfieren en el desarrollo de células cancerígenas, interrumpiendo su ciclo celular e iniciando el proceso de apoptosis (Govea Salas, Zugasti Cruz, Silva Belmares, Valdivia Urdiales, & Rodríguez Herrera, 2013). Quiñones et al. (2012), en su investigación mencionan que los flavonoides tienen la capacidad de inducir efectos moduladores de la apoptosis, además Fariña Flores (2016), señalan que estos compuestos pueden actuar en cualquiera de las etapas de la carcinogénesis.

La luteolina en cambio está relacionada con la protección del ADN ante especies reactivas de oxígeno, por lo que sería considerado un componente para la prevención del cáncer (González-jiménez, Hernández-espinoza, Cooper-bribiesca, & Núñez-bretón, 2015), al igual que el ácido caféico que neutraliza las especies reactivas de oxígeno (Zapata, Cortes, & Rojano, 2013).

4.2. Verificación de hipótesis

En base a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa indicando que el extracto hidrosoluble seco de hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) si presenta potencial como agente antiinflamatorio y citotóxico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. Los componentes hidrosolubles de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) se extrajeron mediante la decocción del material vegetal, donde se obtuvo una mayor cantidad de sólidos solubles totales empleando ultrasonido y una relación material vegetal: volumen de disolvente de 1:15.
2. La aplicación de la tecnología de secado por aspersion permitió obtener un extracto seco de los principios hidrosolubles de las hojas de diente de león, con un rendimiento de secado del 93,88 %, humedad del extracto del 2,86 % y un contenido de polifenoles de 62,08 mg/g.
3. Se evaluó la actividad citotóxica del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) en células de cáncer de mama *in vitro* empleando el método de MTT, el extracto presentó un porcentaje de muerte celular de un 87 % utilizando una dilución de 1,00E-01, cuya concentración madre fue de 50 mg/ml.
4. La actividad antiinflamatoria del extracto seco de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) fue evaluada mediante el método de estabilización de la membrana de los eritrocitos humanos y se comparó con la actividad de la aspirina. A una concentración de 5,5 mg/ml y con respecto a las demás concentraciones empleadas, el extracto presento la mayor actividad siendo esta del 58,89 % y superó a la aspirina que demostró una actividad del 52,74 %

5.2. RECOMENDACIONES

1. Ampliar el estudio a otras actividades biológicas que puedan presentar los principios activos de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*).
2. Emplear diferentes disolventes para la extracción de los principios activos de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) y comparar la actividad de los mismos.
3. Realizar una identificación y cuantificación de los principios activos presentes en el extracto hidrosoluble de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*)
4. Realizar un estudio específico del mecanismo de acción de los principios activos de las hojas de diente de león (*Taraxacum officinale*) sobre el crecimiento de las células de cáncer de mama MCF-7 y la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, J., Izquierdo, S., Sevilla, I., & Nuevas, L. (2016). Empleo del ultrasonido para la extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango), *21*(3), 261–271.
- 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.
- Aquerreta, S., Calvo, I., & Cavero, R. (2013). *SABIDURÍA POPULAR Y PLANTAS CURATIVAS* (Integralia). Madrid-España. Recuperado de: [https://books.google.com.ec/books?id=cupPCgAAQBAJ&pg=PT113&dq=usos+tradicionales+del+diente+de+leon&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=usos tradicionales del diente de leon&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=cupPCgAAQBAJ&pg=PT113&dq=usos+tradicionales+del+diente+de+leon&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=usos+tradicionales+del+diente+de+leon&f=false)
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante. *Información Tecnológica*, *25*(3). Recuperado de: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642014000300006&script=sci_arttext&tlng=pt
- Asqui Lalón, M. (2012). *ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO DE DIENTE DE LEÓN (Taraxacum officinale) EN RATAS (Rattus norvegicus) CON HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR TETRACLORURO DE CARBONO.*”.
- Carvajal, Z., Ramírez, L., Ducurú, M., Gómez, V., Cabrera, G., Méndez, J., & Ortega, M. (2013). Actividad biológica de extractos de tres plantas sobre bacterias patógenas para el humano. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *33*, 35–39. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v33n1/art08.pdf>
- Castro, D., Diaz, J., & Serna, R. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* (2 edición). Medellín-Colombia: UCO. <https://doi.org/9789588385747>
- Chatterjee, S. J., Ovadje, P., Mousa, M., Hamm, C., & Pandey, S. (2011). La eficacia de Diente de León Extracto de raíz en la inducción de apoptosis en células de melanoma humano resistentes a los medicamentos. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*. <https://doi.org/10.1155/2011/129045>

- Coronel Delgado, A. Y. (2015). *Efecto de las condiciones de secado por aspersión en la obtención de un colorante natural a partir de extractos líquidos de curcuma (Curcuma longa L)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Fariña Flores, D. (2016). *OBTENCIÓN DE FLAVONOLES DE PLANTAS SUPERIORES. ACTIVIDAD BIOLÓGICA*. Universidad de La Laguna. Retrieved from [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/2674/Obtencion de Flavonoles de Plantas Superiores. Actividad Biologica. .pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/2674/Obtencion%20de%20Flavonoles%20de%20Plantas%20Superiores.%20Actividad%20Biologica.%20.pdf?sequence=1)
- Fernández, A., Arroyo, J., Bonilla, P., Tomas, G., Medina, F., Chenyuayén, J., ... Guamán, O. (2007). Efecto antiinflamatorio in vitro y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* (Ratania). *Ciencia E Investigación*, 10(2), 65–70.
- Ferraro, G. E., Martino, V. S., Bandoni, A. L., & Nadinic, J. L. (2015). *Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales* (Primera Ed). Buenos Aires-Argentina: Eudeba. Recuperado de: https://books.google.com.ec/books?id=9uBDDAAAQBAJ&pg=PT75&lpg=PT75&dq=cantidad+de+polifenoles+del+diente+de+leon&source=bl&ots=x1_1EgD1fY&sig=5uv0sERAsGz-N5CenhHVBLTu-mA&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- García López, E. B. (2016). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de macroalgas de baja California sur, México*. Instituto Politecnico Nacional. Recuperado de: <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/garcialop1.pdf>
- Gil Garzón, M. A., Alzate Tamayo, L. M., Sánchez-Camargo, A. del P., & Millán Cardona, L. de J. (2011). Secado por aspersión: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 40–52. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492011000200005&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v8n2/v8n2a05.pdf
- Gómez, F., & Jiménez, S. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (Segunda ed). Colombia: Universidad de Antioquia. Recuperado de: <https://books.google.es/books?id=K8eI->

7ZeFpsC&printsec=frontcover&dq=diente+de+leon+caracteristicas+pdf&hl=es
&sa=X&ved=0ahUKEwjH26XKsKLWAhUGOiYKHTNLC7kQ6AEIJTAA#v
=onepage&q=diente&f=false

- González-jiménez, F. E., Hernández-espínosa, N., Cooper-bribiesca, B. L., & Núñez-bretón, L. C. (2015). Empleo De Antioxidantes En El Tratamiento De Diversas Enfermedades Crónico - Degenerativas. *Revista Especializada En Ciencias de La Salud*, 18(1), 16–21.
- González, M. (2007). *Efecto de extractos de Taraxacum officinale sobre la adipogenesis y el metabolismo lipídico de células 3T3-L1*. Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias departamento de Biología.
- Govea Salas, M., Zugasti Cruz, A., Silva Belmares, S., Valdivia Urdiales, B., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(9), 5–11.
- Hu, G., Wang, J., Hong, D., Zhang, T., Duan, H., Mu, X., & Yang, Z. (2017). Effects of aqueous extracts of *Taraxacum Officinale* on expression of tumor necrosis factor- α and intracellular adhesion molecule 1 in LPS-stimulated RMMVECs. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(38). Recuperado de: <https://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-016-1520-3>
- Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (2015). Inflamación crónica. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Jaramillo Jaramillo, C., Jaramillo Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & Rojas de Astudillo, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171–1184. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.19537>
- Jinchun, Z., & Jie, C. (2011). The effects of *taraxacum officinale* extracts (toe) supplementation on physical fatigue in mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(2), 128–133. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i2.63198>
- Kelley, W. N. (1992). *Medicina interna, Volumen 1* (Segunda Ed). Buenos Aires-

- Argentina: Editorial Médica Panamericana. Recuperado de:
https://books.google.com.ec/books?id=ouIAE-zahQ4C&pg=PA998&lpg=PA998&dq=inflamacion+y+los+lisosomas&source=bl&ots=buWxNWURqC&sig=MYv-407S4RDT2eEcFO5TJC4ibIs&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=snippet&q=media
 n algunos aspectos de la inflamación y la lesión tisular&f
- Laza-Loaces, D., Rodríguez-Luis, I., & Sardiña-Cabrera, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 8(3), 10.
- Linares Gimeno, N. (2013). *Plantas Medicinales*. Madrid-España: Centro de Empresas de Loeches.
- López Hernández, O. D., Muñoz Cernada, A., Carmona Fernández, R., Torres Amaro, L., & González Sanabria, M. L. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersion de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(1), 1–4.
- LÓPEZ HERNÁNDEZ, O. D., MENÉNDEZ CASTILLO, R. A., GARCÍA PEÑA, C. M., GONZÁLEZ SANABIA, M. L., & NOGUEIRA MENDOZA, A. (2010). Estudio de secado por aspersion de extractos de *Plectranthus*, 9(3), 216–220.
- López Hernández, O. D., Torres Amaro, L., González Sanabria, M. L., & Rodríguez Ferradá, C. A. (2008). Estudio de secado por aspersion hasta escala de banco del extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4).
 Recuperado de:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400011
- López Hernández, O. D., Torres Amaro, L., Salomón Izquierdo, S., González Sanabria, M. L., & Chávez Figueredo, D. (2008). Secado por aspersion de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(4).
 Recuperado de:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400010
- Makhro, A., Huisjes, R., Verhagen, L. P., Mañú-Pereira, M. del M., Llaudet-Planas, E., Petkova-Kirova, P., ... Kaestner, L. (2016). Red cell properties after different modes of blood transportation. *Frontiers in Physiology*, 7(JUL), 1–21.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00288>

- Modaresi, M., & Resalatpour, N. (2012). The effect of taraxacum officinale hydroalcoholic extract on blood cells in mice. *Advances in Hematology*, 2012, 4. <https://doi.org/10.1155/2012/653412>
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización: Formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica Y Vidrio*, 52(4), 159–168. <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>
- Ovadje, P., Hamm, C., & Pandey, S. (2012). Efficient induction of extrinsic cell death by dandelion root extract in human chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) cells. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030604>
- Oyedapo, O. o, Akinpelu, B. A., Akinwunmi, K. F., Adeyinka, M. ., & Sipeolu, F. O. (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of Lantana camara and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46–51. Retrieved from [http://www.academicjournals.org/ijppb/PDF/PDF 2010/Oct/Oyedapo et al.pdf](http://www.academicjournals.org/ijppb/PDF/PDF%2010/Oct/Oyedapo%20et%20al.pdf)
- Parvin, M. S., Das, N., Jahan, N., Akhter, M. A., Nahar, L., & Islam, M. E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of Crescentia cujete leaves and stem bark. *BMC Research Notes*, 8(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1384-5>
- Prieto, R. E., González, G., & Abella, J. P. (2011). *Extracción con ultrasonido de compuestos fenólicos presentes en la cáscara de uva de variedad Isabella (Vitis labrusca)*. Bogotá-Colombia: RECITEIA. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=g6KLpY0l6-gC&pg=PA120&lpg=PA120&dq=aplicacion+de+ultrasonido+y+rendimiento+d+e+extraccion&source=bl&ots=qD61B6DA3f&sig=ZXEpcNEj6RSmO-reKjXk8aJqIkU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjzxyTm6s3XAhWn1IMKHYUcDOEQ6AEIUDAH#v=onepage&q=apl>
- Quiñones, M., Aleixandre, A., & Miguel, M. (2012). Los polifenoles , compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rodríguez-González, J., Rodríguez-González, A., Triana-Torres, A., & Mendoza-Taño, R. (2012). Conocimientos de los factores de riesgo sobre cáncer de mama

- en Puerto La Cruz, estado Anzoátegui, Venezuela. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 11(5), 673–683. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2012000500013&lang=pt
- Rodríguez-Riera, Z., Robaina-Mesa, M., Jáuregui-Haza, U., Rodríguez-Chanfrau, J., & Blanco-Gonzalez, A. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, 139–147. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Rodriguez_Chanfrau/publication/270273043_Empleo_de_la_radiacion_ultrasonica_para_la_extraccion_de_compuestos_bioactivos_provenientes_de_fuentes_naturales_Estado_actual_y_perspectivas/links/54aa7a060cf2ce2df6688845.pdf
- Salomon Izquierdo, S., López Hernández, O. D., & González Sanabia, M. L. (2011). Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de *Momordica charantia* L. Development of a technology for obtaining the *Momordica charantia* L. aqueous extract. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 304–312.
- Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Sarsf, M. N. (1999). Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, 70, 251–257. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00030-1)
- Tee, L. H., Luqman Chuah, A., Pin, k. Y., Abdull Rashih, A., & Yusof, Y. A. (2012). Optimization of spray drying process parameters of *Piper betle* L. (Sirih) leaves extract coated with maltodextrin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(3), 1833–1841. Recuperado de www.jocpr.com
- Torres, A., Ibarra Martínez, C. M., Martínez, & Díaz de Salas, M. (2016). ESTUDIO FITOQUÍMICO DE PLANTAS MEDICINALES PROPIAS DEL ESTADO DE QUERÉTARO, 2(2), 279–295.
- Tropicos.org. (2017). *Taraxacum officinale* F.H. Wigg. Retrieved from <http://www.tropicos.org/Name/2726999>
- Valenzuela Bustamante, P. D. (2015). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES DE HOJAS DE DIFERENTES GENOTIPOS DE*

UGNI MOLINAE TURCZ. Universidad de Chile. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134044/Evaluacion-de-la-actividad-antioxidante-y-determinacion-del-contenido-de-fenoles-totales-y-flavonoides.pdf;sequence=1>

Vila-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Lara-Zaragoza, E. B., Monsreal, J. F., & Cardeña.Bazziere, I. M. (2011). Biotecnología de plantas medicinales : generando fármacos de un futuro tornado presente . *Temas de Ciencia Y Tecnología*, 15, 13–20. Recuperado de: http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas43/1ENSAYO_43_2-R.pdf

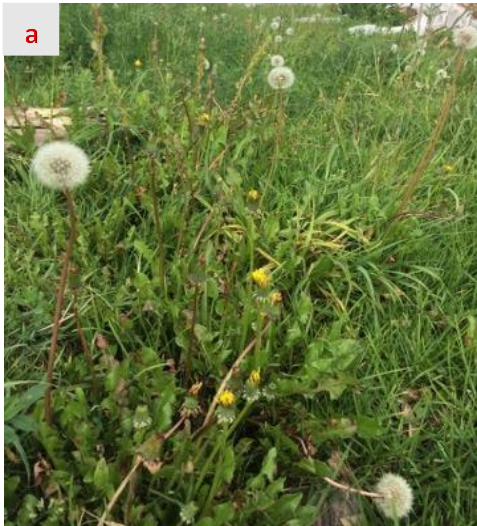
Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Lara-Saragoza, E. B., Mosnreal, J. F., Cardeña-Bozziere, I. M., Galván-Valencia, O. T., & Ruiz-Gómez, L. M. (2011). Biotecnología de plantas medicinales: generando fármacos de un futuro tornado presente. *Temas de Ciencia Y Tecnología*, 15, 13–20. Recuperado de: http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas43/1ENSAYO_43_2-R.pdf

Wang, J., Lu, H. D., Muhammad, U., Han, J. Z., Wei, Z. H., Lu, Z. X., ... Lu, F. X. (2016). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Artemisia selengensis* Turcz and its antioxidant and anticancer activities. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), 1025–1034. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2156-x>

Zapata, K., Cortes, F. B., & Rojano, B. A. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Informacion Tecnologica*, 24(5), 103–112. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500012>

ANEXOS

Anexo I: recolección (a) y secado de las hojas de diente de león (b, c).



Anexo II: determinación de sólidos solubles totales del extracto acuoso.



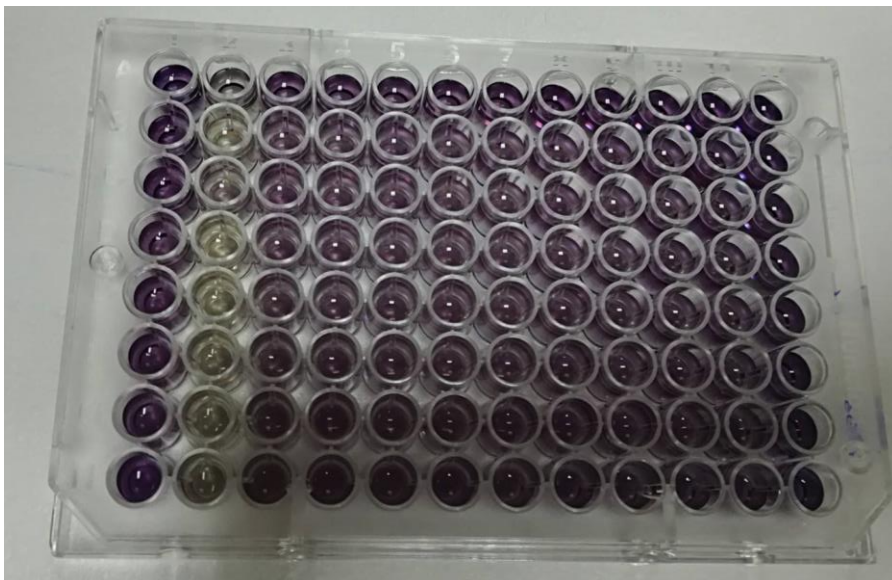
Anexo III: proceso de secado por aspersión del extracto acuoso.



Anexo IV: determinación de polifenoles del extracto seco.



Anexo V: determinación de la actividad citotóxica.



Anexo VI: análisis de varianza del % de rendimiento de extracción de SST

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A	34,5293	1	34,5293	28,46	0,0129 *
B	114,982	1	114,982	94,77	0,0023 *
Ab	53,449	1	53,449	44,05	0,0070 *
Replica	1,14996	1	1,14996	0,95	0,4021
Error total	3,63999	3	1,21333		
Total (corr.)	207,75	7			

Nota: **A.** Relación material vegetal: volumen de disolvente, **B.** Tratamiento del material vegetal. Los resultados se analizaron a un 95% de confianza. * indica que existen diferencias significativas

Fuente: *Software Statgraphics Centurion versión XVI.I.*

Anexo VII: valores de concentración y absorbancia para la curva estándar de ácido gálico.

Concentración	Absorbancia
mg/l	750 nm
0,00	0,000
50,6	0,096
99,5	0,187
151,1	0,263
196,0	0,357

Anexo VIII: curva de ácido gálico

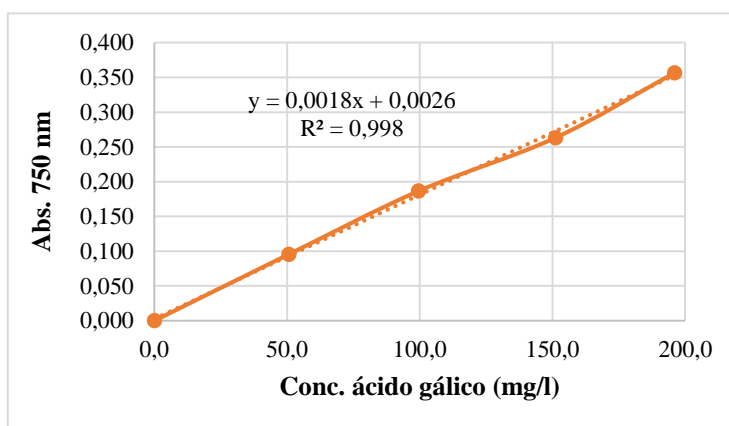


Figura 1. Curva estándar de ácido gálico.