



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



Obtención y caracterización de polifenoles y flavonoides de extractos de *Baccharis macrantha* (Chilca) y estudio de su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a 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 y Biotecnología.

El estudio es parte del proyecto: **Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usados en el Ecuador: Proyecto de Investigación asociado al Proyecto de Canje de Deuda Ecuador - España llevado a cabo en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.** Aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por el Centro de Investigación de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0206-CU-P-2018.

Autor: Santiago André Rosero Mero

Tutora: PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador

Enero 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

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

Ambato, 07 de noviembre de 2019



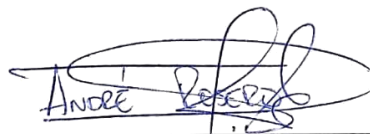
PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I.: 180413557-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Rosero Mero Santiago André, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'André Rosero Mero', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Santiago André Rosero Mero


C.I.: 172690905-2

AUTOR

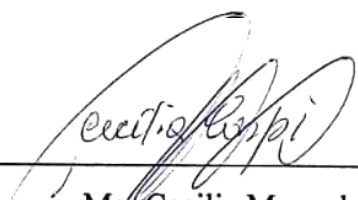
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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 y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

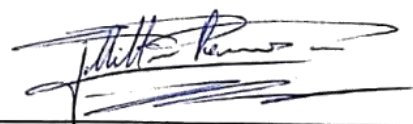
Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Cecilia Mercedes Carpio
C.I.: 170462765-0



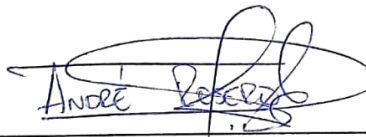
PhD. Milton Rubén Ramos Moya
C.I.: 180111963-5

Ambato, 11 de diciembre de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de Investigación, 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.



Santiago André Rosero Mero

C.I.: 172690905-2

AUTOR

DEDICATORIA

“La humanidad necesita hombres prácticos, que sacar el mayor provecho de su trabajo, y, sin olvidar el interés general, salvaguardar sus propios intereses. Pero la humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio”
-Marie Curie

A Dora y Jaime, mis padres,
este trabajo es para ustedes, que siempre me apoyaron,
me brindaron su confianza y su amor incondicional
en cada una de las decisiones que creí importantes,
que supieron darme fuerzas cuando las necesitaba,
que supieron regañarme cuando me lo merecía, y
que supieron compartir mi felicidad por cada nuevo logro.

A Daniela, mi hermana,
sin ti tampoco habría sido posible llegar hasta aquí,
siempre cuidaste de mí, a pesar de ser el mayor.

A Anthonela, la recién llegada,
espero ser un ejemplo y demostrarte que todo se puede
a pesar de las dificultades.

A Margarita, mi tía,
por todo el apoyo recibido a lo largo de éstos 23 años,
éste trabajo también es fruto de su preocupación,
de su cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Comunidad Teligote, por la protección del Bosque Nativo Andino “Cerro Teligote”, quienes fueron parte fundamental para que éste trabajo de investigación se lleve a cabo, permitieron el acceso al lugar y brindaron información de los usos que se les puede dar a diferentes plantas y en especial a la chilca (*Baccharis macrantha*).

Al proyecto de investigación: “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usados en el Ecuador: Proyecto de Investigación asociado al Proyecto de Canje de Deuda Ecuador – España” por permitirme ser parte de este trabajo de investigación.

Al proyecto de Canje de Deuda Ecuador-España, quienes financiaron parte de los reactivos, y a los ingenieros Mario y Mónica quienes permitieron el uso del Laboratorio de Análisis Instrumental, en cuyas instalaciones realicé mi parte experimental.

A mis tías Margarita, Mercedes y Patricia, por apoyarme, estar pendientes de cada decisión que tomo y por darme sus consejos para seguir adelante y nunca rendirme.

A la Dra. Dayana Morales, mi tutora, por permitirme ser parte de su proyecto y compartir sus conocimientos para sacar adelante este trabajo. Por su paciencia y sobre todo su tiempo.

Al Dr. Jorge Briceño, por su carisma y por asistirme en la determinación de metales.

Al Dr. Walter Simbaña y a Don Juanito, quienes guiaron los ascensos al cerro Teligote.

A la Dra. Cecilia Carpio, por su paciencia, conocimiento y entrega.

A mi amiga Angélica, espero que esta amistad continúe y gracias por estar siempre ahí, soportándome.

A mis amigas Jessica y Verónica, por compartir casi 6 años de risas, tristezas, preocupaciones, bailes y demás.

A mis amigas Melany y Pame, por vernos triunfar juntos y siempre seguir adelante.

A Dianita, Xime, Álex, Melany y Jennifer, el autodenominado Grupo Polifenoles, ¿qué hubiera sido sin ustedes hacer la parte experimental? Por las risas y momentos compartidos.

A todos: GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I	16
MARCO TEÓRICO	16
1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	16
1.1.1. <i>Plantas medicinales</i>	16
1.1.2. <i>Bosque nublado andino “Teligote”</i>	17
1.1.3. <i>Familia ‘Asteraceae’</i>	17
1.1.4. <i>Género Baccharis</i>	17
1.1.5. <i>Especie Baccharis macrantha</i>	18
1.1.6. <i>Polifenoles</i>	19
1.1.7. <i>Determinación del contenido total de polifenoles (CTP)</i>	20
1.1.8. <i>Flavonoides</i>	20
1.1.9. <i>Determinación del contenido total de flavonoides (CTF)</i>	22
1.1.10. <i>Cromatografía</i>	23
1.1.11. <i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)</i>	23
1.1.12. <i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	23
1.1.13. <i>Actividades biológicas</i>	24
1.2. OBJETIVOS	26
1.2.1. <i>Objetivo general</i>	26
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	26
1.3. HIPÓTESIS.....	27
1.3.1. <i>Optimización de las condiciones de extracción</i>	27
• <i>Hipótesis nula</i>	27
• <i>Hipótesis alternativa</i>	27
1.3.2. <i>Actividades biológicas</i>	27
• <i>Hipótesis nula</i>	27
• <i>Hipótesis alternativa</i>	27
1.4. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES	27
1.4.1. <i>Variables independientes</i>	27
1.4.2. <i>Variables dependientes</i>	27
CAPÍTULO II	29
METODOLOGÍA	29
2.1. MATERIALES	29
2.1.1. <i>Materiales</i>	29

2.1.2.	<i>Reactivos</i>	29
2.1.3.	<i>Equipos</i>	30
2.2.	MÉTODOS	30
2.2.1.	<i>Obtención de extractos</i>	30
2.2.1.1.	Pre – tratamiento.....	30
2.2.1.2.	Optimización del proceso de obtención de polifenoles y flavonoides.....	31
2.2.2.	<i>Liofilización</i>	32
2.2.3.	<i>Cuantificación de polifenoles totales</i>	32
2.2.4.	<i>Cuantificación de flavonoides</i>	33
2.2.5.	<i>Caracterización de los extractos</i>	34
2.2.5.1.	Cromatografía en capa fina (TLC).....	34
2.2.5.2.	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	36
2.2.6.	<i>Actividad antiinflamatoria in vitro</i>	37
2.2.7.	<i>Actividad antioxidante in vitro</i>	38
2.2.8.	<i>Metales</i>	39
	CAPÍTULO III	42
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	42
3.1.1.	<i>Optimización del solvente de extracción</i>	42
3.1.2.	<i>Optimización de la temperatura de extracción</i>	45
3.1.3.	<i>Optimización del tiempo de extracción</i>	47
3.1.4.	<i>Desgaste del material vegetal</i>	49
3.1.5.	<i>Caracterización cualitativa por TLC</i>	50
3.1.6.	<i>Caracterización del perfil de polifenoles por HPLC</i>	52
3.1.7.	<i>Actividad antiinflamatoria por HRBC</i>	55
3.1.8.	<i>Actividad antiinflamatoria por desnaturalización proteica</i>	57
3.1.9.	<i>Actividad antioxidante por TBARS</i>	59
3.1.10.	<i>Cuantificación de metales</i>	61
3.1.10.1.	Cadmio	62
3.1.10.2.	Calcio.....	62
3.1.10.3.	Cobalto	63
3.1.10.4.	Cobre	64
3.1.10.5.	Hierro.....	64
3.1.10.6.	Magnesio	64
3.1.10.7.	Manganeso.....	65
3.1.10.8.	Níquel	65
3.1.10.9.	Plomo.....	65
3.1.10.10.	Zinc.....	66
3.2.	VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS	66
3.2.1.	<i>Optimización del proceso de extracción</i>	66

3.2.2. Actividades biológicas.....	66
CAPÍTULO IV	68
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	68
4.1. Conclusiones	68
4.2. Recomendaciones	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS	84
ANEXO A	85
A.1. Curva de calibración para la cuantificación de CTF	85
A.2. Curva de calibración para la cuantificación de CTP	85
ANEXO B	86
B.1. Optimización del solvente para flavonoides.....	86
B.2. Optimización de la temperatura para flavonoides	88
B.3. Optimización del tiempo de extracción	89
B.4. Desgaste del material vegetal para la obtención de flavonoides	91
ANEXO C	93
C.1. Optimización del solvente para polifenoles	93
C.2. Optimización de la temperatura para polifenoles.....	95
C.3. Optimización del tiempo de extracción para polifenoles	96
C.4. Desgaste del material vegetal para polifenoles	98
ANEXO D	100
D.1. Curva de calibración de catequina en HPLC	100
D.2. Curva de calibración para ácido gálico en HPLC	100
ANEXO E.....	101
E.1. Ejemplo del reporte generado por el Software Chem Station de Agilent HPLC.....	101
E.2. Ejemplo de la señal para la curva de calibración de AG y CQ. Señal a 214 nm - 100 µg/ml	102
E.3. Ejemplo de la señal para la curva de calibración de AG y CQ. Señal a 280 nm - 100 µg/ml	102
ANEXO F	103
F.1. Análisis de varianza para la concentración de flavonoides por Solvente	103
F.2. Análisis de varianza para la concentración de polifenoles por Solvente.....	103
F.3. Análisis de varianza multifactorial para diseño factorial A * B	103
F.4. Análisis de varianza para las medias del porcentaje de protección con EtOH25%.....	103
F.5. Análisis de varianza para las medias del porcentaje de protección con EtOH50%.....	103
ANEXO G	104
G.1. Actividad antiinflamatoria por estabilización de RBCs.....	104
G.2. Actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteína	104

G.3. Actividad antioxidante del estándar de referencia	105
G.4. Actividad antioxidante del extracto obtenido con EtOH25	105
G.5. Actividad antioxidante del extracto obtenido con EtOH50	105

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PUNTO DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	31
TABLA 2. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE AG PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN	33
TABLA 3. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE CQ PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN	34
TABLA 4. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS EN ACEITE DE OLIVA	39
TABLA 5. METALES MEDIDOS EN HOJAS SECAS DE <i>B. MACRANTHA</i>	40
TABLA 6. CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL MÉTODO DE LLAMA	41
TABLA 7. CONDICIONES DE TRABAJO PARA EL MÉTODO DE HORNO DE GRAFITO	41
TABLA 8. CTF Y CTP CON DIFERENTES SOLVENTES DE EXTRACCIÓN	43
TABLA 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE UNA VÍA PARA CTF Y CTP EN LA OPTIMIZACIÓN DEL SOLVENTE	44
TABLA 10. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA DETERMINAR LA SIGNIFICANCIA ENTRE EL CTF POR EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLVENTES	44
TABLA 11. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA DETERMINAR LA SIGNIFICANCIA ENTRE EL CTP POR EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLVENTES	45
TABLA 12. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CTF Y CTP	45
TABLA 13. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA PARA LAS MEDIAS DEL CTF Y CTP EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA	46
TABLA 14. CONTRASTE DE TEMPERATURAS A TRAVÉS DEL TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA DETERMINAR DIFERENCIAS EN EL CTF Y CTP	47
TABLA 15. EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN EN EL CTF	48
TABLA 16. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DEL CTF POR NÚMERO DE EXTRACCIÓN	49
TABLA 17. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DEL CTP POR NÚMERO DE EXTRACCIÓN	49
TABLA 18. FACTOR DE RETENCIÓN PARA LAS BANDAS IDENTIFICADAS EN TLC	52
TABLA 19. TIEMPOS DE RETENCIÓN PARA CADA PICO REPRESENTATIVO EN LA SEPARACIÓN POR HPLC	54
TABLA 20. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA DETERMINAR LA SIGNIFICANCIA DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE PROTECCIÓN CON EtOH25% Y EtOH50% POR EL MÉTODO DE ESTABILIZACIÓN DE RBCs	57
TABLA 21. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA DETERMINAR LA SIGNIFICANCIA DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE PROTECCIÓN CON EtOH25% Y EtOH50% POR EL MÉTODO DE DESNATURALIZACIÓN PROTEICA.	59
TABLA 22. TEST DE RANGOS MÚLTIPLES PARA EL PORCENTAJE DE PROTECCIÓN CONTRA LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA PARA LOS EXTRACTOS DE EtOH25 Y EtOH50	60
TABLA 23. CONCENTRACIÓN DE ALGUNOS METALES EN <i>B. MACRANTHA</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. (A) FENOL: ANILLO FENÓLICO QUE CONFORMA LA ESTRUCTURA BASE DE LOS POLIFENOLES, (B) Y (C): ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS, (B) ESTRUCTURA GENERAL DE LOS ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS, (C) ESTRUCTURA GENERAL DE LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS.....	20
FIGURA 2. ESTRUCTURA MOLECULAR BASE DE LOS FLAVONOIDES (FENILBENZOPIRONA).....	21
FIGURA 3. CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS FLAVONOIDES	21
FIGURA 4. CLASIFICACIÓN ADICIONAL DE LOS FLAVONOIDES: (A) FLAVAN-3-OLES Y (B) ANTOCIANIDINAS O SALES DE FLAVILIO.....	22
FIGURA 5. SEPARACIÓN DE COMPUESTOS A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC).....	24
FIGURA 6. INYECCIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE EL MUESTREADOR AUTOMÁTICO CAMAG TLC 4 CON LONGITUDES PROGRAMADAS.....	35
FIGURA 7. COMPARACIÓN GRÁFICA DE MEDIAS EN LA EXTRACCIÓN DE: (A) FLAVONOIDES CON ETANOL Y METANOL; Y (B) POLIFENOLES CON ETANOL Y METANOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES ..	43
FIGURA 8. INTERACCIÓN DE LOS FACTORES TEMPERATURA Y TIEMPO A DISTINTOS NIVELES SOBRE (A) CTF Y (B) CTP	48
FIGURA 9. RECUPERACIÓN DE (A) CTF Y (B) CTP CON EXTRACCIONES SUCESIVAS	50
FIGURA 10. IMÁGENES REVELADAS A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DESPUÉS DE LA SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS: (A) 254 NM, CON PATRONES AG Y CQ EN LAS DOS PRIMERAS COLUMNAS, (B) 366 NM, CON AG Y CQ EN LAS DOS PRIMERAS COLUMNAS, Y (C) 366 NM, CON AG EN LA PRIMERA COLUMNA, CQ EN LA TERCERA Y QT EN LA ÚLTIMA COLUMNA.	50
FIGURA 11. CROMATOGRAMAS DEL PERFIL DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA: (A) SIGB – 214 NM, (B) SIGA – 254 NM, (C) SIGG – 280 NM, (D) SIGE – 320 NM, (E) SIGH – 360 NM Y (F) SIGC – 366 NM.....	53
FIGURA 12. VARIACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA LA LISIS DE LOS RBCS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO, COMPARADOS CON EL DICLOFENACO COMO ESTÁNDAR DE REFERENCIA.	56
FIGURA 13. VARIACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA LA DESNATURALIZACIÓN PROTEICA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS, COMPARADOS CON EL DICLOFENACO COMO ESTÁNDAR DE REFERENCIA.....	58
FIGURA 14. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL BHT CON LOS EXTRACTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES OBTENIDOS CON LOS TRATAMIENTOS DE EtOH25 Y EtOH50. 60	

RESUMEN

El presente estudio buscó obtener el mayor contenido de flavonoides totales (CTF) y polifenoles totales (CTP) en hojas secas de *Baccharis macrantha*, para lo cual se optimizó un método de extracción con solventes (etanol y metanol), a temperaturas (30-60°C) y tiempos de extracción diferentes (5-20 min). Las condiciones optimizadas en la extracción de flavonoides fueron etanol al 25%, 50°C y 10 min, mientras que para polifenoles fueron etanol al 50%, 50°C y 10 min, con lo cual se realizó el desgaste del material vegetal, obteniendo una recuperación del 98,56% para flavonoides y 100% en polifenoles en la cuarta extracción. Los extractos fueron caracterizados mediante TLC y HPLC con tres estándares de referencia (ácido gálico, catequina y quercetina), en donde bajo las condiciones de trabajo utilizadas únicamente se detectó quercetina en los extractos hidroetanólicos, con un R_f de 0,62 y un tiempo de retención de 27 min. En TLC se detectaron además 9 bandas, con grupos aparentemente metilados y glucosidados, mientras que en HPLC se detectaron 14 picos representativos que comparten ambos tratamientos de extracción para cada longitud de onda probada. Las actividades biológicas fueron ensayadas *in vitro*. La actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando el método de desnaturalización proteica y el de estabilización de los glóbulos rojos, cuyos valores de protección fueron 93,70% (EtOH50%) y 97,23% (EtOH25%); y 49,72% (EtOH25%) y 50,71% (EtOH50%), respectivamente. La actividad antioxidante, evaluada mediante el método TBARs, mostró una protección igual a 77% (EtOH25%) y 73,11% (EtOH50%).

Palabras clave: optimización del proceso de extracción, cromatografía, actividades biológicas, *B. macrantha*.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain the highest content of total flavonoid (TFC) and total polyphenol (TPC) from dry leaves of *Baccharis macrantha*, for which an extraction method was optimized using different solvents (ethanol and methanol), temperatures (30-60°C) and extraction times (5-20 min). The optimized conditions for flavonoids extraction were 25% ethanol, 50°C and 10 min, while for polyphenols were 50% ethanol, 50°C and 10 min; under these conditions depletion of plant material was achieved with recoveries of 98.56% for flavonoids and 100% for polyphenols in the fourth extraction. The extracts were characterized by TLC and HPLC with three standards (gallic acid, catechin and quercetin). Thus, quercetin was detected in hydroethanolic extracts with an R_f of 0.62 and a retention time of 27 min. In TLC, 9 bands were also detected, with apparently methylated and glycosylated groups, while in HPLC 14 representative peaks were detected that share both extraction treatments for each wavelength used. The biological activities were tested *in vitro*. Anti-inflammatory activity was evaluated using the protein denaturation method and red blood cells stabilization, whose protection values were 93.70% (EtOH50%) and 97.23% (EtOH25%); and 49.72% (EtOH25%) and 50.71% (EtOH50%), respectively. The antioxidant activity evaluated through the TBARs method, showed a protection equal to 77% (EtOH25%) and 73.11% (EtOH50%).

Keywords: extraction optimization, chromatography, biological activities, *B. macrantha*.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1. Plantas medicinales

Las plantas medicinales han sido ocupadas desde siempre por la medicina tradicional para atender las necesidades de salud primarias (**Akerele, 1993**) para el tratamiento y prevención de enfermedades (**Organización Mundial de la Salud, 2013**). De las plantas se utilizan sus extractos y estos a su vez funcionan como productos sustitutos o complementarios a la medicina farmacéutica (**Gallegos, 2016**).

Según la **OMS, (2004)** no existen directrices que permitan tener una documentación oficial de las plantas que se utilizan en la medicina tradicional, por lo que no se conoce a ciencia cierta el mecanismo de acción de sus extractos herbales. Además, la OMS también ha reportado un incremento de reacciones adversas asociadas a un mayor consumo de “medicamentos naturales” para el tratamiento de enfermedades, causadas principalmente porque muchos de estos productos no cuentan con estudios científicos que avalen su uso.

El Ecuador por su ubicación geográfica cuenta con un sin número de plantas medicinales y se estima que aproximadamente un 80% de la población ecuatoriana utiliza productos naturales derivados de la medicina tradicional o no convencional para tratar ciertos tipos de enfermedades (**Buitrón, 1999**).

Según **Barrantes, Chaves & Vinueza, (2010)** en Ecuador se han estudiado 16 000 especies de plantas vasculares que se han agrupado en 273 familias. A pesar de ello, aún no se conoce con exactitud el área de cobertura forestal (bosques nativos) con los que cuenta el país. Sin embargo, los recursos naturales como bosques primarios se encuentran amenazados y se calcula que una cuarta parte del total de plantas se extinguirán a mediados del siglo XXI (**Akerele, 1993**). Por ello, es importante la conservación y estudio de los bosques para conocer el capital forestal del país.

Un informe de la **FAO, (2014)** asegura que la información más actualizada acerca del estado de los bosques ecuatorianos y la extensión de los mismos corresponde al año 2008. Dicho estudio estuvo a cargo de la Dirección Nacional Forestal del Ministerio

del Ambiente, en donde se indica que la extensión oficial de bosque para el Ecuador Continental corresponde a 13 Mha. Sin embargo, se calcula que anualmente se pierden alrededor de 65 000 ha.

Del total del territorio nacional, aproximadamente el 52% tiene aptitud forestal y de éstos el 43% son bosques naturales. Aproximadamente el 7% de los bosques naturales se encuentran en la Sierra (**Ecuador Forestal, 2007**). Uno de estos bosques es el que se ubica en el Cerro Teligote, en la comunidad del mismo nombre.

1.1.2. Bosque nublado andino “Teligote”

El Bosque Nublado Andino “Teligote” se encuentra ubicado en la zona 3 del Ecuador, cantón San Pedro de Pelileo, Provincia de Tungurahua, y tiene una superficie de 407 ha. Está ubicado a una altura de 3 291 msnm (**Simbaña & Vargas, 2017**). En este sitio se han identificado alrededor de 160 especies de plantas entre plantas vasculares, arbustos y helechos (**Maisanche, 2018**). Entre las plantas estudiadas, se encuentra el género *Baccharis*, perteneciente a la familia de las Asteráceas.

1.1.3. Familia ‘Asteraceae’

Asteraceae es una de las familias más diversas de plantas vasculares en el planeta (**Prada, Orduz & Coy, 2016**), aparentemente debido a la capacidad de adaptación a diversos ecosistemas. Etimológicamente el prefijo ‘*Aster*’ proviene del término en latín del mismo nombre que significa ‘estrella’, al parecer por la inflorescencia de la mayoría de las plantas pertenecientes a esta familia (**Diversidad Vegetal Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, n.d.**). En general, Asteraceae cuenta con alrededor de 417 géneros y 3 113 especies de plantas distribuidas por todo el mundo (**Villaseñor, 2018**). Dentro de esta familia sobresale el género *Baccharis*.

1.1.4. Género *Baccharis*

El género *Baccharis* cuenta con alrededor de 400 a 500 especies (**Abad & Bermejo, 2006**). En el Ecuador se han identificado 35 especies (**Ulloa & Moller, n.d.**), que comprenden a arbustos, subarbustos y plantas perennes herbáceas.

Estas plantas son fácilmente identificables por la pubescencia de sus hojas y su tallo alado. Sin embargo, se puede distinguir una especie de otra por la diferencia morfológica de sus hojas.

1.1.5. Especie *Baccharis macrantha*

La especie *Baccharis macrantha* se extiende por Ecuador (Azuay, Bolívar, Carchi, Cotopaxi, Chimborazo, Imbabura y Tungurahua) (**Tropicos, n.d.**) y en Colombia (Valle del Cauca) (**Prada et al., 2016**). En cada región a esta especie se la conoce con nombres comunes diferentes, entre los que se encuentran: chilca, chilco, chirco y ciro. Sin embargo, la manera de nombrarlas vulgarmente puede llevar a confusiones entre una especie y otra al momento de identificarlas, puesto que el nombre ‘Chilca’ es recibido por todas las especies y subespecies del género *Baccharis* (**Real Jardín Botánico, 1969**).

Etimológicamente el término ‘*macrantha*’ se deriva de la palabra griega ‘*makrós*’, que significa grande o largo y del sufijo griego ‘*ānthos*’ que significa flor. Es decir, son plantas que tienen los capítulos florales aglomerados y grandes.

Se pueden nombrar varias características filogenéticas de *B. macrantha*, que la diferencian de otras asteráceas, entre las más importantes se encuentran sus frúti­ces y ramas tortuosas y lenticeladas. Son árboles de hasta 6 m de alto con hojas glabras o brevemente pecioladas que tienen un tamaño de entre 1,5 a 9,0 cm de longitud (**Real Jardín Botánico, 1969**).

Estudios previos en *B. macrantha* muestran que se han aislado más de 150 compuestos de este género, entre los que destacan los diterpenoides. No obstante, también existen otros compuestos biológicamente activos que no se han estudiado a profundidad como los polifenoles (y sus derivados) y los aceites esenciales (**Abad & Bermejo, 2006**).

En Ecuador, la medicina tradicional ha usado este género para combatir infecciones bacterianas y fúngicas (**Abad & Bermejo, 2006**). Sin embargo, y a pesar de la gran variedad de especies encontradas, no existen estudios de la actividad biológica de los extractos de *B. macrantha*.

Actualmente gran parte del conocimiento que se tiene acerca de las propiedades medicinales de *B. macrantha* es el conocimiento empírico de la gente, de ahí la importancia de estudiar y caracterizar dos grupos importantes de compuestos orgánicos sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas, como los polifenoles y flavonoides, ya que no existe información científica de sus propiedades medicinales.

1.1.6. Polifenoles

Los polifenoles en las plantas son sintetizados a través de las vías del shiquimato y de los fenilpropanoides. Su contenido depende de factores como el género, la especie, el grado de madurez de la planta y de sus frutos, la ubicación geográfica y la composición del suelo (**Valencia et al., 2016**). Según **Quiñones, Miguel & Aleixandre, (2012)** los compuestos fenólicos de origen vegetal son el grupo más grande de sustancias no energéticas, que ayudan a mejorar la salud, ya que están involucrados en procesos de defensa contra agentes patógenos y la radiación ultravioleta gracias a la capacidad que tienen para combatir especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Artículos publicados por **Shirai, Onitsuka, Maseda & Omasa (2015)** señalan que uno de los factores que causa la generación de ROS (aniones de superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo) es la exposición a la luz UV, lo que resulta en reacciones de peroxidación lipídica en las células y la oxidación del ADN. Las células por sí solas tienen mecanismos intracelulares de protección contra el daño por estrés oxidativo, que incluyen enzimas y el efecto de diferentes compuestos antioxidantes. Sin embargo, el desbalance entre la generación de ROS y los mecanismos de protección pueden repercutir en una serie de enfermedades degenerativas.

Los polifenoles en la actualidad están siendo estudiados con mayor énfasis por su capacidad para combatir enfermedades cardiovasculares (**Guillarme, Casetta, Bichi & Veuthey, 2010**), el desarrollo de algunos tipos de cánceres (**Moualek, Iratni Aiche, Mestar Guechaoui, Lahcene & Houali, 2016**), diabetes (**Alhakmani, Kumar & Khan, 2013**), osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas (**Bhoosha & Ibrahim, 2009**), quelar metales, atrapar radicales libres de oxígeno y nitrógeno e inhibir la actividad de la lipooxigenasa, por lo que se los considera como los compuestos fitoquímicos más importantes sobre la salud humana (**Martínez & López, 2017**). Es así, que los compuestos fenólicos obtenidos de plantas son de importancia también para las industrias farmacéuticas, alimenticia y de cosméticos (**Valencia et al., 2016**), por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (**Sepúlveda, Ciro & Zapata, 2016**).

Se estima que hasta la fecha han sido aislados alrededor de 8 000 compuestos fenólicos de plantas. Estructuralmente, los polifenoles son compuestos fitoquímicos polihidroxilados, cuya estructura es similar entre compuestos (**Alexis Biochemicals,**

2017), con una masa molecular comprendida entre 500 a 4 000 Da (Ricco, Agudelo & Wagner, 2015) y que pueden ser clasificados en ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, estiblinas y lignanos (Abbas et al., 2017). En la Figura 1, se muestran algunas de las estructuras que conforman los diferentes grupos de los polifenoles.

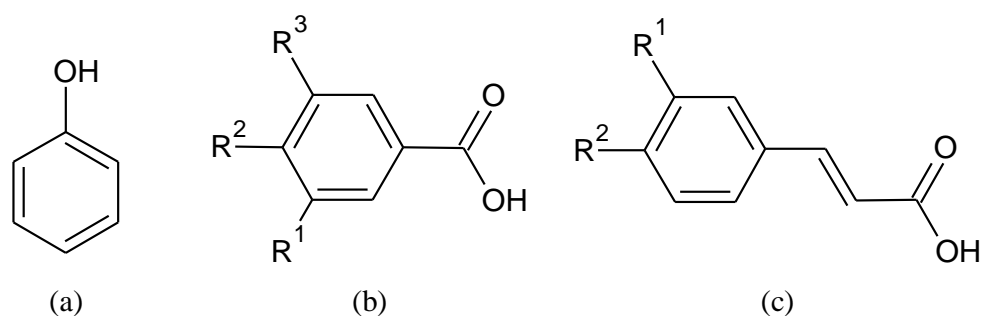


Figura 1. (a) Fenol: anillo fenólico que conforma la estructura base de los polifenoles, (b) y (c): estructura de los ácidos fenólicos, (b) estructura general de los ácidos hidroxibenzoicos, (c) estructura general de los ácidos hidroxicinámicos.

1.1.7. Determinación del contenido total de polifenoles (CTP)

Actualmente hay varios métodos para la determinación de compuestos fenólicos en extractos de matrices vegetales. Sin embargo, uno de los más usados es el método de Folin – Ciocalteu que se basa en la capacidad de los polifenoles de reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo comercial de Folin – Ciocalteu contiene 2,5 % de molibdato de sodio y 10% de wolframato de sodio (Julkunen, 1985) en ácido fosfórico (Martínez & López, 2017), este reactivo es no específico y la coloración final del complejo formado depende principalmente de los grupos hidroxilo y su lugar en las moléculas (Julkunen, 1985). Producto de la oxidación de los polifenoles se obtiene una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 760 nm y la cuantificación de estos compuestos se realiza en base a una curva de calibración de un patrón de ácido gálico (Martínez & López, 2017).

1.1.8. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales (Martínez, Tuñón, González, & Culebras, 2014), generalmente de color amarillo (Primo, 2007), que tienen la capacidad de proteger a las plantas del estrés oxidativo generado por la exposición al sol y la polución ambiental (Martínez et al., 2014).

Son sustancias fenólicas que se encuentran en gran variedad de plantas vasculares y son sintetizadas a partir de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. La estructura molecular base de los flavonoides es un núcleo de benzopirona con un anillo aromático unido a él, denominado fenilbenzopirona, tal como se muestra en la Figura 2 (Primo, 2007). Esta estructura consiste en 15 átomos de carbono, distribuidos en tres anillos, y su clasificación individual se fundamenta en el nivel de oxidación o sustitución de estos (Pietta, 2000).

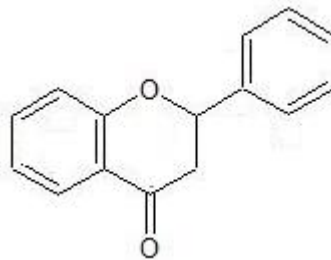


Figura 2. Estructura molecular base de los flavonoides (fenilbenzopirona)

Los flavonoides se clasifican en 4 grupos principales: flavonas, isoflavonas, flavonoles y flavononas (Primo, 2007), tal como se muestra en la Figura 3.

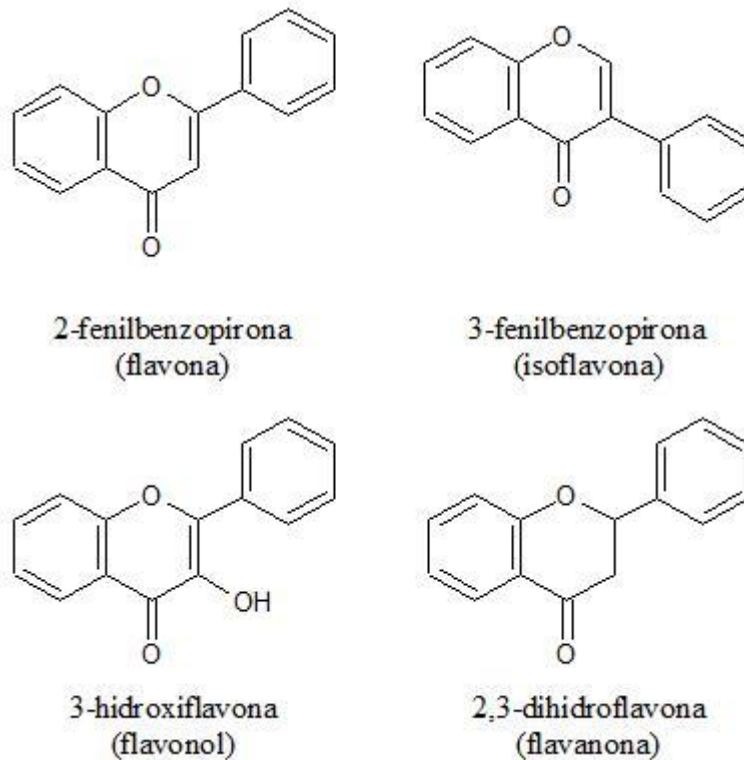


Figura 3. Clasificación general de los flavonoides

Otros autores como **Pietta, (2000)** sugieren dos grupos adicionales en la clasificación de los flavonoides, que son los flavan-3-oles y las antocianidinas, mostradas en la Figura 4.

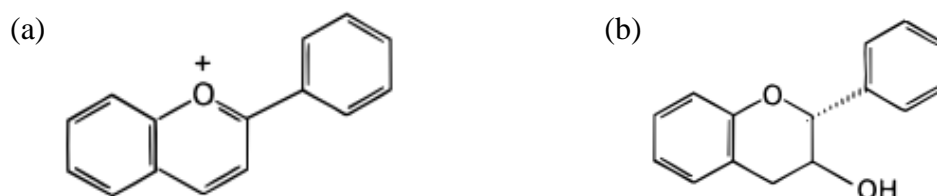


Figura 4. Clasificación adicional de los flavonoides: (a) Flavan-3-oles y (b) antocianidinas o sales de flavilio.

Los flavonoides generalmente se encuentran en las plantas como derivados glucosilados, que actúan como catalizadores en el proceso de fotosíntesis (**Pietta, 2000**).

La cantidad de grupos hidroxilo fenólicos, convierten a los flavonoides en fuente de antioxidantes naturales. En el ser humano ofrecen protección contra el estrés oxidativo, algunos tipos de cánceres y patologías cardíacas (**Martinez et al., 2014**). Un estudio realizado por **Abbas et al. (2017)** asegura que el consumo de alimentos ricos en flavonoides como flavonoles, flavanoles y flavones, reducen el riesgo de sufrir enfermedades cardíacas en un 11%.

1.1.9. Determinación del contenido total de flavonoides (CTF)

El método que se utiliza para la cuantificación del contenido total de flavonoides es el de la formación de un complejo de aluminio. El procedimiento fue descrito por primera vez por Christ y Müller en 1960 y es utilizado en la actualidad para el análisis de extractos herbales. El método se basa en la nitración de los anillos aromáticos que llevan un grupo catecol con tres o cuatro posiciones no sustituidas o bloqueadas estéricamente. La adición del cloruro de aluminio (III) produce un complejo de color amarillo el cual se torna rojo inmediatamente después de la adición del hidróxido de sodio. El complejo de color rojo es medido a 510 nm, y parece ser que a dicha longitud de onda el procedimiento es selectivo para rutina, luteolina y las catequinas, por lo que se deben utilizar como estándares en la curva de calibración (**Pekal & Pyrzynska, 2014**).

1.1.10. Cromatografía

La cromatografía, como tal, es una técnica utilizada para separar los diferentes componentes de una muestra, que se distribuyen entre dos fases: una estacionaria y una móvil (**Quattrocchi, Abelaira de Andrizzi, & Iba, 1996**). El botánico ruso M. Tswett la utilizó por primera vez en el año 1910 para separar pigmentos de plantas, pero no fue hasta el año 1930 que se divulgó esta técnica por la comunidad científica. Es así que, se fueron desarrollando diferentes versiones de la cromatografía, entre las que se encuentran, la cromatografía de reparto, de papel y de capa fina, y a partir del año 1965 empieza el desarrollo de instrumentos que permiten un mayor control del proceso de separación (**Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2017**).

1.1.11. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography, HPLC, por sus siglas en inglés), es una de las técnicas más difundidas para separar componentes de una mezcla, por su sensibilidad, adaptación a determinaciones cuantitativas exactas e idoneidad para separar analitos no volátiles (**Universidad de Alicante, 2008**). El desarrollo de un método de separación por HPLC comprende varios pasos esenciales que incluyen: tratamiento de la muestra, condiciones de separación, detección de las bandas, cuantificación y un método de validación (**Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997**). Sin embargo, una de las etapas críticas en el desarrollo de esta técnica es la identificación de las condiciones de separación más adecuadas, dado que, una misma muestra puede ser separada bajo diferentes condiciones. Por otra parte, el resultado de un análisis cromatográfico básicamente se compone de dos productos principales: el cromatograma y el eluido. El primero muestra una señal que relaciona la concentración de cada uno de los componentes de la muestra en función del tiempo de elución. Mientras que, el eluido representa la fracción de la fase móvil con los compuestos separados que pueden ser recolectados de manera escalonada (**Quattrocchi et al., 1996**).

1.1.12. Cromatografía en capa fina (TLC)

Este tipo de cromatografía también se basa en la separación de compuestos a través de una fase móvil y una estacionaria. Sin embargo, a diferencia de otras técnicas cromatográficas, ésta se fundamenta en la adsorción. En este caso la fase estacionaria se encuentra recubriendo una placa, que por lo general es de aluminio o de vidrio.

Mientras que, la fase móvil ascenderá por capilaridad a lo largo de dicha placa y como consecuencia arrastrará a los componentes de la muestra, separándolos en bandas o manchas bien definidas distribuidas a lo largo de la placa (**Universidad Nacional Autónoma de México, 2017**).

Una vez realizada la separación de la mezcla es necesario revelar la posición de cada uno de sus componentes. En la actualidad se utilizan placas fluorescentes, lo que permite el revelado con luz ultravioleta (**Unidad Criminalística Contra la Vulneración de derechos Fundamentales, 2015**). El último paso después del revelado, ya sea por métodos químicos o físicos, es identificar la distancia que ha recorrido cada compuesto. Cada mancha tiene un factor de retención (R_f) que es igual a la distancia migrada por el compuesto desde el punto de aplicación sobre la distancia total recorrida por la fase móvil o frente del eluyente, tal como se muestra en la Figura 5. Este valor es específico para cada compuesto, siempre y cuando la comparación sea hecha bajo las mismas condiciones de corrida (**Chemistry Libre Texts, 2019**).

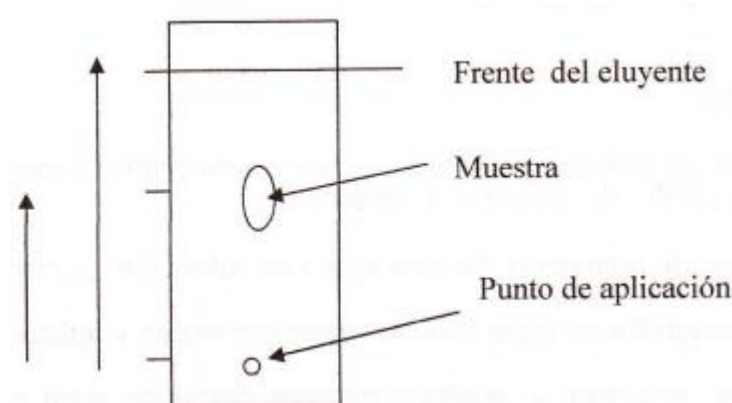


Figura 5. Separación de compuestos a través de cromatografía en capa fina (TLC)

Esta técnica es generalmente utilizada en escala preparativa para purificar compuestos, o determinar si un patrón está completamente puro. Entre las ventajas que presenta esta técnica analítica se encuentran la alta sensibilidad del método, los costos relativamente bajos y la velocidad de separación de los compuestos (**Chemistry Libre Texts, 2019**).

1.1.13. Actividades biológicas

La actividad biológica es la capacidad inherente de cierta sustancia de alterar o modificar funciones fisiológicas en las células (**Vargas, 2019**). Entre estas actividades se encuentran la actividad antiinflamatoria y la antioxidante mostrada por varios

metabolitos secundarios, lo cual sugiere que los extractos de las plantas pueden generar una importante protección contra procesos inflamatorios o daños por estrés oxidativo en las células.

La inflamación es la respuesta de un organismo ante la lesión o agresión que, por lo general, es de un agente externo y que puede ser químico, mecánico o biológico. La respuesta antiinflamatoria es beneficiosa siempre y cuando exista un equilibrio entre las células y los mediadores de la inflamación (**García de Lorenzo, López & Sánchez, 2000**). El método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos (HRBC), como prueba *in vitro* para determinar la actividad antiinflamatoria, se basa en estabilizar la membrana de los eritrocitos al inhibir la tensión causada por una solución hipotónica que induce la lisis de los glóbulos rojos. La membrana de los eritrocitos al ser un análogo de la membrana lisosomal, puede ser usada como modelo de estudio, esta última está implicada en la liberación de constituyentes lisosómicos de neutrófilos activados, y la estabilización de membrana, por lo tanto, inhibirá la liberación de dichos constituyentes provocando una disminución de la inflamación (**Kumar, Bhat, Kumar & Bohra, 2011**).

Por otro lado, la actividad antioxidante se basa en la capacidad que tienen ciertas sustancias (polifenoles y flavonoides) para combatir las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, formadas como un producto normal del metabolismo aeróbico, sin embargo, estas especies pueden ser producidas como consecuencia de la exposición a diferentes tipos de radiación como la radiación UV, rayos X, ultrasonido, y otras fuentes como el tabaquismo. La oxidación es la transferencia de electrones de una molécula a otra para producir energía en forma de ATP (ciclo normal en las células). Sin embargo, cuando no hay un equilibrio en dicha transferencia de electrones, empiezan a surgir problemas en donde las células son las primeras en verse afectadas, al generarse radicales libres. Dichos radicales son atacados con un sistema de defensas del cuerpo basado en antioxidantes donde se involucran enzimas tales como lipasas, transferasas y enzimas de reparación del ADN. Pero no siempre este sistema de defensa, propio de un organismo, es suficiente para erradicar de forma eficaz el exceso de radicales libres en la célula, es ahí cuando es necesario el consumo de antioxidantes dietéticos para disminuir los efectos del daño oxidativo que producen los radicales libres (**Pietta, 2000**).

El método TBARs, empleado para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto, se basa en un proceso de oxidación lipídica cuyo mecanismo de cadena de radicales libres (Ghani, Barril, Bedgood & Prenzler, 2017) tiene tres fases: iniciación, propagación y terminación. Este proceso genera hidroperóxidos lipídicos como productos (Rojano, Gaviria & Sáez, 2008), entre ellos destaca el malondialdehído (MDA) (Ghani et al., 2017). La degradación oxidativa de ácidos grasos insaturados puede ser detectada espectrofotométricamente al calentar el producto de la oxidación con TBA, bajo condiciones ácidas para generar un compuesto coloreado rosado, que se puede medir a 532 nm (Vladimir et al., 2011).

1.2.OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Caracterizar los polifenoles y flavonoides presentes en los extractos obtenidos de *Baccharis macrantha* (Chilca) y evaluar su actividad antioxidante y antiinflamatoria.

1.2.2. Objetivos específicos

Optimizar el método de extracción de polifenoles y flavonoides de *Baccharis macrantha* (Chilca).

Cuantificar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos de *Baccharis macrantha* (Chilca)

Caracterizar cualitativamente los compuestos obtenidos en los extractos de *Baccharis macrantha* (Chilca) a través de cromatografía de capa fina (TLC)

Cuantificar el contenido de ácido gálico y catequina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Estudiar la actividad antioxidante del extracto de *Baccharis macrantha* (Chilca) por el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos de *Baccharis macrantha* (Chilca) por el método de estabilización HRBC.

1.3.HIPÓTESIS

1.3.1. Optimización de las condiciones de extracción.

- **Hipótesis nula**

Las diferentes condiciones de extracción (concentración del solvente, temperatura y tiempo de ruptura celular) no producen diferencias en la concentración de polifenoles y flavonoides presentes en los extractos de *B. macrantha*.

- **Hipótesis alternativa**

Las diferentes condiciones de extracción (concentración del solvente, temperatura y tiempo de ruptura celular) producen diferencias en la concentración de polifenoles y flavonoides presentes en los extractos de *B. macrantha*.

1.3.2. Actividades biológicas.

- **Hipótesis nula**

Las diferentes concentraciones de los extractos no presentan actividad antioxidante, ni antiinflamatoria en ensayos *in vitro*.

- **Hipótesis alternativa**

Las diferentes concentraciones de los extractos presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria en ensayos *in vitro*.

1.4. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

1.4.1. Variables independientes

- Concentración de metanol (puro, 75%, 50%, 25% y 0%)
- Concentración de etanol (puro, 75%, 50%, 25% y 0%)
- Temperatura de extracción (30, 40, 50 y 60°C)
- Tiempo de sonicación (5, 10 y 20 minutos)
- Concentración de los extractos (25, 50, 75, 100, 200, 500 y 1000 µg/ml)
- Concentración de las drogas comerciales (100 y 200 µg/ml)

1.4.2. Variables dependientes

- Contenido de polifenoles y flavonoides
- Actividad antiinflamatoria

- Actividad antioxidante

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1.MATERIALES

2.1.1. Materiales

- Balones de aforo (5, 10, 25, 50, 100, 250 y 1000 ml)
- Probetas (10 y 50 ml)
- Vasos de precipitación (100, 250 y 500 ml)
- Embudos de vidrio
- Balones de fondo plano de 500 ml
- Tubos de microcentrífuga de 2 ml
- Micropipeta de 100 a 1000 μ l
- Micropipeta de 20 a 200 μ l
- Pipeta volumétrica de 25 ml
- Frascos de plástico de 100 ml
- Frascos de vidrio de 10 ml
- Frascos de vidrio ámbar de 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Morteros
- Pistilo
- Desecador
- Frascos de plástico estériles de 100 ml
- Tubos de centrífuga de (14 y 50 ml)
- Gradilla para tubos de centrífuga
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Platillos para el determinador de humedad
- Viales de 2 ml HPLC
- Piseta
- Vacutubos de 10 ml sin coagulante
- Filtros de 0,45 μ m de PVDF
- Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18; 4,6x250 mm; 5 μ m
- Placas de sílica gel; 10x10 cm; F₂₅₄

2.1.2. Reactivos

- Ácido acético glacial, FISHER SCIENTIFIC A38C-212
- Ácido gálico, SIGMA G7384-250G
- Reactivo de Folin y Ciocalteu (2N), SIGMA F925-500ML
- Metanol absoluto, PANREAC 131091.1214
- Cloruro de aluminio hexahidrato, LOBACHEMIE 0099800500
- Ácido tiobarbitúrico, PANREAC A4670,0100
- Nitrito de Sodio 98%, LOLBACHEMIE 05954400500

- Etanol absoluto, SCHARLAU UN1230
- Tolueno, EM SCIENCE UN1294
- Acetato de etilo, FISHER SCIENTIFIC E196-4
- Hidróxido de sodio, MERK B1460698 733
- Ácido fórmico 90%, ANALAR
- (+)-Catequina grado HPLC, SIGMA ALDRICH
- Butil hidroxitolueno
- Ácido tiobarbitúrico

2.1.3. Equipos

- Rotavapor ELEYA
- Plancha de calentamiento IKA C-MAG HS7
- Vórtex Mixer Labnet
- Ultrasonido Branson 2800
- Estufa Binder
- Congeladora Binder -80°C
- Balanza analítica Mettler Toledo XSE205
- Balanza analítica Mettler Toledo XPE204
- Balanza de precisión Mettler Toledo X54002S
- Cromatógrafo HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201
- Liofilizador de Laboratorio VIRTIS SERIES – SP Scientific
- Muestreador automático CAMAG
- Visualizador CAMAG de placas para TLC
- Termobloque
- Homogeneizador horizontal
- Espectrofotómetro de absorción atómica, PG INSTRUMENTS, AA550

2.2.MÉTODOS

2.2.1. Obtención de extractos

2.2.1.1.Pre – tratamiento

Hojas frescas de *B. macrantha* fueron colectadas en el Cerro Teligote, localizado en la comunidad del mismo nombre, en el cantón San Pedro de Pelileo, provincia de

Tungurahua. La ubicación exacta del punto de recolección del material vegetal se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Punto de recolección del material vegetal

Nombre	Coordenadas (Geográficas)	Coordenadas (UTM)	Altura (msnm)
<i>B. macrantha</i>	1°22'18.3"S 78°34'24"W	-1.371750, -78.573333	2645

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Las hojas recolectadas fueron depositadas en fundas de papel y transportadas al Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda de la Universidad Técnica de Ambato. Una vez allí se efectuó la respectiva limpieza y se secaron en una estufa por 72 horas, a una temperatura de 40°C. Subsecuentemente, el material seco se molió para obtener un polvo (o producto pulverizado) que fue almacenado herméticamente en fundas de polietileno a temperatura ambiente hasta posteriores análisis.

2.2.1.2. Optimización del proceso de obtención de polifenoles y flavonoides

Para la optimización del proceso de obtención de polifenoles y flavonoides se estudió el efecto de tres factores: solvente, temperatura y tiempo sobre la ruptura de la pared celular, y con las mejores condiciones de extracción se realizó el agotamiento del material vegetal.

a) Solvente

El efecto del solvente fue evaluado mediante el uso de 1) etanol y 2) metanol, a diferentes concentraciones (%v/v): 0, 25, 50, 75 y absoluto, cada uno.

Para lo cual, se pesó 0,1 g del material vegetal pulverizado en tubos de microcentrífuga de 2 ml. A éste se añadió 1 ml del solvente a evaluar (con su respectiva concentración) y se homogeneizó en un vórtex. La mezcla material vegetal pulverizado-solvente (mezcla 1:10) se llevó a un baño de agua con ultrasonido para la ruptura de la pared celular a 50°C por 5 minutos. Una vez finalizado este tiempo se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 14 900 rpm y 4°C.

Posteriormente, el sobrenadante fue separado y colocado en viales de vidrio color ámbar de 10 ml y llevados a la estufa a 40°C por 2 h, para evaporar parte del solvente orgánico. El remanente se llevó a volumen constante (5 ml) con agua MilliQ. Finalmente se cuantificó el contenido de polifenoles y flavonoides totales (*ver sección 2.2.3. y 2.2.4.*).

Una vez realizada la cuantificación, se escogió el tratamiento con mayor concentración de polifenoles y flavonoides. El solvente escogido en este punto fue el que se utilizó en los siguientes pasos de la optimización.

b) Temperatura

Las temperaturas ensayadas fueron: 30, 40, 50 y 60°C y el procedimiento de extracción fue igual al detallado en el anterior apartado. Se escogió la temperatura con la cual se obtuvo mayor concentración del CTP y CTF luego de su cuantificación.

c) Tiempo en ultrasonido para la ruptura de la pared celular

Una vez escogida la mejor temperatura se realizaron ensayos modificando los tiempos a los cuales la muestra fue sometida a ultrasonido para conseguir la ruptura de la pared celular de la matriz vegetal. Los tiempos experimentados fueron de 5, 10 y 20 min.

d) Desgaste del material vegetal

Con las mejores condiciones de: a) solvente, b) temperatura y c) tiempo, del proceso antes descrito se realizaron 5 extracciones sucesivas. En cada extracción se realizó la cuantificación del CTP y CTF, de ésta manera se determinó el número de extracciones necesarias para obtener un rendimiento superior al 95%.

2.2.2. Liofilización

Los extractos obtenidos en el proceso de optimización fueron recolectados y se evaporó el disolvente orgánico. El remanente fue colocado en frascos estériles bien etiquetados y se los congeló a -80°C por 24h. Los extractos acuosos fueron liofilizados a 112 mT y -60°C durante 4 días en un liofilizador VIRTIS SERIES – SP Scientific. Los extractos liofilizados fueron almacenados a -20°C .

2.2.3. Cuantificación de polifenoles totales

Los polifenoles totales presentes en los extractos se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu. Este método se fundamenta en una reacción de óxido – reducción entre el fosfomolibdato y fosfotungstato (sustancias oxidantes) con los compuestos fenólicos (sustancias reductoras) (**Ricco, Agudelo & Wagner, 2015**).

Se utilizó la metodología reportada por **Vasco, Ruales & Kamal, (2008)**; **Vladimir et al., (2011)** con modificaciones, para lo cual, se tomó una alícuota de 50 μl del extracto y

se añadieron 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu, la mezcla se homogeneizó inmediatamente. Se dejó en reposo por 3 minutos exactos y se añadieron 2 ml de carbonato de sodio (75g/l). La mezcla final se llevó a volumen constante (5 ml) y se dejó en reposo a temperatura ambiente y en total oscuridad para el desarrollo de la reacción.

La absorbancia fue medida a 760 nm frente a un blanco que contenía el solvente escogido en el proceso de optimización en lugar del extracto. El resultado se expresó en equivalentes de ácido gálico (EAG).

Las disoluciones patrón de ácido gálico (AG) se prepararon a partir de una solución madre de 4 000 ppm (Stock A) y una solución de concentración intermedia de 200 ppm (Stock B), en un rango de concentraciones de 1 a 6 ppm (Tabla 2), utilizando la ecuación 1.

$$C_{Stock A} \cdot V_{Stock A} = C_{Stock B} \cdot V_{Stock B} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

$C_{Stock A}$: Solución concentrada de AG

$V_{Stock A}$: Volumen a tomar de la solución concentrada de AG

$C_{Stock B}$: Solución diluida de AG

$V_{Stock B}$: Volumen de aforo de la solución diluida de AG

Tabla 2. Preparación de los estándares de AG para la curva de calibración

Estándar	Alícuota Stock B (µl)	Volumen de aforo (ml)	Concentración Std. (ppm)
Std.1.	25	5	1
Std.2.	50	5	2
Std.3.	75	5	3
Std.4.	100	5	4
Std.5.	125	5	5
Std.6.	150	5	6

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

2.2.4. Cuantificación de flavonoides

Se empleó el método del cloruro de aluminio según lo descrito por **Dewanto, Wu, Adom & Liu, (2002)** y **Zhishen, Mengcheng & Jianming, (1999)** con modificaciones. En donde se tomó una alícuota de 250 µl de los extractos y se añadieron 1,25 ml de agua destilada. A continuación, se colocaron 75 µl de nitrito de sodio (5% p/v) y se dejó en reposo por 6 minutos exactos. Posteriormente se añadieron 150 µl de cloruro de aluminio (10% p/v) y se dejó reposar por 5 minutos. Al final se adicionaron 500 µl de hidróxido de sodio (1M) y se aforó a volumen constante de 5ml.

Se midió la absorbancia a 510 nm frente a un blanco preparado de igual manera, pero reemplazando el extracto por el solvente escogido en el proceso de optimización. El resultado fue expresado en equivalentes de (+)-catequina (CQ).

Los patrones de CQ se prepararon a partir de una solución madre de 50 ppm (Stock C). Los estándares tuvieron un rango de 5 a 30 ppm, preparados a partir de la solución Stock C, tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de los estándares de CQ para la curva de calibración

Estándar	Alícuota Stock C (ml)	Volumen de aforo (ml)	Concentración Std. (ppm)
Std.1.	0,5	5	5
Std.2.	1,0	5	10
Std.3.	1,5	5	15
Std.4.	2,0	5	20
Std.5.	2,5	5	25

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

2.2.5. Caracterización de los extractos

Los extractos fueron caracterizados mediante dos técnicas de separación: a) TLC y b) HPLC.

2.2.5.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

El procedimiento de caracterización por TLC se realizó en cuatro partes:

a) Preparación inicial de la fase estacionaria

Se utilizaron placas de vidrio de HPTLC (10x10cm) pre-recubiertas de gel de sílice 60 con indicador de fluorescencia F₂₅₄. Éstas fueron activadas en una estufa a 105°C por 2 h antes de la aplicación de la muestra y enfriadas dentro de un desecador, hasta su uso.

b) Preparación de la fase móvil

La fase móvil se la realizó mediante la mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico, en proporciones 40:36:4, para obtener un volumen final de 8 ml. La mezcla anterior se colocó en la cámara de corrida, la cual se cubrió hasta su saturación.

c) Inyección automática

Para la inyección de los estándares y los extractos se utilizó el muestreador automático CAMAG TLC 4. Los estándares AG y CQ tuvieron una concentración de 5 mg/ml, al

igual que los extractos liofilizados. Se inyectaron 8 µl de los estándares (1 y 2) y 6 µl de las muestras (3 y 4), de izquierda a derecha en la Figura 6: 1) AG, 2) CQ, 3) EtOH50% y 4) EtOH25%. El equipo fue programado con la ayuda del Software WinCATS, de la siguiente manera:

- **Número de bandas:** 4
- **Longitud de la banda:** 0,8 mm
- **Distancia entre bandas:** 1,36 cm
- **Distancia de inyección desde el borde inferior:** 0,7 mm (Ver Figura 6)

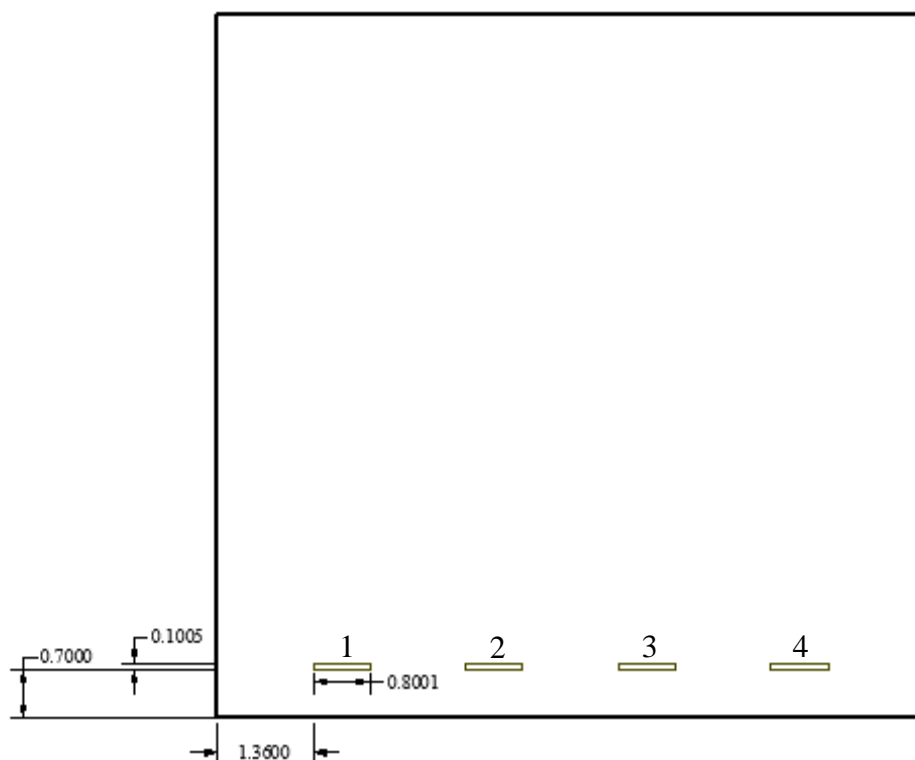


Figura 6. Inyección de muestras mediante el muestreador automático CAMAG TLC 4 con longitudes programadas.

d) Corrida cromatográfica y revelado de la placa

La corrida se llevó a cabo de forma manual en una cámara de vidrio y, una vez finalizada se reveló en el Visualizador CAMAG a 254 y 366 nm. Finalmente, se calculó el valor R_f de los compuestos separados en la placa cromatográfica, a través de la Ecuación 2.

$$R_f = \frac{x_m}{x_s} \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde:

x_m : Distancia recorrida por la muestra

x_s : Distancia recorrida por la fase móvil

2.2.5.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

El perfil de polifenoles fue analizado usando el equipo HPLC, Agilent Technologies 1260 Infinity, que consiste en un inyector automático, un sistema de bombeo, un horno de columna y el detector de diodos (DAD, por sus siglas en inglés). Mientras que, los datos fueron adquiridos a través del software Open LAB Chromatography Data System de Agilent.

En la separación cromatográfica se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6x250 mm, con tamaño de poro de 5 μm (fase reversa).

a) Condiciones de trabajo

a. Fase móvil

Como fase móvil se utilizó una mezcla de agua (A) y metanol absoluto grado HPLC (B). Las condiciones de alimentación de la fase móvil para la separación fueron trabajadas de la siguiente manera: (a) 0 a 30 min, modo gradiente de 5% de B a 80% de B, (b) 30 a 40 min, modo isocrático con 80% de B, (c) 40 a 45 min, modo gradiente de 80% de B a 5% de B.

b. Señales

Los cromatogramas se obtuvieron con seis longitudes de onda diferentes: 214, 254, 280, 320, 360 y 366 nm.

c. Curva de calibración

La curva de calibración se trabajó en un rango de 10 – 300 $\mu\text{g/ml}$, para ambos estándares: AG y CQ, con las longitudes de onda reportadas anteriormente.

d. Separación

Para la separación de los compuestos se utilizó un volumen de inyección de 10 μl , tanto de los estándares AG y CQ, como de los extractos (EtOH25% y EtOH50%), con un flujo

de 0,8 ml/min, y un tiempo total de corrida de 45 min. Mientras que, la temperatura de la columna se mantuvo constante a 20°C.

2.2.6. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Para determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos de *B. macrantha* se realizó la comparación de dos métodos *in vitro*: a) estabilización de glóbulos rojos humanos y b) desnaturalización proteica.

a) Estabilización de glóbulos rojos humanos (HRBC)

La muestra de sangre se mezcló con igual volumen del reactivo de Alsever (2% p/v de dextrosa, 0,8% p/v de citrato de sodio, 0,5% p/v ácido cítrico y 0,42% p/v de NaCl) en tubos estériles de 10 ml sin anticoagulante y se centrifugaron a 3 000 rpm. El pellet se lavó con solución isosalina 0,85% p/v de NaCl y pH 7,2, por tres veces para eliminar el plasma sanguíneo. Se prepararon tubos al 10% v/v de glóbulos rojos en solución isosalina, conocido como 'Stock HRBC'.

A continuación, se prepararon concentraciones de 25, 50, 75, 100, 200, 500 y 1000 µg/ml del extracto. De cada una de las concentraciones de extracto se tomó 1 ml y se colocó en un nuevo tubo estéril, al cual se añadió 1 ml de buffer fosfato (0,15 M, pH 7,4), 2 ml de solución hiposalina (0,36% p/v de NaCl) y 0,5 ml del Stock HRBC. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C y se centrifugó por 3 minutos a 1 300 rpm.

El contenido de hemoglobina del sobrenadante fue determinado espectrofotométricamente a 580 nm frente a un blanco que tuvo agua destilada en reemplazo del extracto. El estándar de referencia utilizado fue diclofenaco sódico a 25, 50, 75, 100 y 200 µg/ml (Aleykutty, Bindu, Sangeetha & Jiljit, 2011; Alhakmani, Kumar & Khan, 2013; Nagaharika, Kalyani, Rasheed & Ramadosskarthikeyan, 2013; Vadivu & Lakshmi, 2008). El porcentaje de protección contra la lisis celular fue calculado mediante la ecuación 3.

$$\%Protección\ contra\ la\ lisis\ celular = 100 - \left(\frac{A_1}{A_2} * 100 \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Dónde:

A_1 : Absorbancia del estándar de referencia o extracto

A_2 : Absorbancia del blanco (control)

b) Desnaturalización proteica

Se siguió el método descrito por **Padmanabhan & Jangle, (2012)**, con modificaciones. Para lo cual, se tomaron 3 ml de una solución de albúmina de huevo (1mM; pH 7,4) preparada con anterioridad en tubos estériles de 10 ml y a cada uno se añadieron 3 ml de las concentraciones de los diferentes extractos: 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. La mezcla se homogeneizó por inversión y los tubos se incubaron a 37°C por 15 minutos. Los tubos se mezclaron nuevamente y se llevaron a un nuevo baño de agua a 70°C por 10 min.

Se midió la densidad óptica a 660 nm frente a un blanco que contenía únicamente agua en lugar de los extractos. El estándar de referencia utilizado fue diclofenaco a 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. El porcentaje de protección contra la desnaturalización proteica fue calculado mediante la ecuación 4.

$$\%Protección\ contra\ la\ desnaturalización\ proteica = 100 - \left(\frac{B_1}{B_2} * 100 \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Dónde:

B_1 : Absorbancia del estándar de referencia o extracto

B_2 : Absorbancia del blanco (control)

2.2.7. Actividad antioxidante *in vitro*

La determinación de la capacidad antioxidante se llevó a cabo por el método conocido como sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARs, por sus siglas en inglés), descrito por **Rojano, Gaviria & Sáez, (2008)** con modificaciones.

El estudio se lo realizó sobre aceite de oliva “El Arbolito” con diferentes concentraciones de extracto. Para lo cual se pesó el extracto hasta obtener el equivalente a 100, 200, 500 y 1000 µg/ml en 10 ml de aceite de oliva, en tubos de vidrio resistentes al calor. En este caso, el aceite de oliva también se pesó para minimizar los errores de pipeteo. En la Tabla 4, se muestra la forma de preparación de los estándares de referencia y las muestras a las diferentes concentraciones.

Tabla 4. Preparación de las diluciones de los extractos en aceite de oliva

Peso del extracto (mg)	Volumen de aforo (ml)	Peso del aceite (g)	Concentración evaluada (µg/ml)
1	10	9,16	100
2	10	9,16	200
5	10	9,16	500
10	10	9,16	1000

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Los tubos fueron llevados a un agitador orbital a 100°C y 225 rpm por 7 días para la oxidación del aceite. Una vez finalizado dicho tiempo, se trasvasó el equivalente en peso a 1 ml de aceite oxidado a un tubo de microcentrífuga de 2ml y se añadió 1 ml de TBA (1mM en ácido acético al 50% v/v). La mezcla fue llevada al termociclador a 100°C por 1 h para el desarrollo de la reacción. A continuación, los tubos se centrifugaron a 14 900 rpm y 4°C por 10 minutos, con el fin de mantener el movimiento de la mezcla y enfriarla. Finalmente, el aceite se eliminó y se leyó la absorbancia de la fracción acuosa a 532 nm frente a un blanco preparado de la misma manera, pero sin la adición de los extractos, únicamente con el aceite oxidado. El estándar de referencia utilizado fue BHT a 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. El porcentaje de protección contra la peroxidación lipídica fue calculado mediante la ecuación 5.

$$\%Protección\ antioxidante = \frac{C_1 - C_2}{C_3 - C_2} * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Dónde:

C_1 : Absorbancia del estándar de referencia o extracto

C_2 : Absorbancia del blanco (control)

C_3 : Absorbancia del aceite sin oxidar

2.2.8. Metales

Adicionalmente, se midió la concentración en la que ciertos metales se encontraban en la matriz vegetal. El procedimiento llevado a cabo se resume en las siguientes etapas:

a) Cenizas

Se etiquetaron 5 crisoles vacíos con lápiz de grafito, los cuales fueron llevados a una mufla a 550°C por 4 h, hasta peso constante. A continuación, se los dejó enfriar en un desecador por 30 min y se registró su peso. Se añadió a cada uno entre 0,6 – 0,7 g del

material vegetal pulverizado de *B. macrantha* (ver sección [2.2.1.1.](#)). Los crisoles con la muestra fueron llevados nuevamente a la mufla a 550°C por 24 h.

b) Digestión ácida

A las cenizas contenidas en los crisoles se añadió 1 ml de HNO₃ concentrado, libre de trazas de metales, y 2 ml de HCl fumante, libre de trazas de metales. Los crisoles con los ácidos fueron llevados a calentamiento a 75°C por 2 h, para digerir la materia orgánica remanente. Una vez finalizada la digestión, el residuo de cada crisol fue filtrado con filtro de tamaño de poro de 0,45 µm y aforado a 25 ml con HNO₃ al 1% v/v. Este contenido fue trasvasado a frascos plásticos de 150 ml hasta su uso.

c) Medición de la concentración de los metales

Los metales fueron medidos con la ayuda del espectrofotómetro de absorción atómica (PG INSTRUMENTS, AA550) y los datos fueron recopilados a través del software AAWin Pro, del mismo fabricante. Los metales que fueron medidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Metales medidos en hojas secas de *B. macrantha*

Metal	Método	Longitud de onda (nm)	Rango de la curva de calibración (ppm)
Cadmio	Horno de grafito	228,80	0,002 – 0,06
Calcio	Llama	422,70	0,5 – 3,5
Cobalto	Horno de grafito	240,70	0,015 – 0,1
Cobre	Llama	324,79	0,1 – 1,75
Hierro	Llama	248,30	0,3 – 3
Magnesio	Llama	285,20	0,04 – 0,4
Manganeso	Llama	279,50	0,2 – 1,4
Níquel	Horno de grafito	232,0	0,0375 – 0,3
Plomo	Horno de grafito	283,30	0,05 – 0,6
Zinc	Llama	213,90	0,1 – 2

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

En las Tablas 6 y 7, se muestran las condiciones óptimas de trabajo en el equipo de absorción atómica, para el método de llama y horno de grafito, respectivamente.

Tabla 6. Condiciones de trabajo para el método de llama

METAL	Corriente de lámpara (mA)	Tipo de llama	Condiciones de la llama
Calcio	5,0	N ₂ O/Acetileno	Zona roja reductora
Cobre	5,0	Aire/Acetileno	Azul oxidante
Hierro	5,0	Aire/Acetileno	Azul oxidante
Magnesio	5,0	Aire/Acetileno	Azul oxidante
Manganeso	5,0	Aire/Acetileno	Azul oxidante
Zinc	5,0	Aire/Acetileno	Azul oxidante

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Tabla 7. Condiciones de trabajo para el método de horno de grafito

METAL	Corriente de la lámpara (mA)	Volumen de inyección (µl)
Cadmio	5,0	10
Cobalto	7,0	10
Níquel	4,0	10
Plomo	3,0	10

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1.1. Optimización del solvente de extracción

El proceso de extracción es una etapa importante en la obtención de compuestos bioactivos, y de éste dependen sus características físicas y químicas (**Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Latha, 2011**). Entre las técnicas de extracción más usadas se encuentran la extracción sólido-líquido, debido a su sencilla aplicabilidad a matrices vegetales. Comúnmente los solventes usados son alcoholes, como metanol y etanol, para una extracción de compuestos hidrofílicos. Sin embargo, el uso de solventes orgánicos puros no garantiza una extracción completa y eficaz de ácidos fenólicos muy polares, por lo que resulta necesario utilizar mezclas de estos solventes con agua, tales como metanol-agua o etanol-agua (**Stalikas, 2007**).

Los tres solventes utilizados, en orden creciente de polaridad, fueron: etanol, metanol y agua (**Universidad Nacional Autónoma de México, 2019**) y los resultados obtenidos para la extracción y cuantificación del CTF y CTP se muestran en la Tabla 8. El rendimiento de extracción del CTF se maximizó con EtOH25% ($7,22 \pm 0,23$ mg CQ \times g⁻¹ de muestra seca), mientras que del CTP fue con EtOH50% ($12,91 \pm 0,77$ mg AG \times g⁻¹ de muestra seca), en ambos casos concentraciones más elevadas de etanol produjeron una disminución en las concentraciones de CTF y CTP. Tal como lo mencionan **Thoo, Ho, Liang, Ho & Tan, (2010)**, el uso de un sistema de solventes binario en la extracción de compuestos fenólicos, en donde también se incluyen a los flavonoides, es superior a un sistema monosolvente, con respecto a su polaridad relativa. Es decir, que las mezclas de etanol-agua y metanol-agua, darán rendimientos más altos que el uso de los solventes en estado puro, debido a la interacción de estos con los diferentes compuestos de la matriz vegetal.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación del CTF y CTP (Tabla 8), se sugiere una distinta interacción entre los solventes y las mezclas probadas con los compuestos hidrofílicos de la matriz vegetal, situación que estaría íntimamente relacionada con la intensidad de las fuerzas intermoleculares. De esta manera, la mezcla etanol-agua, al parecer, tiene menores fuerzas intermoleculares entre sí, que el resto de

solventes y mezclas probadas, lo que contribuiría al arrastre de los compuestos fenólicos al medio de extracción (Chemistry Stack Exchange, 2017).

Tabla 8. CTF y CTP con diferentes solventes de extracción

[Solvente]	Concentración [mg-CQ/gseco]	Concentración [mg-AG/gseco]
Agua	3,02 ± 0,02	6,25 ± 0,44
EtOH-25%	7,22 ± 0,23*	10,54 ± 0,70
EtOH-50%	6,74 ± 0,95	12,91 ± 0,77*
EtOH-75%	6,20 ± 0,21	11,05 ± 0,42
EtOH abs	3,19 ± 0,34	7,90 ± 0,38
MeOH-25%	6,36 ± 0,75	7,45 ± 0,16
MeOH-50%	5,48 ± 0,48	7,05 ± 0,34
MeOH-75%	7,18 ± 0,11	10,82 ± 0,76
MeOH abs	4,21 ± 0,18	3,94 ± 0,14

*Indica los valores más altos obtenidos en la optimización

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

En la Figura 7, se muestra la influencia tanto del etanol como del metanol en el CTF y CTP. En ambos casos las concentraciones más bajas se reportaron al trabajar con los disolventes puros.

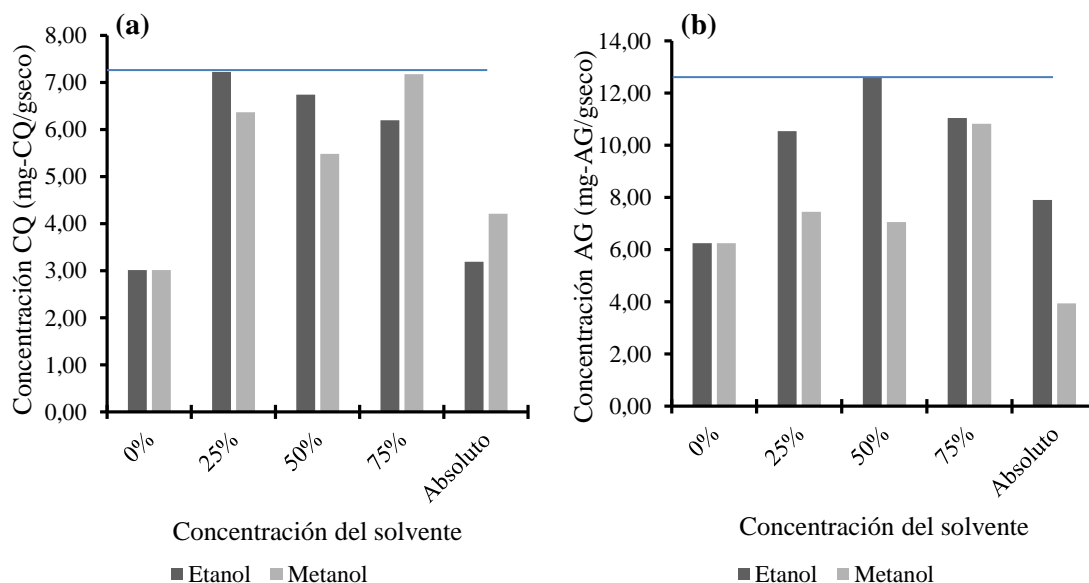


Figura 7. Comparación gráfica de medias en la extracción de: (a) Flavonoides con etanol y metanol; y (b) Polifenoles con etanol y metanol a diferentes concentraciones

Según el análisis estadístico realizado (Tabla 9) se concluye que existen diferencias significativas entre las concentraciones medias del CTF y CTP de los diferentes sistemas polares evaluados, debido a que el valor P de la prueba F es inferior a 0,05, para un 95% de confianza.

Tabla 9. Análisis estadístico de una vía para CTF y CTP en la optimización del solvente

F-Ratio CTF	P-valor CTF	F-Ratio CTP	P-valor CTP
37,54	0,0000	115,38	0,0000

Fuente: StatGraphics Centurion

Adicionalmente se corrieron dos test de rangos múltiples (Tablas 10 y 11) para determinar la significancia del CTF y CTP por efecto de la concentración de los solventes, que los concentra en grupos homogéneos, evalúa las medias obtenidas y verifica qué medias son significativamente diferentes a todas las demás, lo que contribuye a decidir el solvente empleado en las siguientes etapas de optimización del proceso de extracción. En este sentido se identificaron 5 grupos homogéneos para cada conjunto de metabolitos secundarios estudiados y para la elección del mejor disolvente de extracción se tomaron en cuenta tres índices de calidad: rendimiento, inocuidad y costo. Bajo estos parámetros, el solvente escogido para continuar con la optimización de condiciones para la extracción de flavonoides fue EtOH25%, mientras que, para la extracción de polifenoles fue EtOH50%.

Tabla 10. Test de rangos múltiples para determinar la significancia entre el CTF por efecto de la concentración de solventes

[Solvente]	N° de réplicas	Media	Grupos homogéneos
Agua	3	3,01533	X*
EtAbs	3	3,188	X
MeOHAbs	3	4,214	X
MeOH50	3	5,485	X
EtOH75%	3	6,197	XX
MeOH25%	3	6,36467	X
EtOH50%	3	6,73867	XX
MeOH75%	3	7,17933	X
EtOH25%	3	7,22167	X

*Cada columna con una 'X' indica un grupo de medias dentro del cual no hay diferencias significativas entre sí, en donde las medias de las réplicas se colocan en orden ascendente.

Fuente: StatGraphics Centurion

Tabla 11. Test de rangos múltiples para determinar la significancia entre el CTP por efecto de la concentración de solventes

[Solvente]	N° de réplicas	Media	Grupos homogéneos
MeOH abs	3	3,938	X*
Agua	3	6,245	X
MeOH50%	3	7,054	X
MeOH25%	3	7,451	XX
EtOHabs	3	7,905	X
EtOH75%	3	10,539	X
MeOH75%	3	10,821	X
EtOH25%	3	11,045	X
EtOH50%	3	12,906	X

*Cada columna con una 'X' indica un grupo de medias dentro del cual no hay diferencias significativas entre sí, en donde las medias de las réplicas se colocan en orden ascendente.

Fuente: StatGraphics Centurion

3.1.2. Optimización de la temperatura de extracción

Existen varios factores por los cuales es importante evaluar el efecto de la temperatura en el CTF y CTP, entre los más importantes están: el aumento de la solubilidad de los componentes fenólicos, la mejor transferencia de masa y la reducción de la viscosidad del solvente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que un incremento excesivo de la temperatura puede influir negativamente sobre el CTF y CTP, puesto que se pueden degradar los compuestos extraídos y perderse actividades biológicas (**Mokrani & Madani, 2016**).

Según los datos reportados en la Tabla 12 se observa una relación directa entre la temperatura y la concentración de polifenoles y flavonoides, evidenciándose el mayor rendimiento a 60°C. A esta temperatura las concentraciones de CTF y CTP aumentan un 27,97% y 17,97%, respectivamente, en relación a las condiciones iniciales de extracción.

Tabla 12. Efecto de la temperatura en el CTF y CTP

Temperatura (°C)	Concentración [mg-CQ/g _{seco}]	Concentración [mg-AG/g _{seco}]
30	5,01 ± 0,38	10,83 ± 0,16
40	7,18 ± 0,19	10,82 ± 0,31
50	7,22 ± 0,23	12,91 ± 0,77
60	9,24 ± 0,24	15,23 ± 0,49

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Se decide continuar el proceso de optimización trabajando a 50 y 60°C, temperaturas a las cuales se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la concentración de los metabolitos secundarios evaluados.

En estudios realizados por **Mokrani & Madani (2016)**, temperaturas mayores a 60°C producen una reducción en la recuperación del CTF y CTP. Además, cuando la temperatura es igual a 60°C o superior, no solo afecta a la concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos, sino también a sus capacidades biológicas, en especial a su capacidad antioxidante, debido a que dichas temperaturas causan una reducción o descomposición de los antioxidantes naturales y de los ingredientes activos contenidos en el extracto (**Hossain, Hamood AL-Mijizy, Khalifa Al-Rashdi, Weli & Al-Riyami, 2013**). Otro de los problemas causado por el incremento de la temperatura, descrito por **Mokrani & Madani (2016)**, es que se da una pérdida del solvente por vaporización, por lo que el rendimiento de extracción disminuye. Sin embargo, el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de compuestos fenólicos no puede ser generalizada, ya que depende en gran parte del tipo de compuestos extraídos (**Spigno, Tramelli & De Faveri, 2007**). Así lo demuestran estudios sobre extracción de polifenoles totales, por ejemplo **Herodež, Hadolin, Škerget & Knez (2003)** aseguran que el rendimiento más alto en polifenoles extraídos en hojas de bálsamo (*Melissa officinalis* L.) se obtuvo a 0°C y a medida que la temperatura se acerca a 20°C, el CTP disminuye significativamente.

El análisis de varianza de una vía mostró que las temperaturas presentaron diferencias estadísticamente significativas tanto para el CTF como para el CTP, evaluadas al 95% de confianza (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de varianza de una vía para las medias del CTF y CTP en la optimización de la temperatura

F-Ratio CTF	P-Valor CTF	F-Ratio CTP	P-Valor CTP
124,01	0,0000	55,42	0,0000

Fuente: StatGraphics Centurion

También se identificaron tres grupos homogéneos tanto para polifenoles como para flavonoides (Tabla 14), destacándose el hecho de registrar dos temperaturas en cada caso que no muestran diferencias significativas (40 y 50°C para CTF y 30 y 40°C para CTP).

Tabla 14. Contraste de temperaturas a través del test de rangos múltiples para determinar diferencias en el CTF y CTP

Temperatura	N° de réplicas	Media	Grupos	Media	Grupos
		CTF	homogéneos	CTP	homogéneos
30	3	5,014	X	10,821	X
40	3	7,179	X	10,828	X
50	3	7,222	X	12,906	X
60	3	9,244	X	15,227	X

Fuente: StatGraphics Centurion

3.1.3. Optimización del tiempo de extracción

La optimización del tiempo de extracción se realizó en un baño de agua sonicado. Un mayor tiempo de extracción puede conducir a la polimerización fenólica y afectar su solubilidad en el medio por la interacción entre compuestos fenólicos (Thoo et al., 2010). Mientras que, el proceso de sonicación de la matriz vegetal provoca un fenómeno conocido como cavitación (Pradal, Vauchel, Decossin, Dhulster, & Dimitrov, 2016), que es la formación, crecimiento y colapso de burbujas microscópicas en una solución acuosa cuando actúa un campo de alta intensidad acústico. En teoría el colapso de dichas burbujas produce la liberación de energía térmica y liberación de presión al mismo tiempo, y es el colapso de la burbuja en la proximidad de los puntos calientes lo que destruye capas superficiales de material (Salinas, 2014). Este fenómeno ha sido aprovechado en los procesos de extracción de compuestos para romper la pared celular de matrices vegetales y así acelerar la transferencia de masa, lo que al final facilita la liberación de compuestos extraíbles (Pradal et al., 2016).

Muchos de los compuestos fenólicos se encuentran también solubles en la vacuola o unidos a celulosa, hemicelulosa y lignina en forma de glucósidos en la pared celular (Tomadoni, Cassani, Viacava, Moreira, & Ponce, 2017), por lo que la lisis de esta aumentaría el CTF y CTP durante la cuantificación. En la Tabla 15 se muestra el CTF y CTP a 50 y 60°C.

Tabla 15. Efecto del tiempo de extracción en el CTF

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración [mg-CQ/g _{seco}]	Concentración [mg-AG/g _{seco}]
50	5	7,22 ± 0,23	12,91 ± 0,77
	10	8,50 ± 0,49	14,91 ± 0,30
	20	8,75 ± 0,25	14,68 ± 0,63
60	5	9,24 ± 0,24	15,23 ± 0,49
	10	9,11 ± 0,13	15,41 ± 0,36
	20	9,84 ± 0,23	17,33 ± 0,40

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Para determinar el efecto que tienen los dos factores de estudio: temperatura y tiempo, sobre la variable de respuesta (concentración), se aplicó un diseño factorial $A * B$ en donde el factor A con dos niveles (50 y 60°C) corresponde a la temperatura y el factor B con tres niveles (5, 10 y 20 min) al tiempo.

Se realizó un análisis de varianza multifactorial (*Anexo F.3.*), en donde se observó la diferencia de las medias para cada factor y para la interacción entre ellos a un nivel de confianza del 95%. La correlación entre los factores para cada uno de los niveles se muestra en el gráfico de interacciones (Figura 8).

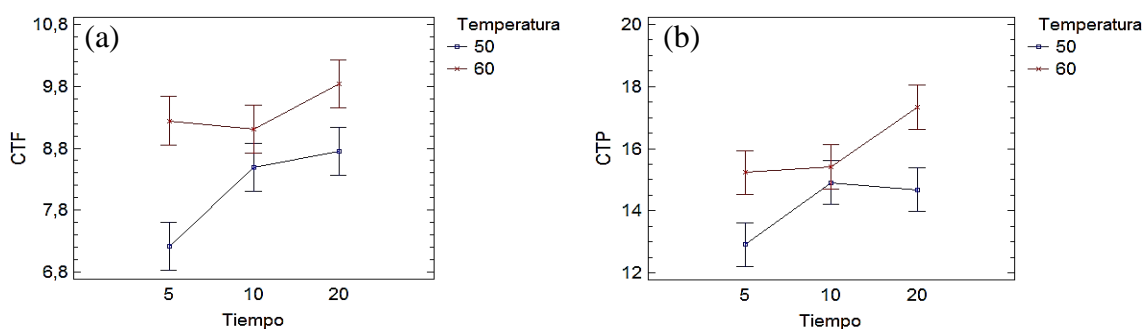


Figura 8. Interacción de los factores temperatura y tiempo a distintos niveles sobre (a) CTF y (b) CTP

Cuando los intervalos para cada celda se solapan, el efecto de los factores es igual en esa celda, efecto que se observa en la Figura 8-(a) y 8-(b) para el CTF y CTP (50 y 60°C por 10 min), se dice entonces que ambas temperaturas a dicho tiempo producen el mismo efecto en la extracción de polifenoles, por lo tanto, se puede escoger a cualquiera de las dos temperaturas como mejor tratamiento. En ambos casos se decidió trabajar con la menor temperatura, es decir, a 50°C por un tiempo de extracción de 10 min, con la finalidad de preservar la calidad de los metabolitos extraídos.

3.1.4. Desgaste del material vegetal

Una vez optimizados todos los parámetros a) solvente, b) temperatura y c) tiempo, se busca a través de ellos, recuperar la mayor cantidad de flavonoides y polifenoles de una misma muestra vegetal, hasta obtener un porcentaje de recuperación superior al 95%, es decir, que se haya extraído casi en su totalidad el CTF y CTP.

En las Tablas 16 y 17, se muestran las concentraciones obtenidas tras cada proceso de extracción. En el caso del CTF, con cinco extracciones se obtuvo un valor total de 19,607 mg CQ \times g⁻¹ de muestra seca que equivale al 100% de recuperación. Mientras que, en el caso del CTP, en la quinta extracción ya no se logró cuantificar polifenoles, infiriéndose el total agotamiento del material vegetal.

Tabla 16. Porcentaje de recuperación del CTF por número de extracción

N° de extracción	Concentración [mg-CQ/g _{seco}]	Σ Concentración [mg-CQ/g _{seco}]	Recuperación (%)
E1	10,135	10,135	51,69
E2	6,103	16,238	82,82
E3	2,299	18,537	94,54
E4	0,787	19,324	98,56
E5	0,283	19,607	100,00

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Tabla 17. Porcentaje de recuperación del CTP por número de extracción

N° de extracción	Concentración [mg-AG/g _{seco}]	Σ Concentración [mg-AG/g _{seco}]	Recuperación (%)
E1	12,683	12,683	53,87
E2	8,319	21,002	89,21
E3	1,941	22,942	97,45
E4	0,599	23,542	100,00
E5	-0,608	23,542	100,00

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Tanto en la extracción de flavonoides como en la de polifenoles, se prefiere trabajar con cuatro extracciones, ya que en dicho punto se ha logrado extraer más del 95% de su contenido total. Esto se observa gráficamente en la Figura 9.

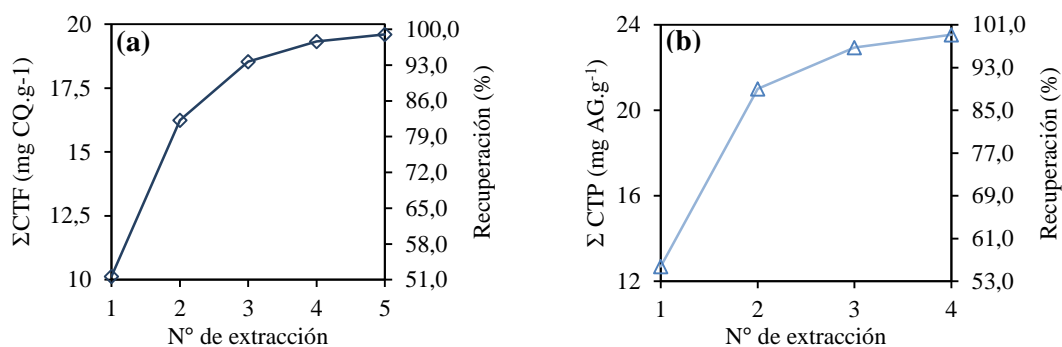


Figura 9. Recuperación de (a) CTF y (b) CTP con extracciones sucesivas

3.1.5. Caracterización cualitativa por TLC

La cromatografía de capa fina permitió la separación de los componentes de los extractos hidroetanólicos de *B. macrantha*, y se llevó a cabo con una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en proporciones 40:36:4, como fase móvil. En la Figura 10 se observa el perfil de polifenoles para las extracciones con etanol al 25 y 50% v/v.

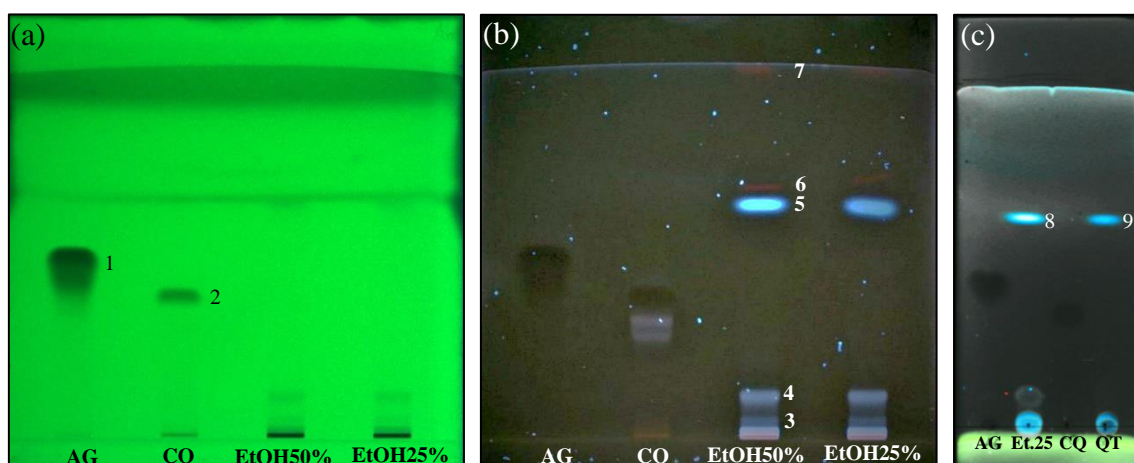


Figura 10. Imágenes reveladas a diferentes longitudes de onda después de la separación de los compuestos: (a) 254 nm, con patrones AG y CQ en las dos primeras columnas, (b) 366 nm, con AG y CQ en las dos primeras columnas, y (c) 366 nm, con AG en la primera columna, CQ en la tercera y QT en la última columna.

La capacidad de absorber la luz UV, es dada por los grupos hidroxil-fenólicos pertenecientes a sistemas conjugados π (Alexandre & du Toit, 2018), es decir, compuestos que tienen simples y dobles enlaces alternos entre moléculas de carbono, de tal manera que los electrones se deslocalizan y se sitúan uniformemente alrededor del compuesto (González, 2010), y son las transiciones orbitales electrónicas de los sistemas conjugados, los responsables de proveer el espectro UV-Vis a este grupo de compuestos (Alexandre & du Toit, 2018). De tal manera, que a diferentes longitudes de onda se identifican diferentes subgrupos de la familia de los polifenoles.

En estudios realizados por **Anouar, Gierschner, Duroux & Trouillas (2012)**, se señala que los compuestos fenólicos absorben luz UV en al menos dos bandas, la primera corresponde al rango de 240 a 280 nm y la segunda entre 300 y 400 nm. La capacidad de absorber la luz UV en cualquiera de las dos bandas se ve afectada por la cantidad de sustituyentes OH u OCH₃, es así que un aumento de cualquiera de los dos radicales, producirá un cambio visible al rojo, mientras que la metilación y glucosilación producen un cambio visible al azul.

En los extractos hidroetanólicos de *B. macrantha* se observaron 5 bandas, identificadas con los números: 3, 4, 5, 6 y 7, de las cuales las bandas 3, 4 y 5, son de color azul intenso, mientras que las bandas 6 y 7 son de color rojo, casi imperceptible. La intensidad de los colores también es indicador de la concentración de dichos compuestos en el extracto, es así que los compuestos de color azul existen en mayor proporción que los de color rojo. Debido a lo que ya se mencionó con anterioridad, las bandas 3 y 4 posiblemente estarían asociadas a compuestos fenólicos metilados o glucosilados, mientras que las bandas 6 y 7, corresponderían a compuestos con sustituyentes hidroxilo o metoxilo.

En la Tabla 18 se muestra el factor de retención (R_f) de cada banda, cuyo valor es igual a la distancia recorrida por la muestra sobre la distancia total recorrida por la fase móvil, lo que permite comparar diferentes muestras. Es así que, dos compuestos son iguales si tienen el mismo valor R_f . Sin embargo, este valor no da información únicamente acerca del tipo de compuesto, sino también de su polaridad. Con la fase móvil utilizada bandas con R_f bajos corresponden a compuestos muy polares, mientras que, bandas con R_f altos se relacionan con compuestos poco polares que no han interactuado fuertemente con la fase estacionaria (**Chemistry Libre Texts, 2019**). En términos de polaridad, la QT es el estándar menos polar, mientras que, la CQ es el patrón más polar, con valores de R_f de 0,69 y 0,38, respectivamente. El AG presenta una polaridad intermedia, con respecto a los otros dos patrones, y su R_f fue de 0,42. Los valores de R_f de las bandas 5 (EtOH50%), 8 (EtOH25%) y 9 (QT), iguales a 0,62; 0,61 y 0,61, respectivamente, son prácticamente iguales, por lo que se puede afirmar, con base en el color de las bandas y del valor R_f tanto del patrón como de las muestras, que el compuesto presente en ambos extractos hidroetanólicos fue QT. La QT es una pentahidroxi flavona (**National Center for Biotechnology Information, 2019**), que consiste en 3 anillos fenólicos y 5 grupos hidroxilo. La QT en las plantas se encuentra como conjugados de glicona (**Lakhanpal &**

Kumar, 2007), debido a esto, y como ya se mencionó anteriormente, en la TLC las bandas 5, 8 y 9 se observan de color azul (Figura 10-(b) y 10-(c)).

Tabla 18. Factor de retención para las bandas identificadas en TLC

N° de banda	Identificación	x_s (cm)	x_m (cm)	R_f
1	AG	8,3	4,04	0,49
2	CQ	8,3	3,17	0,38
3	-	8,3	0,42	0,05
4	-	8,3	0,94	0,11
5	QT	8,3	5,17	0,62
6	-	8,3	5,77	0,69
7	-	8,3	8,29	0,99
8	QT	7,74	4,69	0,61
9	QT	7,74	4,69	0,61

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Los compuestos (3, 4, 6 y 7) separados a través de TLC, arrojan únicamente información cualitativa sobre la huella o perfil de polifenoles y flavonoides, y se puede inferir que los compuestos extraídos con ambos solventes son los mismos, por sus valores de R_f .

3.1.6. Caracterización del perfil de polifenoles por HPLC

Se realizó una separación más exhaustiva de los compuestos contenidos en los extractos de *B. macrantha* por HPLC, para obtener un perfil de polifenoles. Se obtuvieron 6 cromatogramas con la finalidad de visualizar la separación de todos los compuestos, que pueden absorber la luz a diferentes longitudes de onda, los mismos que se muestran en la Figura 11.

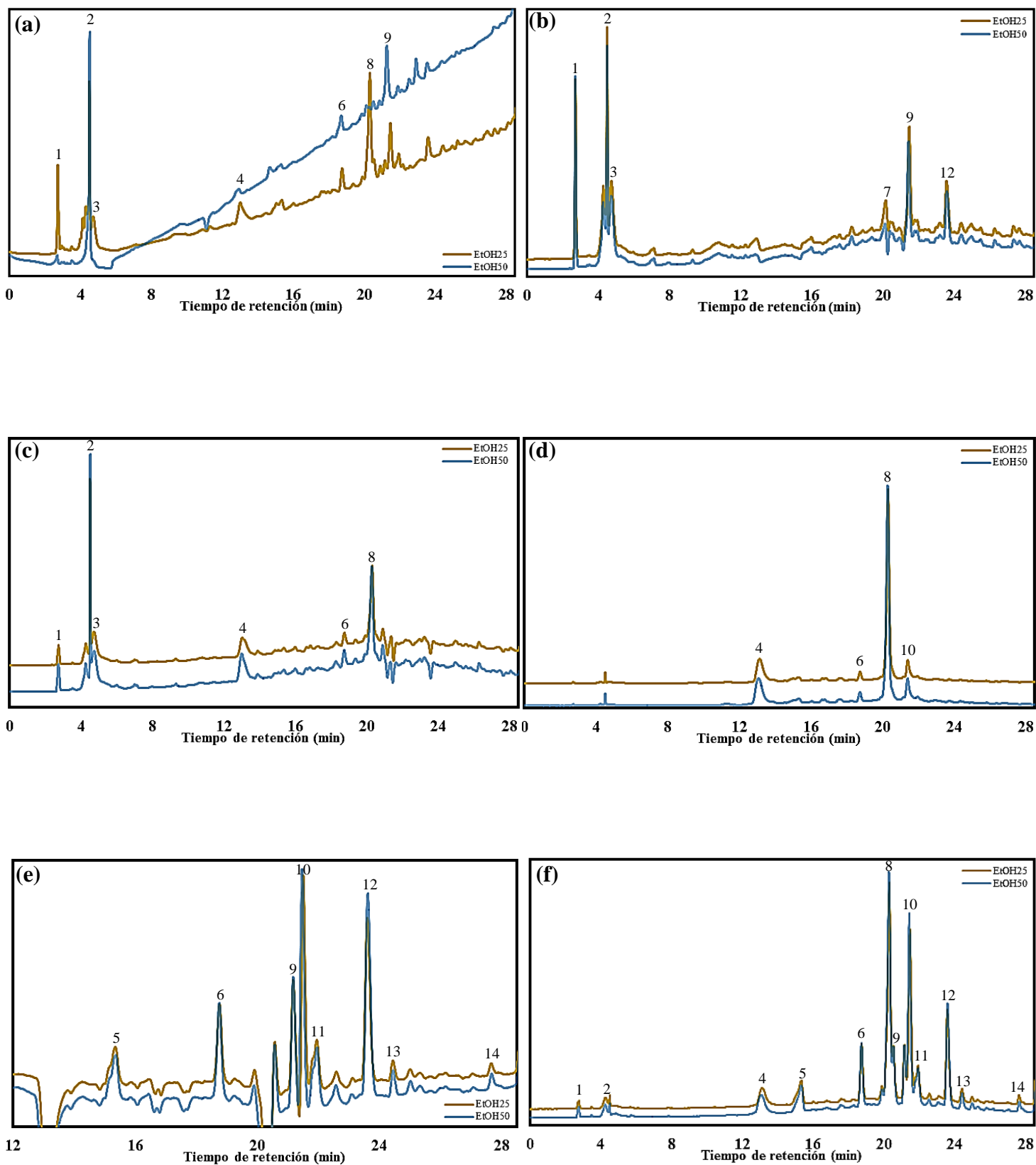


Figura 11. Cromatogramas del perfil de polifenoles y flavonoides a diferentes longitudes de onda: (a) SigB – 214 nm, (b) SigA – 254 nm, (c) SigG – 280 nm, (d) SigE – 320 nm, (e) SigH – 360 nm y (f) SigC – 366 nm.

En la Tabla 19 se observan los tiempos de retención de los picos más representativos de la separación por HPLC con sus respectivas áreas, en donde se distinguen 14 compuestos principales.

Tabla 19. Tiempos de retención para cada pico representativo en la separación por HPLC

N° de pico	t _R (min)	Área (mAU*s)	Altura (mAU)
1	2,73	9,84458	1,37200
2	4,51	49,6878	12,5907
3	4,74	60,4316	3,84608
4	13,01	112,9557	5,12669
5	15,30	27,5347	1,37511
6	18,74	19,2658	1,94355
7	20,16	22,9766	1,66489
8	20,30	62,9793	5,13560
9	21,19	28,6415	3,3916
10	21,45	45,4286	4,1164
11	21,95	30,9720	1,9793
12	23,61	93,3857	5,8944
13	24,43	19,4797	1,8433
14	27,68	13,7431	1,4612

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

Los estándares que se corrieron fueron AG, CQ y QT cuyos tiempos de retención fueron 9.01, 14.99 y 27.5, respectivamente (*Ver Anexo E.3.*). Basándose en los tiempos de retención, aparentemente se identificaría QT en ambos extractos (Figura 11-(f)), cuyo pico eluyó en un tiempo de 27,68 min (Tabla 19).

Al realizar un análisis más detallado de los cromatogramas a las diferentes longitudes de onda, en la Figura 11-(a), se observa que en el extracto EtOH25% existen dos compuestos, que no se identificaron para el extracto EtOH50%, a los tiempos de retención 2.73 y 20.32 minutos, infiriéndose que en la extracción de flavonoides se lograron obtener dos compuestos adicionales que no se extrajeron con el tratamiento optimizado para polifenoles. En todos los demás cromatogramas (Figura 11, b-f), aparentemente, tanto la intensidad de los picos, como el tiempo de retención de cada uno son los mismos para ambos extractos.

A pesar de no poder identificar los demás picos representativos de los cromatogramas, se puede inferir que los compuestos que eluyen primero son más hidrofílicos, mientras que los que eluyen en mayores tiempos de retención son más apolares, lo que se debe a que

se utilizó una separación en fase reversa, en donde la fase estacionaria tiene naturaleza apolar con cadenas hidrocarbonadas (**Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2019**). La polaridad de los estándares en orden creciente es $QT > CQ > AG$, lo que se comprueba al comparar los resultados con TLC (*Ver sección [3.1.5](#)*).

3.1.7. Actividad antiinflamatoria por HRBC

A pesar de que los glóbulos rojos (RBCs, red blood cells, por sus siglas en inglés) no son catalogados como células fagocíticas, y por lo tanto carecen de núcleo y de organelos que permitan la degradación de compuestos exógenos que producen inflamación, se los utiliza como un modelo de estudio *in vitro* de la respuesta antiinflamatoria a través de la estabilización de la membrana (**Nagaharika et al., 2013**). Esto se fundamenta en que la membrana de los RBCs es análoga a la membrana de los lisosomas (**Kumar et al., 2011**) y es el contenido lisosomal, presente en los neutrófilos activados, el responsable de liberar respuestas pro-inflamatorias. Esta analogía entre ambas membranas permite asumir que la estabilización de la membrana de los eritrocitos causa el mismo efecto de estabilización en la membrana lisosomal de los neutrófilos activados, lo cual evita una respuesta inflamatoria (**Srinivasa, Poojary, Brahmavara, Das & Middha, 2018**).

El método de estabilización HRBC, consiste básicamente en inducir la lisis celular de los eritrocitos colocándolos en una solución hipotónica, lo que genera la liberación de hemoglobina al medio. El contenido de hemoglobina en el medio se mide espectrofotométricamente y da una idea de la protección que confiere el fármaco o el extracto evaluado (**Moualek et al., 2016**). En la Figura 12 se muestra la comparación del porcentaje de protección para el fármaco de referencia (diclofenaco) y los extractos hidroetanólicos (EtOH25% y EtOH50%). El diclofenaco confiere protección superior al 91,42% para todas las concentraciones evaluadas, sin embargo, se observa que a concentraciones más bajas del fármaco, logra estabilizar de mejor manera la membrana de los RBCs, es decir, hay menos lisis celular. En estudios realizados por **Parameswari, Devika & Vijayaraghavan, (2019)** con el extracto de hojas secas de ajeno indio (*Artemisia nilagirica*) se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el mismo método y se obtuvo una protección superior al 91,18% con el diclofenaco, cuyo valor es similar al obtenido en este estudio.

Los resultados obtenidos en los extractos hidroetanólicos de *B. macrantha* difieren en cuanto a la dependencia de la dosis del extracto con relación a la estabilización de la

membrana de los RBCs, ya que, a menores concentraciones de los extractos se obtuvieron porcentajes de protección superiores al 90% (Figura 12). Para el extracto obtenido con EtOH25% se obtuvo una protección de $97,23 \pm 0,42\%$ a $25 \mu\text{g/ml}$, mientras que, a $100 \mu\text{g/ml}$ del extracto de EtOH50% se logró proteger la membrana de los RBCs en un $93,70 \pm 0,30\%$.

Estudios realizados por **Bouden, Aimene, Elder & Arrar, (2017)** en *Matricaria pubescens*, una asterácea, indican que la estabilización de la membrana es dependiente de la dosis del fármaco y del extracto evaluado, es así que, a $1500 \mu\text{g/ml}$ se consiguió la máxima estabilización de RBCs, obteniéndose un porcentaje de protección del $72,74 \pm 1,24\%$ para el extracto, y $90,07 \pm 0,98\%$ para el diclofenaco. De igual manera, un estudio de actividad antiinflamatoria en *Vernonia anthelmintica*, muestra que a mayores concentraciones del extracto evaluado se obtuvieron los porcentajes de protección más altos, exhibiendo una protección del $89,92 \pm 0,07\%$ a $1000 \mu\text{g/ml}$ (**Desai & Manvar, 2014**).

Los porcentajes de hemólisis más altos se obtuvieron a $500 \mu\text{g/ml}$ de los extractos, con valores de 39,44 y 51,83 %, para el extracto con EtOH50% y EtOH25%, respectivamente.

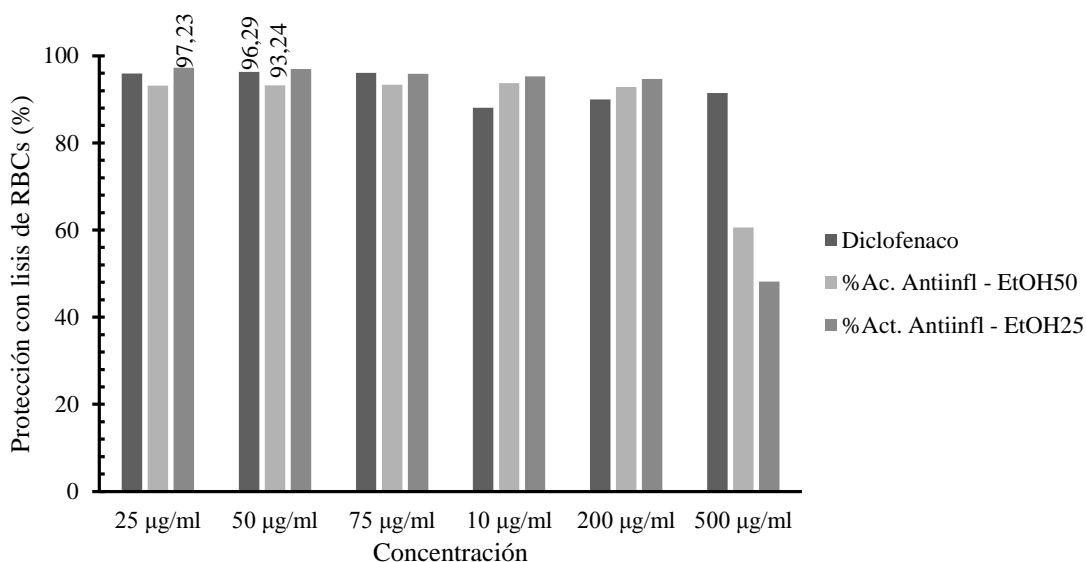


Figura 12. Variación de la protección contra la lisis de los RBCs a diferentes concentraciones de extracto, comparados con el diclofenaco como estándar de referencia.

El análisis estadístico, revela que existen diferencias significativas a un 95% de nivel de confianza, en las medias del porcentaje de protección para los extractos obtenidos con

EtOH25% y EtOH50% (Anexo [G.I.](#)). La prueba de rangos múltiples, muestra que existen dos grupos homogéneos (Tabla 20), y que el tratamiento a 500 $\mu\text{g/ml}$ del extracto presenta diferencias estadísticamente significativas con todas las demás concentraciones evaluadas, tanto para polifenoles como flavonoides.

Tabla 20. Test de rangos múltiples para determinar la significancia de las medias del porcentaje de protección con EtOH25% y EtOH50% por el método de estabilización de RBCs

Concentración EtOH50% ($\mu\text{g/ml}$)	Media	Grupos homogéneos	Concentración EtOH25% ($\mu\text{g/ml}$)	Media	Grupos homogéneos
500	60,56	X	500	48,17	X
200	92,82	X	200	94,66	X
25	93,14	X	100	95,26	X
50	93,24	X	50	95,89	X
75	93,36	X	75	96,96	X
100	93,70	X	25	97,23	X

Fuente: StatGraphics Centurion

3.1.8. Actividad antiinflamatoria por desnaturalización proteica

El modo de acción de los antiinflamatorios no esteroides (AINES) sobre la interacción con algunas proteínas no está muy claro, sin embargo, se conoce que poseen efectos inhibitorios en la formación de mediadores y factores de la inflamación (**Mizushima & Kobayashi, 1968**). La mayoría de proteínas pierden actividad cuando se desnaturalizan, y se ha documentado que la desnaturalización es una de las causas de la inflamación (**Leelaprakash & Dass, 2011**).

Es posible que los extractos de *B. macrantha* actúen hasta cierto punto de forma similar a como lo hacen los AINES, los cuales podrían estabilizar las proteínas plasmáticas, como por ejemplo la albúmina sérica, contra la coagulación por calor y esta propiedad es la que tiene una conexión con la actividad antiinflamatoria (**Mizushima & Kobayashi, 1968**).

Se han realizado diversos estudios sobre la acción que ejercen ciertos extractos sobre la inhibición de la desnaturalización proteica, entre ellos se encuentran los realizados por **Alhakmani et al., (2013)** en *Moringa oleifera*, **Leelaprakash & Dass, (2011)** en *Enicostemma axillare*, **Desai & Manvar, (2014)** en *Vernonia anthelmintica* y **Bouden et al., (2017)** en *Matricaria pubescens*, cuyos valores de protección fueron $88,10 \pm 1,80\%$ a 200 $\mu\text{g/ml}$; 71% a 500 $\mu\text{g/ml}$; $98,57 \pm 0,35\%$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y $54,23 \pm 2,14\%$ a

1500 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Como se observa, ninguna de las matrices inhibe la desnaturalización proteica con una misma concentración de extracto, lo que da una idea de que cada matriz se comporta de diferente manera diferente, y que existen matrices que son más eficaces en proveer un efecto antiinflamatorio.

En *B. macrantha*, la inhibición de la desnaturalización de proteínas evaluada mediante los dos tratamientos (EtOH25% y EtOH50%) presentaron su mayor actividad antiinflamatoria a 500 $\mu\text{g/ml}$ con valores iguales a $49,72 \pm 0,77\%$ y $50,71 \pm 0,43\%$, respectivamente. Mientras que, el estándar de referencia exhibió el mayor porcentaje de protección a 1000 $\mu\text{g/ml}$ con un valor igual a $61,40 \pm 3,08\%$. La protección que confieren los extractos es comparable con los del diclofenaco a concentraciones inferiores a 500 $\mu\text{g/ml}$, puesto que presentan valores similares (Figura 13). Sin embargo, concentraciones de los extractos superiores a 500 $\mu\text{g/ml}$ muestran una disminución en la estabilización de la albúmina, lo que provoca su desnaturalización.

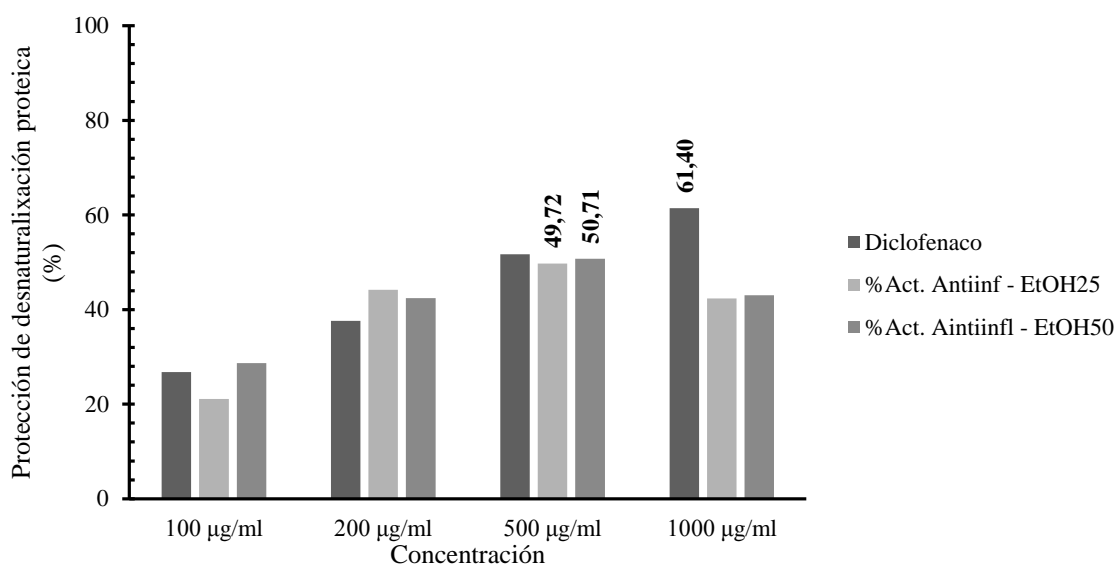


Figura 13. Variación de la protección contra la desnaturalización proteica a las diferentes concentraciones de los extractos, comparados con el diclofenaco como estándar de referencia.

El análisis de varianza ($P < 0,05$) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los porcentajes de protección contra la desnaturalización proteica en cada uno de los extractos a sus diferentes concentraciones. En cada uno de estos tratamientos existen tres grupos homogéneos (Tabla 21), y en donde las concentraciones de 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ no presentaron diferencias significativas entre sus medias.

Tabla 21. Test de rangos múltiples para determinar la significancia de las medias del porcentaje de protección con EtOH25% y EtOH50% por el método de desnaturalización proteica.

Concentración EtOH25%	Media	Grupos homogéneos	Concentración EtOH50%	Media	Grupos homogéneos
100	28,6816	X	100	21,1028	X
200	42,3871	X	1000	42,319	X
1000	43,0225	X	200	44,2024	X
500	50,7148	X	500	49,7164	X

Fuente: StatGraphics Centurion

3.1.9. Actividad antioxidante por TBARS

La peroxidación lipídica es un proceso de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la acción de radicales libres, en especial de las ROS (**Baldissera et al., 2016**). Esta oxidación se mide a través de la cuantificación de MDA, conocido por ser uno de los productos finales de la peroxidación lipídica (**Tiloke, Phulukdaree, & Chuturgoon, 2016**), cuya coloración es rosa al reaccionar con TBA (**Vladimir et al., 2011**).

En estudios sobre la actividad antioxidante contra la peroxidación lipídica realizados por **Siddhuraju, Mohan & Becker, (2002)** y **Cheung & Cheung, (2005)** en caña fístula (*Cassia fistula*) y un hongo comestible (*Volvariella volvacea*), respectivamente, muestran que a 200 $\mu\text{g/ml}$ los extractos de caña pístula muestran un porcentaje de inhibición de peroxidación entre 37 y 62%, mientras que el estándar de referencia mostró una actividad igual a 87%. Los extractos de *V. volvacea*, por otro lado, exhiben un porcentaje de inhibición del 50% a 109 $\mu\text{g/ml}$, lo que indicaría que dichas matrices presentan compuestos con potencial antioxidante, según los autores, cuando se utilizan concentraciones bajas de los respectivos extractos.

La actividad antioxidante en *B. macrantha* se evaluó en un rango de 100 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos (EtOH25% y EtOH50%). La mayor actividad en ambos extractos se presentó a 500 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 14) con el 77% de inhibición para EtOH25% y el 73,11% para EtOH50%. Los valores obtenidos son superiores a los mostrados anteriormente en otras matrices, sin embargo, para conseguir una mayor inhibición contra la peroxidación lipídica se necesitaron concentraciones más altas de los extractos de chilca. En ambos extractos la menor actividad se presentó al trabajar a 100 $\mu\text{g/ml}$ con valores de protección inferiores al 60%, mientras que el BHT, utilizado como estándar de referencia, mostró su mayor actividad antioxidante a 1000 $\mu\text{g/ml}$. En todos los casos, el BHT

confiere una mayor protección contra la peroxidación lipídica, evitando en gran parte la formación de especies reactivas al TBA. A 500 $\mu\text{g/ml}$, existe una variación del 20,96% entre el BHT con respecto al valor obtenido para el extracto con EtOH25%, mientras que para el extracto con EtOH50% hay una variación de 20,02% con respecto al mismo estándar de referencia. Los valores obtenidos indican que los extractos combaten las especies reactivas al TBA de manera efectiva, con valores de protección superiores al 70%.

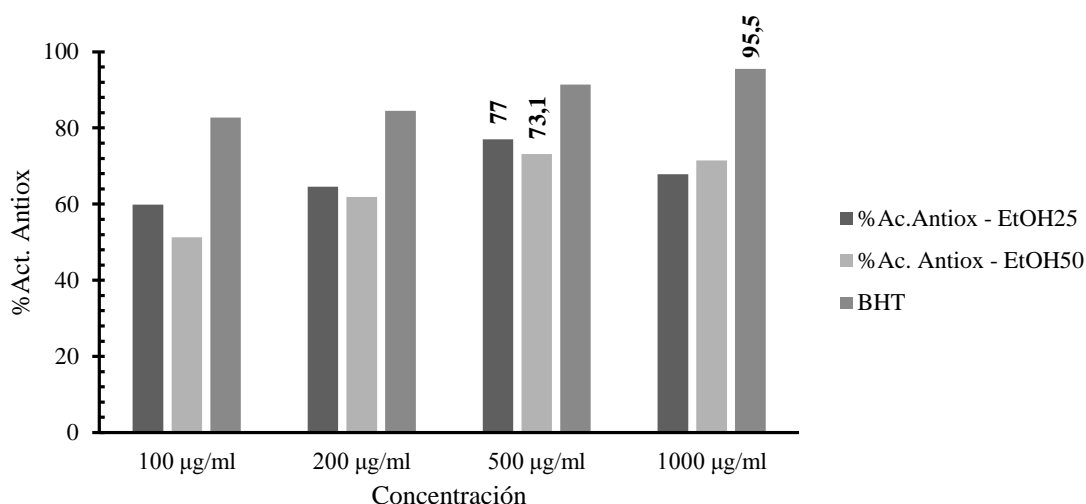


Figura 14. Comparación de la actividad antioxidante del BHT con los extractos a diferentes concentraciones obtenidos con los tratamientos de EtOH25 y EtOH50.

El análisis estadístico a través del análisis de varianza indica que existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las medias de los porcentajes de protección contra la peroxidación lipídica de cada uno de los extractos a las diferentes concentraciones del mismo. Para ambos extractos existen tres grupos homogéneos, en donde 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ presentan diferencias significativas con todas las demás concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Test de rangos múltiples para el porcentaje de protección contra la peroxidación lipídica para los extractos de EtOH25 y EtOH50

Nivel	N° de réplicas	Media	Grupos homogéneos	Media	Grupos homogéneos
		EtOH25	EtOH25	EtOH50	EtOH50
100	5	59,85	X	51,29	X
200	5	64,53	X	61,86	X
1000	5	77,00	X	73,11	X
500	5	67,88	X	71,48	X

Fuente: StatGraphics Centurion

3.1.10. Cuantificación de metales

Las plantas son capaces de absorber diferentes elementos químicos del suelo a lo largo de su ciclo de vida sin los cuales no podrían sobrevivir, sin embargo, no solo están conformadas por moléculas e iones que tienen roles funcionales y estructurales, por lo que su composición elemental excede lo que se considera esencial para la supervivencia de la planta. Es así que, los metales requeridos por las diversas especies de plantas son Mn, Fe, Cu, Zn, Mo y Ni, éste último en menor proporción que los anteriores (**Raskin, Kumar, Dushenkov, & Salt, 1994**).

La absorción de los metales depende también de su naturaleza, sus propiedades físico-químicas y de la especie de la planta (**Kidd, Domínguez-Rodríguez, Díez, & Monterroso, 2007**). Pero, ésta se favorece cuando la concentración del metal en el medio externo (aire o agua) aumenta (**Greger, 1999**), de tal manera que los metales se bioacumulan en los tejidos vegetales hasta tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud más que las concentraciones normales. En las plantas las concentraciones de metales pesados generalmente son bajas, al igual que en las hojas de *B. macrantha*, debido a que fueron recolectadas en el bosque nublado “Teligote” (ver sección [1.1.2.](#)), un bosque, en general, con poca actividad humana., y por lo general, su concentración es de origen geogénico, es decir, provenientes de erupciones volcánicas o lixiviación de mineralizaciones de la roca madre (**Galán & Romero, 2008**)

Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan una densidad alta (**FACSA, 2019**), superior a 4 g.cm^{-3} , y una masa y peso atómico superior a 20 (**Londoño, Londoño, & Muñoz, 2016**). Debido a que la definición de metales pesados es ambigua, y abarca a gran parte de los metales estudiados, a excepción del Ca y Mg (**Croda International Plc, 2019**), se considera que es mejor referirse a metales pesados tóxicos, en donde se encuentran Hg, Pb, Cd y As. En la Tabla 23 se muestran las concentraciones de los metales que fueron medidos por espectrofotometría de absorción atómica.

Tabla 23. Concentración de algunos metales en *B. macrantha*

Catión	mg Catión.kg ⁻¹ base seca
Cadmio	0,09 ± 0,05
Calcio	8780,83 ± 812,88
Cobalto	0,52 ± 0,03
Cobre	8,59 ± 1,98
Hierro	59,71 ± 2,68
Magnesio	2530,30 ± 386,62
Manganeso	292,25 ± 18,41
Níquel	<0,2383
Plomo	<0,1723
Zinc	37,78 ± 14,27

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

En general, altas concentraciones de cualquier metal se considera tóxico para la planta, sin embargo, cada matriz vegetal puede tolerar o absorber ciertas cantidades de los diferentes metales sin que éstas se conviertan en tóxicas. A continuación, se reportan los datos obtenidos para cada metal.

3.1.10.1. Cadmio

En la cuantificación realizada se reportan datos de Cd equivalentes a $0,09 \pm 0,05$ mg Cd \times kg⁻¹ de muestra seca. Un reporte de **Kirkham, (2006)** sobre las concentraciones de Cd en plantas y suelos contaminados y basados en la regulación de la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), indica que la concentración máxima de Cd en condiciones no contaminadas es igual a $0,2$ mg \times kg⁻¹ de planta, sin embargo, el nivel normal debe ser igual o inferior a $0,1$ mg \times kg⁻¹ de planta. Como se observa en la Tabla 23, tales valores indican que no existe una contaminación por Cd en la matriz vegetal, sobre todo por fuentes antropogénicas, y los valores obtenidos están dentro del rango aceptado como normal por la EPA. La normativa ecuatoriana, no habla de la contaminación de metales pesados en matrices vegetales, por lo tanto, no arroja valores de concentraciones consideradas como normales, más bien se regula la concentración de varios de éstos metales en fuentes de agua y suelo.

3.1.10.2. Calcio

El calcio, a diferencia de los demás metales analizados, es un nutriente esencial para la planta, ya que tiene roles estructurales en la pared y membrana celular, y es mensajero intracelular en el citosol (**White & Broadley, 2003**). El Ca, no se considera tóxico para

las plantas, pero una gran cantidad de este compuesto en los suelos, afecta la absorción de otros nutrientes como el P, K, Mg, B, Cu, Fe y Zn (**Tetra Technologies, 2018**).

La concentración de Ca en *B. macrantha* fue igual a 8780 mg \times kg⁻¹ de muestra seca, lo que equivale a 0,8% (p/p) de Ca en la matriz seca. Los valores normales de calcio en matrices vegetales se encuentran entre 0,1 y 5%, por lo que se cumplen los requerimientos nutricionales de Ca en *B. macrantha*. De hecho, la deficiencia de calcio es rara en la naturaleza y cuando ocurre es un pronóstico de que existen altos niveles de deposición ácida y baja saturación alcalina en los suelos. Por lo tanto, la cuantificación de Ca no solo provee información acerca del estado de la planta, sino también da una idea cualitativa de las condiciones físico – químicas del suelo (**White & Broadley, 2003**).

3.1.10.3. Cobalto

Dependiendo de la concentración, el Co puede afectar al crecimiento y metabolismo de las plantas, ya que interactúa con otros elementos para formar complejos (**Palit, Sharma, & Talukder, 1994**). Sin embargo, a concentraciones bajas es necesario para mantener un equilibrio fisiológico de la planta (**Abu et al., 2009**), ya que forma parte de algunas enzimas y co-enzimas (**Palit et al., 1994**). Las plantas acumulan cantidades pequeñas de Co del suelo, las cuales se almacenan en semillas, frutos y granos (**Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, 2019**).

El contenido de Co en *B. macrantha* fue de 0,52 ppm, el cual muy posiblemente sea absorbido desde el suelo. La concentración de Co varía dependiendo del tipo de suelo, sin embargo, se consideran valores normales entre 1 a 40 ppm de Co (**Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, 2019**). Del total existente en el suelo, una pequeña parte esta biodisponible para la planta, es así, que la distribución de Co en plantas, depende de la especie. Se ha encontrado que plantas silvestres forrajeras de diferentes especies contienen Co entre 0,6 y 3,5 ppm, mientras que otras plantas comestibles como la lechuga y col tienen contenidos superiores a 0,6 ppm (**Palit et al., 1994**). Si los valores mencionados anteriormente son considerados como normales para las plantas, se dice entonces, que *B. macrantha* tiene el contenido de Co suficiente para cumplir sus funciones metabólicas y no se presenta contaminación de éste metal por fuentes geogénicas, como las cenizas del volcán Tungurahua.

3.1.10.4. Cobre

El Cu es un micronutriente esencial para las plantas (**Fernandes & Henriques, 1991**), debido a que permite su normal crecimiento y desarrollo, al participar como cofactor de metaloproteínas, envueltas en procesos fisiológicos (**Yruela, 2005**), y ser partícipe de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos (**Yruela, 2009**).

En la cuantificación se obtuvo un valor igual a 8,59 ppm en hojas secas de *B. macrantha*. Datos recolectados por **Fernandes & Henriques, (1991)** sobre estudios realizados por diferentes autores en concentraciones de Cu en tejidos vegetales, indican que el rango aceptable de Cu está entre 3 y 20 ppm, sin embargo, se acepta como valor global una concentración de 12 ppm. Por lo tanto, el contenido de Cu en *B. macrantha* se encuentra dentro de los parámetros normales para la generalidad de las plantas.

3.1.10.5. Hierro

El hierro es uno de los elementos más abundantes de los suelos, sin embargo, muy poca cantidad está biodisponible para las plantas, es de hecho el micronutriente que menor disponibilidad tiene con respecto a los demás elementos requeridos (**Sierra, 2017**).

Las hojas de *B. macrantha* presentaron un contenido de Fe igual a 59,71 mg \times kg⁻¹ de muestra seca, valor que concuerda con lo reportado por **Benavides, (1999)**, en donde se asegura que el contenido normal de Fe debe estar entre 50 y 300 mg \times kg⁻¹.

3.1.10.6. Magnesio

El Mg es el catión divalente libre más abundante en el citoplasma celular (**Shaul, 2002**) y cumple un importante rol en el metabolismo de las plantas, entre los procesos en los que se ve involucrado, se tienen: fotosíntesis, síntesis de proteínas, mediación de energía, metabolismo de los lípidos y carbohidratos, y ensamblaje de microtúbulos (**Sigel & Sigel, 1990**).

El contenido de Mg en *B. macrantha* es igual a 2 530,30 mg \times kg⁻¹, valor que equivale a 0,25% de Mg en peso seco. Según **Sigel & Sigel, (1990)** se considera que el rango normal de Mg en hojas secas es de 0,2 a 0,4% (2000 – 4000 ppm), mientras que, se considera que la planta tiene deficiencia de Mg con valores por debajo de 0,2% en peso seco, por lo tanto, se puede afirmar que *B. macrantha* tiene la cantidad necesaria de Mg para cumplir con las funciones metabólicas.

3.1.10.7. Manganeso

El Mn bioquímicamente cumple funciones similares a las del Mg, como la activación de enzimas que catalizan reacciones de descarboxilación, fosforilación e hidrólisis (**Burnell, 1988**), además tiene influencia directa sobre la fotosíntesis, metabolismo del N y la síntesis de compuestos de anillo aromático, los cuales son precursores de aminoácidos aromáticos, auxinas, fenoles y ligninas (**Campbell & Nable, 1988**).

En el caso del Mn, no existe una concentración o rango de concentraciones que se pueda describir como general para todas las especies de plantas, ya que concentraciones de Mn que pueden ser tóxicas para ciertas especies, no lo son para otras. Es así que, por ejemplo para la soya y el caupí valores por encima de $10 \text{ mg Mn } \times \text{ kg}^{-1}$ en peso seco, ya producen síntomas de toxicidad a la planta, mientras que, para la mostaza se ha reportado que valores por debajo de $570 \text{ mg Mn } \times \text{ kg}^{-1}$ en peso seco, no representan un peligro, pero sí por encima de éste (**El-Jaoual & Cox, 1998**).

En el caso de *B. macrantha* se obtuvieron $292,25 \text{ mg Mn } \times \text{ kg}^{-1}$ en peso seco. Este valor se asume como normal para esta especie de planta, debido a que las hojas recolectadas no presentaban síntomas de toxicidad por Mn, como por ejemplo clorosis de las hojas.

3.1.10.8. Níquel

El Ni en las plantas se ha identificado como componente de un gran número de enzimas, como hidrogenasas, superóxido dismutasas, ureasa y glioxalinas (**Chen, Huang, & Liu, 2009**). La absorción del Ni es llevado a cabo a través de las raíces y depende en gran medida de la concentración en el suelo (**Yusuf, Fariduddin, Hayat, & Ahmad, 2011**), cuyo valor debe ser menor a 50 ppm (**Halstead, Finn, & MacLean, 1969**).

El contenido de Ni en *B. macrantha* es inferior al límite de cuantificación del equipo de absorción atómica, por lo que el valor reportado sobre Ni, en la Tabla 23, es menor a $0,2383 \text{ mg Ni } \times \text{ kg}^{-1}$ de peso seco. **Chen et al. (2009)** asegura que la concentración de Ni en la mayoría de plantas es muy bajo, entre $0,05$ a $10 \text{ mg Ni } \times \text{ kg}^{-1}$ de peso seco.

3.1.10.9. Plomo

El Pb es considerado un veneno protoplasmático, acumulativo y de acción lenta, de origen antropogénico. Las principales fuentes de contaminación son la minería, gases producto de la combustión de hidrocarburos y chimeneas de fábricas que trabajan con Pb (**Sharma & Shanker, 2005**).

Como se esperaba el contenido de Pb en *B. macrantha* es menor al límite de cuantificación del espectrofotómetro de absorción atómica, debido a que no existen fuentes de contaminación directa sobre las especies de plantas existentes en el cerro Teligote o sobre el suelo del mismo.

3.1.10.10. Zinc

El Zn es un componente esencial en las plantas ya que participa en diferentes procesos fisiológicos celulares (**Broadley, White, Hammond, Zelko, & Lux, 2007**), y el único presente en las seis clases de enzimas (**Sagardoy, Morales, López-Millán, Abadía, & Abadía, 2009**).

Ebbs & Kochian (1997) reportan que la concentración total de Zn en la mayoría de suelos es cercana a $3\,420\text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, mientras que (**Sagardoy et al., 2009**) asegura la biodisponibilidad del Zn presente en el suelo es alta, lo que asegura que sea absorbida por la planta. Estudios sobre la distribución y transporte del Zn en plantas, muestran que la concentración de Zn en hojas secas sanas varía entre 15 a $100\text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ de muestra seca (**Longnecker & Robson, 1993**).

La concentración de Zn de las hojas de *B. macrantha* se encuentra dentro del rango descrito por **Longnecker & Robson, (1993)**, cuyo valor fue de $37,78\text{ mg Zn} \times \text{kg}^{-1}$ de muestra seca.

3.2. VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

3.2.1. Optimización del proceso de extracción

Con el análisis de varianza de una vía se determinó que para un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$) existieron diferencias significativas entre las medias de los solventes, temperaturas y tiempos de extracción a las diferentes concentraciones para la cuantificación del CTF y CTP, por lo que el tipo de solvente, la temperatura y tiempo de extracción influyen de manera significativa en la cuantificación de flavonoides y polifenoles de *B. macrantha*. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula H_0 , y se acepta la hipótesis alternativa H_1 .

3.2.2. Actividades biológicas

Con un 95% de confianza el análisis de varianza de una vía determinó que existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de los porcentajes de protección contra la lisis de los RBCs mediante la estabilización de la membrana y de los porcentajes

de inhibición contra la peroxidación lipídica mediante TBARs cuando se utilizan diferentes concentraciones de los extractos de *B. macrantha*. Es decir, que las concentraciones de los estándares (diclofenaco y BHT, respectivamente) y de los extractos influyen en las diferentes actividades biológicas evaluadas, por lo que se rechaza H_0 , y se acepta la H_1 .

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se optimizó el proceso de extracción para la cuantificación del CTF y CTP en hojas secas de *B. macrantha*, a través de la elección del mejor solvente, temperatura y tiempo de sonicación. En cada tratamiento se buscó obtener el mejor rendimiento, reducir costos y que el solvente de extracción sea inocuo. Bajo estas consideraciones las mejores condiciones se obtuvieron con etanol al 25%, 50°C y 10 min para la extracción de flavonoides, mientras que, para la extracción de polifenoles fueron etanol al 50%, 50°C y 10 min. Esto indicaría que las fuerzas polares de la mezcla etanol-agua (sistema de solvente binario) lograron una mejor interacción con los compuestos hidrofílicos presentes en la matriz vegetal, que a su vez se vio favorecida por la temperatura, logrando una mejor transferencia de masa. Mientras que, el tiempo de sonicación de 10 min, fue suficiente para facilitar la liberación de compuestos fenólicos unidos a celulosa, hemicelulosa y lignina. Adicionalmente, se evaluó el desgaste del material vegetal con las condiciones antes mencionadas, en donde se obtuvo que con cuatro extracciones sucesivas se logró recuperar un 98,56% de flavonoides y un 100% de polifenoles.
- La cuantificación del CTF y CTP se llevó a cabo utilizando los mejores tratamientos del proceso de optimización, a través de técnicas espectrofotométricas. Para el caso de los flavonoides (19,607 mg CQ.g⁻¹ muestra seca) se utilizó el método del cloruro de aluminio, en donde se formó un complejo coloreado amarillo, cuya cuantificación se realizó a 510 nm, por lo que se infiere que los compuestos extraídos tienen en su estructura anillos aromáticos con un grupo catecol con posiciones no sustituidas. Mientras que, los polifenoles totales (23,542 mg AG.g⁻¹ muestra seca) fueron medidos a 760 nm, utilizando el método de Folin-Ciocalteu, ya que ocurre un proceso de oxidación que generó un complejo de color azul. Las concentraciones finales fueron expresadas en equivalentes de catequina y equivalentes de ácido gálico, respectivamente.
- Se caracterizaron los extractos de *B. macrantha* por cromatografía en capa fina, con una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en proporciones 40:36:4, en donde se logró la separación de cinco compuestos visualizados a 366 nm. De los cinco compuestos separados, solo se identificó quercetina con un

R_f de $0,615 \pm 0,007$, tanto para el extracto con EtOH25% como para EtOH50%. Se infirió también, que existieron compuestos hidrofílicos que no lograron resolverse con las condiciones utilizadas, mientras que los estándares AG y CQ presentaron una polaridad intermedia, con un R_f de 0,49 y 0,38, respectivamente, de los cuales la QT es el compuesto menos hidrofílico y la CQ el compuesto más polar.

- En HPLC no se detectaron los estándares de AG y CQ bajo las condiciones probadas, por lo que no fue posible realizar su cuantificación en la matriz vegetal. Esta técnica cromatográfica está ligada con TLC, ya que en términos de R_f ninguna banda coincidió con los estándares de referencia, a excepción de la QT. Sin embargo, en HPLC se logró una mejor separación de los compuestos, al trabajar en modo gradiente y en fase reversa, lo que permitió que eluyan en primer lugar los compuestos más polares y conforme avanzó la corrida cromatográfica eluyeron los compuestos menos hidrofílicos. De esta manera, se obtuvieron 14 picos representativos, visualizados a 6 longitudes de onda diferentes. Con las condiciones de separación utilizadas se dedujo también que la mayoría de compuestos obtenidos con ambos tratamientos de extracción son iguales, ya que los picos coinciden en sus tiempos de retención al compararlos a una misma longitud de onda.
- Se comprobó que los extractos de *B. macrantha* poseen actividad antioxidante mediante el método TBARS. Los porcentajes más altos de inhibición contra la peroxidación lipídica se reportaron a $500 \mu\text{g/ml}$ para los tratamientos con EtOH25% y EtOH50%, cuyos valores de protección fueron $77,00 \pm 8,65\%$ y $73,11 \pm 3,14\%$, respectivamente. Los valores obtenidos indican que las hojas secas de *B. macrantha* son buena fuente de compuestos que ayudan a combatir los productos del estrés oxidativo, como las especies reactivas de oxígeno.
- La actividad antiinflamatoria se comprobó por dos métodos, que fueron la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) y desnaturalización proteica de la albúmina de huevo. En el método HRBC el extracto con EtOH25%, logró una mejor protección a $25 \mu\text{g/ml}$, con un porcentaje de protección igual a $97,23 \pm 0,42\%$, mientras que el extracto con EtOH50% lo hizo a $100 \mu\text{g/ml}$ con un valor de $93,70 \pm 0,30\%$. En el caso del método de desnaturalización proteica se obtuvieron porcentajes más bajos de

protección a concentraciones más altas de extracto. Tanto para los tratamientos con EtOH25% y EtOH50% se obtuvieron los mayores porcentajes de protección contra la desnaturalización a $500 \mu\text{g/ml}$, cuyos valores fueron de $49,72 \pm 0,77\%$ y $50,71 \pm 0,43\%$, respectivamente. Por lo tanto, los valores indicarían que a partir de los extractos de *B. macrantha* se lograría estabilizar la membrana lisosomal, evitando que se liberen compuestos pro-inflamatorios de los neutrófilos activados. Mientras que, el método de desnaturalización proteica mostraría que se logran estabilizar proteínas y factores de la inflamación, por lo que sería útil implementar los extractos liofilizados como antiinflamatorios naturales.

4.2.Recomendaciones

- Utilizar diferentes patrones para la caracterización de los extractos tanto en TLC como en HPLC, dentro de los cuales se encuentren: ácidos fenólicos, como el ácido cafeico o el ácido clorogénico; flavanoles, como la (-)-epigallocatequina galato; flavonoles, como la rutina y flavones, como la luteolina, lo que permitirá tener más información no únicamente sobre los compuestos, sino también sobre sus diferentes actividades biológicas.
- Ampliar el estudio sobre otras actividades biológicas, como las anticarcinógenas, antimutagénicas, antimicrobianas y antihelmínticas, ya que pueden existir compuestos fenólicos en las hojas secas que pueden ser farmacológicamente activos.
- Utilizar modelos de estudio *in vivo*, sobre todo para la actividad antioxidante, que no necesariamente impliquen el uso de animales, ya que se podría inducir un estrés oxidativo en ciertos microorganismos y comparar así las tasas de sobrevivencia con los extractos y con los estándares de referencia.
- Ampliar el estudio de los metales a los suelos de donde se tomaron las muestras de las plantas para tener la relación del contenido total en el suelo con la cantidad que está biodisponible para la planta.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, M., & Bermejo, P. (2006). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 2007(7), 76–96. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.709>
- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., ... Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8), 1689–1699. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Abu, M., Abu, Z., Mufeed, B., Rahman, A., Al-Tawaha, M., & Yassin, S. (2009). *Trace element contents and essential oil yields from wild thyme plant (Thymus serpyllum L.) grown at different natural variable environments, Jordan. Agriculture & Environment (Vol. 7)*. Retrieved from www.world-food.net
- Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades. (2019). Resúmenes de Salud Pública - Cobalto (Cobalt). Retrieved September 18, 2019, from https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs33.html
- Akerele, O. (1993). *Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar*. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/47707/WHF_1993_14_4_p390-;jsessionid=8FA8F7C999496FE1B8544114EC4718BC?sequence=1
- Alexandre, J., & du Toit, W. (2018). The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. In *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79550>
- Alexis Biochemicals. (2017). *Polyphenols*. Retrieved from www.alexis-biochemicals.com,
- Aleykutty, N. A., Bindu, A. R., Sangeetha, S., & Jiljit, G. (2011). Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Wrightia Tinctoria Leaves. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(1), 33–41. <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719071>
- Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera.

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(8), 623–627.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)

- Anouar, E. H., Gierschner, J., Duroux, J.-L., & Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, 131(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.08.034>
- Baldissera, G., Sperotto, N. D. M., Rosa, H. T., Henn, J. G., Peres, V. F., Moura, D. J., ... Saffi, J. (2016). Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.056>
- Barrantes, G., Chaves, H., & Vinueza, M. (2010). *El bosque en el Ecuador. Una visión transformada para el desarrollo y la conservación*. Retrieved from <http://comafors.org/wp-content/uploads/2010/05/El-Bosque-en-el-Ecuador.pdf>
- Benavides, A. (1999). Absorción y asimilación de hierro en las plantas. Retrieved September 18, 2019, from http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/hierro_en_plantas.pdf
- Bhoosha, K., & Ibrahim, S. (2009). *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Allahabad. Retrieved from www.landesbioscience.com/journals/oximed/article/9498
- Bouden, I., Aimene, W., Elder, R., & Arrar, L. (2017). In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Matricaria pubescens* (Desf.). *Advances in Environmental Biology*, 11(11), 11–19. Retrieved from <http://www.aensiweb.com/AEB/http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007, March). Zinc in plants: Tansley review. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>
- Buitrón, X. (1999). *Ecuador: Uso y Comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación*. TRAFFIC International. Retrieved from <https://www.traffic.org/site/assets/files/9729/ecuador-uso-y-comercio-de-plantas-medicinales.pdf>

- Burnell, J. N. (1988). The Biochemistry of Manganese in Plants. In *Manganese in Soils and Plants* (pp. 125–137). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2817-6_10
- Campbell, L. C., & Nable, R. O. (1988). Physiological Functions of Manganese in Plants. In *Manganese in Soils and Plants* (pp. 139–154). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2817-6_11
- Chemistry Libre Texts. (2019). Thin Layer Chromatography. Retrieved July 25, 2019, from https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos%2C_Techniques%2C_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography
- Chemistry Stack Exchange. (2017). Polarity of alcohols and their miscibility in water. Retrieved August 31, 2019, from <https://chemistry.stackexchange.com/questions/69090/polarity-of-alcohols-and-their-miscibility-in-water>
- Chen, C., Huang, D., & Liu, J. (2009, April). Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean - Soil, Air, Water*. <https://doi.org/10.1002/clen.200800199>
- Cheung, L. M., & Cheung, P. C. K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89(3), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.049>
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2017). *Conceptos fundamentales de cromatografía*. Retrieved from http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2019). *Cromatografía líquida de alta eficacia*. Retrieved from http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf
- Croda International Plc. (2019). Micronutrientes (Nutrición Vegetal). Retrieved September 17, 2019, from <https://www.crodacropcare.com/es-mx/discovery->

zone/market-areas/micronutrients

- Desai, T., & Manvar, M. (2014). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activities of fruits of *Vernonia anthelmintica* Willd. (Asteraceae). *Pharm. Res*, 4, 186–188. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/277957703>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Diversidad Vegetal Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. (n.d.). *CORE EUDICOTILEDÓNEAS-Asterideas-Euasterideas II: Asterales: Asteraceae*. Retrieved from <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>
- Ebbs, S. D., & Kochian, L. V. (1997). Toxicity of zinc and copper to Brassica species: Implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 26(3), 776–781. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030026x>
- Ecuador Forestal. (2007). *Planificación Estratégica. Bosques nativos del Ecuador*. Quito. Retrieved from https://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2013/03/PE_BN.pdf
- El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- FACSA. (2019). Metales pesados. Retrieved October 23, 2019, from <https://www.facsa.com/metales-pesados/>
- FAO. (2014). *Informe nacional. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015. Ecuador*. Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-au190s.pdf>
- Fernandes, J. C., & Henriques, F. S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57(3), 246–273. <https://doi.org/10.1007/BF02858564>
- Galán, E., & Romero, A. (2008). *Contaminación de Suelos por Metales Pesados*. Sevilla. Retrieved from http://www.ehu.es/sem/macla_pdf/macla10/Macla10_48.pdf
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la

- salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- García de Lorenzo, A., López, J., & Sánchez, M. (2000). *Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores*. Retrieved from <http://www.medintensiva.org/es-pdf-S0210569100796227>
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, 230, 195–207. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.02.127>
- González, M. (2010). Sistema conjugado. Retrieved September 5, 2019, from <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/sistema-conjugado>
- Greger, M. (1999). Metal Availability and Bioconcentration in Plants. In *Heavy Metal Stress in Plants* (pp. 1–27). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_1
- Guillarme, D., Casetta, C., Bicchi, C., & Veuthey, J.-L. (2010). High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6882–6890. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.08.060>
- Halstead, R., Finn, B., & MacLean, J. (1969). *Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants*. Retrieved from www.nrcresearchpress.com
- Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80(2), 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00382-5)
- Hossain, M. A., Hamood AL-Mijizy, Z., Khalifa Al-Rashdi, K., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2013). Effect of temperature and extraction process on antioxidant activity of various leaves crude extracts of *Thymus vulgaris*. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(2), 130–134. <https://doi.org/10.12980/JCLM.1.2013C706>
- Julkunen, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2),

213–217. <https://doi.org/10.1021/jf00062a013>

- Kidd, P. S., Domínguez-Rodríguez, M. J., Díez, J., & Monterroso, C. (2007). Bioavailability and plant accumulation of heavy metals and phosphorus in agricultural soils amended by long-term application of sewage sludge. *Chemosphere*, 66(8), 1458–1467. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.007>
- Kirkham, M. B. (2006, December 31). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.024>
- Kumar, V., Bhat, Z., Kumar, D., & Bohra, P. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Basella alba* Linn. var. *alba*. *International Journal Drug Development & Research*, 3(2), 176–179. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/85a4/be0c17fb158695f142d232db192bced34d51.pdf>
- Lakhanpal, P., & Kumar, D. (2007). *Quercetin: A Versatile Flavonoid*. *Internet Journal of Medical Update* (Vol. 2). Retrieved from https://www.akspublication.com/Paper05_Jul-Dec2007_.pdf
- Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *Int. J. Drug Dev. & Res*, 3(3), 189–196. Retrieved from <http://www.ijddr.in>
- Londoño, L., Londoño, P., & Muñoz, G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145–153. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- Longnecker, N. E., & Robson, A. D. (1993). Distribution and Transport of Zinc in Plants. In *Zinc in Soils and Plants* (pp. 79–91). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2_6
- Maisanche, F. (2018). El Cerro Teligote es sagrado para el pueblo Salasaka. Retrieved from <https://www.elcomercio.com/tendencias/cerro-teligote-sagrado-pueblo-salasaka.html>

- Martínez, G., & López, F. (2017). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Valencia. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia Martínez et al.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia_Martínez_et_al.pdf?sequence=1)
- Martinez, S., Tuñón, M., González, J., & Culebras, J. (2014). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII(6), 271–278. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/10961859>
- Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169–173. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x>
- Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2016.01.043>
- Moualek, I., Iratni Aiche, G., Mestar Guechaoui, N., Lahcene, S., & Houali, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 937–944. <https://doi.org/10.1016/J.APJT.B.2016.09.002>
- Nagaharika, Y., Kalyani, V., Rasheed, S., & Ramadosskarthikeyan. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60118-3)
- National Center for Biotechnology Information. (2019). Quercetin. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quercetin>
- OMS. (2004). OMS | Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Retrieved February 4, 2019, from <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 - 2023*. China: Organización Mundial de la Salud. Retrieved from

<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>

- Padmanabhan, P., & Jangle, S. (2012). Evaluation of in-vitro anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *International Journal of Basic and Applied Medical Sciences*, 2(1), 109–116. Retrieved from <http://www.cibtech.org/jms.htm>
- Palit, S., Sharma, A., & Talukder, G. (1994). Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review*, 60(2), 149–181. <https://doi.org/10.1007/BF02856575>
- Parameswari, P., Devika, R., & Vijayaraghavan, P. (2019). In vitro anti-inflammatory and antimicrobial potential of leaf extract from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 460–463. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.005>
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Prada, J., Orduz, L., & Coy, E. (2016). *Baccharis latifolia* : Una Asteraceae poco valorada con potencialidad química y medicinal en el neotrópico. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. <https://doi.org/10.18359/rfcb.1858>
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137–146. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.03.001>
- Primo, E. (2007). Flavonoides y antocianos. In *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (pp. 915–918). Barcelona: Reverté.
- Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., & Ibañez, R. (1996). *Introducción a la HPLC, Aplicación y Técnica*. Buenos Aires: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/315771927_Introduccion_a_la_HPLC_A

- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (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>
- Raskin, I., Kumar, P. N., Dushenkov, S., & Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 285–290. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90030-2)
- Real Jardín Botánico. (1969). *Baccharis macrantha*. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 13(39), 10. Retrieved from [http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff\(8\)MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_47/MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_47_032.pdf](http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff(8)MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_47/MUT_Fl_Exp_Bot_N_Gra_47_032.pdf)
- Ricco, R. A., Agudelo, I. J., & Wagner, M. L. (2015). *Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad*. *Lilloa* (Vol. 52). <https://doi.org/doi.org/10.30550/j.lil>
- Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*, 15(2), 212–218. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815391002>
- Sagardoy, R., Morales, F., López-Millán, A. F., Abadía, A., & Abadía, J. (2009). Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology*, 11(3), 339–350. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x>
- Salinas, V. (2014). *Fluidos bajo cavitación acústica en recintos: Experimentos y modelación*. Universidad de Santiago de Chile. Retrieved from <https://fisica.usach.cl/sites/fisica/files/vicentesalinas.pdf>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/60483/48716>
- Sepúlveda, C., Ciro, G., & Zapata, J. (2016). Extracción de compuestos fenólicos y

- actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21, 133–144. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n2/pla02216.pdf>
- Sharma, P., & Shanker, R. (2005). Lead toxicity in Plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*.
- Shaul, O. (2002). Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals*, 15(3), 307–321. <https://doi.org/10.1023/A:1016091118585>
- Shirai, A., Onitsuka, M., Maseda, H., & Omasa, T. (2015). Effect of Polyphenols on Reactive Oxygen Species Production and Cell Growth of Human Dermal Fibroblasts after Irradiation with Ultraviolet-A Light. *Biocontrol Science*, 20(1), 2733. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/20/1/20_27/_pdf/-char/en
- Siddhuraju, P., Mohan, P. S., & Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. *Food Chemistry*, 79(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00179-6)
- Sierra, C. (2017). Una relación intensa: El hierro, el suelo y las plantas. Retrieved September 18, 2019, from <http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Análisis/2016/02/02/Una-relacion-intensa-El-hierro-el-suelo-y-las-plantas.aspx>
- Sigel, H., & Sigel, A. (1990). Metal Ions in Biological Systems. Retrieved September 19, 2019, from https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=l8bw5GYeLk0C&oi=fnd&pg=PA33&dq=magnesium+in+plants&ots=G2wG10IIHZ&sig=WkChOe1xkwsjkt9C5rj57bGiOb8&redir_esc=y#v=onepage&q=magnesium+in+plants&f=false
- Simbaña, W., & Vargas, H. (2017). *Plantas de los remanentes del Cerro Teligote*. Retrieved from https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/968_ecuador_plantas_del_cerro_teligote.pdf
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (Joseph J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC method development*. Wiley.

- Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 200–208. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2006.10.021>
- Srinivasa, S. B., Poojary, B., Brahmavara, U., Das, A. J., & Middha, S. K. (2018). Anti-Inflammatory, Radical Scavenging Mechanism of New 4-Aryl-[1,3]-thiazol-2-yl-2-quinoline Carbohydrazides and Quinoliny[1,3]-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazoles. *ChemistrySelect*, 3(44), 12478–12485. <https://doi.org/10.1002/slct.201801398>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Tetra Technologies. (2018). The Importance of Calcium. Retrieved September 18, 2019, from http://www.tetrachemicals.com/Products/Agriculture/The_Importance_of_Calcium.aqf
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., & Tan, C. P. (2010). Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120(1), 290–295. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.09.064>
- Tiloke, C., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A. A. (2016). The Antiproliferative Effect of *Moringa oleifera* Crude Aqueous Leaf Extract on Human Esophageal Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food*, 19(4), 398–403. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.0113>
- Tomadoni, B., Cassani, L., Viacava, G., Moreira, M. D. R., & Ponce, A. (2017). Effect of ultrasound and storage time on quality attributes of strawberry juice. *Journal of Food Process Engineering*, 40(5), e12533. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12533>
- Tropicos. (n.d.). *Baccharis macrantha* Kunth. Retrieved July 20, 2019, from <http://tropicos.org/Name/2704756?tab=specimens&langid=66>
- Ulloa, C., & Moller, P. (n.d.). *Baccharis* in Trees and shrubs of the Andes of Ecuador. Retrieved September 24, 2018, from http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=103317

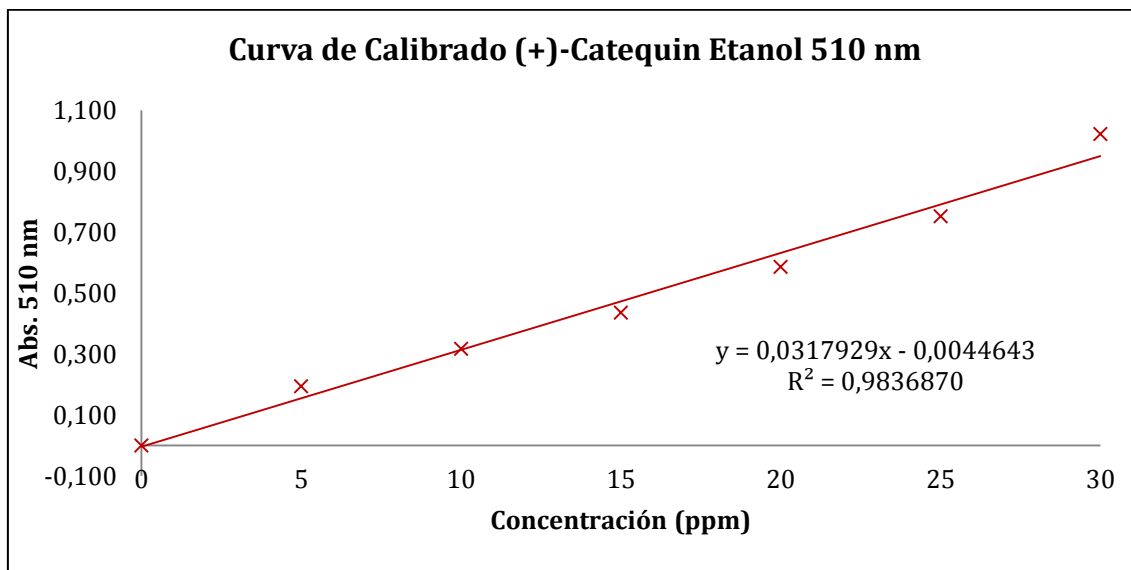
- Unidad Criminalística Contra la Vulneración de derechos Fundamentales. (2015). *Cromatografía en capa fina*. Caracas. Retrieved from <http://criminalistica.mp.gob.ve/wp-content/uploads/2015/07/Técnica-de-Cromatografía-en-Capa-Fina.pdf>
- Universidad de Alicante. (2008). *Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución*. Alicante. Retrieved from <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2017). *Cromatografía en capa fina*. Ciudad de México. Retrieved from http://organica1.org/1311/1311_6.pdf
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2019). Tabla de disolventes más usados en orden de polaridad. Retrieved August 28, 2019, from <http://organica1.org/1311/1311tablas.pdf>
- Vadivu, R., & Lakshmi, K. (2008). *In vitro* and *In vivo* anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (lour) Moere ssp *laurina*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3(1), 121–124. Retrieved from <https://www.banglajol.info/index.php/BJP/article/view/956/1097>
- Valencia, E., Ignacio, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, H., & García, M. (2016). *Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols: antioxidant and toxicological properties*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2.1583-4794-2-PB.pdf>
- Vargas, G. (2019). *Principios Activos y Actividades Biológicas de Especies Vegetales Amazónicas*. Retrieved from <http://www.iiap.org.pe/Upload/Conferencia/CONF247.pdf>
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.04.054>
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332. <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>
- Vladimir, S., Blažeković, B., Štefan, M., Alegro, A., Koszegi, T., & Petrik, J. (2011).

- Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *16*(2), 1454–1470. <https://doi.org/10.3390/molecules16021454>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>
- Yruela, I. (2005). Copper in plant. *Braz. J. Plant Physiol*, *17*(1), 145–156. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100012>
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, *36*(5), 409–430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., & Ahmad, A. (2011). Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *86*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0171-1>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

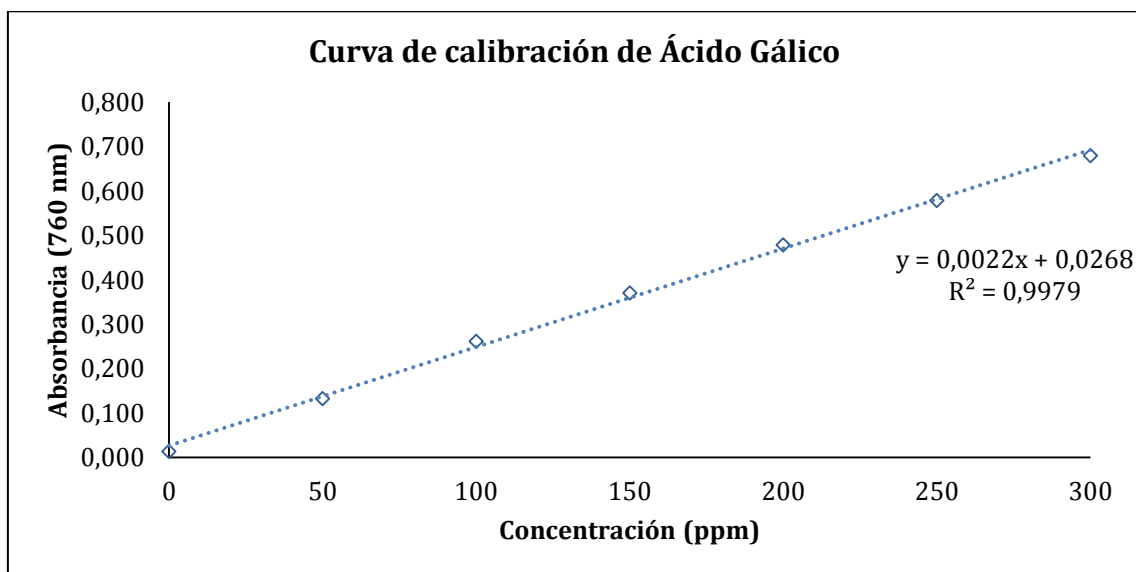
ANEXOS

ANEXO A

A.1. Curva de calibración para la cuantificación de CTF



A.2. Curva de calibración para la cuantificación de CTP



ANEXO B

B.1. Optimización del solvente para flavonoides

OPTIMIZACIÓN <i>Baccharis macrantha</i> (Chilca)											
FLAVONOIDES											
AGUA											
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio 500nm	Promedio 510 nm
BM.R1	0,1000	5	250	5	1	0,100	1,386	0,100	3,005		
BM.R2	0,1000	5	250	5	1	0,101	1,421	0,101	3,036	1,421	3,015
BM.R3	0,1000	5	250	5	1	0,100	1,386	0,100	3,005		
Etanol 75%											
BM1.75	0,1007	5	250	5	1	0,206	5,111	0,200	6,108		
BM2.75	0,1001	5	250	5	1	0,203	5,035	0,197	6,050	5,227	6,197
BM3.75	0,1000	5	250	5	1	0,217	5,537	0,209	6,433		
Etanol 50%											
BM1.50	0,1012	5	250	5	1	0,192	4,595	0,186	5,642		
BM2.50	0,1007	5	250	5	1	0,245	6,485	0,236	7,232	5,897	6,739
BM3.50	0,1009	5	250	5	1	0,249	6,613	0,240	7,342		
Etanol 25%											
BMe1.25	0,1005	5	250	5	1	0,246	6,533	0,239	7,340		
BMe2.25	0,1010	5	250	5	1	0,235	6,114	0,228	6,961	6,403	7,222
BMe3.25	0,1006	5	250	5	1	0,247	6,562	0,240	7,364		
Etanol puro											
BMe1P	0,1006	5	250	5	1	0,113	1,836	0,109	3,268		
BMe2P	0,1010	5	250	5	1	0,101	1,407	0,095	2,819	1,738	3,188

BMe3P	0,1009	5	250	5	1	0,117	1,971	0,116	3,477		
Metanol 25%											
BMm1.25	0,1003	5	250	5	1	0,204	5,060	0,199	6,101		
BMm2.25	0,1005	5	250	5	1	0,241	6,357	0,235	7,215	5,364	6,365
BMm3.25	0,1010	5	250	5	1	0,194	4,674	0,190	5,778		
Metanol 50%											
BMm1.50	0,1009	5	250	5	1	0,189	4,503	0,185	5,628		
BMm2.50	0,1007	5	250	5	1	0,166	3,701	0,163	4,952	4,337	5,485
BMm3.50	0,1004	5	250	5	1	0,197	4,808	0,192	5,875		
Metanol 75%											
BMm1.75	0,1005	5	250	5	1	0,243	6,427	0,237	7,278		
BMm2.75	0,1005	5	250	5	1	0,235	6,145	0,230	7,059	6,293	7,179
BMm3.75	0,1007	5	250	5	1	0,240	6,309	0,235	7,201		
Metanol puro											
BMm1P	0,1008	5	250	5	1	0,135	2,607	0,134	4,042		
BMm2P	0,1007	5	250	5	1	0,144	2,926	0,139	4,202	2,880	4,214
BMm3P	0,1005	5	250	5	1	0,149	3,109	0,145	4,398		

B.2. Optimización de la temperatura para flavonoides

OPTIMIZACIÓN *Baccharis macrantha* (Chilca)

TEMPERATURA

FLAVONOIDES - Etanol 25%

Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio 510nm	Promedio 500nm
40°C											
BM.Et.1.25.40	0,1008	5	250	5	1	0,243	6,408	0,238	7,287		
BM.Et.2.25.40	0,1008	5	250	5	1	0,242	6,373	0,238	7,287	7,180	6,261
BM.Et.3.25.40	0,1005	5	250	5	1	0,231	6,003	0,227	6,965		
30°C											
Et30.1	0,1010	5	250	5	1	0,163	3,585	0,160	4,844		
Et30.2	0,1007	5	250	5	1	0,183	4,300	0,179	5,452	5,014	3,752
Et30.3	0,1011	5	250	5	1	0,157	3,371	0,157	4,746		
60°C											
Et60.1.25	0,1004	5	250	5	1	0,308	8,731	0,301	9,290		
Et60.2.25	0,1003	5	250	5	1	0,309	8,775	0,306	9,456	9,244	8,583
Et60.3.25	0,1003	5	250	5	1	0,294	8,244	0,291	8,986		
50°C											
BMe1.25	0,1005	5	250	5	1	0,246	6,533	0,239	7,340		
BMe2.25	0,1010	5	250	5	1	0,235	6,114	0,228	6,961	7,222	6,403
BMe3.25	0,1006	5	250	5	1	0,247	6,562	0,240	7,364		

B.3. Optimización del tiempo de extracción

OPTIMIZACIÓN *Baccharis macrantha* (Chilca)

TIEMPO

FLAVONOIDES - Etanol 25%

Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio 510nm	Promedio 500nm
50°C - 10 min											
Et.25.1	0,1008	5	250	5	1	0,271	7,394	0,267	8,192		
Et.25.2	0,1007	5	250	5	1	0,278	7,648	0,268	8,232	8,497	7,818
Et.25.3	0,1008	5	250	5	1	0,300	8,414	0,295	9,066		
60°C - 20 min											
Et.60.20.1	0,1005	5	250	5	1	0,320	9,146	0,314	9,688		
Et.60.20.2	0,1014	5	250	5	1	0,335	9,589	0,330	10,098	9,836	9,296
Et.60.20.3	0,1008	5	250	5	1	0,321	9,154	0,316	9,721		
60°C - 5min											
Et60.1.25	0,1004	5	250	5	1	0,308	8,731	0,301	9,290		
Et60.2.25	0,1003	5	250	5	1	0,309	8,775	0,306	9,456	9,244	8,583
Et60.3.25	0,1003	5	250	5	1	0,294	8,244	0,291	8,986		
50°C - 5 min											
BMe1.25	0,1005	5	250	5	1	0,246	6,533	0,239	7,340		
BMe2.25	0,1010	5	250	5	1	0,235	6,114	0,228	6,961	7,222	6,403
BMe3.25	0,1006	5	250	5	1	0,247	6,562	0,240	7,364		
60°C - 10 min											
Et.60.10.1	0,1002	5	250	5	1	0,296	8,323	0,290	8,963		
Et.60.10.2	0,1010	5	250	5	1	0,307	8,644	0,300	9,204	9,109	8,515
Et.60.10.3	0,1001	5	250	5	1	0,303	8,580	0,296	9,161		
50°C - 20 min											

Et.1.25.20	0,1001	5	250	5	1	0,281	7,800	0,276	8,532		
Et.2.25.20	0,1002	5	250	5	1	0,287	8,004	0,282	8,712	8,754	8,051
Et.3.25.20	0,1003	5	250	5	1	0,297	8,350	0,292	9,017		

B.4. Desgaste del material vegetal para la obtención de flavonoides

OPTIMIZACIÓN *Baccharis macrantha* (Chilca)

DESGASTE DEL MATERIAL VEGETAL

FLAVONOIDES - Etanol 25%

Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alicuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio 510nm	Promedio 500nm
50°C - 10 min											
1.25E1	0,1008	5	250	5	1	0,312	8,837	0,308	9,472		
2.25E1	0,1006	5	250	5	1	0,316	8,995	0,311	9,584	9,686	9,089
3.25E1	0,1008	5	250	5	1	0,329	9,435	0,325	10,002		
1.25E2	0,1008	5	250	5	1	0,197	4,789	0,194	5,914		
2.25E2	0,1006	5	250	5	1	0,196	4,763	0,194	5,926	6,022	4,898
3.25E2	0,1008	5	250	5	1	0,207	5,141	0,204	6,226		
1.25E3	0,1008	5	250	5	1	0,092	1,093	0,090	2,669		
2.25E3	0,1006	5	250	5	1	0,087	0,919	0,086	2,549	2,567	0,953
3.25E3	0,1008	5	250	5	1	0,085	0,847	0,084	2,482		
1.25E4	0,1008	5	250	5	1	0,045	-0,561	0,045	1,265		
2.25E4	0,1006	5	250	5	1	0,043	-0,633	0,043	1,205	1,193	-0,644
3.25E4	0,1008	5	250	5	1	0,040	-0,737	0,040	1,109		
1.25E5	0,1008	5	250	5	1	0,025	-1,265	0,025	0,641		
2.25E5	0,1006	5	250	5	1	0,030	-1,092	0,030	0,798	0,735	-1,149
3.25E5	0,1008	5	250	5	1	0,030	-1,089	0,029	0,766		
60°C - 20 min											
1.25E1	0,1011	5	250	5	1	0,347	10,039	0,331	10,159		
2.25E1	0,1010	5	250	5	1	0,342	9,873	0,311	9,546	9,902	9,853

3.25E1	0,1008	5	250	5	1	0,335	9,646	0,325	10,002		
1.25E2	0,1011	5	250	5	1	0,198	4,810	0,194	5,897		
2.25E2	0,1010	5	250	5	1	0,200	4,885	0,197	5,996	6,081	5,004
3.25E2	0,1008	5	250	5	1	0,212	5,317	0,208	6,351		
1.25E3	0,1011	5	250	5	1	0,088	0,949	0,086	2,537		
2.25E3	0,1010	5	250	5	1	0,093	1,126	0,091	2,695	2,665	1,091
3.25E3	0,1008	5	250	5	1	0,095	1,199	0,093	2,763		
1.25E4	0,1011	5	250	5	1	0,037	-0,840	0,035	0,950		
2.25E4	0,1010	5	250	5	1	0,032	-1,017	0,031	0,826	0,899	-0,935
3.25E4	0,1008	5	250	5	1	0,034	-0,949	0,034	0,922		
1.25E5	0,1011	5	250	5	1	0,015	-1,613	0,014	0,297		
2.25E5	0,1010	5	250	5	1	0,019	-1,474	0,018	0,422	0,380	-1,533
3.25E5	0,1008	5	250	5	1	0,018	-1,512	0,018	0,422		

ANEXO C

C.1. Optimización del solvente para polifenoles

POLIFENOLES							
Agua							
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)
BM.R1	0,1000	5	50	5	1	0,175	6,035
BM.R2	0,1000	5	50	5	1	0,191	6,756
BM.R3	0,1000	5	50	5	1	0,173	5,945
Etanol 75%							
BM1.75	0,1007	5	50	5	1	0,278	10,598
BM2.75	0,1001	5	50	5	1	0,259	9,807
BM3.75	0,1000	5	50	5	1	0,290	11,212
Etanol 50%							
BM1.50	0,1012	5	50	5	1	0,330	12,859
BM2.50	0,1007	5	50	5	1	0,320	12,475
BM3.50	0,1009	5	50	5	1	0,320	12,451
Etanol 25%							
BMe1.25	0,1005	5	50	5	1	0,291	11,201
BMe2.25	0,1010	5	50	5	1	0,278	10,566
BMe3.25	0,1006	5	50	5	1	0,295	11,369
Etanol puro							
BMe1P	0,1006	5	50	5	1	0,211	7,610
BMe2P	0,1010	5	50	5	1	0,228	8,338
BMe3P	0,1009	5	50	5	1	0,215	7,766
Metanol 25%							

BMm1.25	0,1004	5	50	5	1	0,210	7,581	
BMm2.25	0,1008	5	50	5	1	0,209	7,506	7,452
BMm3.25	0,1010	5	50	5	1	0,204	7,268	
Metanol 50%								
BMm1.50	0,1009	5	50	5	1	0,202	7,186	
BMm2.50	0,1007	5	50	5	1	0,190	6,664	7,054
BMm3.50	0,1004	5	50	5	1	0,204	7,312	
Metanol 75%								
BMm1.75	0,1005	5	50	5	1	0,301	11,649	
BMm2.75	0,1005	5	50	5	1	0,279	10,664	10,821
BMm3.75	0,1007	5	50	5	1	0,268	10,151	
Metanol puro								
BMm1P	0,1008	5	50	5	1	0,126	3,799	
BMm2P	0,1007	5	50	5	1	0,129	3,937	3,939
BMm3P	0,1005	5	50	5	1	0,132	4,079	

C.2. Optimización de la temperatura para polifenoles

POLIFENOLES - Etanol 50%								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	
40°C								
Et.40.50.1	0,1008	5	50	5	1	0,287	10,989	
Et.40.50.2	0,1007	5	50	5	1	0,275	10,464	10,821
Et.40.50.3	0,1006	5	50	5	1	0,287	11,011	
30°C								
Et.30.50.1	0,1005	5	50	5	1	0,280	10,709	
Et.30.50.2	0,1010	5	50	5	1	0,288	11,012	10,828
Et.30.50.3	0,1004	5	50	5	1	0,281	10,764	
50°C								
BM1.50	0,1012	5	50	5	1	0,351	13,793	
BM2.50	0,1007	5	50	5	1	0,320	12,475	12,906
BM3.50	0,1009	5	50	5	1	0,320	12,451	
60°C								
Et.60.50.1	0,1008	5	50	5	1	0,371	14,741	
Et.60.50.2	0,1008	5	50	5	1	0,393	15,723	15,227
Et.60.50.3	0,1009	5	50	5	1	0,382	15,217	

C.3. Optimización del tiempo de extracción para polifenoles

POLIFENOLES - Etanol 50%							
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)
50°C - 10 min							
Et.50.1	0,1007	5	50	5	1	0,367	14,576
Et.50.2	0,1011	5	50	5	1	0,378	15,009
Et.50.3	0,1011	5	50	5	1	0,381	15,142
60°C - 20 min							
Et.50.20.1	0,1001	5	50	5	1	0,424	17,227
Et.50.20.2	0,1012	5	50	5	1	0,423	16,995
Et.50.20.3	0,1003	5	50	5	1	0,437	17,776
50°C - 5 min							
BM1.50	0,1012	5	50	5	1	0,351	13,793
BM2.50	0,1007	5	50	5	1	0,320	12,475
BM3.50	0,1009	5	50	5	1	0,320	12,451
60°C - 5min							
Et.60.50.1	0,1008	5	50	5	1	0,371	14,741
Et.60.50.2	0,1008	5	50	5	1	0,393	15,723
Et.60.50.3	0,1009	5	50	5	1	0,382	15,217
60°C - 10 min							
Et.1.50.60	0,1007	5	50	5	1	0,384	15,336
Et.2.50.60	0,1003	5	50	5	1	0,377	15,083
Et.3.50.60	0,1003	5	50	5	1	0,393	15,801
50°C - 20 min							

Et.1.50.20	0,1009	5	50	5	1	0,372	14,771	
Et.2.50.20	0,1009	5	50	5	1	0,383	15,261	14,679
Et.3.50.20	0,1003	5	50	5	1	0,353	14,006	

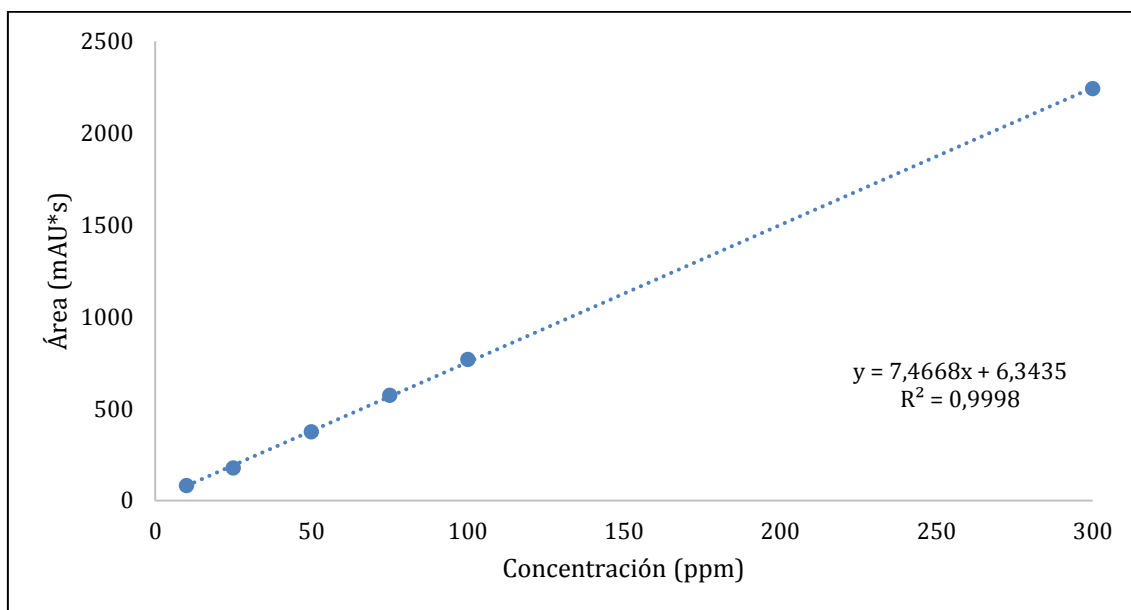
C.4. Desgaste del material vegetal para polifenoles

OPTIMIZACIÓN <i>Baccharis macrantha</i> (Chilca)								
<u>DESGASTE DEL MATERIAL VEGETAL</u>								
POLIFENOLES - Etanol 50%								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio
50°C - 10 min								
1.50E1	0,1005	5	50	5	1	0,308	11,963	
2.50E1	0,1008	5	50	5	1	0,323	12,597	12,683
3.50E1	0,1008	5	50	5	1	0,343	13,490	
1.50E2	0,1005	5	50	5	1	0,241	8,962	
2.50E2	0,1008	5	50	5	1	0,227	8,310	8,319
3.50E2	0,1008	5	50	5	1	0,213	7,685	
1.50E3	0,1005	5	50	5	1	0,090	2,198	
2.50E3	0,1008	5	50	5	1	0,082	1,834	1,941
3.50E3	0,1008	5	50	5	1	0,081	1,790	
1.50E4	0,1005	5	50	5	1	0,051	0,451	
2.50E4	0,1008	5	50	5	1	0,055	0,628	0,599
3.50E4	0,1008	5	50	5	1	0,057	0,718	
1.50E5	0,1005	5	50	5	1	0,021	-0,893	
2.50E5	0,1008	5	50	5	1	0,025	-0,711	-0,608
3.50E5	0,1008	5	50	5	1	0,036	-0,220	
60°C - 20 min								
1.50E1	0,1005	5	50	5	1	0,422	17,069	

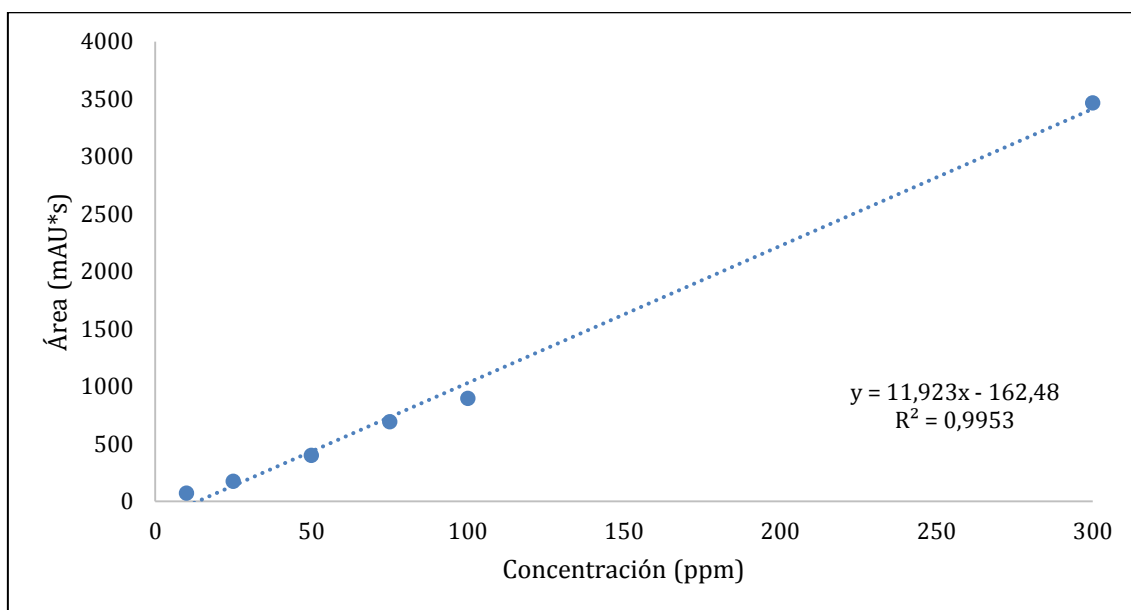
2.50E1	0,1005	5	50	5	1	0,458	18,682	17,774
3.50E1	0,1004	5	50	5	1	0,433	17,572	
1.50E2	0,1005	5	50	5	1	0,206	7,394	
2.50E2	0,1005	5	50	5	1	0,190	6,677	7,605
3.50E2	0,1004	5	50	5	1	0,236	8,743	
1.50E3	0,1005	5	50	5	1	0,097	2,512	
2.50E3	0,1005	5	50	5	1	0,110	3,094	2,826
3.50E3	0,1004	5	50	5	1	0,105	2,872	
1.50E4	0,1005	5	50	5	1	0,034	-0,310	
2.50E4	0,1005	5	50	5	1	0,039	-0,086	-0,146
3.50E4	0,1004	5	50	5	1	0,040	-0,042	
1.50E5	0,1005	5	50	5	1	0,014	-1,206	
2.50E5	0,1005	5	50	5	1	0,020	-0,937	-1,057
3.50E5	0,1004	5	50	5	1	0,018	-1,028	

ANEXO D

D.1. Curva de calibración de catequina en HPLC



D.2. Curva de calibración para ácido gálico en HPLC



ANEXO E

E.1. Ejemplo del reporte generado por el Software Chem Station de Agilent HPLC

Data File C:\Chem32\...\Calibracion_acido_galicoP2 2019-05-21 15:19:23\OnlineEdited--811.D
 Sample Name: AG-CQ 300ug/ml

```

-----
                          Area Percent Report
-----
Sorted By      :      Signal
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  4.788 BB  0.0624  5.19205  1.20299  0.0620
2  8.945 BB  0.2169 6292.95654 388.74747 75.1996
3 14.991 BB  0.1211 403.54306  51.65710  4.8223
4 27.263 BB  0.1582 14.19179  1.40063  0.1696
5 28.986 BB  0.1350 1652.45972 183.63692 19.7466

Totals :                      8368.34316 626.64511

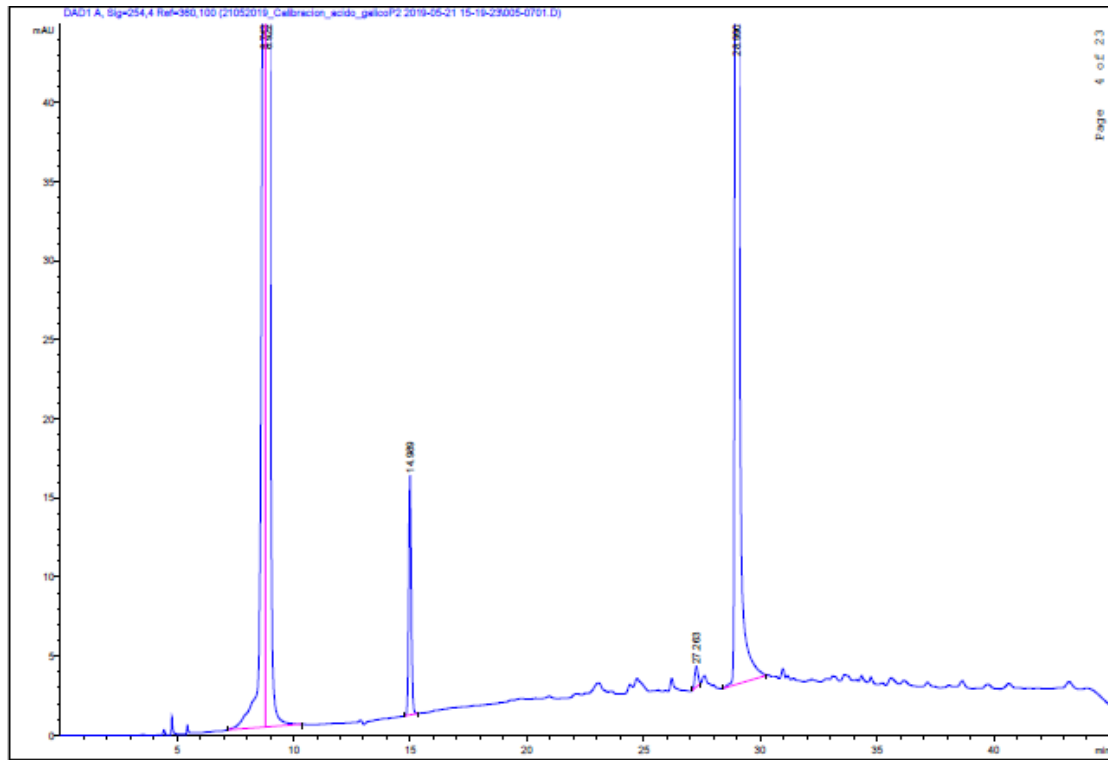
Signal 2: DAD1 B, Sig=214,4 Ref=360,100

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] [min] [min] [mAU*s] [mAU] %
-----|-----|-----|-----|-----|-----
1  3.531 BB  0.0961 12.27319  1.98507  0.0156
2  4.787 BB  0.0498 460.13733 141.84033  0.5854
3  5.505 BB  0.0618 18.70812  4.76171  0.0238
4  8.945 BB  0.2106 2.83854e4 1813.43958 36.1100
5 10.958 BB  0.5098 279.35989  6.96749  0.3554
6 14.991 BB  0.1340 2.18175e4 2495.99194 27.7548
7 15.959 BB  0.1150 10.11668  1.38831  0.0129
8 20.381 BV  0.1296 22.67311  2.71127  0.0288
9 20.966 VB  0.2023 55.39766  4.24414  0.0705
10 27.275 BV  0.2052 80.50504  5.75450  0.1024
11 27.666 VB  0.1614 24.42708  2.16880  0.0311
12 28.986 BB  0.1397 2.59366e4 2809.82935 32.9949
13 30.971 BB  0.1225 10.19380  1.34367  0.0130
14 32.202 BB  0.1191 18.32804  2.45511  0.0233
15 33.371 BV  0.6107 339.04099  6.81134  0.4313
16 34.354 VB  0.8221 368.66144  5.64366  0.4690
17 35.603 BV  0.2715 302.63846 16.69287  0.3850
18 36.161 VB  0.3137 335.27957 15.29796  0.4265
19 38.661 BB  0.2653 37.56749  2.05441  0.0478
20 39.807 BB  0.2267 15.88352  1.11188  0.0202
21 40.722 BB  0.4127 77.41592  2.54619  0.0985

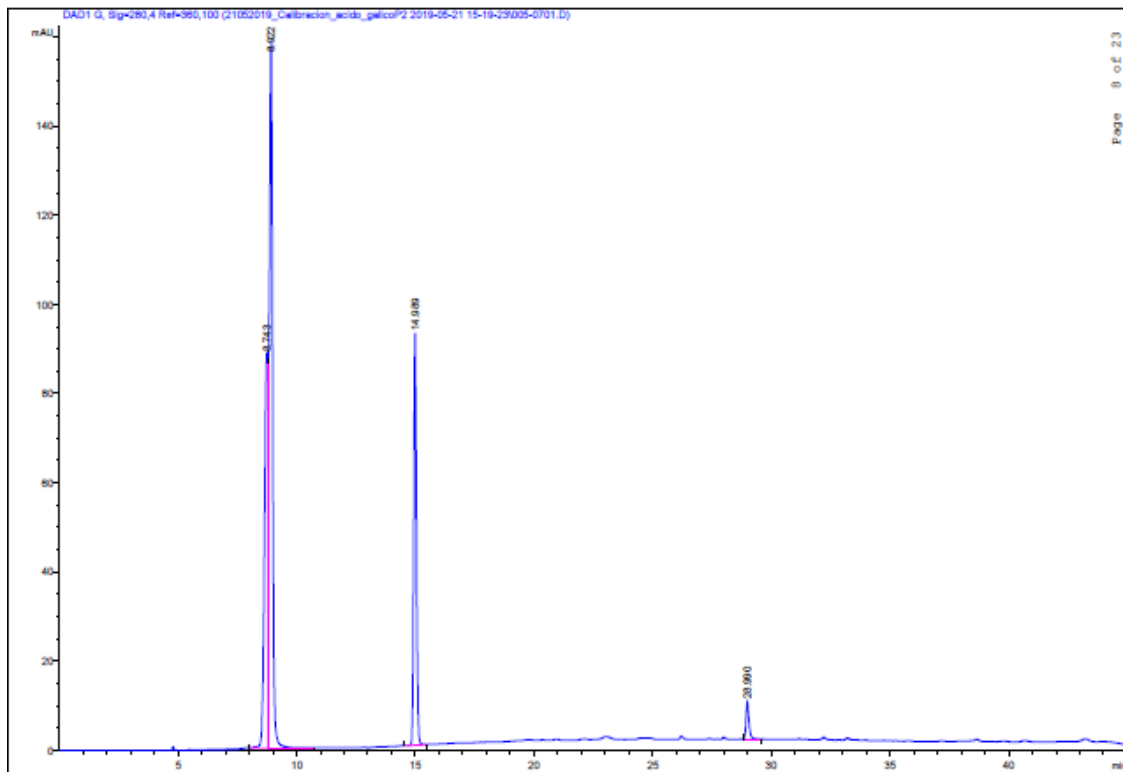
Totals :                      7.86081e4 7345.03957
  
```

LC-100TA 5/27/2019 5:21:20 PM SYSTEM Page 10 of 25

**E.2. Ejemplo de la señal para la curva de calibración de AG y CQ. Señal a 214 nm
- 100 µg/ml**



**E.3. Ejemplo de la señal para la curva de calibración de AG y CQ. Señal a 280 nm
- 100 µg/ml**



ANEXO F

F.1. Análisis de varianza para la concentración de flavonoides por Solvente

Recurso	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	82,9685	8	10,3711	76,64*	0,0000*
Dentro de grupos	2,43589	18	0,135327		
Total (Corr.)	85,4044	26			

*El valor marcado en rojo muestra diferencia significativa entre disolventes.

Fuente: StatGraphics Centurion

F.2. Análisis de varianza para la concentración de polifenoles por Solvente

Recurso	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
Entre grupos	186,292	8	23,2865	115,38	0,0000
Dentro de grupos	3,63271	18	0,201817		
Total (Corr.)	189,925	26			

Fuente: StatGraphics Centurion

F.3. Análisis de varianza multifactorial para diseño factorial $A * B$

Recursos	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
<i>EFECTOS PRINCIPALES</i>					
A: Temperatura	7,72376	1	7,72376	63,03	0,0000
B: Tiempo	3,55345	2	1,77673	14,50	0,0006
<i>INTERACCIONES</i>					
AB	1,47837	2	0,739183	6,03	0,0154
RESIDUAL	1,4706	12	0,12255		
TOTAL (CORREGIDO)	14,2262	17			

Fuente: StatGraphics Centurion

F.4. Análisis de varianza para las medias del porcentaje de protección con EtOH25%

Recurso	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	5733,73	5	1146,75	405,85	0,0000
Dentro de grupos	33,9066	12	2,82555		
Total (Corr.)	5767,64	17			

F.5. Análisis de varianza para las medias del porcentaje de protección con EtOH50%

Recurso	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	2673,92	5	534,784	86,16	0,0000
Dentro de grupos	74,4784	12	6,20653		
Total (Corr.)	2748,4	17			

Fuente: StatGraphics Centurion

ANEXO G

G.1. Actividad antiinflamatoria por estabilización de RBCs

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra lisis (%)
Diclofenaco	25	$96,32 \pm 1,13$
	50	$97,12 \pm 0,72$
	75	$96,88 \pm 1,10$
	100	$91,62 \pm 1,60$
	200	$92,95 \pm 5,32$
	500	$91,42 \pm 0,92$
EtOH25%	25	$97,23 \pm 0,42$
	50	$96,96 \pm 0,38$
	75	$95,89 \pm 0,93$
	100	$95,26 \pm 1,32$
	200	$94,66 \pm 0,81$
	500	$48,17 \pm 3,66$
EtOH50%	25	$93,14 \pm 0,05$
	50	$93,24 \pm 0,58$
	75	$93,36 \pm 0,59$
	100	$93,70 \pm 0,30$
	200	$92,82 \pm 0,72$
	500	$60,56 \pm 6,00$

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

G.2. Actividad antiinflamatoria por desnaturalización de proteína

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra desnaturalización proteica (%)
Diclofenaco	100	$26,80 \pm 0,93$
	200	$37,60 \pm 2,20$
	500	$51,69 \pm 1,33$
	1000	$61,40 \pm 3,08$
EtOH25%	100	$21,10 \pm 3,10$
	200	$44,20 \pm 1,04$
	500	$49,72 \pm 0,77$
	1000	$42,32 \pm 1,40$
EtOH50%	100	$29,51 \pm 2,36$
	200	$41,70 \pm 2,36$
	500	$50,71 \pm 0,43$
	1000	$42,39 \pm 0,93$

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

G.3. Actividad antioxidante del estándar de referencia

BHT ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra peroxidación lipídica (%)	Coefficiente de variación (%)
100	$82,75 \pm 0,32$	0,39
200	$84,52 \pm 0,57$	0,68
500	$91,42 \pm 1,21$	1,33
1000	$95,54 \pm 0,79$	0,82

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

G.4. Actividad antioxidante del extracto obtenido con EtOH25

Extracto con EtOH25 ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra peroxidación lipídica (%)	Coefficiente de variación (%)
100	$59,85 \pm 8,16$	14,93
200	$64,54 \pm 8,14$	12,37
500	$77,00 \pm 8,65$	12,03
1000	$67,88 \pm 5,21$	7,28

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

G.5. Actividad antioxidante del extracto obtenido con EtOH50

Extracto con EtOH50 ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra peroxidación lipídica (%)	Coefficiente de variación (%)
100	$51,29 \pm 5,82$	10,65
200	$61,86 \pm 5,92$	9,00
500	$73,11 \pm 3,14$	4,36
1000	$71,48 \pm 3,41$	4,77

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda