



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



---

**Tema: “Caracterización y estudio de actividades biológicas de los extractos obtenidos a partir del Sambuel (*Hedyosmum luteynii* Todzia)”**

---

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

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

**Autora:** Ximena Sabina Mendoza Murillo

**Tutora:** PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

**Ambato-Ecuador**

**Octubre - 2019**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**PhD. Dayana Cristina Morales Acosta**

### **CERTIFICO:**

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, 20 de Septiembre del 2019



**PhD. Dayana Cristina Morales Acosta**

**C.I. 180413557-0**

**TUTORA**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Ximena Sabina Mendoza Murillo, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



---

Ximena Sabina Mendoza Murillo

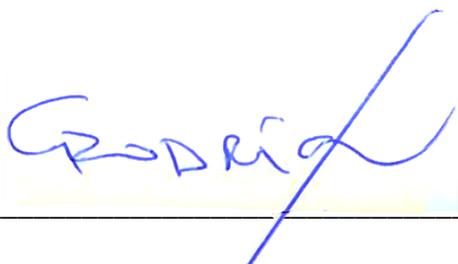
C.I. 120647018-7

**AUTORA**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia, firman:



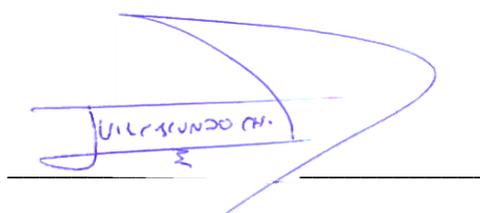
---

Presidente del Tribunal



---

Mg. Paulo Santiago Baquero Icaza  
C.I: 1803233541



---

PhD. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro  
C.I: 1802738102

## **DEDICATORIA**

Este estudio va dedicado a mi madre Elsa Murillo cuya abnegación, carácter implacable y valores éticos inquebrantables son una de las mejores enseñanzas que pudo haberme inculcado.

A mi hermana Eliana Mendoza, mi segunda madre, cuya dulzura y sensibilidad me han permitido sentir y ver el mundo de una manera diferente, sin maldad ni rencores, y su pasión por los alimentos fue influyente al elegir mi carrera universitaria.

A mi padre William Mendoza por enseñarme a soñar, porque siempre me ha apoyado en los retos que me propongo por imposible que parezcan.

Al ex presidente de la república del Ecuador Rafael Correa Delgado y al Instituto de Fomento al Talento Humano (IFTH) por creer en el potencial ecuatoriano y haberme permitido llevar a cabo mis estudios universitarios de tercer nivel.

## AGRADECIMIENTOS

“El poder creativo de la naturaleza está más allá del instinto de destrucción del hombre”  
- *Julio Verne* –

Agradezco a Dios por la diversidad paradisiaca que existe en Ecuador, por esa belleza natural que se refleja en cada paisaje de cada región de mi hermoso país y por colocarme en el momento y lugar indicado para poder conocer un ápice de él mediante la investigación.

A la **comunidad del CERRO TELIGOTE**, quienes me permitieron acceder a este lugar sagrado para la recolección de las muestras de sambuel que hicieron este estudio posible y al Dr. Walter Simbaña quién ayudó en la identificación y recolección de la planta.

A los proyectos de investigación: “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usadas en el Ecuador” y al proyecto de canje de deuda Ecuador-España, quienes financiaron los reactivos para los análisis realizados y a los ingenieros Mario y Mónica a cargo del laboratorio canje de deuda Ecuador-España en cuyas instalaciones realicé la parte experimental de este estudio.

A mi tutora y docente PhD. Dayana Morales, cuya calidad humana, inteligencia y pasión científica valoro y admiro desde que le conocí; gracias por los conocimientos compartidos y por acompañarme durante todo este proceso.

Al Dr. Jorge Briceño quien estuvo siempre presto a ayudarme en todo momento, por su asistencia en la determinación de metales y en los ascensos al cerro Teligote.

A mi grupo de investigación “Polifenoles” Dianita Muñoz, André Rosero y Melani Espinoza. cuyo apoyo y amistad fue crucial para llevar el proyecto a cabo; y, en especial a mi confidente y compañero Alex Tigsilema por su paciencia y cariño sincero; con quien espero poder compartir muchas experiencias más en el futuro.

A mis amigas Angélica Sumba y Danna Castillo, personas cuya amistad ha sido mi fortaleza en los momentos difíciles de mi carrera universitaria.

A mis docentes Dr. Freddy del Pozo, Dr. Milton Ramos, Dr. Paulo Baquero, Mg. Diego Salazar, Dra. Nahir Dugarte, Mg. Liliana Acurio, Dra. Jacqueline Ortiz, Ing. Silvia Sánchez, Mg. Joel Hernández cuya experticia e interés mostrado en cada área de su especialización, han marcado un antes y un después en mi formación profesional y/o personal.

*Gracias a Todos*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	II
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	IV
DEDICATORIA .....	V
AGRADECIMIENTOS .....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	VII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN EJECUTIVO .....	XVII
ABSTRACT .....	XVIII
CAPÍTULO 1 .....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
<b>1.1 Antecedentes Investigativos.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Sambuel.....	2
1.1.2 Antioxidantes .....	5
1.1.3 Métodos de Caracterización.....	6
1.1.3.1 Cromatografía .....	7
Cromatografía de capa fina.....	7
Cromatografía líquida de alto rendimiento.....	7
1.1.3.2 Actividades Biológicas .....	8
Actividad antioxidante.....	8
Actividad anti-inflamatoria.....	8
1.1.3.3 Metales .....	9
<b>1.2 Objetivos.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Objetivo General .....	10
1.2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>1.3 Hipótesis .....</b>	<b>11</b>

1.3.1	Señalamiento de variables .....	11
CAPÍTULO 2	.....	12
METODOLOGÍA	.....	12
<b>2.1</b>	<b>Materiales .....</b>	<b>12</b>
2.1.1	Material Vegetal.....	12
2.1.2	Material de Laboratorio.....	12
2.1.3	Reactivos .....	12
2.1.4	Equipos.....	13
<b>2.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Preparación de la muestra .....	14
2.2.2	Obtención de los extractos .....	15
2.2.3	Optimización de las condiciones de extracción .....	15
2.2.4	Cuantificación de polifenoles y flavonoides totales.....	16
	Polifenoles .....	16
	Flavonoides.....	16
2.2.5	Caracterización.....	16
	Cromatografía de capa fina (TLC): .....	17
	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):.....	17
2.2.6	Actividad antioxidante .....	17
	Método TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances):.....	18
2.2.7	Actividad anti-inflamatoria.....	18
	Desnaturalización de proteínas .....	18
	Estabilización de HRBC (Human Red Blood Cell).....	19
2.2.8	Metales .....	20
CAPÍTULO 3	.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	.....	21
<b>3.1</b>	<b>Optimización del proceso de extracción .....</b>	<b>21</b>
3.1.1	Optimización del disolvente.....	22
3.1.2	Optimización de la temperatura .....	24
3.1.3	Optimización del tiempo .....	25
3.1.4	Desgaste del material vegetal.....	27
<b>3.2</b>	<b>Caracterización de los extractos.....</b>	<b>30</b>
3.2.1	Cromatografía de capa fina (TLC).....	30
3.2.2	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) .....	31

<b>3.3</b>	<b>Actividades Biológicas.....</b>	<b>33</b>
3.3.1	Actividad Antiinflamatoria - método HRBC .....	33
3.3.2	Actividad Antiinflamatoria – método desnaturalización de proteínas .	36
3.3.3	Actividad antioxidante - método TBARS .....	38
<b>3.4</b>	<b>Metales.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Verificación de Hipótesis .....</b>	<b>42</b>
3.5.1	Condiciones del proceso de extracción .....	42
3.5.2	Actividades Biológicas.....	42
CAPÍTULO 4 .....		43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		43
<b>4.1</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>44</b>
ANEXOS .....		60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Rangos de detección y modo de operación utilizados en la determinación de metales.....	21
<b>Tabla N° 2.</b> Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos aplicando diferentes concentraciones de disolventes.....	23
<b>Tabla N° 3.</b> Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos aplicando diferentes temperaturas en el proceso de extracción.....	25
<b>Tabla N° 4.</b> Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos en el proceso de extracción con variación del tiempo.....	27
<b>Tabla N° 5.</b> Contenido de polifenoles y flavonoides totales con desgaste del material vegetal variando el número de extracciones.....	28
<b>Tabla N° 6.</b> Porcentaje de actividad antiinflamatoria en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones - método HRBC .....	35
<b>Tabla N° 7.</b> Porcentaje de actividad antiinflamatoria en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones - método desnaturalización de proteínas .....	37
<b>Tabla N° 8.</b> Porcentaje de actividad antioxidante en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones – método TBARS .....	39
<b>Tabla N° 9.</b> Curvas de calibrado y concentraciones de los minerales determinados en las hojas secas de sambuel .....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Flores y hojas de <i>Hedyosmum luteynii</i> Todzia.....	2
<b>Fig. 2.</b> Ubicación del punto de recolección .....	15
<b>Fig. 3</b> Concentración de polifenoles en mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm vs el número de extracciones realizadas a 50°C.....	29
<b>Fig. 4</b> Concentración de polifenoles en mg de catequina/g muestra seca a 500 nm vs el número de extracciones realizadas a 60°C.....	29
<b>Fig. 5</b> Perfiles de huellas dactilares de los extractos de las hojas de <i>H. luteynii</i> en placas HPTLC .....	31
<b>Fig. 6</b> Perfiles cromatográficos de los extractos etanólico (EtOH) y metanólico (MeOH) de las hojas de <i>H. luteynii</i> obtenidos mediante HPLC a diferentes longitudes de onda .....	33

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>A. RESULTADOS EXPERIMENTALES</b> .....	<b>61</b>
<b>Curvas de calibración de los estándares</b> .....	<b>62</b>
<b>Fig. A1</b> Curva de calibración de ácido gálico .....	62
<b>Fig. A2</b> Curva de calibración de catequina .....	62
<b>Optimización del proceso de extracción</b> .....	<b>63</b>
<b>Optimización del disolvente</b> .....	<b>63</b>
<b>Tabla A1.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de polifenoles.....	63
<b>Tabla A2.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de flavonoides.....	64
<b>Optimización de la temperatura</b> .....	<b>65</b>
<b>Tabla A3.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de polifenoles. ....	65
<b>Tabla A4.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de flavonoides. ....	66
<b>Optimización del tiempo</b> .....	<b>67</b>
<b>Tabla A5.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de polifenoles.....	67
<b>Tabla A6.</b> Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de flavonoides... ..	68
<b>Desgaste del material vegetal</b> .....	<b>69</b>
<b>Tabla A7.</b> Datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de polifenoles.....	69
<b>Tabla A8.</b> Datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de flavonoides .....	70
<b>Actividades biológicas</b> .....	<b>71</b>
<b>Actividad antiinflamatoria-método HRBC</b> .....	<b>71</b>
<b>Tabla A9.1</b> Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC en los extratos del estándar diclofenaco ....	71
<b>Tabla A9.2</b> Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC en los extratos de etanólico y metanólico de sambuel. ....	72
<b>Actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteínas</b> .....	<b>73</b>

<b>Tabla A10.1</b> Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteínas en el estándar diclofenaco.....	73
<b>Tabla A10.2.</b> Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteínas en los extractos de etanólico y metanólico de sambuel.....	74
<b>Actividad antioxidante-método TBARS.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla A11.</b> Datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante en los extractos de etanólico y metanólico de sambuel y el estándar diclofenaco.....	75
<b>Metales.....</b>	<b>75</b>
<b>Tabla A12.</b> Condiciones utilizadas en la determinación de minerales analizados por llama.....	76
<b>Tabla A13.</b> Condiciones utilizadas en la determinación de minerales analizados por horno de grafito.....	76
<b>B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>77</b>
<b>Determinación de polifenoles.....</b>	<b>78</b>
<b>Optimización del disolvente.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla B1.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de polifenoles.....	78
<b>Tabla B2.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	78
<b>Optimización de la temperatura .....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla B3.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de polifenoles.....	78
<b>Tabla B4.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	79
<b>Optimización del tiempo .....</b>	<b>79</b>
<b>Tabla B5.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de polifenoles.....	79
<b>Tabla B6.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de polifenoles .Método:	

Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza .....	79
<b>Desgaste del material vegetal.....</b>	<b>80</b>
<b>Tabla B7.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en el desgaste del material vegetal para la determinación de polifenoles.....	80
<b>Tabla B8.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza .....	80
<b>Determinación de flavonoides .....</b>	<b>81</b>
<b>Optimización del disolvente.....</b>	<b>81</b>
<b>Tabla B9.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de flavonoides.....	81
<b>Tabla B10.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de flavonoides .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	81
<b>Optimización de la temperatura .....</b>	<b>81</b>
<b>Tabla B11.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de flavonoides.....	81
<b>Tabla B12.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de flavonoides .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	82
<b>Optimización del tiempo .....</b>	<b>82</b>
<b>Tabla B13.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de flavonoides.....	82
<b>Tabla B14.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de flavonoides .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	82
<b>Desgaste del material vegetal.....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla B15.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en el desgaste del material vegetal para la determinación de flavonoides .....	83
<b>Tabla B16.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de flavonoides .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza .....	83
<b>Actividades biológicas .....</b>	<b>84</b>

<b>Actividad antiinflamatoria-método HRBC .....</b>	<b>84</b>
<b>Tabla B17.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el extracto etanólico.....	84
<b>Tabla B18.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el extracto metanólico.....	84
<b>Tabla B19.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el estándar ...	84
<b>Tabla B20.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	85
<b>Tabla B21.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	85
<b>Actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína .....</b>	<b>85</b>
<b>Tabla B22.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el extracto etanólico .....	85
<b>Tabla B23.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el extracto metanólico .....	86
<b>Tabla B24.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el estándar .....	86
<b>Tabla B25.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	86
<b>Tabla B26.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	86
<b>Actividad antioxidante-método TBARS .....</b>	<b>87</b>
<b>Tabla B27.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el extracto etanólico.....	87

<b>Tabla B28.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el extracto metanólico.....	87
<b>Tabla B29.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el estándar.....	87
<b>Tabla B30.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	87
<b>Tabla B31.</b> Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.....	88
<b>C. FOTOGRAFÍAS DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>89</b>
<b>Recolección de las hojas de Sambuel .....</b>	<b>90</b>
<b>Fig. C1.</b> Socialización del proyecto de estudio y petición de permiso para la recolección del material vegetal en la comunidad Teligote.....	90
<b>Fig. C2.</b> Ascensos al cerro Teligote para la recolección de las hojas de sambuel .....	90
<b>Fig. C3.</b> Preparación de las hojas de sambuel .....	91
<b>Optimización del proceso de extracción .....</b>	<b>91</b>
<b>Fig. C4.</b> Determinación de polifenoles (A) y de flavonoides (B) .....	91
<b>Fig. C5.</b> Desgaste del material vegetal en la optimización del proceso de extracción.....	92
<b>Fig. C6.</b> Evaporación de los disolventes en el rotavapor .....	92
<b>Actividades Biológicas .....</b>	<b>93</b>
<b>Fig. C7.</b> Resultados luego de realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria-método HRBC a diferentes concentraciones de los extractos de sambuel .....	93
<b>Fig. C8.</b> Extracto de las hojas de sambuel a diferentes concentraciones y los resultados luego de realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteína con albúmina de huevo .....	93
<b>Fig. C9.</b> Tubos de ensayo con aceite de oliva y los extractos liofilizados de sambuel a diferentes concentraciones en el ensayo de actividad antioxidante, antes de la oxidación.....	93

## RESUMEN EJECUTIVO

*Hedyosmum luteynii* (sambuel) es una planta del cerro Teligote, un bosque nativo y de gran importancia para la cultura Salasaca del cantón Pelileo, debido a las propiedades medicinales de las plantas que allí crecen.

El presente estudio tuvo como finalidad la optimización del proceso de extracción de antioxidantes (polifenoles y flavonoides) de las hojas de sambuel, la caracterización (mediante TLC y HPLC) y el estudio de las actividades biológicas (antiinflamatoria y antioxidante) de los extractos optimizados. Además, se determinó el contenido de diez minerales (Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Ni, Zn) en las hojas.

La optimización se realizó variando 4 factores (disolvente, temperatura, tiempo y desgaste del material vegetal) y se demostró que las mejores condiciones para la extracción de polifenoles fueron: etanol al 50%, 50°C y 10 min, mientras que para flavonoides el mejor disolvente fue el metanol al 50%, 60°C y 10 min. En ambos casos se determinó que se necesitan 3 extracciones para obtener un rendimiento mayor al 90% (37,328 mg AG/g para la determinación de polifenoles y 30,321 mg CQ/g para la determinación de flavonoides).

Además, se determinó que los extractos optimizados presentaban actividad tanto antiinflamatoria [98.13% y 97.89% a 500 µg/ml mediante el método de estabilización de HRBC para los extractos etanólico y metanólico respectivamente; y, 80.82% (extracto etanólico) y 48.63% (extracto metanólico) mediante el método de desnaturalización de proteínas] como antioxidante [61,72% (extracto etanólico) y 47,32% (extracto metanólico) mediante el método TBARS], comparable con los estándares utilizados. Mientras que, en la determinación de minerales, los que estuvieron presentes en mayor cantidad fueron el magnesio (558,4 mg/100g de base seca), el calcio (111,1 mg/100g de base seca) y el manganeso (43,1 mg/100g de base seca).

**Palabras clave:** *Hedyosmum luteynii*, sambuel, polifenoles, flavonoides optimización, actividades biológicas.

## ABSTRACT

*Hedyosmum luteynii* (sambuel) is a plant from the Teligote hill, which is a native forest of great importance for the Salasaca culture of the Pelileo canton, due to the medicinal properties of the plants that grow there.

The objective of this study was to optimize the extraction process of antioxidants (polyphenols and flavonoids) from sambuel leaves, characterization (using TLC and HPLC) and also the study of the biological activities (anti-inflammatory and antioxidant) of optimized extracts. In addition, the content of ten minerals (Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb, Ni, Zn) in the leaves was determined.

The optimization was carried out by modifying 3 factors (solvent, temperature and time) and showed that the best condition for the extraction of polyphenols was: 50% ethanol, 50 °C and 10 min, while for flavonoids the best condition was 50% methanol, 60 °C and 10 min. In both cases, it was determined that 3 extractions were needed to obtain a yield greater than 90% (37,328 mg AG/g for polyphenols and 30,321 mg CQ/g for flavonoids).

The optimized extracts showed both anti-inflammatory [98.13% and 97.89% at 500 µg/ml by the HRBC stabilization method for the ethanolic and methanolic extracts respectively; and, 80.82% (ethanolic extract) and 48.63% (methanolic extract) using the protein denaturation method] and antioxidant activities [61.72% (ethanolic extract) and 47.32% (methanolic extract) using the TBARS method], comparable with the standards used. Whereas, magnesium (558.4 mg /100g of dry base), calcium (111.1 mg/100g of dry base) and manganese (43.1 mg/100g of dry base) were the minerals with the highest concentration in the sambuel leaves.

**Keywords:** *Hedyosmum luteynii*, sambuel, polyphenols, flavonoids optimization, biological activities.

# CAPÍTULO 1

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes Investigativos

Ecuador es un país que cuenta con una gran biodiversidad de especies vegetales, ya que con apenas el 2 % de la superficie total de la Tierra, posee el 10% de todas las plantas que existen en el mundo (**Viteri et al., 2016**), de las que se han reportado 5172 especies con algún uso medicinal o alimenticio y 2430 de estas se encuentran en la región Sierra (**De la Torre et al., 2008**) distribuidas en cerros y parques protegidos, como es el caso del Cerro Teligote un bosque nativo de 407.40 hectáreas reconocido a nivel nacional y por la red de Socio Bosque, como un bosque protector (**Aimacaña, 2010**) y que se encuentra ubicado en la provincia de Tungurahua, cantón Pelileo, a 01°22'22" latitud sur y 78°34'55 longitud oeste (**Jaramillo, 2008**).

El cerro Teligote es considerado un lugar sagrado para los Salasacas, un pueblo indígena que habita a los pies de este desde la época incaica y cuyo origen se atribuye a los aymaras (Bolivia), traídos por los incas en calidad de mitimaes (pueblos desplazados como parte de la estrategia política de los incas para evitar la subversión de los pueblos conquistados) (**Villarías, 1995**). Los chamanes de Salasaca consideradas personas con poder espiritual y mediadores entre el cuerpo humano, el alma y la naturaleza (**Corr, 2010**) utilizan las plantas del cerro Teligote para tratar enfermedades comunes como la gripe, dolor de cabeza o infecciones estomacales y para realizar rituales de curación y ofrendas (**Whitten, 2003**). Por ello los conocimientos empíricos desarrollados por los Salasacas representan una riqueza cultural ancestral invaluable para el país.

### 1.1.1 Sambuel

Una de las plantas encontradas en el cerro Teligote es el sambuel.

El sambuel (*Hedyosmum luteynii* Todzia) es un árbol de la familia Chloranthaceae de 3-16 m de altura y un diámetro de 7-50 cm, con hojas brillantes aromáticas, flores verdes carentes de estambres o carpelos y frutas negras (Todzia, 2015). Esta especie endémica de las cordilleras de Ecuador y Colombia se puede encontrar a 2600-3600 m.s.n.m (Torres, *et al.*, 2018). Representa una de las 40 especies encontradas cuyo género es reportado con un índice de valor de importancia ecosistémico (Zamora & Arturo, 2016). *H. luteynii* tiene un amplio uso en la medicina ancestral del Ecuador, para tratar dolores abdominales, problemas digestivos, calambres estomacales, neuralgia, reumatismo, además de ser antiséptico, afrodisíaco y diaforético (Gupta, 2006).



**Fig 1.** Flores y hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia

Fuente: [https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Muestra-de-la-planta-Hedyosmun-luteynii-Todzia-del-genero-Hedyosmun-de-la\\_fig1\\_325521043](https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Muestra-de-la-planta-Hedyosmun-luteynii-Todzia-del-genero-Hedyosmun-de-la_fig1_325521043)

Los estudios realizados en *H. luteynii* son escasos. Siendo el trabajo realizado por Torres *et al.*,(2018) denominado “Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae)” el único reportado hasta la fecha. En este las muestras recolectadas en el bosque natural Jacarón, cantón Colta,

provincia de Chimborazo, Ecuador, fueron sometidas a hidrodestilación para la extracción de su aceite esencial siendo luego analizado mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés); logrando identificar 28 compuestos, de los cuáles los que en mayor proporción se encontraron fueron:  $\alpha$ -felandreno (32.72%),  $\alpha$ -pineno (13.20%), (Z)- $\beta$ -ocimeno (10.99%), silvestreno (6.51%), biciclogermacreno (5.05%), 1.8-cineol (4.95%), (E)- $\beta$ -ocimeno (3.88%) y germacreno D (3.20%). Llegando a ser el silvestreno el compuesto reportado por primera vez y que diferencia al aceite de *H. luteynii* del resto de especies del mismo género cuyo aceite ha sido estudiado.

Tal es el caso del estudio de **Zamora & Arturo, (2016)** titulado “Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo)”, donde las muestras fueron hidrodestiladas y analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas. Se reporta al germacreno D (8,9%) como el único compuesto en común entre los aceites esenciales de estas dos especies. Los otros componentes reportados fueron:  $\alpha$ -eudesmol (11,4%), trans- $\beta$ -cariofileno (7,8%), elemol (5,8%) y óxido de cariofileno (5,3%).

En el estudio titulado “Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica” (**Mundina et al., 2000**). Los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de hojas y frutos de *Hedyosmum mexicanum* Cordemoy, hojas de *Hedyosmum bonplandianum* Kunth y hojas de *Hedyosmum costaricensis* C.E. Wood se analizaron mediante GC-FID, GC-MS, GC-IR y  $^{13}\text{C}$ -RMN. Hidrocarburos monoterpénicos, especialmente sabineno (28% en las hojas y 25 % en los frutos), y sesquiterpenos que contienen oxígeno, principalmente furanodieno (20% en las hojas y 12% en los frutos), fueron los principales constituyentes encontrados en *H. mexicanum*. Los hidrocarburos monoterpenos también fueron el principal grupo de componentes (sabineno 15%, (E)- $\beta$ -ocimeno 11%) en el aceite de *H. bonplandianum*, mientras que el aceite de *H. costaricensis* estuvo constituido principalmente por hidrocarburos sesquiterpénicos (63%), especialmente el germacreno-D (32%). El análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN de este último aceite permitió identificar el compuesto *1\beta,6 \alpha*-dihydroxy-4(14)-eudesmene.

Mientras que **Lorenzo, Loayza, & Dellacassa, (2003)** en su estudio “Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia”; analizaron los aceites esenciales de *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach y *Hedyosmum scabrum* (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach mediante GC-FID y CG-MS; obteniendo que los hidrocarburos monoterpenos (64%), principalmente el  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno (24 y 23.5 %) y monoterpenos que contienen oxígeno (linalool (6.1%) y 1.8-cineol (3.7%)) son los principales constituyentes del aceite de *H. angustifolium*, mientras que en el aceite esencial de *H. scabrum* se encontró un mayor contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos el germacreno-D (13%),  $\alpha$ -gurjuneno (6.6%) y 3',4'-dimethoxy propiodenol (6.6%) y monoterpenos ( $\delta$ -3-careno (12.1%))

En la literatura no se han reportado estudios acerca de la caracterización de compuestos fenólicos y las actividades biológicas asociadas a *H. luteynii*, lo más cercano a ello son los estudios realizados para otra especie de *Hedyosmum*, llamada *brasiliense*.

**Kirchner et al., (2010)** en su estudio “Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil” evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *H. brasiliense* contra 6 especies de bacterias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *S. saprophyticus*) y 6 especies de hongos (*Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes*) mediante el método de dilución en agar. Los resultados mostraron que el aceite esencial tenía baja actividad contra los microorganismos Gram- negativos, pero una notable actividad contra las bacterias Gram- positivas y hongos en concentraciones mínimas (0.125 a 2.5% v/v).

**Murakami et al., (2017)** en su estudio “Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils”, determinó en aceite esencial de *H. brasiliense* la actividad antimicrobiana mediante bioautografía y la actividad antioxidante por los métodos DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hidrate) y  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico. Reporta al curzene como el posible responsable de la actividad antifúngica y un potencial antioxidante fuerte en  $\beta$ -caroteno / ácido linoleico con un IC<sub>50</sub> desde 80 a 180  $\mu$ g/ml y

una débil actividad de captura de radicales en el método DPPH con IC<sub>50</sub> desde 2516.18 a 3783.49 µg/ml.

Otros estudios en plantas del género *Hedyosmum* se enfocan en el aislamiento y análisis de lactonas sesquiterpénicas un derivado del germacreno-D de interés farmacológico (Acebey *et al.*, 2010, 2007; Amoah & Biavatti, 2018; Amoah *et al.*, 2013, 2015; Bercion, Martin, Baltaze, & Bourgeois, 2005; Fan *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2012; Guerrini *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2008; Tolardo *et al.*, 2010; Tretin *et al.*, 1999).

### 1.1.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos químicos que sintetizan las plantas y se consideran no esenciales para su metabolismo básico. Estos son introducidos en el cuerpo humano mediante la alimentación y este los utiliza para prevenir o retardar la oxidación de las células (Ramírez *et al.*, 2012).

La oxidación de las células se produce cuando dentro de sus actividades normales se generan sustancias oxidantes. Algunas de las más comunes son el peróxido de hidrógeno, anión superóxido y el radical hidróxido. Estos compuestos, cuando se encuentran en altas concentraciones pueden dañar las proteínas y lípidos de las células o transformar las células normales a cancerosas mediante un proceso que se conoce como aducción del ADN. (Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa, 2018; Seifried, *et al.*, 2007)

Los antioxidantes pueden ser enzimáticos como la catalasa y la glutatión peroxidasa o no enzimáticos como las vitaminas, tioles, metales y fitoquímicos como los polifenoles. Estos últimos son los responsables del color de los frutos; así, entre éstos hay pigmentos como las antocianinas, que otorgan tonos rojizos, azules y violetas a las fresas y uvas o los flavonoles, de tonalidad crema-amarillenta, que están presentes principalmente en las partes externas de frutas y hortalizas (Barberán *et al.*, 2001) y son reconocidos por sus propiedades medicinales y farmacológicas, (Jaramillo *et al.*,

2016) debido a la capacidad que tienen para captar radicales libres (**Ovando et al., 2009**); contribuyendo a la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas como problemas de corazón, diabetes y cáncer de colon (**Chasquibol et al., 2003; Robles et al., 2005; Velasquez, 2006**).

Las sustancias fenólicas o polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos atendiendo a su estructura básica. Así, los flavonoides incluyen a las antocianinas, los flavonoles y las flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavanoles. Los fenil propanoides incluyen a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico). También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol) y los derivados del ácido benzoico (ácido gálico y elágico, etc.). Sólo de flavonoides se conocen más de 5.000 compuestos diferentes en la naturaleza. Muchos compuestos fenólicos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal y por tanto tienen importancia en la calidad de los mismos. (**Barberán, 2003**).

Estos compuestos debido a lo expuesto anteriormente han cobrado interés científico y comercial; investigando así el efecto de los antioxidantes como parte de una dieta sana y aislándolos de sus fuentes naturales para su uso como conservantes alimentarios (**Jiménez, 2005**) o en la prevención de enfermedades (**Chasquibol et al., 2003; Robles et al., 2005; Velasquez, 2006**).

### **1.1.3 Métodos de Caracterización**

La creciente demanda de métodos analíticos altamente sensibles y selectivos para la caracterización de compuestos fenólicos en plantas ha permitido el desarrollo de gran cantidad de técnicas para detectar la actividad antioxidante en extractos complejos o distinguir los componentes de plantas con carácter antioxidante. Entre ellas se encuentran: espectrofotometría, electroforesis, espectroscopía y cromatografía. (**Ignat, Volf, & Popa, 2011**)

### **1.1.3.1 Cromatografía**

La cromatografía es una técnica analítica de gran aplicabilidad para la caracterización de compuestos fenólicos y ha permitido avanzar en el estudio de polifenoles. Tiene muchas ventajas como: costos más bajos, tiempo de análisis corto, posibilidad de detección múltiple y derivación específica **(Cimpoi, 2006)**.

Entre los métodos cromatográficos más utilizados se encuentran la cromatografía de capa fina, la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de gases, entre otras. Todas estas técnicas buscan conseguir la separación de los compuestos en base a su diferente afinidad por la fase móvil y la fase estacionaria.

#### **Cromatografía de capa fina**

La cromatografía de capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla. Consiste en una lámina de vidrio o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria) en la que se deposita la muestra; la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente. Esta técnica permite entre otras cosas: determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras y obtener una especie de huella dactilar de la mezcla de compuestos **(UAM, 2018)**.

#### **Cromatografía líquida de alto rendimiento**

La cromatografía líquida de alto rendimiento (en inglés high performance liquid chromatography o HPLC) se encuadra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de la fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las

substancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, provocando su separación (**Hernández, 2007**).

### **1.1.3.2 Actividades Biológicas**

La actividad biológica es la capacidad de una entidad molecular específica para lograr un efecto biológico definido en un objetivo vivo. Se mide en términos de potencia o concentración de la entidad molecular, necesaria para producir el efecto (**Batista, 2013**).

Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles presentan tanto actividad antioxidante como anti-inflamatoria.

#### **Actividad antioxidante**

A través de la actividad antioxidante se busca medir la capacidad que tienen los compuestos fenólicos para estabilizar un radical libre a través de la donación de un electrón, o bien, de un átomo de hidrógeno. Como resultado de tal interacción, el radical libre pierde su reactividad y se bloquea la propagación de la oxidación de células que desencadena (**Atasoy, Yesilnacar, & Atasoy, 2019; Avello & Suwalsky, 2006**).

Para la medición de la actividad antioxidante uno de los métodos más conocidos es el TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Este procedimiento mide el malondialdehído (MDA) formado como producto principal de la degradación de hidroperóxidos generados por la oxidación de la muestra. Cada mol de MDA reacciona con dos moles de ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto de color rosa que puede ser medido espectrofotométricamente a 532–535 nm (**Londoño, 2012**).

#### **Actividad anti-inflamatoria**

La inflamación es un proceso normal del cuerpo humano en respuesta al dolor que involucra una compleja activación de enzimas. La sobreproducción de estas últimas

puede inducir estrés oxidativo y generar daños a nivel celular, que promueven la aparición de enfermedades crónicas **(Cui et al., 2006)**.

Los métodos para el estudio de la actividad anti-inflamatoria se realizan *in vivo* e *in vitro* **(Jaimes, 2009)**. Dentro de los métodos *in vitro* más conocidos se encuentran: a) el de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos (en inglés Human Red Blood Cell o HRBC) que se basa en la protección de la membrana de estas células ante la hemólisis inducida por hipotonicidad y b) el de desnaturalización de proteína en el cual se inhibe la desnaturalización de la albúmina de huevo inducida por temperatura **(García López, 2016)**.

### 1.1.3.3 Metales

Los minerales son sustancias inorgánicas requeridas por el cuerpo en pequeñas cantidades para una variedad de funciones. Son responsables de las funciones estructurales que involucran el esqueleto y los tejidos blandos y de las funciones reguladoras, incluida la transmisión neuromuscular, la coagulación de la sangre, el transporte de oxígeno y la actividad enzimática **(National Research Council, 1989)**.

Existen 16 minerales esenciales: calcio, fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, yodo, selenio, molibdeno, cromo y flúor. **(HFA, 2010)**. El cuerpo requiere diferentes cantidades de cada mineral y los requisitos varían según la edad, el sexo y el estado fisiológico (por ejemplo, el embarazo) **(British Nutrition Foundation, 2018)**. Los minerales se distribuyen ampliamente en los 5 grupos de alimentos (lácteos, carnes y mariscos, vegetales y frutos secos, cereales, grasas) por lo que, con una dieta variada, se puede suplir los requerimientos diarios de estas y otros nutrientes **(Romito & O'Brien, 2018)**.

Sin embargo, la dieta de la mayoría de las poblaciones es frecuentemente deficiente en hierro y zinc, produciendo un aumento de la susceptibilidad y severidad a infecciones **(Albuja, 2012)**. Por otro lado, metales como el cadmio y el plomo son tóxicos aún en concentraciones bajas. La acción del hombre en minas y fábricas libera a la atmósfera estos metales como material particulado que respiramos, contaminan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos **(Gaitán, 2004)**, de ahí la importancia

de su análisis en alimentos y los productos que de estos se deriven.

En la actualidad, existen una amplia variedad de métodos analíticos para la cuantificación de minerales. Los métodos más frecuentemente utilizados incluyen: espectrofotometría, fluorescencia, espectroscopia de absorción o de emisión atómica (**Amador, 2010**). De estos, uno de los más usados es la espectroscopía de absorción atómica en la que se emplea una fuente de radiación externa de la misma longitud de onda que la de absorción del analito. Esta radiación pasa a través de la llama donde están los átomos del analito que la absorben y generan así una señal (**Harris, 2012**). Mediante este método, más de 60 elementos metálicos pueden determinarse en un amplio rango de concentraciones, con una buena sensibilidad y precisión. Diferentes formas de introducción de la muestra y atomización han sido desarrolladas para esta técnica la cual puede automatizarse fácilmente para el análisis rutinario (**Kastenmayer, 1997**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Estudiar la fitoquímica del sambuel (*Hedyosmum luteynii* Todzia)

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- a) Establecer el mejor método para la extracción de polifenoles y flavonoides del sambuel (*Hedyosmum luteynii* Todzia).
- b) Caracterizar los extractos mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- c) Determinar la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos liofilizados.
- d) Cuantificar el contenido de micronutrientes (zinc y hierro) y metales pesados (plomo y cadmio) mediante espectroscopía de absorción atómica.

### 1.3 Hipótesis

#### Hipótesis 1.

- **Ho:** Las condiciones del proceso de extracción no afectan el contenido de polifenoles y flavonoides totales del sambuel.
- **Hi:** Las condiciones del proceso de extracción afectan el contenido de polifenoles y flavonoides totales del sambuel.

#### Hipótesis 2.

- **Ho:** Los extractos del sambuel obtenidos a través del proceso optimizado no presentan actividades biológicas.
- **Hi :** Los extractos del sambuel obtenidos a través del proceso optimizado presentan actividades biológicas.

#### 1.3.1 Señalamiento de variables

#### Hipótesis 1.

- **Variable dependiente:** concentración de polifenoles y flavonoides totales.
- **Variable independiente:** disolvente, concentración, temperatura y tiempo de extracción.

#### Hipótesis 2.

- **Variable dependiente:** porcentajes de las actividades biológicas.
- **Variable independiente:** concentraciones de los extractos.

## **CAPÍTULO 2**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1 Materiales**

##### **2.1.1 Material Vegetal**

Hojas de sambuel recolectadas en el cerro Teligote.

##### **2.1.2 Material de Laboratorio**

- Vasos de precipitación de 100 y 250 ml
- Balones de aforo de 5, 10, 25, 100 y 250 ml
- Probetas 250, 500, 1000 ml
- Micropipetas: 20-200 $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas: 20-200 $\mu$ l; 100-1000  $\mu$ l
- Tubos falcon 15 ml; 50 ml
- Espátula y agitadores magnéticos
- Tubos de vidrio 10 ml (VanTubo)
- Eppendorf 2 ml
- Viales 10 ml
- Viales HPLC Wicom de 2 ml con tapa 12x 32 mm
- Filtros 0.45  $\mu$ m
- Placas cromatográficas Camag 10x10cm sílica gel 60 F 254 (TLC y HPTLC)
- Columna HPLC eclipse XDB-C18 4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m (Agilent Technologies)

##### **2.1.3 Reactivos**

- Ácido gálico (Sigma, 97,5%)
- Catequina hidrato grado HPLC (Sigma, 98%)
- Butylhidroxitolueno (Sigma, 99%)
- Follin & Ciocalteu's (Sigma, 2N)
- Alcohol etílico (Sharlau, 99,8%)
- Metanol (Applichem, 99,8%)

- Metanol grado HPLC (Merck, 99%)
- Nitrito de sodio (Lobachemie, 98%)
- Hidróxido de sodio (Merck, 99%)
- Ácido fórmico (Analar, 90%)
- Cloruro de aluminio hexahidratado (Lobachemie)
- Ácido acético glacial (Fisher)
- Ácido tiobarbitúrico (Applichem)
- Tolueno (Merck)
- Acetato de etilo (Fisher)
- Ácido clorhídrico grado metal traza (Fisher)
- Ácido nítrico grado metal traza (Fisher)

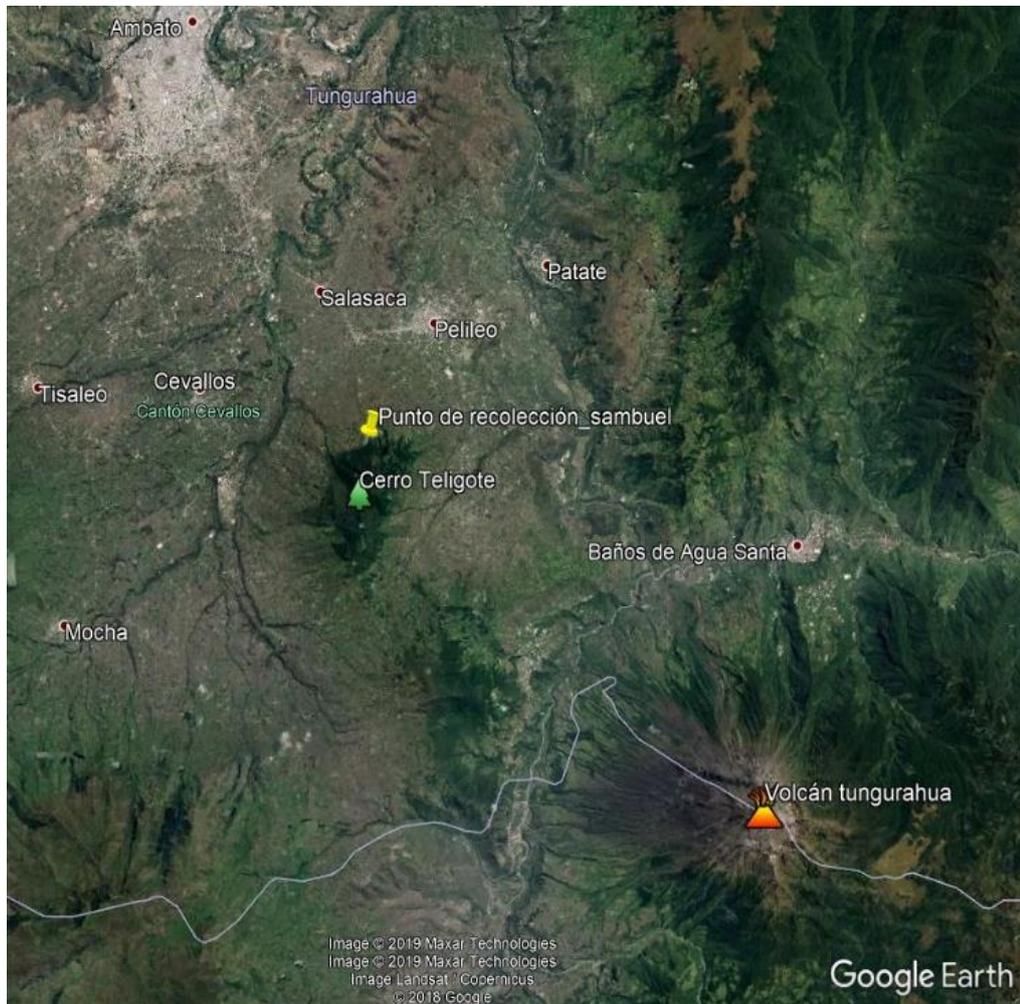
#### **2.1.4 Equipos**

- Centrifuga (Eppendorf)
- Centrifuga (Bunsen)
- Espectrofotómetro (HACH)
- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Placa de agitación (VWR)
- Vortex (VWR)
- Rotavapor (Eyela)
- Liofilizador (LABCONCO)
- Equipo de cromatografía de líquidos (Agilent Technologies)
- Equipo de cromatografía de capa fina (CAMAG)
- Equipo de espectroscopía de absorción atómica (P&G)
- Baño de ultrasonido (Branson 2800)
- Estufa de secado (Binder)
- Mufla (Nabertherm)
- Ultracongelador (Binder)

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparación de la muestra

Hojas de *H. luteynii* fueron recolectadas en Abril del 2018 en el cerro Teligote, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua – Ecuador a una altura de 3311 msnm (Ver Fig. 2 01°22'0.1.6" S; 78°33'51.6" O), previo a la identificación por parte del botánico Walter Simbaña, catedrático de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. La planta fue identificada usando la guía “Plantas de los Remanentes del Cerro Teligote” (Simbaña & Vargas, 2017) Un espécimen de la planta fue depositado en el herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato.



**Fig. 2.** Ubicación del punto de recolección

Fuente: <https://www.earth.google.com>

El material vegetal colectado fue almacenado en fundas de papel para su posterior transporte al laboratorio de Canje de Deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, donde fueron limpiadas y secadas en una estufa a 40°C durante 72 h. Las muestras secas se molieron para reducir su tamaño de partícula hasta polvo y se conservaron en fundas ziploc en un ambiente seco y protegido de la luz.

### **2.2.2 Obtención de los extractos**

La obtención de los extractos se realizó según lo descrito por **Knežević *et al.*, (2011)**, con ciertas modificaciones. Brevemente, 0,1 g de la muestra se mezcló con 1 ml del disolvente y se homogenizó en un vórtex. La muestra se colocó en un baño de ultrasonido, luego se centrifugó a 14900 rpm, 10 °C por 10 minutos y el sobrenadante se secó en una estufa a 40 °C por 2 horas y 30 minutos.

El extracto obtenido fue llevado a 5ml con agua destilada para su posterior análisis.

### **2.2.3 Optimización de las condiciones de extracción**

Se realizó la optimización siguiendo la metodología expuesta anteriormente y considerando 3 factores de modificación (disolvente, temperatura y tiempo). Para el disolvente se probó: agua, etanol (25%, 50%,75% y puro) y metanol (25%, 50%, 75% y puro). Mientras que para la temperatura se trabajó a 30, 40, 50 y 60 °C con tiempos de 5, 10 y 20 minutos en el ultrasonido para determinar las condiciones óptimas de la extracción.

Con las mejores condiciones de trabajo se realizó el desgaste del material vegetal, para ello, se aumentó la cantidad de muestra a 3 g y se realizaron 5 extracciones sucesivas; añadiendo nuevo disolvente para cada extracción. Los extractos fueron evaporados en un rotavapor a 35°C y 60 Hpa y posteriormente liofilizados.

#### **2.2.4 Cuantificación de polifenoles y flavonoides totales.**

##### **Polifenoles**

Para la cuantificación del contenido de fenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu, según la metodología propuesta por **Vasco *et al.*, (2008)**, con ciertas modificaciones. Brevemente, una alícuota de 50 µl del extracto obtenido previamente, del blanco o del estándar se colocó en un balón de 5 ml, más 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, y esta combinación se dejó reaccionar durante 3 minutos bajo agitación continua. Posteriormente se añadió 2 ml de una solución de carbonato de sodio (75g/L) y se homogenizó. El volumen se lo aforó a 5 ml con agua destilada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, la absorbancia se midió a una longitud de onda de 760 nm y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (AG) usando una curva de calibración en el rango de 50 – 300 ppm.

##### **Flavonoides**

Para la cuantificación del contenido de flavonoides se utilizó el método descrito por **Dewanto *et al.*, (2002)** con ciertas modificaciones. A 250 µl del extracto obtenido se le añadieron 1,25 ml de agua, más 75 µl de nitrito de sodio (5%) y se dejó reaccionar durante 6 minutos para luego añadir 150 µl de cloruro de aluminio (10%), se esperó 5 minutos más e inmediatamente se añadieron 0,5 ml de hidróxido de sodio (1M) y se aforó con agua a 5 ml. Ipso facto el complejo coloreado generado se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm y los resultados se expresaron como equivalentes de catequina (CQ) usando una curva de calibración en el rango de 5 – 100 ppm.

#### **2.2.5 Caracterización**

Para la caracterización de los extractos se emplearon dos técnicas de separación:

### **Cromatografía de capa fina (TLC):**

Se llevó a cabo en placas de vidrio (10 x 10 cm) previamente cubiertas con sílica gel 60 F\_254, según la metodología propuesta por **Knežević *et al.*, (2011)** y **Khatoon, Singh, Srivastava, Rawat, & Mehrotra, (2008)** con las respectivas modificaciones. Para ello, alícuotas de 6 µl de los extractos etanólicos/metanólicos, tanto de la muestra (15 mg/ml de los liofilizados) como de los estándares (ácido gálico y catequina a 5 mg/ml) previamente filtrados (microfiltros de 0,4 µm) se aplicaron sobre las placas mediante el sistema de inyección automático Camag (Automatic TLC sampler 4) con el software Wincats 1.4.9. Para la corrida cromatográfica se utilizó como fase móvil una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (40:40:2). Los platos se secaron con una corriente de aire por unos cuantos minutos y se realizó la detección bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm.

### **Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):**

Se llevó a cabo en condiciones de gradiente; utilizando agua (A) y metanol (B) como fase móvil (en 35 min de 5-95% B) y una columna eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm, 5µm) como fase estacionaria, según la metodología descrita por **Saéñz *et al.*, (2009)**, **Guillarme *et al.*, (2010)** , **Parets *et al.*, (2016)** con ciertas modificaciones. Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. El caudal fue de 0,8 ml/min y la temperatura de la columna y del automuestreador fue de 20 °C.

Para la identificación de los compuestos se trabajó con ácido gálico y catequina, se comparó los tiempos de retención de los estándares con relación a los obtenidos de los extractos. Se trabajó a 214, 254, 280, 320, 360 y 366 nm.

#### **2.2.6 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos fue evaluada mediante el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

### **Método TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances):**

Se siguió la metodología descrita por **Rojano *et al.*, (2008)** con modificaciones. Brevemente, en tubos de vidrio se pesaron tanto muestra como BHT (Butil-Hidroxitolueno) a varias concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) y se mezcló con 10 ml de aceite de oliva “El arbolito”. La mezcla se dejó en agitación constante a 100°C durante 48 horas. Luego los tubos se enfriaron y centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos.

Se tomó 0,95 g del aceite resultante y se mezcló con una solución de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 1mM en ácido acético glacial al 50%) en relación 1:1. Se agitó y se incubó a 100 °C durante 1 hora. También se preparó un control con el mismo procedimiento. Luego los tubos se enfriaron en agua durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó, eliminando el sobrenadante y midiendo el residuo a 532 nm. El porcentaje de actividad antioxidante se calculó usando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de Actividad Antioxidante} = \frac{(A_m - A_c)}{(A_0 - A_c)} \times 100$$

Donde:

Am es la absorbancia de la muestra de ensayo

Ac es la absorbancia del control (aceite oxidado sin antioxidante)

Ao es la absorbancia del aceite sin oxidar

**(Cárdenas, Carpio, Welbaum, Vilcacundo, & Carrillo, 2018; Quinga, 2017)**

#### **2.2.7 Actividad anti-inflamatoria.**

La actividad anti-inflamatoria *in vitro* de los extractos obtenidos se midió mediante los siguientes métodos.

#### **Desnaturalización de proteínas**

Se evaluó por el método de la desnaturalización de proteína según lo descrito por **Alhakmani *et al.*, (2013)**, con modificaciones. Diclofenaco de sodio (Merck, 25 mg/ml), un poderoso anti-inflamatorio no esterooidal se usó como fármaco estándar. La mezcla de la reacción consistió de 2 ml del extracto o del estándar a diferentes

concentraciones (100, 200, 500 y 1000 µg/ml) y 2 ml de solución albúmina de huevo (1mM) en buffer fosfato (0,15 M, pH = 6,4), se incubó a 37 °C por 15 minutos. La desnaturalización se indujo manteniendo la mezcla de reacción a 70 °C en un baño con agua por 10 minutos. Luego de enfriar, se midió la absorbancia a 660 nm, usando como blanco agua mili-q. Cada experimento se realizó por triplicado y se tomó el promedio. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la proteína se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = 100 - \left( \frac{A_t}{A_c} \times 100 \right)$$

Donde:

At es la absorbancia de la muestra de ensayo

Ac es la absorbancia del control

### **Estabilización de HRBC (Human Red Blood Cell)**

Este ensayo se llevó a cabo mediante el método de **Vadivu, (2018)** con ciertas modificaciones. Se colectó la sangre de voluntarios que no hayan ingerido antiinflamatorios no esteroideos las últimas dos semanas antes del experimento y se mezcló la sangre con volúmenes iguales de una solución de Alsever (2 % dextrosa, 0.8 % citrato de sodio, 0.5 % ácido cítrico y 0.42 % cloruro de sodio); se centrifugó para luego ser lavada (tres veces) con una solución isosalina al 0.85%. Se conservó el resultante en refrigeración hasta el ensayo. Posteriormente se prepararon varias concentraciones de los extractos y del estándar en agua destilada (25, 50, 75, 100, 200, 500 y 1000 µg/ml), y en un tubo de ensayo se añadió 1ml de buffer fosfato (pH 6.4), 2ml de solución hipotónica (0,36%), 0,5 ml de la suspensión de glóbulos rojos (10% v/v) y 0,5 ml del extracto o del estándar. La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se midió el sobrenadante a 540nm. Como estándar de referencia se empleó diclofenaco de sodio (Merck ,25mg/ml). El porcentaje de inhibición se calculó usando la misma fórmula descrita en el método de desnaturalización de proteína.

### 2.2.8 Metales

Para la determinación de metales (calcio, cadmio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, plomo y zinc) en las hojas de sambuel, se realizó la digestión de la muestra según el método AOAC 985.35 para eliminar la materia orgánica. Brevemente, se pesó 0.6 g de la muestra en crisoles previamente llevados a peso constante (550°C durante 3 horas), y se calcinó a 550°C durante 24 horas. Se enfrió en el desecador durante 30 minutos. A cada crisol se añadió 1ml de HNO<sub>3</sub> (ácido nítrico) concentrado grado metal traza y 2ml de HCl (ácido clorhídrico) concentrado grado metal traza, se calentó a 75°C y se dejó actuar durante 15 minutos. Luego el remanente se filtró (0.45 µm) y se aforó a 25 ml con HNO<sub>3</sub> al 1% y se analizaron los metales según las condiciones óptimas (*Ver Anexos, Tabla A12*) para el espectrofotómetro de absorción atómica PG - AA500 (Cook Book). Los resultados se contrastaron con las curvas de calibrado para cada metal en los rangos descritos a continuación:

**Tabla N° 1.** Rangos de detección y modo de operación utilizados en la determinación de metales.

Elemento	Rango de detección de la curva de calibrado(ppm)	Sistema de atomización
Ca	0.5-3	Llama
Cu	0.1-1.75	
Fe	0-3	
Mg	0.04-0.4	
Mn	0-1	
Zn	0-2	
Cd	0.006-0.06	Horno de grafito
Co	0.025-0.2	
Ni	0.025-0.4	
Pb	0.05-0.6	

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Optimización del proceso de extracción

**Oreopoulou, Tsimogiannis, & Oreopoulou, (2019)** y otros autores (**Baharuddin, Nordin, Morad, Aris, & Yunus, 2018; Both, Chemat, & Strube, 2014; Sakanaka, Tachibana, & Okada, 2005**) concuerdan en que los factores que pueden influir en el proceso de extracción de metabolitos secundarios son: la composición del disolvente, la temperatura de extracción, el tiempo y/o la cantidad de veces que se necesita repetir el proceso para lograr el mayor rendimiento y el mayor contenido fenólico. Por ello estos fueron los factores que se tomaron en cuenta para la optimización del proceso de extracción de polifenoles y flavonoides totales en las hojas de sambuel.

El contenido de polifenoles se midió mediante el método fotométrico de Folin-Ciocalteu. El método se basa en la reducción de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico en solución alcalina a óxidos cromógenos de color azul intenso de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia de estos es proporcional al número de grupos fenólicos aromáticos y se utiliza para su cuantificación con ácido gálico como estándar (**Xi et al., 2009**). Este método permite la extracción de una amplia gama de polifenoles, como: fenoles simples, glucósidos flavonoides, flavanoles como la catequina, procianidinas (dímeros de catequina y epicatequina) y taninos condensados (oligómeros o polímeros de flavanoles) e hidrolizables (polímeros del ácido gálico y elágico) (**Cheyrier, 2005; Vasco et al., 2008**). Para la determinación del contenido de flavonoides se utilizó un método colorimétrico en donde el cloruro de aluminio reacciona con las flavonas y flavanoles, creando un complejo coloreado que va del amarillo al naranja dependiendo de la concentración de estos en la muestra (**Salamanca, Correal, & Principal, 2007**)

Para este estudio se preparó una curva de calibración de ácido gálico (AG) (50 a 300 ppm) y los resultados, determinados por la ecuación de regresión lineal ( $y = 0.111x - 0.0409$ ,  $R^2 = 0.994$ ), se expresaron como mg de ácido gálico equivalentes por gramo

de la muestra seca. Mientras que, para el contenido de flavonoides se realizó una curva de calibración de catequina (CQ) (50 a 100 ppm) y los resultados, determinados por la ecuación de regresión de la curva de calibración ( $y = 0.02909x - 0.0206$ ,  $R^2 = 0.997$ ), se expresaron como mg de catequina equivalentes por gramo de la muestra seca.

### 3.1.1 Optimización del disolvente

Los solventes utilizados fueron etanol y metanol a 4 concentraciones diferentes (25,50,75,99,8% y agua). Se eligieron estos, debido a la afinidad que han demostrado los compuestos fenólicos por los disolventes polares en estudios previos (Daneshfar, Ghaziaskar, & Homayoun, 2008; Sakanaka *et al.*, 2005)

Los resultados obtenidos para la optimización del primer factor: concentración del disolvente (Ver Tabla N° 2), fueron mayores a los obtenidos por Güler & Candemir, (2015) en hojas de vid ( 9.72 a 14.25 mg AG /g para polifenoles y 5.08 a 6.22 mg CQ/g para flavonoides). Se observa un mayor contenido de fenoles que de flavonoides; esta misma tendencia se reporta en hojas de *Curcuma Zedoaria* (125.75 mg/g para polifenoles y 6.12 mg/g para flavonoides ) (Azahar, Gani, & Mohd Mokhtar, 2017) y hojas de *Zingiber officinale* Roscoe (33.0 a 39.1 mg/g para polifenoles y 5.54 a 7.05 mg/g para flavonoides) (Ghasemzadeh, Jaafar, & Rahmat, 2010).

**Tabla N° 2.** Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos aplicando diferentes concentraciones de disolventes.

Optimización por disolventes									
Disolvente	Etanol				Metanol				Agua
Concentración del disolvente	25%	50%	75%	99,8%	25%	50%	75%	99,8%	
mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm*	17,725 ± 0,481 <sup>t,u</sup>	20,005 ± 0,393 <sup>v</sup>	14,018 ± 1,040 <sup>w</sup>	3,094 ± 0,341 <sup>x</sup>	14,663 ± 0,231 <sup>w</sup>	16,584 ± 0,332 <sup>t</sup>	18,385 ± 0,732 <sup>u</sup>	8,451 ± 0,911 <sup>y</sup>	10,342 ± 1,155 <sup>z</sup>
mg de catequina/g muestra seca a 500 nm*	12,538 ± 0,359 <sup>a</sup>	13,827 ± 0,714 <sup>b</sup>	10,374 ± 0,852 <sup>c</sup>	2,509 ± 0,668 <sup>d</sup>	11,459 ± 0,372 <sup>a,c</sup>	14,014 ± 0,280 <sup>b</sup>	13,923 ± 0,792 <sup>b</sup>	7,586 ± 0,800 <sup>e</sup>	7,961 ± 0,570 <sup>e</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar

<sup>t,u,v,w,x,y,z</sup> Valores en la misma fila con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre disolventes para la cuantificación de polifenoles ( $p < 0,05$ ).

<sup>a,b,c,d</sup> Valores en la misma fila con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre disolventes para la cuantificación de flavonoides ( $p < 0,05$ ).

- Mejor condición seleccionada (disolvente) para la cuantificación de polifenoles.
- Mejor condición seleccionada (disolvente) para la cuantificación de flavonoides.

El etanol y el metanol son los disolventes más utilizados para la extracción cuantitativa de polifenoles de plantas aromáticas (**Oreopoulou et al., 2019**). El rendimiento tanto en la extracción de fenoles totales como de flavonoides disminuyó al aumentar la concentración de etanol y metanol (superior al 50%); mientras que, al comparar el rendimiento en los disolventes puros, fue el agua el mejor. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por **Xi et al., (2009)** y **Bouras et al., (2015)** donde la concentración óptima de medio alcohólico se encontraba entre 40 y 50% para la extracción de polifenoles. Además, el rendimiento de extracción en plantas depende en gran medida de la polaridad del solvente, que determina cualitativa y cuantitativamente los compuestos antioxidantes extraídos (**Franco et al., 2008**); de hecho, cuando se agrega agua al etanol y al metanol, la polaridad del solvente aumenta (**Ćujić et al., 2016**) y esto afecta positivamente la solubilidad de los compuestos fenólicos en la solución.

Debe considerarse que, la eficiencia de un solvente depende principalmente de su capacidad para disolver grupos fenólicos específicos, mientras que, la solubilidad de los polifenoles depende principalmente de los grupos hidroxilo, del tamaño molecular y la longitud del hidrocarburo (**Franco et al., 2008**). Estas diferencias se pueden atribuir a los grupos fenólicos específicos presentes en la planta. Esto explica el hecho de que, en el sambuel, para la extracción de fenoles totales, el mejor disolvente fuera el etanol, mientras que; el metanol dio mejores resultados para la extracción de flavonoides. Las flavonas son un tipo de flavonoides que se disuelven en metanol (**Oreopoulou et al., 2019**), por lo que los resultados sugieren que el extracto de sambuel podría ser rico en estos compuestos.

El análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre el rendimiento de flavonoides extraídos con metanol al 50% y 75%. Sin embargo, debido a que el metanol al 50% requiere de menor gasto de solvente y resulta menos tóxico, se consideró como la mejor concentración de disolvente.

Siendo que, las mezclas etanol-agua (fenoles totales) y metanol-agua (flavonoides) al 50% permitieron obtener las concentraciones más altas de estos metabolitos en los extractos; fueron elegidas para la siguiente etapa del proceso de optimización.

### 3.1.2 Optimización de la temperatura

El incremento de la temperatura en el proceso de extracción mejora la solubilidad de los compuestos fenólicos en los extractos (**Baharuddin et al., 2018**); favoreciendo así a un mayor rendimiento. Sin embargo, a temperaturas mayores de 60°C en la extracción, los compuestos fenólicos podrían degradarse, repercutiendo de manera negativa al rendimiento de la extracción (**Zhou et al., 2013**). Es por ello, que las temperaturas utilizadas en la optimización del proceso de extracción fueron 30, 40, 50 y 60 °C y los resultados se muestran en la Tabla N°3.

**Tabla N° 3.** Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos aplicando diferentes temperaturas en el proceso de extracción.

Optimización con temperaturas					
Disolvente	Temperatura de extracción	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
Etanol 50%	mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm*	17,334 ± 0,270 <sup>i</sup>	14,498 ± 0,135 <sup>j</sup>	21,011 ± 0,248 <sup>k</sup>	21,626 ± 0,651 <sup>k</sup>
Metanol 50%	mg de catequina/g muestra seca a 500 nm*	13,900 ± 0,408 <sup>m</sup>	14,965 ± 0,102 <sup>n</sup>	15,710 ± 0,090 <sup>n</sup>	17,600 ± 0,730 <sup>o</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

<sup>i,j,k</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre temperaturas para la prueba de polifenoles ( $p < 0,05$ ).

<sup>m,n,o</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre temperaturas para la prueba de flavonoides ( $p < 0,05$ ).

■ Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de polifenoles.

■ Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de flavonoides.

Los mejores resultados se obtuvieron a 50 y 60°C, notándose una relación directamente proporcional entre la temperatura y la concentración de polifenoles y flavonoides en los extractos. La misma tendencia obtuvieron **Baharuddin et al.,**

(2018) en hojas de *Clinacanthus nutans* ( 11.05 mg AG/g (30°C) a 13.87 mg AG/g (55°C) para polifenoles y 8.97 mg QE/g (30°C) a 12.25 mg QE/g (55°C) para flavonoides), siendo estos resultados menores a los encontrados en el presente estudio.

En general, cuanto mayor es la temperatura de extracción, mayor es la recuperación de compuestos fenólicos. Una temperatura más alta puede mejorar la recuperación, porque puede extraer algunos polisacáridos pécticos de la pared celular y debilitar su integridad (Sun, Chu, Wu, & Rui, 2001), como resultado, se produce una mayor solubilidad de los compuestos fenólicos, mayores fenómenos de transferencia de calor y masa a través de la matriz de la planta y se mejora el rendimiento (Oreopoulou et al., 2019).

Con las dos mejores condiciones de temperaturas (50 y 60°C) se decidió optimizar el tiempo de extracción, para verificar si el rendimiento presenta diferencia significativa al utilizar estas dos temperaturas cuando el tiempo de extracción incrementa y eventualmente establecer la mejor temperatura.

### 3.1.3 Optimización del tiempo

El tiempo al igual que la temperatura presenta un efecto positivo en el incremento de la concentración de polifenoles y flavonoides de los extractos. Por ende fue el siguiente factor a optimizar; estableciendo 5, 10 y 20 min como los parámetros a evaluar. Las concentraciones resultantes de metabolitos secundarios obtenidas para esta etapa de optimización se reportan en la Tabla N° 4.

**Tabla N° 4.** Contenido de polifenoles y flavonoides totales en los tratamientos en el proceso de extracción con variación del tiempo.

		Optimización con tiempos	
		mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm	mg de catequina/g muestra seca a 500 nm
Temperatura de extracción	Tiempo de extracción (min)	Etanol 50%	Metanol 50%
50 °C	5	21,011 ± 0,248 <sup>f</sup>	15,710 ± 0,079 <sup>k</sup>
	10	22,181 ± 0,113 <sup>g</sup>	16,684 ± 0,034 <sup>l</sup>
	20	22,361 ± 0,094 <sup>g</sup>	16,589 ± 0,121 <sup>l</sup>
60 °C	5	21,626 ± 0,651 <sup>h</sup>	14,965 ± 0,103 <sup>m</sup>
	10	22,706 ± 0,138 <sup>i</sup>	17,497 ± 0,635 <sup>n</sup>
	20	22,841 ± 0,104 <sup>i</sup>	17,944 ± 0,053 <sup>n</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

f,g,h,i Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre tiempos para la prueba de polifenoles ( $p < 0,05$ ).

k,l,m,n Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre tiempos para la prueba de flavonoides ( $p < 0,05$ ).

■ Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de polifenoles.

■ Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de flavonoides.

Los tiempos utilizados para la optimización fueron menores a los utilizados por estudios anteriores en hojas de plantas (Nour, Trandafir, & Cosmulescu, 2016; Sharmila *et al.*, 2016). Generalmente, el aumento del tiempo y la temperatura promueven la solubilidad analítica. Sin embargo, los compuestos fenólicos generalmente se degradan o experimentan reacciones indeseables tales como oxidación enzimática por tiempos de extracción prolongados y altas temperaturas (Gullian & Terrats, 2017). Por, ello, cuando el tiempo aumentó de 10 a 20 min, el rendimiento no incrementó significativamente.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a los 10 y 20 min de extracción para ambas temperaturas, tanto para la extracción de polifenoles como de flavonoides, por ello el tiempo seleccionado fue de 10 min, para conservar los metabolitos secundarios extraídos, facilitar el proceso de extracción y reducir los gastos en recursos.

### 3.1.4 Desgaste del material vegetal

Para el desgaste del material vegetal se realizaron 5 extracciones sucesivas, y se determinó el contenido de polifenoles y flavonoides por cada extracción, con el fin de conocer cuántas veces se puede repetir el proceso en una misma muestra para conseguir el máximo de rendimiento posible. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N°5.

**Tabla N° 5.** Contenido de polifenoles y flavonoides totales con desgaste del material vegetal variando el número de extracciones.

		Desgaste del material vegetal	
		mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm	mg de catequina/g muestra seca a 500 nm
Temperatura y Tiempo de extracción	Número de extracciones	Etanol 50%	Metanol 50%
50 °C x 10 min	1	22,751 ± 0,026 <sup>a</sup>	16,741 ± 1,746 <sup>q</sup>
	2	10,522 ± 0,104 <sup>b</sup>	8,125 ± 0,786 <sup>r</sup>
	3	4,055 ± 0,045 <sup>c</sup>	3,187 ± 0,121 <sup>s</sup>
	4	1,099 ± 0,052 <sup>d</sup>	1,296 ± 0,469 <sup>t</sup>
	5	< LOD	0,471 ± 0,040 <sup>t</sup>
60 °C x 10 min	1	21,836 ± 0,119 <sup>e</sup>	18,070 ± 0,189 <sup>q</sup>
	2	9,292 ± 0,138 <sup>f</sup>	7,678 ± 0,172 <sup>r</sup>
	3	3,079 ± 0,026 <sup>g</sup>	4,573 ± 1,975 <sup>s</sup>
	4	1,024 ± 0,113 <sup>d</sup>	1,308 ± 0,105 <sup>t</sup>
	5	< LOD	0,804 ± 0,091 <sup>t</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar.

<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre tiempos para la prueba de polifenoles ( $p < 0,05$ ).

<sup>q,r,s,t</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre tiempos para la prueba de flavonoides ( $p < 0,05$ ).

- Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de polifenoles.
- Mejores condiciones seleccionadas para la cuantificación de flavonoides

Al realizar extracciones sucesivas se obtuvieron rendimientos significativos hasta la tercera repetición, luego de esta el porcentaje de recuperación fue mínimo (3% para polifenoles y 5% para flavonoides) (Ver Fig.3 y 4), demostrando así el desgaste del material vegetal y estableciendo que con tres extracciones se supera el 90% de

rendimiento. El mecanismo de extracción ultrasónica involucra dos tipos de fenómenos físicos: difusión a través de las paredes celulares y expulsión del contenido celular una vez que las paredes se rompen (Tiwari, 2015), lo que permite que el método sea más efectivo en comparación con métodos convencionales (Zhou et al., 2013).

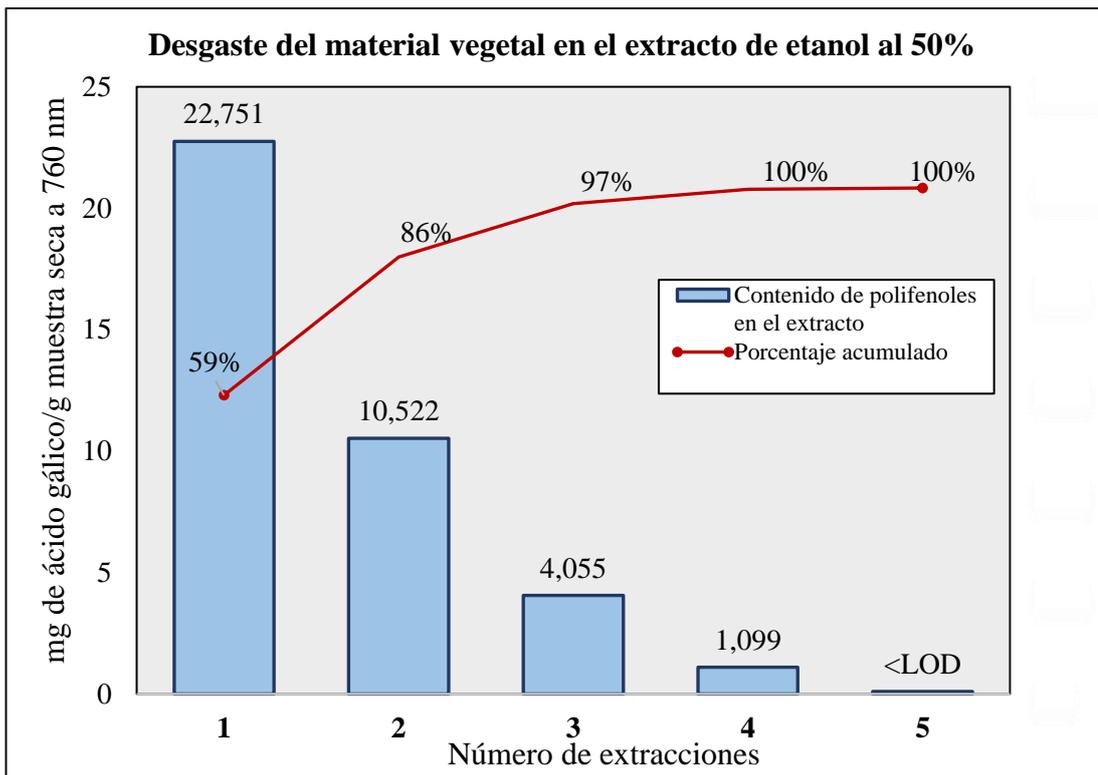
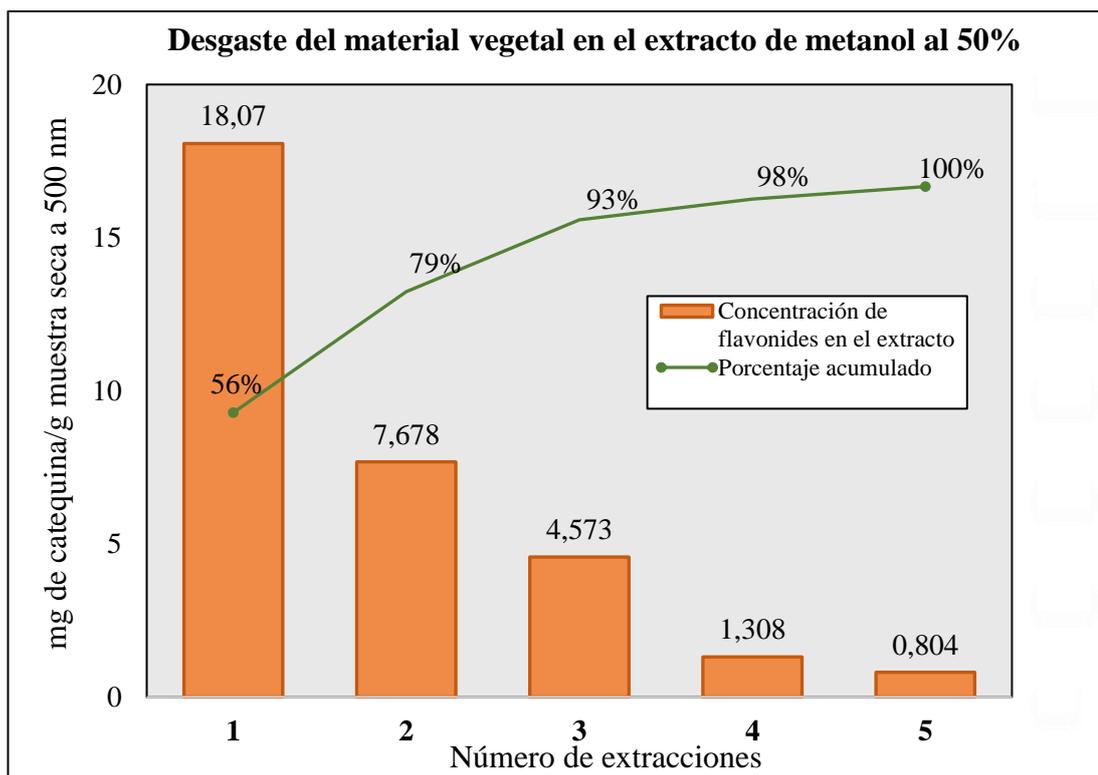


Fig. 3 Concentración de polifenoles en mg de ácido gálico/g muestra seca a 760 nm vs el número de extracciones realizadas a 50°C.



*Fig. 4* Concentración de polifenoles en mg de catequina/g muestra seca a 500 nm vs el número de extracciones realizadas a 60°C.

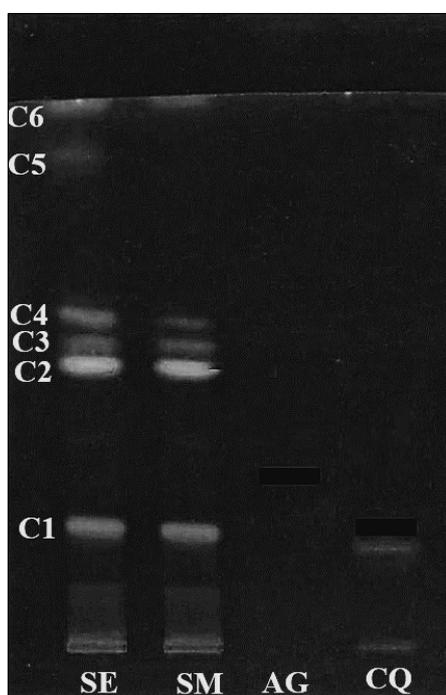
En base a los resultados obtenidos, se eligieron 50°C x 10 min como las mejores condiciones para la extracción de fenoles totales y 60°C x 10 min para la extracción de flavonoides en las hojas de sambuel. Comportamientos similares fueron obtenidos en los estudios de **Gullian & Terrats, (2017)** y **Baharuddin, Nordin, Morad, Aris, & Yunus, (2018)** en hojas de *Brosimum alicastrum* y *C. nutans*, dónde la temperatura afectó de manera diferente a la muestra, consiguiendo condiciones de extracción diferentes para la determinación de fenoles y flavonoides.

## 3.2 Caracterización de los extractos

Los extractos obtenidos a partir del sambuel empleando las mejores condiciones de disolvente, concentración, temperatura y tiempo (etanol 50%, 50 °C x 10 min para la extracción de polifenoles y metanol 50% 60°C x 10min para la extracción de flavonoides) fueron caracterizados cualitativamente mediante TLC y HPLC, con el fin de conseguir el patrón de compuestos presentes en los extractos y con ello una especie de huella dactilar que los caracterice y diferencie de otros extractos.

### 3.2.1 Cromatografía de capa fina (TLC)

La cromatografía se realizó aplicando 6µl de las muestras y usando como fase móvil una mezcla de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (40:40:2). Se reveló a 366 nm (los compuestos solo se pudieron detectar a esta longitud de onda, a 254nm y bajo luz visible no se apreciaron) y los resultados se muestran en la Fig. 5.



**Fig. 5** Perfiles de huellas dactilares de los extractos de las hojas de *H. luteynii* en placas HPTLC de sílica gel 60 F 254 (Merck) de dimensiones 10x10cm con tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (40: 40: 2), como fase móvil. La detección se realizó por iluminación UV a 366nm. SE: Sambuel extraído con etanol 50% (15mg/ml), SM: Sambuel extraído con metanol 50% (15mg/ml), AG: Ácido gálico

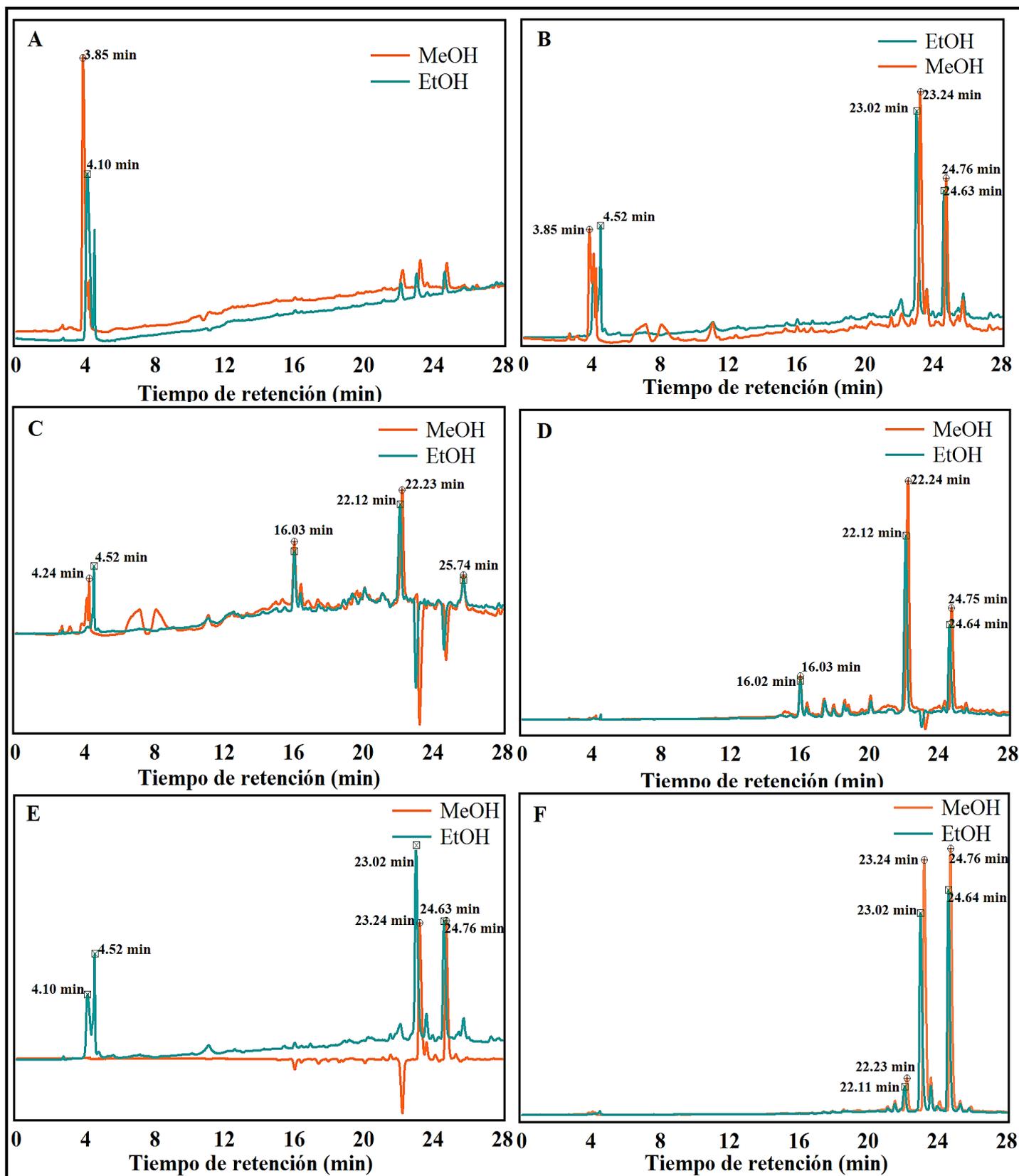
(5mg/ml); CQ: catequina (5mg/ml). Rf de compuestos obtenidos de forma ascendente: C1:0.21 , C2:0.51 , C3:0.55 , C4:0.59 , C5: 0.89, C6: 0.99, AG: 0.3, CQ: 0.23.

Bajo las condiciones establecidas se observaron 6 compuestos representativos, cuyos Rf se reportan en la **Fig. 5**. El compuesto 5 (C5) no se aprecia en el extracto obtenido con metanol al 50%, lo cual estaría directamente relacionado con la solubilidad que los compuestos presentan en los disolventes empleados para su extracción. Además, por la intensidad de las bandas parecería que los compuestos C4, C5 y C6 estuvieran en menor concentración en el extracto metanólico.

Por otra parte, la intensidad de la banda de inyección (base) en ambos extractos sugiere la presencia de más compuestos, pero con una polaridad elevada, razón por la cual bajo las condiciones empleadas no lograron ascender. Finalmente, la presencia de ácido gálico y catequina no se pudo apreciar en ninguno de los extractos.

### **3.2.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)**

Para la caracterización mediante HPLC, los extractos fueron inyectados en un volumen de 10  $\mu$ l a una presión inicial de 130.5 bar y un flujo de 0.8 ml/min; la fase móvil utilizada fue metanol y agua y se trabajó en modo gradiente. Los principales picos se observaron durante los primeros 30 minutos de análisis.



**Fig. 6** Perfiles cromatográficos de los extractos etanólico (EtOH) y metanólico (MeOH) de las hojas de *H. luteynii* obtenidos mediante HPLC a diferentes longitudes de onda. A: 214 nm, B: 254 nm, C: 280 nm, D: 320 nm, E: 360 nm y F: 366 nm

La Fig. 6 presenta los cromatogramas de los extractos obtenidos en condiciones óptimas del proceso de extracción para las hojas de sambuel. Los cromatogramas obtenidos para los extractos etanólico y metanólico presentan el mismo patrón al compararlos a la misma longitud de onda, con picos representativos ligeramente desplazados en los tiempos de retención. Sin embargo, el uso de etanol como disolvente para la extracción de metabolitos secundarios incrementa el contenido de compuestos detectados a 360 nm. Esto, como se había mencionado antes (Ver Optimización por disolvente) se debe a la capacidad del disolvente para disolver grupos fenólicos específicos (**Franco et al., 2008**).

A cada longitud de onda se observan dos picos importantes (a 240 nm: 23.24 y 23.24 min, a 280 nm: 22.12 y 22.23 min, a 320 nm: 22.12 y 22.24 min, a 360 nm: 23.02 y 23.24 min, a 366 nm: 24.64 y 24.76 min ) cuya concentración es mayor en el extracto metanólico en todos los casos (comparación de áreas). Lo que sugiere que este disolvente favorece la extracción de compuestos específicos que deberán ser identificados en estudios posteriores.

Además, se corrieron dos estándares disponibles :ácido gálico y catequina, obteniéndose un tiempo de retención de 8.33 min y 14.97 min a 280 nm, respectivamente. Al comparar estos picos con los obtenidos en los cromatogramas de los extractos de sambuel (a la misma longitud de onda), no se logró identificarlos.

### **3.3 Actividades Biológicas**

#### **3.3.1 Actividad Antiinflamatoria - método HRBC**

La determinación de la actividad antiinflamatoria mediante HRBC se realizó con los extractos liofilizados disueltos en buffer fosfato pH 7.4 a diferentes concentraciones (25,50,75,100,200,500,1000 $\mu$ g/ml). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

**Tabla N° 6.** Porcentaje de actividad antiinflamatoria en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones - método HRBC.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/ml}$	% de Actividad antiinflamatoria a 540nm*
Diclofenaco	25	97,01 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>
	50	97,25 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
	75	97,19 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>
	100	93,53 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>
	200	93,19 $\pm$ 2,79 <sup>b</sup>
Extracto etanólico (50%)	25	92,25 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
	50	92,30 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>
	75	93,00 $\pm$ 0,26 <sup>d</sup>
	100	93,35 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>
	200	94,47 $\pm$ 0,48 <sup>e</sup>
	500	98,13 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
Extracto metanólico (50%)	1000	94,04 $\pm$ 0,44 <sup>e</sup>
	25	90,67 $\pm$ 0,44 <sup>f</sup>
	50	92,70 $\pm$ 0,28 <sup>g</sup>
	75	93,88 $\pm$ 0,17 <sup>h,i</sup>
	100	94,23 $\pm$ 0,21 <sup>h</sup>
	200	93,45 $\pm$ 0,17 <sup>i,j</sup>
	500	97,89 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
1000	93,08 $\pm$ 0,17 <sup>g,j</sup>	

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar

<sup>a,b</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad para el estándar diclofenaco ( $p < 0,05$ ).

<sup>c,d,e</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antiinflamatoria para el extracto etanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

<sup>f,g,h,i,j</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antiinflamatoria para el extracto metanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

□ Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria -método HRBC para el estándar diclofenaco.

■ Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria -método HRBC para el extracto etanólico de sambuel.

■ Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria -método HRBC para el extracto metanólico de sambuel.

La estabilización de la membrana de los eritrocitos humanos (también conocidos como glóbulos rojos) conseguida por los extractos contra la lisis inducida por la solución hipotónica, implica que estos también pueden estabilizar membranas lisosómicas (Parameswari, Devika, & Vijayaraghavan, 2019); esto se explica debido a que la membrana de los eritrocitos y de los lisosomas se consideran análogos (Chippada, Volluri, Bammidi, & Vangalapati, 2008; Kota, Sharma, & Tahashildar, 2018).

Cuando los eritrocitos son sometidos a estrés hipotónico, los fármacos antiinflamatorios impiden que estos liberen la hemoglobina de su interior; mientras que, durante la inflamación, los fármacos antiinflamatorios impiden que los lisosomas de las células liberen las enzimas lisosomales (generalmente bactericidas (ciclooxigenasa) o proteasas) o inactivan las ya liberadas (**Bag et al., 2013; Kumar et al., 2011; Parameswari et al., 2019**) lo que permite que no se produzca daño al tejido y por ende, la inflamación; la cual, cuando es persistente y no es controlada a tiempo, puede actuar como un factor etiológico para varias enfermedades crónicas como ataques cardíacos, descargas sépticas y artritis reumatoide (**Kota et al., 2018; Sharma, Karunakar, & Ragavendhra, 2018**)

Por ello, la estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC) por lisis de membrana inducida por hipotonicidad se puede tomar como una medida *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de los fármacos o extractos de plantas.

Los extractos de hoja de sambuel mostraron actividad antiinflamatoria significativa (superior a 90%) a todas las concentraciones probadas, inclusive a concentraciones bajas (Ver Tabla N° 5). A la concentración de 500 µg/ml los extractos mostraron el máximo porcentaje de actividad antiinflamatoria inhibiendo la lisis celular en un 98,13% (extracto etanólico) y 97,89% (extracto metanólico); porcentajes superiores a los reportados en estudios de actividad antiinflamatoria mediante este método, en hojas de otras plantas como la *Gardenia coronaria* (33% a 300 µg/ml ) (**Chowdhury et.al 2014**) , *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp (74,63% a 200 µg/ml ) (**Parameswari et al., 2019**), *Basella alba* L. var. alba. (71,89% a 400 µg/ml) (**Kumar et.al., 2011**) y *Punica granatum* Linn (87,41% a 500 µg/ml) (**Kota et al., 2018**).

Cabe indicar que a una concentración de 100 µg/ml la actividad antiinflamatoria de los extractos de sambuel resulta totalmente comparable a la actividad presentada por el diclofenaco.

### 3.3.2 Actividad Antiinflamatoria – método desnaturalización de proteínas

La desnaturalización puede definirse en términos generales como cualquier modificación de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de las moléculas de proteína que no implica la ruptura de enlaces covalentes. (Grant, Alburn, & Kryzanas, 1970). Al momento se cree que la producción de autoantígenos que inducen a la inflamación en enfermedades inflamatorias y artríticas puede deberse a la desnaturalización de proteínas *in vivo* (Alhakmani *et al.*, 2013; Chandra, Chatterjee, Dey, & Bhattacharya, 2012). Por lo tanto, los agentes que pueden prevenir la desnaturalización de las proteínas valdrían la pena para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios.

**Tabla N° 7.** Porcentaje de actividad antiinflamatoria en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones - método desnaturalización de proteínas.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/ml}$	% de Actividad antiinflamatoria a 660nm*	% de Actividad antiinflamatoria normalizado respecto al estándar*
Diclofenaco	100	24,18 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	40,29 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>
	200	35,37 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>	58,93 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>
	500	49,96 $\pm$ 1,38 <sup>c</sup>	83,24 $\pm$ 1,38 <sup>c</sup>
	1000	60,02 $\pm$ 3,19 <sup>d</sup>	100,00 $\pm$ 3,19 <sup>d</sup>
Extracto etanólico (50%)	100	36,50 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	60,81 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>
	200	48,51 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>	80,82 $\pm$ 0,27 <sup>c</sup>
	500	46,60 $\pm$ 0,52 <sup>e</sup>	77,65 $\pm$ 0,52 <sup>e</sup>
	1000	21,83 $\pm$ 1,25 <sup>f</sup>	36,38 $\pm$ 1,25 <sup>f</sup>
Extracto metanólico (50%)	100	27,85 $\pm$ 0,08 <sup>g</sup>	46,40 $\pm$ 0,08 <sup>g</sup>
	200	29,19 $\pm$ 0,27 <sup>g</sup>	48,63 $\pm$ 0,27 <sup>g</sup>
	500	21,25 $\pm$ 1,10 <sup>f</sup>	35,40 $\pm$ 1,10 <sup>f</sup>
	1000	12,39 $\pm$ 3,44 <sup>h</sup>	20,64 $\pm$ 3,44 <sup>h</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar

<sup>a,b,c,d</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad para el estándar diclofenaco ( $p < 0,05$ ).

<sup>e,f</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antiinflamatoria para el extracto etanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

<sup>g,h</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antiinflamatoria para el extracto metanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

■ Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria mediante el método de desnaturalización de proteína para el estándar diclofenaco.

- Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria mediante el método de desnaturalización de proteína para el extracto etanólico de sambuel.
- Mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria mediante el método de desnaturalización de proteína para el extracto metanólico de sambuel.

Se ha informado que una de las características de varios medicamentos antiinflamatorios no esteroideos es su capacidad para prevenir la desnaturalización de la albúmina inducida mediante calor a pH de 6.2-6.5 (**Chatterjee, Chandra, Dey, & Bhattacharya, 2012**). Por ello, los extractos del sambuel a diferentes concentraciones (100, 200, 500 y 1000) µg/ml, fueron analizados mediante este método a un pH de 6.4, utilizando diclofenaco sódico como estándar.

Los extractos de *H. luteynii* y el diclofenaco sódico exhibieron un porcentaje de actividad antiinflamatoria dependiente de la concentración (Tabla N° 7). Para el caso de los extractos, se observó una tendencia parabólica, en dónde la máxima actividad fue a 200 µg/ml (80,82% para el extracto etanólico y 48,63% para el extracto metanólico) y a partir de ésta, a concentraciones mayores del extracto, la actividad antiinflamatoria disminuye. Una tendencia similar fue reportada por **Umamathy et al., (2011)** en el estudio de la actividad antiinflamatoria en *Albuca cetosa* mediante el mismo método (65% a 125 µg/ml, 45% a 250 µg/ml y 59% a 500 µg/ml). Además, se observa que a la misma concentración (200 µg/ml) el extracto etanólico presenta mayor capacidad antiinflamatoria que el diclofenaco y el extracto metanólico, lo que sugiere que este podría llegar a ser más efectivo para el tratamiento de procesos antiinflamatorios. Un resultado similar al del sambuel etanol 50% se reporta para el extracto de las hojas de *Cynodon dactylon* (48,46% a 200 µg/ml) (**Ghumre et al., 2017**)

Los resultados observados mediante los métodos *in vitro* de estabilización de HRBC y desnaturalización de proteína indican que los extractos de *H. luteynii* extraídos con metanol y etanol al 50 % poseen capacidad antiinflamatoria, actividad biológica que estaría relacionada con los compuestos fenólicos presentes en los extractos (**Chopade, Somade, & Sayyad, 2012**). Además, cabe destacar que el uso del extracto a concentraciones bajas (100 a 200 µg/ml) podría dar resultados satisfactorios en el tratamiento de inflamaciones.

### 3.3.3 Actividad antioxidante - método TBARS

Las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) están presentes de forma natural en lípidos poliinsaturados e incluyen hidroperóxidos lipídicos y aldehídos que aumentan su concentración como respuesta al estrés oxidativo y al descomponerse forman malonaldehído un compuesto medible espectrofotométricamente a 532nm (Oxford Biomedical Research, 2013). Los ensayos se realizaron con aceite de oliva y los liofilizados de los extractos a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. Trabajando con butilhidroxitolueno como estándar.

**Tabla N° 8.** Porcentaje de actividad antioxidante en los extractos de sambuel a diferentes concentraciones – método TBARS.

Muestra	Concentración µg/ml	% de Actividad antioxidante a 532nm*
BHT (Butil hidroxitolueno)	100	82,75 ± 0,32 <sup>a</sup>
	200	84,52 ± 0,57 <sup>a</sup>
	500	91,42 ± 1,21 <sup>b</sup>
	1000	95,54 ± 0,79 <sup>b</sup>
Extracto etanólico (50%)	100	19,15 ± 4,62 <sup>c</sup>
	200	41,02 ± 7,31 <sup>d</sup>
	500	51,07 ± 2,47 <sup>e</sup>
	1000	61,72 ± 2,43 <sup>f</sup>
Extracto metanólico (50%)	100	47,32 ± 2,80 <sup>g</sup>
	200	43,81 ± 0,18 <sup>h</sup>
	500	34,00 ± 3,57 <sup>i</sup>
	1000	27,70 ± 2,71 <sup>j</sup>

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar

<sup>a,b</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antioxidante para el estándar butilhidroxitolueno ( $p < 0,05$ ).

<sup>c,d,e,f</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antioxidante para el extracto etanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

<sup>g,h,i,j</sup> Valores en la misma columna con letras diferentes indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre porcentajes de actividad antioxidante para el extracto metanólico de sambuel ( $p < 0,05$ ).

- Mayor porcentaje de actividad antioxidante mediante el método TBARS para el estándar butilhidroxitolueno.
- Mayor porcentaje de actividad antioxidante mediante el método TBARS para el extracto etanólico de sambuel.
- Mayor porcentaje de actividad antioxidante mediante el método TBARS para el extracto metanólico de sambuel.

Los resultados obtenidos (Tabla N° 8) muestran que los extractos del sambuel poseen actividad antioxidante, lográndose diferenciar distintas tendencias en ambos extractos. Así, en el extracto etanólico el porcentaje de actividad se incrementa a medida que aumenta la concentración, mientras que en el extracto metanólico desciende.

En general, el máximo porcentaje de actividad antioxidante obtenido fue mayor en el extracto etanólico (61,72% a 1000µg/ml), que en el metanólico (47,32% a 100 µg/ml) y se relaciona directamente con los resultados de fenoles totales obtenidos durante la primera etapa de la optimización (20 mg ác. gálico/g para el extracto etanólico al 50% y 16 mg ác.gálico/g para el extracto metanólico al 50%) (Ver Tabla N°2). Según lo informado por otros investigadores (**Franco et al., 2008; Zhou et al., 2013**), el contenido de fenoles totales tiene una relación directa con la actividad antioxidante. Además, resultados similares a los obtenidos fueron reportados en el estudio de **Bouras et al., (2015)** para el extracto de *Quercus* (Etanol 5,47% y Metanol 4,87%) quienes informaron que las mediciones de la capacidad antioxidante fueron consistentes con el contenido de los compuestos fenólicos. Sin embargo, desde una perspectiva de efectividad en lugar de rendimiento, el extracto metanólico sería más efectivo al lograr una mayor actividad con una menor concentración; todo esto se podría explicar, debido a las diferentes condiciones de extracción utilizadas, ya que, estas pueden dar como resultado la obtención de componentes fenólicos con diferentes estructuras químicas (**Li, Smith, & Hossain, 2006**). Por lo tanto, aunque el contenido fenólico total puede ser alto, si el extracto consta de componentes fenólicos, que tienen menor capacidad antioxidante, la actividad antioxidante total puede no ser alta.

Por otra parte, la peroxidación lipídica de los alimentos puede conducir al desarrollo de sabores desagradables, así como a pérdidas nutricionales y a la formación de productos finales potencialmente tóxicos, una de las principales razones del deterioro de los alimentos durante su procesamiento y almacenamiento (**Amensour et al., 2010**). Por ello, el potencial antioxidante del extracto metanólico a bajas concentraciones sugiere la posibilidad de usarlo en la industria alimentaria para aumentar el tiempo de vida útil mediante la inhibición de la oxidación de grasas.

Se cree que los antioxidantes al reducir los niveles de radicales libres, ayudan a que las células sean menos susceptibles a experimentar estrés oxidativo y en definitiva respuesta inflamatoria (**Chopade et al., 2012; Karthikeyan & Koushik O, 2016;**

Nagaharika, kalyani, Rasheed, & Ramadosskarthikeyan, 2013; Umeti, Onajobi, Oboutor, Anyasor, & Esan, 2019); lo que explicaría las actividades biológicas encontradas en los extractos de sambuel.

### 3.4 Metales

Para la determinación de metales se evaluaron un total de 10 minerales) (Ver Tabla N° 9) con la finalidad de obtener mayor información sobre la composición de la planta y además para verificar la posible contaminación por influencia de las cenizas del volcán Tungurahua.

**Tabla N° 9.** Curvas de calibrado y concentraciones de los minerales determinados en las hojas secas de sambuel.

Mineral	Concentración mg/100g base seca	Curvas de Calibración	
		Ecuación	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )
<b>Calcio</b>	111,1 ± 3,0	$y = 0,119x + 0,006$	0,983
<b>Cadmio</b>	< 0,002	$y = 13,318x + 0,008$	0,994
<b>Cobalto</b>	< 0,014	$y = 3,478x + 0,060$	0,998
<b>Cobre</b>	0,9 ± 0,1	$y = 0,336x + 0,007$	0,999
<b>Hierro</b>	3,1 ± 0,5	$y = 0,207x + 0,013$	0,995
<b>Magnesio</b>	558,4 ± 53,9	$y = 1,690x + 0,006$	0,999
<b>Manganeso</b>	43,1 ± 3,0	$y = 0,551x - 0,034$	0,992
<b>Plomo</b>	< 0,017	$y = 0,963x + 0,056$	0,928
<b>Níquel</b>	0,2 ± 0,02	$y = 2,217x + 0,127$	0,996
<b>Zinc</b>	4,8 ± 0,5	$y = 0,553x + 0,020$	0,993

\*Los datos reportados corresponden al promedio de tres réplicas ± desviación estándar

■ Minerales con mayor concentración en las hojas secas de sambuel.

Dentro de los minerales analizados y que considerados como esenciales, el magnesio reporta la mayor concentración (558,4 mg/100g) seguido del calcio (111,1 mg/100g) y el manganeso (43,1 mg/100g). En menor concentración se obtuvo el zinc (4,8 mg/100g), el hierro (3,1 mg/100g) y el cobre (0,9 mg/100g).

Los contenidos de hierro, magnesio y manganeso conseguidos fueron mayores que los reportados en otros estudios en hojas de *Boerhavia diffusa* (Fe 0.012, Mg 8,7 y Mn 0,4 mg/100g) y *Commelina nudiflora* (Fe 0.017, Mg 6,6 y Mn 0,1 mg/100g); aunque en el estudio los contenidos de zinc y cobre estuvieron por debajo del límite de detección,

el calcio se reportó en mayor cantidad (174,1 mg/100g para *B.diffusa* y 240,0 mg/100g *C.nudiflora*) que en el sambuel (Ujowundu, Igwe, Enemor, Nwaogu, & Okafor, 2008).

Aunque ciertos minerales son necesarios para el organismo, existe un rango estrecho entre la concentración máxima a la que no se producen efectos nocivos y la concentración a la que se esperan efectos adversos (British Nutrition Foundation, 2018). Esta es una de las razones por las cuales se deben monitorear las concentraciones de estos en los productos destinados al consumo humano. A partir de los resultados obtenidos, se observó que todos los elementos se encuentran dentro de los límites establecidos para la legislación ecuatoriana vigente y el Codex Alimentarius (Mg: 300mg, Cu: 0.9 mg, Ca: 1000 mg, Fe: 14mg , Zn: 15mg, Mn: 2,3 mg ) (Codex Alimentarius, 2015; INEN(Instituto Ecuatoriano de Normalización), 2016; National academies of sciences, 2015). Sin embargo, debido a que las hojas de sambuel son consumidas mediante infusión a modo de té por los moradores del cerro Teligote, la cantidad en la que estos minerales puedan retenerse en el organismo dependerá del contenido total del elemento en las hojas, la fracción del contenido total eluido en la infusión y la biodisponibilidad del mineral presente en la infusión (Wróbel, Wróbel, & Colunga, 2000), por lo que, sería de utilidad estudiar el contenido de minerales presentes en la infusión del sambuel, para determinar el contenido real de minerales que una persona podría ingerir con este.

Por otro lado, la determinación de metales pesados es importante para juzgar el valor nutricional de las hojas de sambuel y evitar cualquier posible efecto negativo que pueda causar a la salud humana si este es ingerido. Los contenidos de cadmio, cobalto y plomo fueron menores a los límites de detección; mientras que el contenido de níquel (0,2 mg/100g) fue menor al reportado por Shaltout, Abdel-Aal, Welz, & Castilho, (2013) en las hojas de té negro (0,8 mg/100g) y por Srividhya, Subramanian, & Raj, (2011) en las hojas de té negro (1,1 mg/100g) y de té verde (0,9 mg/100g). Lo que indica que el sambuel podría ser una matriz alimenticia segura para el consumo humano (Martins *et al.*, 2013).

### 3.5 Verificación de Hipótesis

#### Hipótesis 1.

#### 3.5.1 Condiciones del proceso de extracción

Según el análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos HSD de Tukey (Honestly Significant Difference, por sus siglas en inglés) existe diferencia significativa en el contenido de polifenoles y flavonoides a las distintas condiciones de extracción, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

#### Hipótesis 2.

#### 3.5.2 Actividades Biológicas

El análisis de varianza y la prueba de múltiples rangos HSD de Tukey mostró que los extractos del sambuel presentan actividades biológicas, cuyas medias presentan diferencia significativa de acuerdo con la concentración del extracto, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

Luego de realizar la optimización del proceso de extracción considerando cuatro factores diferentes (disolvente, temperatura, tiempo y el desgaste de material). Se determinó que las mejores condiciones para la extracción de polifenoles y flavonoides de las hojas de *H. luteynii* son: etanol 50%, 50 °C x 10 min (polifenoles) y metanol 50% 60°C x 10min (flavonoides) con 3 extracciones sucesivas en ambos casos para conseguir el máximo de concentración de estos metabolitos en los extractos (37,328 mg AG/g muestra seca para polifenoles y 30,321 mg CQ/g muestra seca para polifenoles). Esto muestra que los polifenoles contenidos en las hojas de sambuel son ligeramente menos polares que los flavonoides y requieren de menor temperatura para transferirse al disolvente. La determinación de estos parámetros en la extracción es de utilidad porque desde el punto de vista económico, permiten reducir costos y aprovechar al máximo el material vegetal.

Se obtuvo un perfil cromatográfico de los extractos optimizados mediante la caracterización por TLC y HPLC. En TLC se detectaron 6 compuestos en el extracto etanólico y 5 en el metanólico a 366 nm, lo cual podría estar relacionado con los resultados de los cromatogramas en HPLC, en donde a 360 nm se observaron compuestos a 4.10 y 4.52 min de retención, visibles solo en el extracto etanólico. Por lo que se podría inferir, que el etanol permite la solubilidad de una mayor diversidad de compuestos fenólicos que el metanol.

Las hojas de *H. luteynii* presentan actividad antiinflamatoria (98,13% y 97,89% a 500 µg/ml en el extracto etanólico y metanólico respectivamente- método HRBC y 48,51% y 29,19% a 200 µg/ml en el extracto etanólico y metanólico- método desnaturalización de proteína), y antioxidante (61,72% a 1000µg/ml en el extracto etanólico y 47,32%

a 100 µg/ml en el extracto metanólico), por lo que podrían llegar a ser usados en la industria alimenticia para prevenir la oxidación de los aceites o en la industria farmacéutica para sustituir a los antiinflamatorios sintéticos como el diclofenaco cuyos efectos colaterales, limitan su consumo en la población.

Se lograron detectar 10 minerales mediante espectroscopía de absorción atómica, donde por cada 100g de hojas secas de sambuel se determinaron que existen 4.8 mg de zinc , 3.1 mg de hierro , 0.9 mg de cobre, 111.1 mg de calcio, 43.1 mg de manganeso y 558,4 mg de magnesio. Siendo el magnesio el mineral con mayor concentración encontrado en la muestra. Los contenidos de cadmio, cobalto y plomo fueron menores a los límites de detección y el níquel 0.2 mg, esto convierte al sambuel en una matriz segura para su consumo si llegase a ser procesada industrialmente, debido a que la materia prima posee un contenido de minerales tan bajo, las probabilidades de que se produzca una intoxicación por consumo son escasas.

## **4.2 Recomendaciones**

Se recomienda realizar ensayos *in vivo* y de citotoxicidad para la determinación de las actividades biológicas con el fin de ver la biodisponibilidad de los compuestos en el organismo y sus posibles efectos tóxicos si son ingeridos.

Caracterizar los extractos mediante HPLC acoplado a un espectro de masas y aumentando la cantidad de estándares como quercetina, ácidos *p*-cumárico, siringo y sinápico, para determinar con exactitud cuales son los compuestos que constituyen los extractos de sambuel y de ser detectados, despertarían gran interés en el estudio posterior de su síntesis como fármaco.

Realizar el estudio de la concentración de metales en la infusión de las hojas de sambuel, para determinar el contenido de minerales que se puede lixiviar en el té.

Estudiar las posibles formas de proteger los extractos de la oxidación para su uso en fórmulas alimenticias, como por ejemplo el recubrimiento con maltodextrina mediante secado por aspersión.

Vincular en próximos proyectos con la comunidad los resultados experimentales de esta investigación para conocimiento de la sociedad.

## Bibliografía

- Acebey, L., Jullian, V., Sereno, D., Chevalley, S., Estevez, Y., Moulis, C., ... Sauvain, M. (2010). Anti-leishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. *Planta Medica*, 76(4), 365–368. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186192>
- Acebey, L., Sauvain, M., Beck, S., Moulis, C., Gimenez, A., & Jullian, V. (2007). Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic Letters*, 9(23), 4693–4696. <https://doi.org/10.1021/ol7015725>
- Albuja, D. M. (2012). *Determinación de hierro y zinc por absorción atómica de llama en tejidos y vísceras de cobayos (Cavia porcellus), alimentados con alfalfa (Medicago sativa) o concentrado de pescado*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- 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)
- Amador, J. (2010). Espectrometría óptica atómica. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 14, 3–10.
- Amensour, M., Sendra, E., Pérez, J. A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., & Fernández, J. (2010). Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), 170–178. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0168-2>
- Amoah, S. K. S., & Biavatti, M. W. (2018). A LC-MS validated method for quantification of rosmarinic acid and sesquiterpene lactones in *Hedyosmum brasiliense*. *Journal of Chromatographic Science*, 56(9), 812–818. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy057>
- Amoah, S. K. S., De Oliveira, F. L., Da Cruz, A. C. H., De Souza, N. M., Campos, F.

- R., Barison, A., & Biavatti, M. W. (2013). Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry*, *87*, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.11.018>
- Amoah, S. K. S., Kouloura, E., Dutra, L. M., Barison, A., Wildner, L. M., Bazzo, M. L., ... Biavatti, M. W. (2015). Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry Letters*, *13*, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.07.013>
- Atasoy, A. D., Yesilnacar, M. I., & Atasoy, A. F. (2019). Essential Element Contents of Turkish Black Tea. In *Non-Alcoholic Beverages*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815270-6.00002-5>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172. Retrieved from [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-04622006000200010&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010&nrm=iso)
- Azahar, N. F., Gani, S. S. A., & Mohd Mokhtar, N. F. (2017). Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions of *Curcuma Zedoaria* leaves using response surface methodology. *Chemistry Central Journal*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0324-y>
- Bag, A., Kumar Bhattacharyya, S., Kumar Pal, N., & Chattopadhyay, R. R. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharmaceutical Biology*, *51*(12), 1515–1520. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.799709>
- Baharuddin, N. A. F., Nordin, M. F. M., Morad, N. A., Aris, N. I. A., & Yunus, M. A. C. (2018). Total phenolic, flavonoid content and antioxidant activity of *Clinacanthus nutans* leaves by water-based ultrasonic assisted extraction. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *22*(4), 659–666. <https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2204-12>
- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentacion, Nutricion Y Salud*, *10*, 41–53. Retrieved from <http://digital.csic.es/bitstream/10261/18042/3/lecturaPDF.pdf>

- Barberán, T. F., & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Batista, R. T. (2013). Biological Activity. In W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, & H. Yokota (Eds.), *Encyclopedia of Systems Biology* (p. 110). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_1337](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_1337)
- Bercion, S., Martin, M. A., Baltaze, J. P., & Bourgeois, P. (2005). A new  $\alpha$ -methylene  $\gamma$ -lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. *Fitoterapia*, 76(7–8), 620–624. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.06.006>
- Both, S., Chemat, F., & Strube, J. (2014). Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.005>
- Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018>
- British Nutrition Foundation. (2018). Minerals and trace elements. Retrieved from Nutrition Science website: <https://www.nutrition.org.uk/nutritionscience/nutrients-food-and-ingredients/minerals-and-trace-elements.html?showall=1&limitstart=>
- Cárdenas, M., Carpio, C., Welbaum, J., Vilcacundo, E., & Carrillo, W. (2018). Chia protein concentrate (*Salvia hispanica* L.) anti-inflammatory and antioxidant activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 382–386. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i2.17225>
- Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa. (2018). Antioxidantes. Retrieved from MedlinePlus website: <https://medlineplus.gov/spanish/antioxidants.html>
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., & Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fotoquímicos, clasificación e importancia. In *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* (Vol. 6). Retrieved from

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4822>

- Chatterjee, P., Chandra, S., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effects of green tea and black tea: A comparative in vitro study. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 3(2), 136–138. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.97298>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 223–229.
- Chippada, S., Volluri, S., Bammidi, S., & Vangalapati, M. (2008). In vitro antiinflammatory activity of methanolic extract of centella asiatica by HRBC membrane stabilisation. *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*, 5(13), 1–84.
- Chopade, A., Somade, P., & Sayyad, F. (2012). Membrane stabilizing activity and protein denaturation : a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Phyllanthus amarus. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 1(1), 67–72.
- Chowdhury, A., Azam, S., Jainul, M. A., Faruq, K. O., & Islam, A. (2014). Antibacterial activities and in vitro anti-inflammatory (Membrane Stability) properties of methanolic extracts of gardenia coronaria leaves. *International Journal of Microbiology*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/410935>
- Cimpoi, C. (2006). Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29(7–8), 1125–1142. <https://doi.org/10.1080/10826070600574911>
- Codex Alimentarius. (2015). Anteproyecto de valores de referencia de nutrientes adicionales o revisados con fines de etiquetado de las directrices del codex sobre etiquetado nutricional (vitaminas A, D y E, magnCodex Alimentarius joint FAO/OMSesio, fósforo, cromo, cobre, cloruro y h. In *Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Cui, X., Kim, J., Zhao, X., Chen, B., BC, L., & Pyo, H. et al. (2006). Antioxidative and acute anti-inflammatory effects of *Campsis grandiflora* flower. *J Ethnopharmacol*, *103*(2), 223-8.
- Daneshfar, A., Ghaziaskar, H. S., & Homayoun, N. (2008). Solubility of gallic acid in methanol, ethanol, water, and ethyl acetate. *Journal of Chemical and Engineering Data*, *53*(3), 776–778. <https://doi.org/10.1021/je700633w>
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Marcia, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. *Herbario QCA de La Escuela de Ciencias Biológicas de La Pontífica Universidad Católica Del Ecuador & Herbario AAU Del Departameto de Ciencias Biológicas de La Universidad de Aarhus.*, *1*, 1–3.
- Dewanto, V., Xianzhong, W., Dom, K., & Rui, H. L. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Fan, Y., Sun, Y., Zhou, B., Zhao, J., Sheng, L., Li, J., & Yue, J. (2018). Hedyorienoids A and B, Two Sesquiterpenoid Dimers Featuring Different Polycyclic Skeletons from *Hedyosmum orientale* [Rapid-communication]. *Organic Letters*, *20*, 5435–5438. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02340>
- Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., ... Núñez, M. J. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *7*(8), 3210–3216.
- Gaitán, M. S. (2004). *Determinación de Metales Pesados Totales con Digestión Ácida Solubles por Espectrofotometría de Absorción Atómica*. Colombia.
- García López, E. B. (2016). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de macroalgas de baja California sur, México*. (Instituto Politécnico Nacional). Retrieved from <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/garcialop1.pdf>
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total

phenolics and flavonoids content in two varieties of malaysia young ginger (Zingiber officinale Roscoe). *Molecules*, 15(6), 4324–4333. <https://doi.org/10.3390/molecules15064324>

Ghumre, S., Sawant, M., Jadhav, V., Kadam, V., Sonawane, N., & Ramaiya, M. (2017). Assessment of In-vitro Anti-Inflammatory Activity of Cynodon Dactylon and Acyclovir Showing Synergistic Effect by Albumin Denaturation and Membrane Stabilization Assay. *Modern Approaches in Drug Designing*, 1(2), 1–5. <https://doi.org/10.31031/madd.2017.01.000506>

Gonçalves, A. E., Bürger, C., Amoah, S. K. S., Tolardo, R., Biavatti, M. W., & De Souza, M. M. (2012). The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 674(2–3), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.11.009>

Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M., & Scalvenzi, L. (2016). Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian Hedyosmum sprucei Essential Oil . *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/1638342>

Guillarme, D., Casetta, C., Bicchi, C., & Veuthey, J. (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>

Güler, A., & Candemir, A. (2015). Total phenolic and flavonoid contents, phenolic Compositions and color properties of fresh grape leaves. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1(1), 778–782.

Gullian, K. M., & Terrats, P. M. (2017). Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Brosimum alicastrum Leaves and the Evaluation of Their Radical-Scavenging Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081286>

- Gupta, M. P. (2006). *Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador and Peru*. La Paz, Bolivia.
- Harris, D. (2012). Espectroscopia atómica. *Análisis Químico Cuantitativo*, pp. 495–500.
- HFA. (2010). Essential nutrients: vitamins y minerals. Retrieved from Hemophilia Federation of America website: <https://www.hemophiliafed.org/news-stories/2010/11/essential-nutrients-vitamins-minerals/>
- INEN(Instituto Ecuatoriano de Normalización). *Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado nutricional. Requisitos.*, Pub. L. No. Registro Oficial No. 704 del 1978-11-06 (2016).
- Jaimes, J. J. (2009). Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta (Vol. 1). Pontificia Universidad Javeriana.
- Jaramillo, C., Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & Rojas, L. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171–1184. <https://doi.org/10.15517/rbt.v64i3.19537>
- Jaramillo, M. G. (2008). “*Elaboración de un producto turístico comunitario para Patuloma, parroquia Salasaca, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua.*” Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH).
- Jiménez, J. (2005). Antioxidantes y alimentos. *Universidad de La Rioja*, 6. Retrieved from [www.unirioja.es/ensaya/archivos/antioxidantes.pdf](http://www.unirioja.es/ensaya/archivos/antioxidantes.pdf)
- Karthikeyan, R., & Koushik O, S. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Flowers *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. By HRBC Membrane Stabilization Method. *Translational Biomedicine*, 7(2), 1–5. <https://doi.org/10.21767/2172-0479.100060>
- Kastenmayer, P. (1997). Análisis De Minerales Y Elementos Traza En Alimentos. *Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos Em*

*Nutrición*, 271–294.

- Khatoon, S., Singh, N., Srivastava, N., Rawat, A. K. S., & Mehrotra, S. (2008). Chemical evaluation of seven Terminalia species and quantification of important polyphenols by TLC. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 21(3), 167–171. <https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.3.2>
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Bella Cruz, A., Biavatti, M. W., & Netz, D. J. A. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of Hedyosmum brasiliense Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(5), 692–699. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000005>
- Knežević, V. S., Blažeković, B., Štefan, M. B., Alegro, A., Koszegi, T., & Petrik, J. (2011). Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected micromeria species from croatia. *Molecules*, 16(2), 1454–1470. <https://doi.org/10.3390/molecules16021454>
- Kota, K., Sharma, S., & Tahashildar, J. (2018). A scientific validation of In vitro anti-inflammatory activity of Punica granatum L. by human red blood cell membrane stabilization. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 6(7), 2430. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20182830>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of basella alba linn. var. alba. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(2), 176–179.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>
- Lorenzo, D., Loayza, I., & Dellacassa, E. (2003). Composition of the essential oils from leaves of two Hedyosmum spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(1), 32–35. <https://doi.org/10.1002/ffj.1146>
- Martins, A. E., Pereira, M. S., Jorgetto, A. O., Martines, M. A. U., Silva, R. I. V., Saeki, M. J., & Castro, G. R. (2013). The reactive surface of Castor leaf [Ricinus communis L.] powder as a green adsorbent for the removal of heavy metals from natural river water. *Applied Surface Science*, 276, 24–30.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.096>

- Mundina, M., Vila, R., Iban, C., Casanova, J., Tomi, F., Ciccio, J., ... Cañigueral, S. (2000). Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*, (15), 190–194.
- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M., Moreno, P., & Young, M. (2017). Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils. *Medicines*, 55(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicines4030055>
- Nagaharika, Y., kalyani, V., Rasheed, S., & Ramadoskarthikeyan. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/s2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/s2221-6189(13)60118-3)
- National academies of sciences. (2015). Dietary Reference Intakes ( DRIs ): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes , Vitamins Food and Nutrition Board. *Food and Nutrition Board*, 0–2.
- National Research Council. (1989). Minerals. In *Diet and Health. Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218735/>
- Nour, V., Trandafir, I., & Cosmulescu, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction of phenolic compounds from walnut leaves using response surface methodology. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2176–2187. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150303>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants : An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In *Polyphenols in Plants* (2nd ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>
- Ovando, M., Osorio, P., & Bello, L. (2009). Efecto del riego y temporal sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *XVIII Congreso Nacional de Ingeniería*

*Bioquímica* . Retrieved from <http://repositoriodigital.ipn.mx/>

- Oxford Biomedical Research. (2013). 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). *Oxford Biomedical Research*, pp. 1–5. Retrieved from <http://bionovus.com.au/images/stories/file/OBR/pdf/FR35.pdf>
- 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>
- Parets, L., Alechanga, E., Nuñez, O., Saurina, J., Hernández, S., & Puignou, L. (2016). Analytical methods atmospheric pressure photoionization-tandem polyphenolic profiles in the characterization and preparations and natural extracts. *Royal Society of Chemistry*, 8, 4363–4378. <https://doi.org/10.1039/C6AY00929H>
- Quinga, M. A. (2017). *Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (Vigna unguiculata L.) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP- UHPLC*. Universidad Técnica de Ambato.
- Ramírez, J., García, C., Vizcaíno, J., Cárdenas, J., Gutiérrez, F., Murga, H., & Villagrán, S. (2012). ¿Qué son y para qué sirven los antioxidantes? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de La Universidad Veracruzana*, 25(2).
- Robles, F., Segovia, F., & López, J. (2005). Alimentación y cáncer. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 40(3), 184–194. [https://doi.org/10.1016/S0211-139X\(05\)74851-4](https://doi.org/10.1016/S0211-139X(05)74851-4)
- 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, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 15(2), 212–218.
- Romito, K., & O'Brien, R. (2018). Minerals: Their functions and Sources. Retrieved from St. Luke's website: <https://www.stlukesonline.org/health-services/health-information/healthwise/2017/11/14/22/57/minerals-their-functions-and-sources>
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., & Paz, R. (2009). Microencapsulation by spray drying

- of bioactive compounds from cactus pear ( *Opuntia ficus-indica* ). *Food Chemistry*, *114*(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, *89*(4), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.013>
- Salamanca, G., Correal, I. L., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, *25*(2), 95–102.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *18*, 567–579. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.10.007>
- Shaltout, A. A., Abdel-Aal, M. S., Welz, B., & Castilho, I. N. B. (2013). Determination of Cd, Cu, Ni, and Pb in Black Tea from Saudi Arabia using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry after Microwave-Assisted Acid Digestion. *Analytical Letters*, *46*(13), 2089–2100. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.784918>
- Sharma, S., Karunakar, K., & Ragavendhra, P. (2018). HRBC membrane stabilization as a study tool to explore the antiinflammatory activity of *Allium cepa* linn.-relevance for 3r. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*, *6*(January), 30–34. <https://doi.org/10.21276/jamdsr>
- Sharmila, G., Nikitha, V. S., Ilaiyarasi, S., Dhivya, K., Rajasekar, V., Kumar, N. M., ... Muthukumaran, C. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from *Cassia auriculata* leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *84*, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.010>
- Simbaña, W., & Vargas, H. (2017). Plantas de los remanentes del Cerro Teligote. *Field Guides*. Retrieved from [https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/968\\_ecuador\\_plantas\\_del\\_cerro\\_teligote.pdf](https://fieldguides.fieldmuseum.org/sites/default/files/rapid-color-guides-pdfs/968_ecuador_plantas_del_cerro_teligote.pdf)
- Srividhya, B., Subramanian, R., & Raj, V. (2011). Determination of lead, manganese,

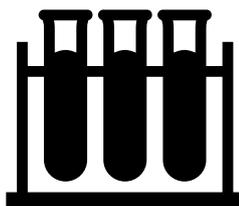
- copper, zinc, cadmium, nickel and chromium in tea leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 257–258.
- Su, Z. S., Yin, S., Zhou, Z. W., Wu, Y., Ding, J., & Yue, J. M. (2008). Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1410–1413. <https://doi.org/10.1021/np800240v>
- Sun, J., Chu, Y.-F., Wu, X., & Rui, H. L. (2001). Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. *Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 7449–7454.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Todzia, C. A. (2015). Four New Species of *Hedyosmum* (Chloranthaceae) from South America. *American Society of Plant Taxonomists*, 13(1), 21–31. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2419238>
- Tolardo, R., Zetterman, L., Rilo, D., Camila, T., Lazzarotto, F., Oliveira, D., ... Souza, D. (2010). Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.026>
- Torres, S., Tovar, M., García, V., Lucena, M., & Araujo, L. (2018). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum luteynii* Todzia (Chloranthaceae). *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 173–178. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14289>
- Tretin, A., Santos, A., Guedes, A., Pizzolatti, M., Yunes, R., & Calixto, J. (1999). Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-Hidroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*, 65, 517–521.
- UAM, U. A. de M. (2018). *Cromatografía en Capa Fina*. Retrieved from <https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>
- Ujowundu, C. O., Igwe, C. U., Enemor, V. H. A., Nwaogu, L. A., & Okafor, O. E. (2008). Nutritive and anti-nutritive properties of *Boerhavia diffusa* and *Commelina nudiflora* leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1), 90–92.

<https://doi.org/10.3923/pjn.2008.90.92>

- Umeti, C., Onajobi, F., Oboutor, E., Anyasor, G., & Esan, E. (2019). Anti-inflammatory property and gas chromatography-mass spectrometry analysis of ethyl acetate fraction of *Crateva adansonii* DC leaves. *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.5455/ajpbp.20181226090820>
- Vadivu, R. (2018). In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour.) Moore ssp. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3, 121–124. <https://doi.org/10.3329/bjp.v3i2.956>
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111, 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Velasquez, G. (2006). *Fundamentos de alimentacion saludable*. Editorial Universidad de Antioquia.
- Viteri, S., & Nuñez, A. (2016, April 23). El Ecuador es el hogar de más de 25 mil distintas especies de flores. *El Telégrafo*.
- Wróbel, K., Wróbel, K., & Colunga, E. (2000). Determination of Total Aluminum, Chromium, Copper, Iron, Manganese, and Nickel and Their Fractions Leached to the Infusions of Black Tea, Green Tea, Hibiscus sabdariffa, and Ilex paraguariensis (Mate) by ETA-AAS. *Biological Trace Element Research*, 78, 1–19.
- Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., & Zhang, R. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 382(1–2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.023>
- Zamora, A. M., & Arturo, D. E. (2016). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(3), 192–198.

Zhou, J., Zheng, X., Yang, Q., Liang, Z., Li, D., Yang, X., & Xu, J. (2013). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction and Radical-Scavenging Capacity of Phenols and Flavonoids from *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz Leaves. *PLoS ONE*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068392>

# **ANEXOS**



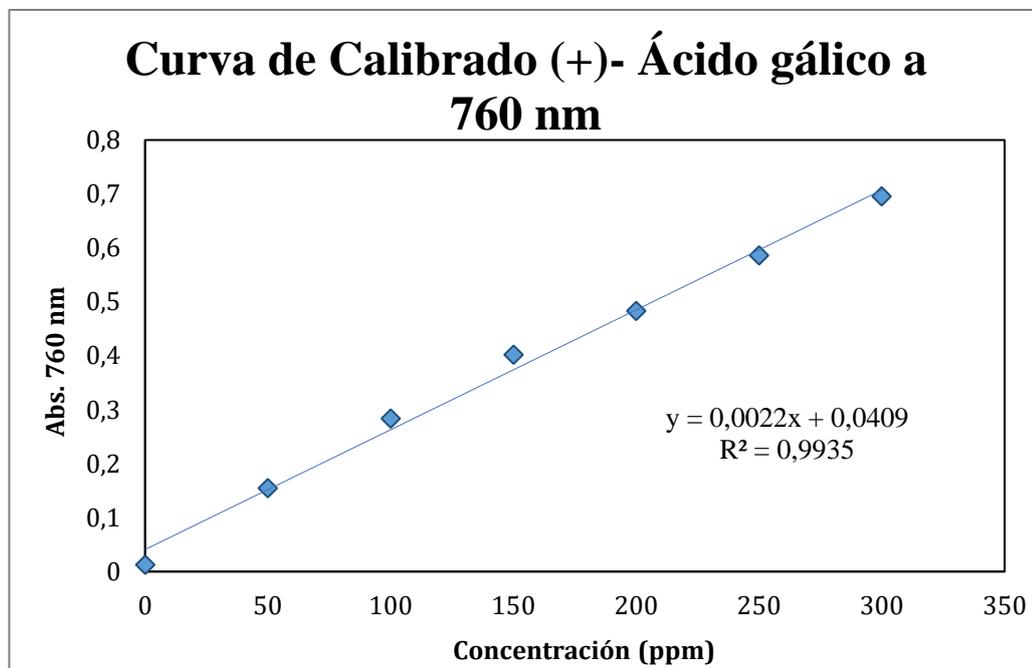
## **ANEXO A**

# **RESULTADOS EXPERIMENTALES**

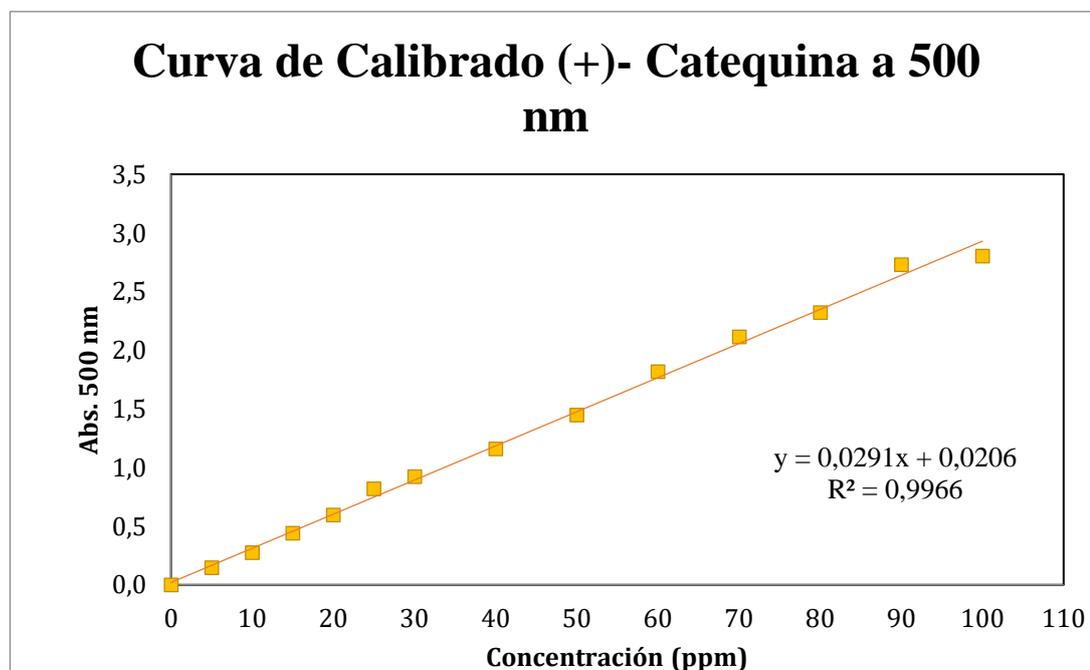
---

*CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES*

---



**Fig. A1.** Curva de calibración estándar de ácido gálico utilizada para el cálculo del contenido de polifenoles presentes en el sambuel.



**Fig. A2.** Curva de calibración estándar de catequina utilizada para el cálculo del contenido de flavonoides presentes en el sambuel.

**OPTIMIZACIÓN DE PROCESO DE EXTRACCIÓN**

**Optimización del disolvente**

**Tabla A1.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de polifenoles.

<b>POLIFENOLES</b>										
<b>Agua</b>										
<b>Código</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Aforo inicial (ml)</b>	<b>Alícuota muestra (µl)</b>	<b>Aforo final (ml)</b>	<b>F.D.</b>	<b>Abs 760nm</b>	<b>Conc. 760 nm (mg/g muestra)</b>	<b>Promedio conc. a 760 nm</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coefficiente de variación</b>
SA1	0,1000	5	50	5	1	0,299	11,617	10,342	1,155	0,112
SA2	0,1000	5	50	5	1	0,249	9,367			
SA3	0,1000	5	50	5	1	0,264	10,042			
<b>Etanol 25%</b>										
SE25.1	0,1000	5	50	5	1	0,437	17,830	17,725	0,481	0,027
SE25.2	0,1000	5	50	5	1	0,444	18,145			
SE25.3	0,1000	5	50	5	1	0,423	17,199			
<b>Etanol 50%</b>										
SE50.1	0,1000	5	50	5	1	0,478	19,675	20,005	0,393	0,020
SE50.2	0,1000	5	50	5	1	0,495	20,441			
SE50.3	0,1000	5	50	5	1	0,483	19,900			
<b>Etanol 75%</b>										
SE75.1	0,1000	5	50	5	1	0,339	13,418	14,018	14,018	14,018
SE75.2	0,1000	5	50	5	1	0,379	15,219			
SE75.3	0,1000	5	50	5	1	0,339	13,418			
<b>Etanol puro</b>										
SEP.1	0,1000	5	50	5	1	0,115	3,334	3,094	0,341	0,110
SEP.2	0,1000	5	50	5	1	0,113	3,244			
SEP.3	0,1000	5	50	5	1	0,101	2,704			
<b>Metanol 25%</b>										
SM25.1	0,1000	5	50	5	1	0,371	14,859	14,663	0,231	0,016
SM25.2	0,1000	5	50	5	1	0,368	14,723			
SM25.3	0,1000	5	50	5	1	0,361	14,408			
<b>Metanol 50%</b>										
SM50.1	0,1000	5	50	5	1	0,415	16,839	16,584	0,332	0,020
SM50.2	0,1000	5	50	5	1	0,401	16,209			
SM50.3	0,1000	5	50	5	1	0,412	16,704			
<b>Metanol 75%</b>										
SM75.1	0,1000	5	50	5	1	0,435	17,740	18,385	0,732	0,040
SM75.2	0,1000	5	50	5	1	0,446	18,235			
SM75.3	0,1000	5	50	5	1	0,467	19,180			

Metanol puro										
SMP.1	0,1000	5	50	5	1	0,252	9,502	8,451	0,911	0,108
SMP.2	0,1000	5	50	5	1	0,218	7,971			
SMP.3	0,1000	5	50	5	1	0,216	7,881			

**Tabla A2.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente para la determinación de flavonoides.

FLAVONOIDES										
Agua										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Promedio Conc. a 500nm	Desviación estándar	Coefficiente de variación
SA1	0,1000	5	250	5	1	0,297	8,375	7,961	0,570	0,072
SA2	0,1000	5	250	5	1	0,267	7,311			
SA3	0,1000	5	250	5	1	0,292	8,198			
Etanol 25%										
SE25.1	0,1000	5	250	5	1	0,426	12,952	12,538	0,359	0,029
SE25.2	0,1000	5	250	5	1	0,408	12,314			
SE25.3	0,1000	5	250	5	1	0,409	12,349			
Etanol 50%										
SE50.1	0,1000	5	250	5	1	0,448	13,733	13,827	0,714	0,052
SE50.2	0,1000	5	250	5	1	0,432	13,165			
SE50.3	0,1000	5	250	5	1	0,472	14,584			
Etanol 75%										
SE75.1	0,1000	5	250	5	1	0,381	11,356	10,374	0,852	0,082
SE75.2	0,1000	5	250	5	1	0,338	9,830			
SE75.3	0,1000	5	250	5	1	0,341	9,936			
Etanol puro										
SEP.1	0,1000	5	250	5	1	0,110	1,740	2,509	0,668	0,266
SEP.2	0,1000	5	250	5	1	0,141	2,840			
SEP.3	0,1000	5	250	5	1	0,144	2,947			
Metanol 25%										
SM25.1	0,1000	5	250	5	1	0,366	11,872	11,459	0,372	0,032
SM25.2	0,1000	5	250	5	1	0,345	11,150			
SM25.3	0,1000	5	250	5	1	0,351	11,356			
Metanol 50%										
SM50.1	0,1000	5	250	5	1	0,434	14,209	14,014	0,280	0,020
SM50.2	0,1000	5	250	5	1	0,419	13,693			
SM50.3	0,1000	5	250	5	1	0,432	14,140			
Metanol 75%										
SM75.1	0,1000	5	250	5	1	0,427	13,968	13,923	0,792	0,057
SM75.2	0,1000	5	250	5	1	0,448	14,690			
SM75.3	0,1000	5	250	5	1	0,402	13,109			
Metanol puro										

SMP.1	0,1000	5	250	5	1	0,225	7,025	7,586	0,800	0,106
SMP.2	0,1000	5	250	5	1	0,268	8,503			
SMP.3	0,1000	5	250	5	1	0,231	7,231			

### Optimización de la temperatura

**Tabla A3.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de polifenoles.

POLIFENOLES										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 760 nm	Desviación estándar	Coefficiente de variación
<b>Etanol 50% a 30°C</b>										
SE30.1	0,1000	5	50	5	1	0,426	17,334	17,334	0,270	0,016
SE30.2	0,1000	5	50	5	1	0,420	17,064			
SE30.3	0,1000	5	50	5	1	0,432	17,605			
<b>Etanol 50% a 40°C</b>										
SE40.1	0,1000	5	50	5	1	0,363	14,498	14,498	0,135	0,009
SE40.2	0,1000	5	50	5	1	0,366	14,633			
SE40.3	0,1000	5	50	5	1	0,360	14,363			
<b>Etanol 50% a 50°C</b>										
SE50.1	0,1000	5	50	5	1	0,508	21,026	21,011	0,248	0,012
SE50.2	0,1000	5	50	5	1	0,513	21,251			
SE50.3	0,1000	5	50	5	1	0,502	20,756			
<b>Etanol 50% a 60°C</b>										
SE60.1	0,1000	5	50	5	1	0,512	21,206	21,626	0,651	0,030
SE60.2	0,1000	5	50	5	1	0,514	21,296			
SE60.3	0,1000	5	50	5	1	0,538	22,376			

**Tabla A4.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura para la determinación de flavonoides.

<b>FLAVONOIDES</b>										
<b>Código</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Aforo inicial (ml)</b>	<b>Alícuota muestra (µl)</b>	<b>Aforo final (ml)</b>	<b>F.D.</b>	<b>Abs 500nm</b>	<b>Conc. 500 nm (mg/g muestra)</b>	<b>Promedio conc. a 500 nm</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Coficiente de variación</b>
<b>Metanol 50% a 30°C</b>										
<b>SM30.1</b>	0,1000	5	250	5	1	0,433	14,175	13,900	0,418	0,030
<b>SM30.2</b>	0,1000	5	250	5	1	0,431	14,106			
<b>SM30.3</b>	0,1000	5	250	5	1	0,411	13,418			
<b>Metanol 50% a 40°C</b>										
<b>SM40.1</b>	0,1000	5	250	5	1	0,459	15,068	14,965	0,103	0,007
<b>SM40.2</b>	0,1000	5	250	5	1	0,453	14,862			
<b>SM40.3</b>	0,1000	5	250	5	1	0,456	14,965			
<b>Metanol 50% a 50°C</b>										
<b>SM50.1</b>	0,1000	5	250	5	1	0,479	15,756	15,710	0,079	0,005
<b>SM50.2</b>	0,1000	5	250	5	1	0,475	15,618			
<b>SM50.3</b>	0,1000	5	250	5	1	0,479	15,756			
<b>Metanol 50% a 60°C</b>										
<b>SM60.1</b>	0,1000	5	250	5	1	0,551	18,231	17,600	0,716	0,041
<b>SM60.2</b>	0,1000	5	250	5	1	0,537	17,749			
<b>SM60.3</b>	0,1000	5	250	5	1	0,510	16,821			

## Optimización del tiempo

**Tabla A5.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de polifenoles.

POLIFENOLES										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 760 nm	Desviación estándar	Coficiente de variación
<b>Etanol 50% a 50°C x 5 min</b>										
SE505.1	0,1000	5	50	5	1	0,508	21,026	21,011	0,248	0,012
SE505.2	0,1000	5	50	5	1	0,513	21,251			
SE505.3	0,1000	5	50	5	1	0,502	20,756			
<b>Etanol 50% a 50°C x 10 min</b>										
SE510.1	0,1000	5	50	5	1	0,531	22,061	22,181	0,113	0,005
SE510.2	0,1000	5	50	5	1	0,536	22,286			
SE510.3	0,1000	5	50	5	1	0,534	22,196			
<b>Etanol 50% a 50°C x 20 min</b>										
SE520.1	0,1000	5	50	5	1	0,536	22,286	22,361	0,094	0,004
SE520.2	0,1000	5	50	5	1	0,537	22,331			
SE520.3	0,1000	5	50	5	1	0,540	22,466			
<b>Etanol 50% a 60°C x 5 min</b>										
SE605.1	0,1000	5	50	5	1	0,512	21,206	21,626	0,651	0,030
SE605.2	0,1000	5	50	5	1	0,514	21,296			
SE605.3	0,1000	5	50	5	1	0,538	22,376			
<b>Etanol 50% a 60°C x 10 min</b>										
SE610.1	0,1000	5	50	5	1	0,548	22,826	22,706	0,138	0,006
SE610.2	0,1000	5	50	5	1	0,542	22,556			
SE610.3	0,1000	5	50	5	1	0,546	22,736			
<b>Etanol 50% a 60°C x 20 min</b>										
SE620.1	0,1000	5	50	5	1	0,551	22,961	22,841	0,104	0,005
SE620.2	0,1000	5	50	5	1	0,547	22,781			
SE620.3	0,1000	5	50	5	1	0,547	22,781			

**Tabla A6.** Datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo para la determinación de flavonoides.

FLAVONOIDES										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 500nm	Desviación estándar	Coefficiente de variación
<b>Metanol 50% a 50°C x 5 min</b>										
SM505.1	0,1000	5	250	5	1	0,479	15,756	15,710	0,079	0,005
SM505.2	0,1000	5	250	5	1	0,475	15,618			
SM505.3	0,1000	5	250	5	1	0,479	15,756			
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min</b>										
SM510.1	0,1000	5	250	5	1	0,506	16,684	16,684	0,034	0,002
SM510.2	0,1000	5	250	5	1	0,507	16,718			
SM510.3	0,1000	5	250	5	1	0,505	16,649			
<b>Metanol 50% a 50°C x 20 min</b>										
SM520.1	0,1000	5	250	5	1	0,503	16,581	16,569	0,121	0,007
SM520.2	0,1000	5	250	5	1	0,499	16,443			
SM520.3	0,1000	5	250	5	1	0,506	16,684			
<b>Metanol 50% a 60°C x 5 min</b>										
SM605.1	0,1000	5	250	5	1	0,459	15,068	14,965	0,103	0,007
SM605.2	0,1000	5	250	5	1	0,453	14,862			
SM605.3	0,1000	5	250	5	1	0,456	14,965			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min</b>										
SM610.1	0,1000	5	250	5	1	0,519	17,131	17,497	0,635	0,036
SM610.2	0,1000	5	250	5	1	0,551	18,231			
SM610.3	0,1000	5	250	5	1	0,519	17,131			
<b>Metanol 50% a 60°C x 20 min</b>										
SM620.1	0,1000	5	250	5	1	0,543	17,956	17,944	0,053	0,003
SM620.2	0,1000	5	250	5	1	0,544	17,990			
SM620.3	0,1000	5	250	5	1	0,541	17,887			

## Desgaste del materia vegetal

**Tabla A7.** Datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de polifenoles.

POLIFENOLES										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 760 nm	Desviación estándar	Coficiente de variación
Etanol 50% a 50°C x 10 min. <u>Extracción 1</u>										
SE501.1	0,1000	5	50	5	1	0,546	22,736	22,751	0,026	0,001
SE501.2	0,1000	5	50	5	1	0,546	22,736			
SE501.3	0,1000	5	50	5	1	0,547	22,781			
Etanol 50% a 50°C x 10 min. <u>Extracción 2</u>										
SE502.1	0,1000	5	50	5	1	0,272	10,402	10,522	0,104	0,010
SE502.2	0,1000	5	50	5	1	0,276	10,582			
SE502.3	0,1000	5	50	5	1	0,276	10,582			
Etanol 50% a 50°C x 10 min. <u>Extracción 3</u>										
SE503.1	0,1000	5	50	5	1	0,130	4,010	4,055	0,045	0,011
SE503.2	0,1000	5	50	5	1	0,131	4,055			
SE503.3	0,1000	5	50	5	1	0,132	4,100			
Etanol 50% a 50°C x 10 min. <u>Extracción 4</u>										
SE504.1	0,1000	5	50	5	1	0,066	1,129	1,099	0,052	0,047
SE504.2	0,1000	5	50	5	1	0,066	1,129			
SE504.3	0,1000	5	50	5	1	0,064	1,039			
Etanol 50% a 50°C x 10 min. <u>Extracción 5</u>										
SE505.1	0,1000	5	50	5	1	0,025	-0,717	-0,822	0,113	-0,138
SE505.2	0,1000	5	50	5	1	0,020	-0,942			
SE505.3	0,1000	5	50	5	1	0,023	-0,807			
Etanol 50% a 60°C x 10 min. <u>Extracción 1</u>										
SE601.1	0,1000	5	50	5	1	0,523	21,701	21,836	0,119	0,005
SE601.2	0,1000	5	50	5	1	0,528	21,926			
SE601.3	0,1000	5	50	5	1	0,527	21,881			
Etanol 50% a 60°C x 10 min. <u>Extracción 2</u>										
SE602.1	0,1000	5	50	5	1	0,244	9,141	9,292	0,138	0,015
SE602.2	0,1000	5	50	5	1	0,248	9,322			
SE602.3	0,1000	5	50	5	1	0,250	9,412			
Etanol 50% a 60°C x 10 min. <u>Extracción 3</u>										
SE603.1	0,1000	5	50	5	1	0,109	3,064	3,079	0,026	0,008
SE603.2	0,1000	5	50	5	1	0,110	3,109			
SE603.3	0,1000	5	50	5	1	0,109	3,064			
Etanol 50% a 60°C x 10 min. <u>Extracción 4</u>										
SE604.1	0,1000	5	50	5	1	0,064	1,039	1,024	0,113	0,111
SE604.2	0,1000	5	50	5	1	0,066	1,129			
SE604.3	0,1000	5	50	5	1	0,061	0,904			
Etanol 50% a 60°C x 10 min. <u>Extracción 5</u>										
SE605.1	0,1000	5	50	5	1	0,039	-0,087	-0,222	0,162	-0,732
SE605.2	0,1000	5	50	5	1	0,037	-0,177			
SE605.3	0,1000	5	50	5	1	0,032	-0,402			

**Tabla A8.** Datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de flavonoides.

FLAVONOIDES										
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 500nm	Desviación estándar	Coefficiente de variación
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min. Extracción 1</b>										
SM501.1	0,1000	5	250	5	1	0,537	17,749	16,741	1,746	0,104
SM501.2	0,1000	5	250	5	1	0,537	17,749			
SM501.3	0,1000	5	250	5	1	0,449	14,725			
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min. Extracción 2</b>										
SM502.1	0,1000	5	250	5	1	0,240	7,541	8,125	0,786	0,097
SM502.2	0,1000	5	250	5	1	0,248	7,816			
SM502.3	0,1000	5	250	5	1	0,283	9,019			
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min. Extracción 3</b>										
SM503.1	0,1000	5	250	5	1	0,110	3,072	3,187	0,121	0,038
SM503.2	0,1000	5	250	5	1	0,117	3,313			
SM503.3	0,1000	5	250	5	1	0,113	3,175			
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min. Extracción 4</b>										
SM504.1	0,1000	5	250	5	1	0,056	1,216	1,296	0,469	0,362
SM504.2	0,1000	5	250	5	1	0,046	0,872			
SM504.3	0,1000	5	250	5	1	0,073	1,800			
<b>Metanol 50% a 50°C x 10 min. Extracción 5</b>										
SM505.1	0,1000	5	250	5	1	0,035	0,494	0,471	0,040	0,084
SM505.2	0,1000	5	250	5	1	0,033	0,426			
SM505.3	0,1000	5	250	5	1	0,035	0,494			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min. Extracción 1</b>										
SM601.1	0,1000	5	250	5	1	0,549	18,162	18,070	0,189	0,010
SM601.2	0,1000	5	250	5	1	0,550	18,196			
SM601.3	0,1000	5	250	5	1	0,540	17,852			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min. Extracción 2</b>										
SM602.1	0,1000	5	250	5	1	0,244	7,678	7,678	0,172	0,022
SM602.2	0,1000	5	250	5	1	0,239	7,506			
SM602.3	0,1000	5	250	5	1	0,249	7,850			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min. Extracción 3</b>										
SM603.1	0,1000	5	250	5	1	0,122	3,485	4,573	1,975	0,432
SM603.2	0,1000	5	250	5	1	0,220	6,853			
SM603.3	0,1000	5	250	5	1	0,119	3,382			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min. Extracción 4</b>										
SM604.1	0,1000	5	250	5	1	0,058	1,285	1,308	0,105	0,080
SM604.2	0,1000	5	250	5	1	0,056	1,216			
SM604.3	0,1000	5	250	5	1	0,062	1,422			
<b>Metanol 50% a 60°C x 10 min. Extracción 5</b>										
SM605.1	0,1000	5	250	5	1	0,042	0,735	0,804	0,091	0,113
SM605.2	0,1000	5	250	5	1	0,047	0,907			
SM605.3	0,1000	5	250	5	1	0,043	0,769			

**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**

**Actividad Antiinflamatoria- método HRBC**

**Tabla A9.1** Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método HRBC en los extratos del estándar diclofenaco

Muestra	Concentración µg/ml	Absorbancias a 540 nm			Promedio control	$\% \text{ de Act} = 100 - \left( \frac{\text{abs. muestra}}{\text{abs. control}} \times 100 \right)$						
		1,253	1,254	1,235						1,247		
					%Act. Antiinflamatoria a 540 nm	%Act. Antiinflamatoria Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación				
Diclofenaco	Control	0	1,253	1,254	1,235	1,247						
			0,050	0,045	0,050	95,99	97,01	0,94	0,010			
			0,035	0,031	0,037	97,19						
	0,027	0,024	0,029	97,84								
	50	0,031	0,027	0,036	97,51	97,25	0,68	0,007				
									0,044	0,039	0,046	96,47
									0,028	0,025	0,029	97,76
	75	0,033	0,030	0,035	97,35	97,19	0,50	0,005				
									0,030	0,026	0,039	97,59
									0,042	0,038	0,044	96,63
	100	0,095	0,090	0,100	92,38	93,53	1,53	0,016				
									0,059	0,042	0,064	95,27
									0,088	0,083	0,094	92,94
	200	0,057	0,041	0,062	95,43	93,19	2,79	0,030				
									0,074	0,070	0,079	94,07
									0,124	0,118	0,127	90,06

**Tabla A9.2** Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método HRBC en los extratos de etanólico y metanólico de sambuel.

Muestra	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Absorbancias a 540 nm			Promedio control	$\% \text{ de Act} = 100 - \left( \frac{\text{abs. muestra}}{\text{abs. control}} \times 100 \right)$			
Control	0	1,253	1,254	1,235	1,247				
					%Act. Antiinflamatoria a 540 nm	%Act. Antiinflamatoria Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	
Sambuel_Etanol 50%	25	0,097	0,064	0,091	92,22	92,25	0,05	0,001	
		0,096	0,063	0,09	92,30				
		0,097	0,080	0,086	92,22				
	50	0,095	0,059	0,09	92,38	92,30	0,14	0,002	
		0,098	0,063	0,089	92,14				
		0,095	0,059	0,090	92,38				
	75	0,086	0,073	0,076	93,11	93,00	0,26	0,003	
		0,085	0,056	0,079	93,19				
		0,091	0,077	0,081	92,70				
	100	0,083	0,062	0,093	93,35	93,35	0,08	0,001	
		0,084	0,056	0,078	93,27				
		0,082	0,055	0,075	93,43				
200	0,075	0,051	0,07	93,99	94,47	0,48	0,005		
	0,069	0,047	0,064	94,47					
	0,063	0,046	0,071	94,95					
500	0,021	0,012	0,027	98,32	98,13	0,32	0,003		
	0,021	0,013	0,027	98,32					
	0,028	0,019	0,035	97,76					
1000	0,068	0,049	0,083	94,55	94,04	0,44	0,005		
	0,078	0,058	0,063	93,75					
	0,077	0,056	0,061	93,83					
Sambuel_Metanol 50%	25	0,111	0,072	0,102	91,10	90,67	0,44	0,005	
		0,122	0,079	0,114	90,22				
		0,116	0,075	0,108	90,70				
	50	0,093	0,068	0,103	92,54	92,70	0,28	0,003	
		0,087	0,056	0,082	93,03				
		0,093	0,061	0,086	92,54				
	75	0,074	0,050	0,068	94,07	93,88	0,17	0,002	
		0,077	0,055	0,070	93,83				
		0,078	0,053	0,074	93,75				
	100	0,074	0,050	0,068	94,07	94,23	0,21	0,002	
		0,069	0,047	0,063	94,47				
		0,073	0,049	0,067	94,15				
200	0,080	0,057	0,061	93,59	93,45	0,17	0,002		
	0,084	0,063	0,095	93,27					
	0,081	0,06	0,092	93,51					

	500	0,029	0,019	0,037	97,68	97,89	0,20	0,002
		0,026	0,019	0,034	97,92			
		0,024	0,014	0,031	98,08			
	1000	0,087	0,066	0,07	93,03	93,08	0,17	0,002
		0,084	0,061	0,067	93,27			
		0,088	0,058	0,080	92,94			

## Actividad Antiinflamatoria- método desnaturalización de proteínas

**Tabla A10.1** Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteínas en el estándar diclofenaco.

Muestra	Concentración del extracto	Réplica	Abs. A 660 nm	Promedio control	$\% \text{ de Act.} = 100 - \left( \frac{\text{abs.muestra}}{\text{abs.control}} \times 100 \right)$				
Control	0 µg/ml	C1	1,414	1,42	% de Act. Antiinflamatoria	Promedio del % de Act. Antiinflamatoria	Desviación estándar	Coficiente de variación	
		C2	1,414						
		C3	1,427						
Diclofenaco	25 µg/ml	1	1,074	24,28	20,09	4,20	0,21		
		2	1,193	15,89					
		3	1,133	20,12					
Diclofenaco	50 µg/ml	1	1,049	26,04	28,86	2,82	0,10		
		2	1,009	28,86					
		3	0,969	31,68					
Diclofenaco	75 µg/ml	1	0,909	35,91	35,28	0,63	0,02		
		2	0,927	34,64					
		3	0,918	35,28					
Diclofenaco	100 µg/ml	1	1,066	24,84	24,18	0,96	0,04		
		2	1,091	23,08					
		3	1,069	24,63					
Diclofenaco	200 µg/ml	1	0,953	32,81	35,37	2,28	0,06		
		2	0,906	36,12					
		3	0,891	37,18					
Diclofenaco	500 µg/ml	1	0,728	48,67	49,96	1,38	0,03		
		2	0,712	49,80					
		3	0,689	51,42					
Diclofenaco	1000 µg/ml	1	0,583	58,90	60,02	3,19	0,05		
		2	0,516	63,62					
		3	0,602	57,56					

**Tabla A10.2.** Datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteínas en los extractos de etanólico y metanólico de sambuel.

Muestra	Concentración del extracto	Réplica	Abs. A 660 nm	Promedio del control				
Control	0 µg/ml	C1	1,414	1,42	$\% \text{ de Act.} = 100 - \left( \frac{\text{abs. muestra}}{\text{abs. control}} \times 100 \right)$			
		C2	1,414					
		C3	1,427					
				% de Act. Antiinflamatoria	Promedio del % de Act. Antiinflamatoria	Desviación estándar	% Normalizado respecto al estándar	Coefficiente de variación
Sambuel etanol 50%	100 µg/ml	1	0,907	36,05	36,50	0,90	60,81	0,02
		2	0,886	37,53				
		3	0,909	35,91				
Sambuel etanol 50%	200 µg/ml	1	0,732	48,39	48,51	0,27	80,82	0,01
		2	0,726	48,81				
		3	0,733	48,32				
Sambuel etanol 50%	500 µg/ml	1	0,760	46,42	46,60	0,52	77,65	0,01
		2	0,749	47,19				
		3	0,763	46,20				
Sambuel etanol 50%	1000 µg/ml	1	1,129	20,40	21,83	1,25	36,38	0,06
		2	1,100	22,44				
		3	1,097	22,66				
Sambuel metanol 50%	100 µg/ml	1	1,022	27,94	27,85	0,08	46,40	0,00
		2	1,024	27,80				
		3	1,024	27,80				
Sambuel metanol 50%	200 µg/ml	1	1,006	29,07	29,19	0,27	48,63	0,01
		2	1,007	29,00				
		3	1,000	29,49				
Sambuel metanol 50%	500 µg/ml	1	1,109	21,81	21,25	1,10	35,40	0,05
		2	1,135	19,98				
		3	1,107	21,95				
Sambuel metanol 50%	1000 µg/ml	1	1,299	8,41	12,39	3,44	20,64	0,28
		2	1,215	14,34				
		3	1,214	14,41				

## Actividad Antioxidante - método TBARS

**Tabla A11.** Datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante en los extractos de etanólico y metanólico de sambuel y el estándar diclofenaco

	Absorbancia a 532 nm								
	R1	R2	Promedio						
CONTROL (Aceite Oxidado)	0,977	0,928	0,953						
Aceite sin oxidar	0,129	0,124	0,127	<b>% Ac. Antioxidante</b>					
Muestras	R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
S. Etanol 100	0,809	0,751	0,823	17,37	24,39	15,68	19,15	4,62	0,241
S. Etanol 200	0,680	0,562	0,599	32,99	47,28	42,80	41,02	7,31	0,178
S. Etanol 500	0,516	0,554	0,522	52,85	48,24	52,12	51,07	2,47	0,048
S. Etanol 1000	0,426	0,465	0,437	63,74	59,02	62,41	61,72	2,43	0,039
S. Metanol 100	0,575	0,575	0,535	45,70	45,70	50,54	47,32	2,80	0,059
S. Metanol 200	0,592	0,591	0,589	43,64	43,77	44,01	43,81	0,18	0,004
S. Metanol 500	0,684	0,638	0,693	32,51	38,08	31,42	34,00	3,57	0,105
S. Metanol 1000	0,748	0,719	0,704	24,76	28,27	30,08	27,70	2,71	0,098
BHT 100	0,268	0,267	0,272	82,87	82,99	82,38	82,75	0,32	0,004
BHT 200	0,249	0,256	0,258	85,17	84,32	84,08	84,52	0,57	0,007
BHT 500	0,205	0,186	0,201	90,50	92,80	90,98	91,42	1,21	0,013
BHT 1000	0,163	0,170	0,157	95,58	94,73	96,31	95,54	0,79	0,008

$$Act. = \frac{(Ab.muestra - Ab.control)}{(Ab. aceite sin oxidar - Ab.control)} * 100$$

## Metales

**Tabla A12.** Condiciones utilizadas en la determinación de minerales analizados por llama

Mineral	Longitud de onda (nm)	Ancho de banda (nm)	Corriente de la lámpara (ma)	Tipo de flama	Fondo /Ambiente	Ajuste de llama
<b>Ca</b>	422.70	0.4	5.0	N <sub>2</sub> O/Acetileno	Ninguno/SR	Rojo reductor
<b>Cu</b>	324.79	0.4	5.0	Aire/Acetileno	Ninguno/SR	Azul oxidante
<b>Fe</b>	248.30	0.2	5.0	Aire/Acetileno	D <sub>2</sub> /SR	Azul oxidante
<b>Mg</b>	285.20	0.4	5.0	Aire/Acetileno	D <sub>2</sub> /SR	Azul oxidante
<b>Mn</b>	279.50	0.4	5.0	Aire/Acetileno	D <sub>2</sub> /SR	Azul oxidante
<b>Zn</b>	213.90	0.4	5.0	Aire/Acetileno	D <sub>2</sub> /SR	Azul oxidante

**Tabla A13.** Condiciones utilizadas en la determinación de minerales analizados por horno de grafito.

Mineral	Longitud de onda (nm)	Ancho de banda (nm)	Corriente de la lámpara (ma)	Temperatura de pirólisis (°C)	Temperatura de atomización (°C)	Fondo /Ambiente
<b>Cd</b>	228.80	0.4	5.0	600	1800	D <sub>2</sub>
<b>Co</b>	240.70	0.2	7.0	600	1800	D <sub>2</sub>
<b>Ni</b>	232.04	0.2	4.0	600	1800	D <sub>2</sub>
<b>Pb</b>	217.00	0.4	3.0	450	1800	Ninguno



**ANEXO B**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

---

**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES**

---

**Optimización del disolvente**

**Tabla B1.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de polifenoles.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	715,689	8	89,461	181,08	0,0000
Intra grupos	8,893	18	0,494		
Total (Corr.)	724,581	26			

**Tabla B2.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Disolventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Etanol Puro	3	3,094	X
Metanol puro	3	8,451	X
Agua	3	10,342	X
Etanol 75%	3	14,018	X
Metanol 25%	3	14,663	X
Metanol 50%	3	16,584	X
Etanol 25%	3	17,725	XX
Metanol 75%	3	18,385	X
Etanol 50%	3	20,005	X

**Optimización de la temperatura**

**Tabla B3.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de polifenoles.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	100,19	3	33,397	231,63	0,0000
Intra grupos	1,153	8	0,144		
Total (Corr.)	101,344	11			

**Tabla B4.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Temperaturas</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Etanol 50% a 40°C	3	14,498	X
Etanol 50% a 30°C	3	17,334	X
Etanol 50% a 50°C	3	21,011	X
Etanol 50% a 60°C	3	21,626	X

### Optimización del tiempo

**Tabla B5.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de polifenoles.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>A 50°C</b>					
Entre grupos	3,2238	2	1,6119	58,24	0,0001
Intra grupos	0,16605	6	0,027675		
Total (Corr.)	3,38985	8			
<b>A 60°C</b>					
Entre grupos	2,66085	2	1,33042	8,80	0,0164
Intra grupos	0,9072	6	0,1512		
Total (Corr.)	3,56805	8			

**Tabla B6.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de polifenoles .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Tiempos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>A 50°C</b>			
Etanol 50% x 5min	3	21,011	X
Etanol 50% x 10min	3	22,181	X
Etanol 50% x 20min	3	22,361	X
<b>A 60°C</b>			
Etanol 50% x 5min	3	21,626	X
Etanol 50% x 10min	3	22,706	X
Etanol 50% x 20min	3	22,841	X

## Desgaste del material vegetal

**Tabla B7.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en el desgaste del material vegetal para la determinación de polifenoles.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2079,29	9	231,032	22633,50	0,0000
Intra grupos	0,204	20	0,0102		
Total (Corr.)	2079,49	29			

**Tabla B8.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de polifenoles. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Número de extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Etanol 50% a 50°C x 10min. Ext 5	3	-0,822	X
Etanol 50% a 60°C x 10min. Ext 5	3	-0,222	X
Etanol 50% a 60°C x 10min. Ext 4	3	1,024	X
Etanol 50% a 50°C x 10min. Ext 4	3	1,099	X
Etanol 50% a 60°C x 10min. Ext 3	3	3,079	X
Etanol 50% a 50°C x 10min. Ext 3	3	4,055	X
Etanol 50% a 60°C x 10min. Ext 2	3	9,292	X
Etanol 50% a 50°C x 10min. Ext 2	3	10,522	X
Etanol 50% a 60°C x 10min. Ext 1	3	21,836	X
Etanol 50% a 50°C x 10min. Ext 1	3	22,751	X

---

**DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES**

---

**Optimización del disolvente**

**Tabla B9.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de flavonoides.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	357,008	8	44,6259	<b>110,94</b>	<b>0,0000</b>
Intra grupos	7,2405	18	0,40225		
Total (Corr.)	364,248	26			

**Tabla B10.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por disolvente en la determinación de flavonoides. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Disolventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Etanol Puro	3	2,509	X
Metanol puro	3	7,586	X
Agua	3	7,961	X
Etanol 75%	3	10,374	X
Metanol 25%	3	11,459	XX
Etanol 25%	3	12,538	X
Etanol 50%	3	13,827	X
Metanol 75%	3	13,922	X
Metanol 50%	3	14,014	X

**Optimización de la temperatura**

**Tabla B11.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de flavonoides.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	21,885	3	7,295	<b>41,35</b>	<b>0,0000</b>
Intra grupos	1,412	8	0,176		
Total (Corr.)	23,297	11			

**Tabla B12.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por temperatura en la determinación de flavonoides. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Temperaturas</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Metanol 50% a 40°C	3	13,899	×
Metanol 50% a 30°C	3	14,965	×
Metanol 50% a 50°C	3	15,71	×
Metanol 50% a 60°C	3	17,600	×

### Optimización del tiempo

**Tabla B13.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de flavonoides.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>A 50°C</b>					
Entre grupos	1,699	2	0,849	115,04	0,0000
Intra grupos	0,044	6	0,007		
Total (Corr.)	1,743	8			
<b>A 60°C</b>					
Entre grupos	15,490	2	7,745	55,76	0,0001
Intra grupos	0,833	6	0,139		
Total (Corr.)	16,324	8			

**Tabla B14.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la optimización del proceso de extracción por tiempo en la determinación de flavonoides. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Tiempos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>A 50°C</b>			
Etanol 50% x 5min	3	15,71	×
Etanol 50% x 10min	3	16,569	×
Etanol 50% x 20min	3	16,684	×
<b>A 60°C</b>			
Etanol 50% x 5min	3	14,965	×
Etanol 50% x 10min	3	17,498	×
Etanol 50% x 20min	3	17,944	×

## Desgaste del material vegetal

**Tabla B15.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en el desgaste del material vegetal para la determinación de flavonoides.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1138,63	9	126,514	160,40	0,0000
Intra grupos	15,775	20	0,789		
Total (Corr.)	1154,4	29			

**Tabla B16.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en el desgaste de material vegetal en la determinación de flavonoides .Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Número de extracción</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Metanol 50% a 50°C x 10min. Ext 5	3	0,471	X
Metanol 50% a 60°C x 10min. Ext 5	3	0,804	X
Metanol 50% a 50°C x 10min. Ext 4	3	1,296	X
Metanol 50% a 60°C x 10min. Ext 4	3	1,308	X
Metanol 50% a 50°C x 10min. Ext 3	3	3,187	X
Metanol 50% a 60°C x 10min. Ext 3	3	4,573	X
Metanol 50% a 60°C x 10min. Ext 2	3	7,678	X
Metanol 50% a 50°C x 10min. Ext 2	3	8,125	X
Metanol 50% a 50°C x 10min. Ext 1	3	16,741	X
Metanol 50% a 60°C x 10min. Ext 1	3	18,07	X

---

**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS**

---

**Actividad antiinflamatoria-método HRBC**

**Tabla B17.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el extracto etanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	73,992	6	12,332	137,92	0,0000
Intra grupos	1,252	14	0,089		
Total (Corr.)	75,244	20			

**Tabla B18.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el extracto metanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	85,369	6	14,228	197,69	0,0000
Intra grupos	1,008	14	0,072		
Total (Corr.)	86,376	20			

**Tabla B19.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC para el estándar.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	51,967	4	12,992	5,53	0,0130
Intra grupos	23,484	10	2,348		
Total (Corr.)	75,451	14			

**Tabla B20.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b><i>Extracto etanólico</i></b>			
Etanol 50%_25µg/ml	3	92,247	X
Etanol 50%_50µg/ml	3	92,3	X
Etanol 50%_75µg/ml	3	93,0	X
Etanol 50%_100µg/ml	3	93,35	X
Etanol 50%_1000µg/ml	3	94,043	X
Etanol 50%_200µg/ml	3	94,47	X
Etanol 50%_500µg/ml	3	98,133	X
<b><i>Extracto metanólico</i></b>			
Metanol 50%_500µg/ml	3	97,893	X
Metanol 50%_25µg/ml	3	90,673	X
Metanol 50%_50µg/ml	3	92,703	X
Metanol 50%_1000µg/ml	3	93,08	XX
Metanol 50%_200µg/ml	3	93,51	XX
Metanol 50%_75µg/ml	3	93,83	XX
Metanol 50%_100µg/ml	3	94,23	X

**Tabla B21.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método HRBC del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del estándar</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Diclofenaco_200µg/ml	3	93,187	X
Diclofenaco_100µg/ml	3	93,53	X
Diclofenaco_25µg/ml	3	97,007	X
Diclofenaco_75µg/ml	3	97,19	X
Diclofenaco_50µg/ml	3	97,247	X

### **Actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína**

**Tabla B22.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el extracto etanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1342,53	3	447,51	663,19	0,0000
Intra grupos	5,398	8	0,675		
Total (Corr.)	1347,93	11			

**Tabla B23.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el extracto metanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	531,113	3	177,038	53,87	0,0000
Intra grupos	26,293	8	3,287		
Total (Corr.)	557,406	11			

**Tabla B24.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína para el estándar.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2247,51	3	749,17	164,98	0,0000
Intra grupos	36,327	8	4,541		
Total (Corr.)	2283,84	11			

**Tabla B25.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<b>Extracto etanólico</b>			
Etanol 1000 µg/ml	3	21,833	X
Etanol 100 µg/ml	3	36,497	X
Etanol 500 µg/ml	3	46,603	X
Etanol 200 µg/ml	3	48,507	X
<b>Extracto metanólico</b>			
Metanol 1000 µg/ml	3	12,387	X
Metanol 500 µg/ml	3	21,247	X
Metanol 100 µg/ml	3	27,847	X
Metanol 200 µg/ml	3	29,187	X

**Tabla B26.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antiinflamatoria-método desnaturalización de proteína del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del estándar</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Diclofenaco 100µg/ml	3	24,183	X
Diclofenaco 200µg/ml	3	35,37	X
Diclofenaco 500µg/ml	3	49,963	X
Diclofenaco 1000µg/ml	3	60,027	X

## Actividad antioxidante-método TBARS

**Tabla B27.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el extracto etanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2965,03	3	988,345	45,54	0,0000
Intra grupos	173,63	8	21,7037		
Total (Corr.)	3138,66	11			

**Tabla B28.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el extracto metanólico.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	726,838	3	242,279	34,71	0,0001
Intra grupos	55,843	8	6,980		
Total (Corr.)	782,681	11			

**Tabla B29.** Análisis de varianza (ANOVA) para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS para el estándar.

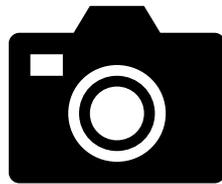
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	321,083	3	107,028	169,22	0,0000
Intra grupos	5,0598	8	0,632		
Total (Corr.)	326,143	11			

**Tabla B30.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS de los extractos del sambuel. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del extracto</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
<i>Extracto etanólico</i>			
S.E 100	3	19,147	X
S.E 200	3	41,023	X
S.E 500	3	51,07	X
S.E 1000	3	61,723	X
<i>Extracto metanólico</i>			
S.M 1000	3	27,703	X
S.M 500	3	34,003	X
S.M 200	3	43,807	X
S.M 100	3	47,313	X

**Tabla B31.** Prueba de múltiples rangos para los datos obtenidos en la determinación de actividad antioxidante-método TBARS del estándar diclofenaco. Método: Diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza.

<i>Concentración del estándar</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BHT 100	3	82,747	X
BHT 200	3	84,523	X
BHT 500	3	91,427	X
BHT 1000	3	95,54	X



## **ANEXO C**

# **FOTOGRAFÍAS DE LA INVESTIGACIÓN**

## Recolección de las hojas de Sambuel



**Fig. C1.** Socialización del proyecto de estudio y petición de permiso para la recolección del material vegetal en la comunidad Teligote.

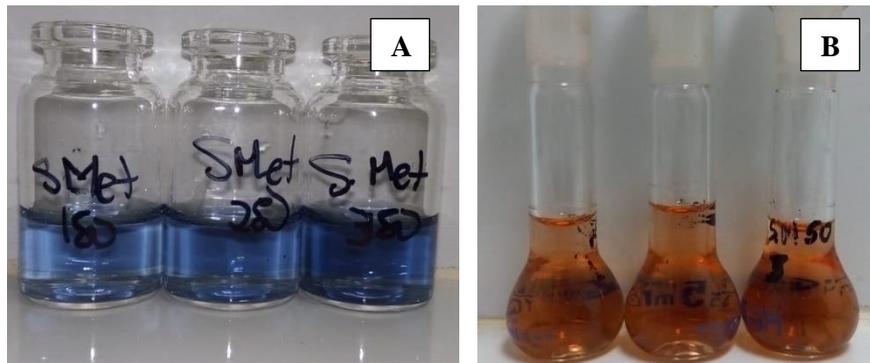


**Fig. C2.** Ascensos al cerro Teligote para la recolección de las hojas de sambuel.



**Fig. C3.** Preparación de las hojas de sambuel.

### Optimización del proceso de extracción



**Fig. C4.** Determinación de polifenoles (A) y de flavonoides (B).

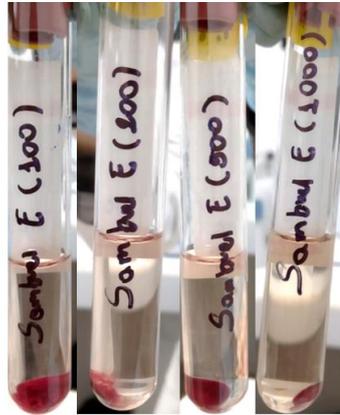


**Fig. C5.** Desgaste del material vegetal en la optimización del proceso de extracción. Donde : A= extractos de las hojas de sambuel, B= complejo coloreado formado luego del ensayo de polifenoles (Folin Ciocalteu) y C= complejo coloreado formado luego del ensayo de flavonoides.



**Fig. C6.** Evaporación de los disolventes en el rotavapor. Extractos de las hojas de sambuel antes (A) y después (B) de la evaporación.

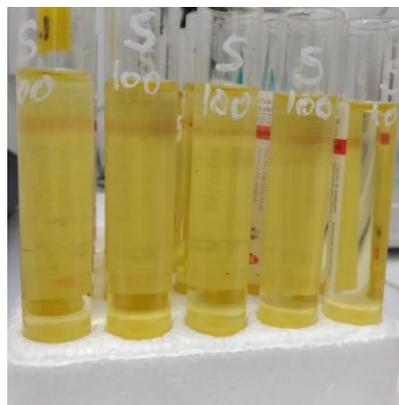
## Actividades Biológicas



**Fig. C7.** Resultados luego de realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria- método HRBC a diferentes concentraciones de los extractos de sambuel.



**Fig. C8.** Extracto de las hojas de sambuel a diferentes concentraciones y los resultados luego de realizar el ensayo de actividad antiinflamatoria- método desnaturalización de proteína con albúmina de huevo.



**Fig. C9.** Tubos de ensayo con aceite de oliva y los extractos liofilizados de sambuel a diferentes concentraciones en el ensayo de actividad antioxidante, antes de la oxidación.