



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



Tema: Estudio de las actividades biológicas, antioxidante y antiinflamatoria de los extractos obtenidos a partir de Pussu pato (*Grosvenoria rimbachii*).

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

Autor: Alex Genaro Tigsilema Chico

Tutora: Dra. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato-Ecuador

Enero - 2020

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, 5 de Diciembre del 2019



PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I. 180413557-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Alex Genaro Tigsilema Chico, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Alex Genaro Tigsilema Chico

C.I. 180427781-0

AUTOR

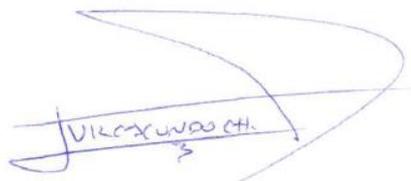
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia, firman:



Presidente del Tribunal de Grado



PhD. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

C.I: 1802738102

Mg. Wilson Patricio Orozco Freire

C.I: 1721363008

Ambato, 23 de Enero de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Alex Genaro Tigsilema Chico

C.I. 1804277810

AUTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico principalmente a Genaro Tigsilema y Elvia Chico mis padres por el apoyo brindado en toda mi formación académica y personal, porque su sacrificio nunca fue en vano, porque este es el fruto de muchas situaciones que tuvimos que pasamos juntos.

A Andrea Tigsilema mi hermana, que desde el cielo me cuidó y fue un pilar muy importante para llegar a este punto de mi vida, ya que siempre se encuentra presente en mi mente y en mi corazón.

A Andrés Tigsilema y Sebastián Sánchez mis queridos y respetados hermanos, que siempre estuvieron conmigo apoyándome, aconsejándome y preocupándose en todo momento.

A mis abuelos Luis Tigsilema y Cristóbal Chico quienes extraño inmensamente, pero sé que desde el cielo estuvieron conmigo en los momentos de confusión y soledad, orientándome en cada momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida, por protegerme en cada momento y permitirme llegar a este momento importante de mi vida, a mis padres Genaro Tigsilema y Elvia Chico que con su sacrificio y apoyo incondicional creyeron en su hijo por sobre todas las cosas, aconsejándome y motivándome para lograr cada una de mis metas.

Agradezco a mis hermanos Andrés y Paola, a mis primos, a mis tíos, a toda mi familia, que de una u otra manera siempre estuvieron conmigo ayudándome en este largo trayecto.

Agradezco a mi tutora Dra. Dayana Morales por su paciencia, dedicación y compromiso mostrado en este proyecto, a Ximena Mendoza que supo apoyarme incondicionalmente en cada momento, a mi grupo de investigación “Polifenoles”, a mis amigos con quienes compartimos juntos muchos momentos inolvidables.

Agradezco al Proyecto de canje de deuda Ecuador – España, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, a la Universidades Técnica de Ambato y a los ingenieros de tan prestigiosa Universidad, muchas gracias por abrirme las puertas y permitirme culminar mis estudios con éxito.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Pussu pato	2
1.1.2 Antioxidantes naturales	3
1.1.3 Cuantificación y caracterización de metabolitos secundarios	4
1.1.4 Actividades biológicas	6
1.1.5 Metales	8
1.2 Objetivos	9
1.2.1 Objetivo general	9
1.2.2 Objetivos específicos	9
1.3 Hipótesis	9
1.3.1 Factores del proceso de extracción	9
1.3.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante	10
1.3.3 Contenido de metales pesados	10
1.4 Señalamiento de variables	10
1.4.1 Factores del proceso de extracción	10
1.4.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante	11
1.4.3 Contenido de metales pesados	11
CAPÍTULO II.....	12
2. METODOLOGÍA.....	12
2.1 Materiales	12
2.1.1 Muestra	12
2.1.2 Materiales de laboratorio	12
2.2 Reactivos	13
2.3 Equipos	13
2.4 Métodos	14
2.4.1 Preparación de la muestra	14
2.4.2 Cuantificación de polifenoles totales	15
2.4.3 Cuantificación de flavonoides totales	16
2.4.4 Caracterización	16
2.4.5 Actividad anti-inflamatoria	17
2.4.6 Actividad antioxidante	18

2.4.7 Metales	19
CAPÍTULO III.....	21
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
3.1 Optimización del proceso de extracción – Factor: disolvente	21
3.2 Optimización del proceso de extracción – Factor: temperatura	23
3.3 Optimización del proceso de extracción – Factor: tiempo	24
3.4 Desgaste del material vegetal	26
3.5 Caracterización	28
3.5.1 TLC	28
3.5.2 HPLC	29
3.6 Actividades biológicas	32
3.6.1 Actividad antiinflamatoria	32
3.6.2 Actividad Antioxidante	35
3.7 Metales	37
3.8 Verificación de hipótesis	39
3.8.1 Factores del proceso de extracción	39
3.8.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante	39
3.8.3 Contenido de metales pesados	39
CAPÍTULO IV.....	40
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
4.1 Conclusiones	40
4.2 Recomendaciones	41
5. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ANEXOS

ANEXOS A	52
Tablas Estadísticas	52
Optimización del proceso de extracción – Factor disolvente	53
Polifenoles	53
Flavonoides	54
Optimización del proceso de extracción – Factor: Temperatura	54
Polifenoles	54
Flavonoides	55
Optimización del proceso de extracción – Factor: Tiempo	56
Polifenoles	56
Flavonoides	56
Desgaste de material vegetal	57
Polifenoles	57
Flavonoides	58
Actividades biológicas	58
Actividad antiinflamatoria- Método HRBC	58
Polifenoles	58
Flavonoides	59
Diclofenaco	60
Actividad antiinflamatoria - Método de desnaturalización de proteínas	60
Polifenoles	60
Flavonoides	61
Diclofenaco	62
Actividad antioxidante	62
Polifenoles	62
Flavonoides	63
Butilhidroxitolueno	64
ANEXOS B	65
Datos de la experimentación.....	65
Optimización del proceso de extracción – Factor disolvente	66
Polifenoles	66
Flavonoides	67
Optimización del proceso de extracción – Factor temperatura	68
Polifenoles	68

Flavonoides	68
Optimización del proceso de extracción – Factor tiempo	69
Polifenoles	69
Flavonoides	69
Actividades Biológicas	70
Actividad antiinflamatoria - Método HRBC	70
Actividad antiinflamatoria - Desnaturalización de proteína	72
Actividad antioxidante	74
ANEXOS C	75
Fotografías.....	75
Muestreo	76
Cuantificación	77
Caracterización	78
Actividades Biológicas	78
Actividad antiinflamatorio - Método HRBC	78
Actividad antiinflamatoria – Método desnaturalización de proteína	79
Actividad antioxidante	79
Metales	80

RESUMEN

La sierra ecuatoriana es parte de la conocida Cordillera de los Andes, formada por irregularidades topográficas, una de ellas es el cerro Teligote, el cuál ha sido fuente importante de plantas medicinales como el *Pussu pato*, el mismo que ha sido usado en la reconstrucción músculo-esquelética y fue estudiado en el presente proyecto de investigación, con el fin de evaluar los compuestos fenólicos (polifenoles y flavonoides) su caracterización y la presencia de actividades biológicas antiinflamatoria y antioxidante, además del contenido de minerales (calcio, magnesio, manganeso, hierro, cinc, cobalto, cobre, níquel, plomo y cadmio). Para ello se realizó una optimización del proceso de extracción de metabolitos secundarios variando el disolvente, la temperatura y el tiempo; obteniéndose 10,492 mg AG/g para polifenoles (metanol 25% a 50°C por 5min) y 3,676 mg CQ/g para flavonoides, (etanol 75% a 50°C por 20min), mientras que la caracterización se realizó mediante cromatografía de capa fina y cromatografía de alto rendimiento. La actividad antiinflamatoria se realizó mediante los métodos de estabilización de membrana de glóbulos rojos y desnaturalización de proteína dando como resultados 98,6% (extracto metanólico a 100 µg/ml) y 95,9% (extracto etanólico a 25 µg/ml) para HRBC y 41,4% (extracto metanólico a 1000 µg/ml) y 32,6% (extracto etanólico a 100 µg/ml) para desnaturalización de proteína. La actividad antioxidante evaluada mediante el método TBARS mostró los mejores resultados a 1000 µg/ml (39,9% extracto metanólico y 61,7% extracto etanólico) y en la determinación de minerales mediante espectroscopia de absorción atómica, el que se encontró en mayor cantidad fue el calcio (1295,2 mg/100g).

Palabras clave: *Pussu pato*, extracción, polifenoles, flavonoides, caracterización, actividades biológicas.

ABSTRACT

The Ecuadorian mountain range is part of the well-known Andes mountain range, formed by topographic irregularities, one of them is the Teligote hill, which has been an important source of medicinal plants such as Pussu pato, the same one that has been used in muscle reconstruction skeletal and was studied in the present research project, in order to evaluate the phenolic compounds (polyphenols and flavonoids) their characterization and the presence of biological anti-inflammatory and antioxidant activities, in addition to the mineral content (calcium, magnesium, manganese, iron, zinc, cobalt, copper, nickel, lead and cadmium). For this, an optimization of the secondary metabolite extraction process was carried out by varying the solvent, temperature and time; obtaining 10,492 mg AG/g for polyphenols (with 25% methanol at 50 °C for 5min) and 3,676 mg CQ/g for flavonoids, (with 75% ethanol at 50 °C for 20min), while the characterization was performed by thin layer chromatography and high performance chromatography. The anti-inflammatory activity was carried out by means of the methods of stabilization of red blood cell membrane and protein denaturation resulting in 98.6% (methanolic extract at 100 µg/ml) and 95.9% (ethanolic extract at 25 µg/ml) for HRBC and 41.4% (methanolic extract at 1000 µg/ml) and 32.6% (ethanolic extract at 100 µg/ml) for protein denaturation. The antioxidant activity using the TBARS method showed the best results at 1000 µg/ml (39.9% methanolic extract and 61.7% ethanolic extract) and in the determination of minerals by atomic absorption spectroscopy, calcium (1295.2 mg/100g) was the mineral with the highest content in Pussu pato leaves.

Keywords: Pussu pato, extraction, polyphenols, flavonoids, characterization, biological activities

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

La filogenia molecular sugiere que las regiones tropicales y templadas han contribuido a la evolución de la flora en los páramos andinos y esto sumado al tiempo, ha provocado una gran diversidad de plantas (Sklenář et al., 2011), cuyos usos para las poblaciones locales, radican en ser una fuente de recursos como madera, alimentos y medicamentos (MacLaren et al., 2014). Se cree que dos tercios de las especies de plantas del mundo contienen una importancia medicinal.

La Sierra ecuatoriana forma parte de la conocida cordillera de los Andes, la cual está formada por una gran variedad de volcanes, montañas, nevados y cerros. El llamado cerro Teligote está ubicado en el cantón Pelileo, provincia de Tungurahua y tiene una superficie de 407.40 hectáreas. Se encuentra limitado por las comunidades de Pintag y Guantugsumo al norte, al sur por la parroquia de Bolívar, al este por la comunidad de Ladrillo y al oeste por la Comunidad de Llimpe y Masabacho. Su altura máxima es de 3640 m.s.n.m. y posee un clima semi nublado – lluvioso con temperaturas que van de entre 7 a 15°C (Villac, 2012).

Tanto el cerro Teligote como los otros cerros que se encuentran a los alrededores de la comunidad de Salasaca, son considerados lugares sagrados, ya que representan a la *Pachamama* (madre tierra). Estos lugares poseen una energía especial que conecta la naturaleza con los seres humanos y se han dado a conocer de generación en generación, desde hace mucho tiempo (Dominguez & Muscio, 2017). Siendo el Cerro Teligote una fuente importante para la comunidad de Salasaca que emplea las plantas que en el crecen para teñir sus atuendos, para realizar actos de veneración, fertilidad de los cultivos y curación con aquellas plantas consideradas medicinales (Corr, 2010).

1.1.1 Pussu pato

Una de las plantas utilizadas por los comuneros del cerro Teligote es el Pussu pato cuyo nombre científico es *Grosvenoria rimbachii* y pertenece a la familia Asteraceae. El género de esta planta se encuentra constituido por 4 especies descritas, distribuidas a una altura de 3000 msnm aproximadamente, solo en Ecuador y Perú (**King & Robinson, 1975**). Su uso medicinal se reporta para la reconstitución de músculos y huesos (**Galarza, 2014**).

Se han realizado escasos estudios en el género *Grosvenoria*, uno de ellos es el estudio realizado por **Zdero et al., (1991)** titulado "Diterpenes and norditerpenes from the aristeguetza group" en el cual se analizó el extracto de *G. rimbachii* mediante resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN) obteniendo como resultado 8 compuestos orgánicos: germacreno D, euparina, ferrato de coniferilo, 4-metoxi 3-isovaleril acetofenona, las guaianolides dehidroleucodina, 8-desoxicocumambrina B, 2α -acetoxi- $3\alpha,4\alpha$ -epoxykauniolida, la novanina de germacranólidos y los derivados de tremetona.

Aunque no se han encontrado más referencias bibliográficas sobre este género, existen estudios de la misma división (Magnoliophyta) enfocados en la extracción, la caracterización y el análisis de actividades biológicas.

En cuanto al contenido de polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante, existen estudios como aquel realizado por **Premanath & Lakshmidivi, (2010)** titulado "Studies on Antioxidant activity of *Tinospora cordifolia* (Miers.) Leaves using *in vitro* models" donde se utilizaron disolventes como hexano, cloroformo, metanol, etanol y agua para la obtención del extracto, dando valores más altos con el extracto obtenido mediante etanol.

Otro estudio realizado por **Ficarra et al., (1995)** denominado "Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis" se basa en el análisis de extractos de cinco especies de hojas del genero *Cordia* (*Cordia francisci*, *Cordia myxa*, *Cordia serratifolia*, *Cordia*

martinicensis, *Cordia ulmifolia*), donde los resultados obtenidos mostraron mayor actividad analgésica, antiinflamatoria y antiartrítica en las hojas de *C. francisci*, *C. myxa* y *C. serratifolia*. El contenido de flavonoides y derivados fenólicos de las cinco especies se investigó por TLC y se determinó por HPLC. Se evidenciaron y determinaron cuatro glucósidos flavonoides, una aglicona flavonoide y dos derivados fenólicos.

1.1.2 Antioxidantes naturales

Los antioxidantes son metabolitos secundarios presentes en las hojas de muchas plantas superiores, frutas (**Reitzer et al., 2018**), verduras, productos de cereales, así como en hierbas, especias y especialmente en té y café natural (**Samsonowicz et al., 2018**). Estos se dividen en tres grandes grupos: carotenoides, alil-sulfuros y polifenoles, estos últimos a su vez se subdividen en varias categorías que abarcan ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos; dentro de este grupo los flavonoides son los que se encuentran en mayor cantidad en la naturaleza, habiéndose identificado hasta la fecha alrededor de 5000 tipos (**Martínez et al., 2002**).

Los polifenoles han mostrado muchas bioactividades potenciales (**Quirós et al., 2014**) en la prevención de enfermedades crónicas y la reducción del riesgo de cáncer (**Zhang et al., 2018**). Uno de los principales beneficios de estos compuestos es la disminución de los radicales libres, los cuáles son átomos o grupos de átomos de vida biológica corta (microsegundos), que provocan un gran daño a nivel celular y en el ADN, llevando a la progresión de muchas patologías, como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (**Brainina et al., 2018**). Este daño se produce debido a que estos, carecen de un electrón o átomo de hidrógeno y captan electrones de moléculas estables para alcanzar su estabilidad electroquímica (**Gutteridge & Halliwell, 1999**).

En un inicio los radicales libres se producen naturalmente en el cuerpo para luchar contra bacterias y virus. El problema para la salud se produce cuando el organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos en su mayoría

por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo del cigarrillo **(Finkel & Holbrook, 2000)**.

El mecanismo de acción de los polifenoles para inhibir el desarrollo de radicales libres es ceder electrones para que estos ganen estabilidad y así evitar la oxidación de las células **(Avello & Suwalsky, 2006)**.

Otro de los beneficios de los polifenoles es su capacidad de inhibir las respuestas inflamatorias que se producen de manera defensiva desde el interior del cuerpo contra estímulos potencialmente dañinos como el estrés metabólico, lesiones o patógenos **(Ondua et al., 2018)**.

Estos compuestos fenólicos son biosintetizados de manera innata por las plantas **(Hassan, 2017)**, por lo que son una de las principales fuentes de interés científico en la industria alimentaria y farmacéutica con el fin de sustituir antioxidantes sintéticos **(De Las Heras et al., 1998)** y desarrollar nuevos medicamentos antiinflamatorios que sirvan de sustitutos a los fármacos comunes, pero con la ventaja de no llevar asociados efectos secundarios **(Dutra et al., 2016)**.

1.1.3 Cuantificación y caracterización de metabolitos secundarios

Los principales tipos de análisis de metabolitos secundarios se basan en la cuantificación y caracterización de los mismos. Estos se complementan de tal manera que mientras la cuantificación permite conocer la cantidad total de los compuestos fenólicos presentes en una matriz vegetal, la caracterización permite identificar compuestos específicos y en algunos casos determinar su proporción. Así, para cuantificar el contenido total de compuestos fenólicos de plantas, generalmente se usan métodos colorimétricos que utilizan curvas estándar derivadas de cantidades conocidas de polifenoles purificados como el ácido gálico o la catequina. Mientras que la determinación de polifenoles específicos se realiza mediante técnicas cromatográficas con la comparación de estándares **(Bajkacz et al., 2018; Galili & Hovav, 2014)**.

Dentro de los compuestos fenólicos más representativos en el reino vegetal se encuentran los polifenoles y un subgrupo de estos, los flavonoides.

Cuantificación de polifenoles y flavonoides

Los polifenoles totales se determinan comúnmente por el método espectrofotométrico de Folin Ciocalteu. Este método es simple, sensible y preciso y se basa en la reacción del extracto vegetal con el reactivo de Folin el cual consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Esta reacción, que ocurre en condiciones alcalinas, se lleva a cabo con carbonato de sodio (Na_2CO_3) (**Vinson, Proch, & Bose, 2001**); lo cual, permite que el electrón se elimine fácilmente de la molécula de fenol y se produzca su oxidación, lo que lleva a la reducción del reactivo de Folin a óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}).

Durante esta reducción, el color de la solución cambia a una coloración azul y presenta una absorción máxima a 760 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos y generalmente se expresa como ácido gálico (**Galili & Hovav, 2014**). De manera similar los flavonoides totales también pueden medirse por espectrofotometría, usando cloruro de aluminio ($AlCl_3$) como reactivo. Este método se basa en la reacción de iones de aluminio con moléculas flavonoides en condiciones básicas. Los productos de esta reacción son quelatos de flavonoides de aluminio de color naranja capaces de absorberse a una longitud de onda que va en el rango de 500-510 nm (**Matic, Sabljic, & Jakobek, 2017**)

Caracterización

Varias son las técnicas cromatográficas que se utilizan en la caracterización de polifenoles y flavonoides, entre ellos se destacan la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida de alto rendimiento.

Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés) se basa principalmente en el análisis de mezclas de componentes, en donde se determina cualitativamente los productos de una reacción (**Okada et al., 2016**). Su aplicación es amplia y generalmente es utilizada para caracterizar compuestos epitoquímicos en extractos de plantas, tinturas, aceites esenciales y productos herbales. Las placas de TLC son examinadas con una fuente de luz visible o ultravioleta, o se rocían con reactivos químicos con el fin de visualizar las manchas de los analitos y así obtener perfiles de separación (**Cheng et al., 2018**). Es importante la uniformidad del tamaño y la forma de las manchas al momento de la siembra de las muestras para obtener placas homogéneas y reproducibles (**Okada et al., 2012**).

Cromatografía líquida de alto rendimiento

La cromatografía líquida de alto rendimiento se utiliza en su mayoría para la separación y caracterización de macromoléculas en el campo biológico (**Buchholz et al., 1982**). Otorga un medio rápido, sensible y reproducible para separar y cuantificar por igual una amplia variedad de compuestos (**Fariss & Reed, 1987**), desde sustancias de masa molecular baja hasta muy alta. En esta técnica una mezcla disuelta en una fase móvil pasa a través de otro material llamado fase estacionaria y dependiendo de su interacción con las fases se separa y eluye a diferentes tiempos de retención (**Sánchez et al., 2018**).

1.1.4 Actividades biológicas

Los compuestos bioactivos presentes en las plantas poseen actividades biológicas como la actividad antiinflamatoria y antioxidante, las mismas que resultan de interés especialmente en el campo farmacéutico (**Rodríguez, 2015**).

Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria mide la capacidad de un compuesto para evitar la inflamación, la cual se produce como protección del sistema vascular del cuerpo con el objetivo de curar el tejido y erradicar los estímulos dañinos (**Shehata et al., 2018**). En la actualidad, los productos naturales y sobre todo las plantas medicinales son fuentes importantes de nuevos compuestos activos que pueden convertirse en moléculas clave en nuevas preparaciones médicas (**Edziri et al., 2018**). Una alternativa de posible farmacoterapia convencional es el uso de los extractos de plantas que presentan propiedades antiinflamatorias (**Balunas & Kinghorn, 2005**). Para ello se realizan ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* que comprueben estas actividades. Debido a que existen problemas éticos del uso de animales en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos para tratar enfermedades inflamatorias, son los estudios *in vitro* los que ayudan a desarrollar una comprensión del mecanismo de la actividad mediante un sistema cerrado donde se mantienen las condiciones experimentales. (**Sarveswaran, Jayasuriya, & Suresh, 2017**).

Entre las técnicas *in vitro* más utilizadas para la determinación de la actividad antiinflamatoria se encuentran los métodos de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC) y el método de desnaturalización de proteínas. El primero es un método para compuestos orgánicos en el que se induce una hemólisis de la membrana celular de glóbulos rojos humanos por hipotonicidad y se mide el contenido de hemoglobina liberado al medio (**García, 2016**). Mientras que el segundo busca determinar la capacidad de la sustancia probada para prevenir la desnaturalización de proteínas como la albúmina de huevo o albúmina de suero bovino (BSA) frente a la desnaturalización inducida por calor (**Sarveswaran et al., 2017**).

Actividad antioxidante

La actividad de un antioxidante es la medición de la eficacia que tiene este para proteger las células de la oxidación (**Antolovich et al., 2001**). Algunas sustancias conocidas por su actividad antioxidante, como los tocoferoles, el β -caroteno y el ácido ascórbico, solo tienen una actividad inhibitoria restringida en los procesos de radicales

libres (**Spagnol et al., 2019**). No así, los compuestos fenólicos, los cuáles contribuyen mucho más a la inhibición del daño oxidativo ya que, además de que funcionan como eliminadores de radicales libres mediante la transferencia de electrones únicos, actúan también con otros dos mecanismos que son: la transferencia de átomos de hidrógeno y la quelación de metales en la etapa de iniciación y en el proceso oxidativo (**Prior, Wu, & Schaich, 2005**). De ahí que la medición de la actividad antioxidante de compuesto fenólicos se base en estos tres mecanismos de acción.

En este sentido, los ensayos *in vitro* que destacan a la hora de evaluar la transferencia de electrones únicos incluyen la capacidad antioxidante reductora de iones cúpricos (CUPRAC), la capacidad reductora férrica del plasma (FRAP), los efectos de eliminación en relación con el 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH), el 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables (ABTS) y el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). De estos la determinación colorimétrica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico es el método más rápido y sencillo para la determinación de la capacidad antioxidante (**Granato et al., 2018**). La metodología consiste en medir un cromógeno de color rosa formado por el ácido tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA), obtenido como producto final de la oxidación (**Mayne, 2003**), a una longitud de onda de 532–535 nm (**Londoño, 2012**).

1.1.5 Metales

Los minerales se encuentran presentes en la constitución de tejidos vegetales y animales y son esenciales para las funciones biológicas del cuerpo humano; se pueden dividir en macronutrientes y en micronutrientes. Los macronutrientes son aquellos que el cuerpo necesita en cantidades significativas (gramos) y son el calcio, potasio, magnesio, sodio, fósforo y azufre; mientras que los micronutrientes u oligoelementos, cuya necesidad diaria es del orden de miligramos o microgramos se pueden subdividir a su vez en elementos esenciales (como cobalto, cobre, fluoruro, hierro, yodo, selenio y zinc) y elementos potencialmente tóxicos (como aluminio, arsénico, cadmio, mercurio, estaño y plomo) (**Dugo et al., 2012**). Por ello, la importancia de conocer la

cantidad de minerales presentes en los alimentos y bebidas que pueden introducirse a través de la dieta.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

- Estudiar las actividades biológicas antioxidante y antiinflamatoria de los extractos obtenidos a partir de Pussu pato (*Grosvenoria rimbachii*)

1.2.2 Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de extracción de polifenoles y flavonoides.
- Determinar la capacidad antiinflamatoria y antioxidante de los extractos del Pussu pato.
- Caracterizar el extracto liofilizado mediante cromatografía (TLC y HPLC).

1.3 Hipótesis

1.3.1 Factores del proceso de extracción

Hipótesis Nula (H₀):

Los factores del proceso de extracción no alteran el contenido de polifenoles y flavonoides totales del Pussu pato.

Hipótesis Alternativa (H_i):

Los factores del proceso de extracción alteran el contenido de polifenoles y flavonoides totales del Pussu pato.

1.3.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante

Hipótesis Nula (Ho):

Los extractos de Pussu pato obtenidos mediante el proceso optimizado de extracción no presentan actividades antiinflamatoria y antioxidante.

Hipótesis Alternativa (Hi):

Los extractos de Pussu pato obtenidos mediante el proceso optimizado de extracción presentan actividades antiinflamatoria y antioxidante.

1.3.3 Contenido de metales pesados

Hipótesis Nula (Ho):

El contenido de cadmio, cobalto y plomo presente en las hojas de Pussu pato no sobrepasan los límites establecidos por la normativa nacional vigente.

Hipótesis Alternativa (Hi):

El contenido de cadmio, cobalto y plomo presente en las hojas de Pussu pato sobrepasan los límites establecidos por la normativa nacional vigente.

1.4 Señalamiento de variables

1.4.1 Factores del proceso de extracción

Variable dependiente: Concentración de polifenoles y flavonoides totales.

Variable independiente: Disolvente, concentración, temperatura y tiempo de extracción.

1.4.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante

Variable dependiente: Porcentaje de las actividad antiinflamatoria y antioxidante

Variable independiente: Concentraciones de los extractos.

1.4.3 Contenido de metales pesados

Variable dependiente: Contenido de minerales en mg/100g muestra seca.

Variable independiente: Muestra de hoja seca.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Muestra

- Hojas de Pussu pato (*Grosvenoria rimbachii*) recolectas en el Cerro Teligote

2.1.2 Materiales de laboratorio

- Probetas 50, 250, 500, 1000 ml
- Mortero y pistilo
- Vasos de precipitación de 50, 100, 250 y 500 ml
- Tubos Falcon de 50 ml
- Tubos de ensayo (Van tubos 10 ml)
- Tubos Eppendorf de 2 ml
- Viales de 10 ml
- Gradillas de metal y plásticas
- Pissetas
- Micropipetas: 20-200 μ l; 100-1000 μ l
- Puntas para micropipetas: 20-200 μ l; 100-1000 μ l
- Goteros
- Balones de aforo de 5, 10, 25,50, 100, 250, 500 ml
- Placas de sílica gel
- Espátula y agitadores magnéticos
- Papel aluminio
- Embudo
- Marcadores
- Bandejas
- Capilares
- Columna HPLC eclipse XDB-C18 4.6 x 250 mm, 5 μ m (Agilent Technologies)

- Cámara cromatográfica
- Filtros 0.45 µm
- Viales de 2 ml con tapa 12 x 32 mm para HPLC Wicom

2.2 Reactivos

- Metanol (Applichem, 99,8%)
- Alcohol etílico (Sharlau, 99,8%)
- Follin & Ciocalteu's (Sigma, 2N)
- Ácido nítrico grado metal traza (Fisher)
- Ácido clorhídrico grado metal traza (Fisher)
- Ácido tiobarbitúrico (Applichem)
- Ácido acético glacial (Fisher)
- Metanol grado HPLC (Merck, 99%)
- Catequina Hidrato grado HPLC (Sigma, 98%)
- Ácido gálico (Sigma, 97,5%)
- Nitrito de Sodio (Lobachemie, 98%)
- Hidróxido de sodio (Merck, 99%)
- Cloruro de aluminio hexahidratado (Lobachemie)
- Tolueno (Merck 99%)
- Ácido Fórmico (AnalaR 90%)
- Butylhidroxitolueno (Sigma, 99%)
- Acetato de Etilo (Fisher 99%)
- Citrato de sodio Dihidrato (Mallinckrodt)
- Cloruro de sodio (Lobachemie)
- Ácido cítrico (Mallinckrodt)
- Diclofenaco sódico (75 mg/ 3ml Merck)
- Fosfato de sodio dibásico (Baker analyzed)
- Fosfato monosódico (Baker analyzed)

2.3 Equipos

- Estufa de secado _Heretherm
- Vortex _VWR

- Balanza analítica _Mettler Toledo
- Centrifuga _Eppendorf
- Centrifuga_Van tubos
- Centrifuga Tubos Falcon
- Equipo de cromatografía de líquidos _Agilent Technologies
- Equipo de cromatografía de capa fina _CAMAG
- Espectrofotómetro _HACH
- Baño termostato SD20R-30 PolyScience
- Ultrasonido BRANSON 2800
- Plancha de calentamiento _VWR
- Evaporador Rotativo SELECTA
- pH-metro Mettler Toledo
- Termobloque AccuBlock
- Liofilizador (LABCONCO)

2.4 Métodos

2.4.1 Preparación de la muestra

Recolección

La recolección de las hojas del Pussu pato se realizó en el Cerro Teligote a 3400 msnm aproximadamente (01°22'14.92"S; 78°33'55.02"O) previo reconocimiento del Botánico Walter Simbaña. Una vez ubicada la planta se procedió a escoger las mejores hojas en cuanto a su color, tamaño, aspecto físico, libres de ramas y tallos, las mismas que fueron transportadas en fundas de papel a las instalaciones de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en la Universidad Técnica de Ambato (Campus Huachi).

Pre-Tratamiento

Se procedió a limpiar cada hoja con el objetivo de obtener la materia vegetal libre de impurezas como tierra, insectos, telarañas etc. Terminada la etapa de limpieza se

secaron las hojas en bandejas metálicas en una estufa a 40 °C. Una vez secas las hojas se molieron con un mortero hasta obtener un polvo fino, el mismo que se guardó en fundas plásticas “ziploc” con el fin de conservar la muestra para análisis posteriores.

Obtención del extracto

Se determinaron las condiciones óptimas de extracción variando el tipo de disolvente (metanol y etanol a concentraciones de 25, 50, 75, 100% y agua), la temperatura (30, 40, 50, 60°C) y el tiempo (5, 10, 20min), estos factores fueron evaluados uno a la vez y la extracción fue asistida por ultrasonido. La metodología se realizó según lo descrito por **Knežević et al., (2011)**, con algunas variaciones. Se pesó 0,1 g de muestra por triplicado en tubos eppendorf, se agregó 1 ml del disolvente, se homogenizó la muestra en el vortex y se sometió a ultrasonido variando tanto el tiempo como la temperatura, finalmente se centrifugaron los extractos por 10 min a 4°C y se evaporaron en la estufa por 2 horas y media.

Para realizar el desgaste del material vegetal, se trabajó con las mejores condiciones, donde se emplearon 5 gramos de muestra y sobre ella se realizaron 5 extracciones sucesivas con la respectiva regeneración del disolvente. Los extractos líquidos obtenidos luego de la optimización, se liofilizaron y con ellos se realizaron las actividades biológicas y la caracterización.

2.4.2 Cuantificación de polifenoles totales

Se utilizó la metodología propuesta por **Vasco et al., (2008)**, con ciertas modificaciones. A una alícuota de 50 µl del extracto obtenido previamente, se añadió 0.1 ml del reactivo Folin - Ciocalteu, se mantuvo durante 3 minutos bajo agitación continua y se agregó 2ml de una solución de carbonato de sodio (75g/l, 10ml). El volumen se lo aforó a 5 ml con agua destilada y se dejó reposar a temperatura ambiente en un lugar protegido de la luz durante 2 horas. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm y usando una curva de calibración con ácido gálico como estándar en el rango de concentraciones de 50 a 300 ppm, se determinó el contenido de polifenoles totales.

2.4.3 Cuantificación de flavonoides totales

Se utilizó la metodología descrita por **Sakanaka et al., (2005)** con ciertas modificaciones. A una alícuota de 0,25 ml del extracto obtenido previamente, se agregó 0,075 ml de una solución de nitrito de sodio al 5%, después de 6 min se añadió 0,15 ml de cloruro de aluminio al 10%, se esperaron 5 min y se añadió 0,5 ml de hidróxido de sodio 1M, la mezcla resultante se llevó a un volumen constante de 5 ml y se midió su absorbancia a 500 nm. Finalmente, los resultados se expresaron en mg/g de catequina en base a una curva de calibrado en el rango de 5 a 100 ppm.

2.4.4 Caracterización

Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):

Se utilizó la metodología descrita por **Guillarme et al., (2010)** y **Saénz et al., (2009)** con modificaciones. El extracto seco, se disolvió en metanol al 50% (0.3 mg/ml) y se filtró (0.45µm), la inyección se realizó en una columna XDB-C18 (4.6x250 ml, 5 µm). La corrida cromatográfica se efectuó con un flujo de 0,8ml por min a una temperatura de 20 °C; teniendo como fases móviles agua (fase A) y metanol (fase B). Se trabajó en modo gradiente.

Cromatografía de capa fina (TLC):

Se utilizó la metodología descrita por **Khatoon et al., (2008)** y **Knežević et al., (2011)** con ciertas modificaciones. Se preparó una disolución de 10 mg/ml tanto de la muestra liofilizada (en metanol al 50%) como de los estándares (ácido gálico y catequina) y estas fueron colocadas en los viales del equipo Camag (Automatic TLC sampler 4) para su respectiva inyección. Se inyectaron volúmenes de 8 µl para los estándares y 6 µl para las muestras. Se vertió en la cámara cromatográfica la fase móvil compuesta por tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en proporción 40:30:4 y se dejó saturar antes de colocar la placa. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo hasta que la fase móvil alcanzó aproximadamente 1cm por debajo del borde superior. La placa se dejó secar al ambiente y finalmente se reveló a 254 y 366nm en el equipo Camag TLC visualizer 2.

2.4.5 Actividad anti-inflamatoria

La actividad antiinflamatoria fue evaluada a través de dos métodos *in vitro* que corresponden a:

Método HRBC

El método *in vitro* de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos humanos (HRBC por sus siglas en inglés) descrito por **Anosike et al., (2012)** fue empleado con ciertas modificaciones.

Una muestra de sangre fue mezclada con una solución Alsever (2% dextrosa 0,8% citrato de sodio, 0,05% ácido cítrico, 0,42% cloruro de sodio) en volúmenes iguales. Esta mezcla fue centrifugada a 3000 rpm para separar los eritrocitos. Los eritrocitos fueron lavados tres veces con una solución isosalina al 10%. La suspensión de eritrocitos resultantes fue llevada al 10% con una solución isosalina para el posterior análisis.

Diferentes concentraciones de la muestra y del estándar diclofenaco (25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000 µg/ml) fueron mezclados por separado con 1ml de buffer fosfato (10mM pH 6,4), 2 ml de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 ml de la suspensión HRBC (10%), usando agua como control. Las mezclas fueron incubadas por 30 minutos a 37°C y centrifugadas a 1300 gravedades por 3 minutos. La hemoglobina contenida en el sobrenadante fue estimada espectrofotométricamente a 540 nm. El porcentaje de inhibición de la hemólisis fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición de la hemólisis} = 100 - \frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Control}} \times 100$$

Donde:

Abs Muestra es la absorbancia de la muestra

Abs Control es la absorbancia del control

Método de desnaturalización de proteínas:

La actividad antiinflamatoria a través de este método fue desarrollado según la metodología descrita por **Alhakmani et al. (2013)** con ciertas modificaciones.

Se utilizó diclofenaco sódico como fármaco estándar ya que es considerado un potente antiinflamatorio. En un tubo de ensayo se vertió 3ml de solución de albúmina (en buffer fosfato 0.15M, pH:6.4) y 3ml de la solución estándar o la solución de extracto en agua a concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml. Una vez preparados los tubos, se incubaron a 37°C por 15 min, después fueron sometidos a un baño María a 70°C por 10 min. Se dejaron enfriar y se procedió a la medición de las absorbancias a una longitud de onda de 660 nm, utilizando agua mili-q como blanco. La experimentación fue realizada por triplicado y el cálculo del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteína fue calculado con la ecuación:

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

Donde:

At es la absorbancia de la muestra de ensayo

Ac es la absorbancia del control

2.4.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó usando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según lo propuesto por **Rojano et al. (2008)** con algunas modificaciones. Se realizaron ensayos a diferentes concentraciones (100, 200, 500, 1000 mg/ml) del extracto seco, el cual se mezcló con aceite de oliva (“El Arbolito”) y se llevó a oxidación en un baño de aceite a 100°C por 48 horas. Se dejó enfriar y se procedió a centrifugar los tubos a 13000 rpm por 10 min. En tubos eppendorf se colocó el sobrenadante obtenido, el cual se mezcló con TBA (ácido 2-tiobarbitúrico 1mM en ácido acético glacial al 50%) en relación 1:1. Se agitó la muestra en el vórtex y se la colocó en el termobloque por una hora a 100°C. Se

centrifugaron los tubos a 14900 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y finalmente se procedió a la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm, los resultados se expresaron en porcentaje de malondialdehído según la siguiente formula:

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

Donde:

A_m es la absorbancia de la muestra de ensayo

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

A_o es la absorbancia del aceite sin oxidar

2.4.7 Metales

Para la determinación de metales en las hojas de Pussu pato se procedió a realizar la digestión de la muestra mediante el método AOAC 985.35, para ello se pesó 0,6 g de material seco en crisoles (previamente tarados a 550°C por 3 horas), seguido de una calcinación a 550°C por 24 horas, las cenizas resultantes se enfriaron en el desecador por 30 min. En cada crisol se añadió 1ml de ácido nítrico (HNO_3) concentrado y 2 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado, la mezcla resultante se dejó en agitación constante a 75°C en una plancha de calentamiento durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se filtró el sobrenadante, se aforó a 25ml con ácido nítrico al 1%. Las determinaciones para cada metal se realizaron según las condiciones óptimas del espectrofotómetro de absorción atómica (PG-AA500) reportadas en el COOK-BOOK, las cuales se detallan a continuación.

Tabla 1: Parámetros reportados en el manual (ANALYTICAL COOKBOOK) para la determinación de minerales por llama.

Mineral	Rango de detección de curva de calibrado (ppm)	Longitud de onda (nm)	Ancho de banda (nm)	Corriente de lámpara (ma)	Tipo de flama	Fondo /Ambiente	Ajuste de llama
Ca	0.5-3	422.70	0.4	5.0	N ₂ O/ Acetileno	Ninguno /SR	Rojo reductor
Cu	0.1-1.75	324.79	0.4	5.0	Aire/ Acetileno	Ninguno /SR	Azul oxidante
Fe	0-3	248.30	0.2	5.0	Aire/ Acetileno	D ₂ /SR	Azul oxidante
Mg	0.04-0.4	285.20	0.4	5.0	Aire/ Acetileno	D ₂ /SR	Azul oxidante
Mn	0-1	279.50	0.4	5.0	Aire/ Acetileno	D ₂ /SR	Azul oxidante
Zn	0-2	213.90	0.4	5.0	Aire/ Acetileno	D ₂ /SR	Azul oxidante

Tabla 2: Parámetros reportados en el manual (ANALYTICAL COOKBOOK) para la determinación de minerales por grafito.

Mineral	Rango de detección de curva de calibrado (ppm)	Longitud de onda (nm)	Ancho de banda (nm)	Corriente de lámpara (ma)	Temperatura de pirólisis (°C)	Temperatura de atomización (°C)	Fondo /Ambiente
Cd	0.006-0.06	228.80	0.4	5.0	600	1800	D ₂
Co	0.025-0.2	240.70	0.2	7.0	600	1800	D ₂
Ni	0.025-0.4	232.04	0.2	4.0	600	1800	D ₂
Pb	0.05-0.6	217.00	0.4	3.0	450	1800	Ninguno

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Optimización del proceso de extracción – Factor: disolvente

Se ha comprobado que los solventes son un factor preponderante en el proceso de extracción de metabolitos secundarios y aunque no hay un consenso sobre el mejor disolvente para extraer polifenoles y flavonoides, se ha aceptado ampliamente que una mayor polaridad generalmente significa una mejor solubilidad de los polifenoles en los disolventes de extracción (Aires, 2017). En general, los solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, n-hexano, cloroformo, propanol y sus formulaciones acuosas se han usado principalmente para la extracción de polifenoles, debido a que en diversos estudios se ha observado que estas mezclas tienen una mayor eficiencia de extracción que los disolventes orgánicos absolutos (Farias et al., 2018; Nivas et al., 2010; Patonay et al., 2019). Así, mientras el disolvente orgánico disuelve las membranas celulares y los polifenoles no polares, el agua disuelve los polifenoles polares. El agua también hace que el material vegetal se hinche, lo que permite que el solvente penetre más fácilmente en la matriz sólida y aumenta la capacidad de extracción de polifenoles (Aires, 2017).

Por lo tanto, la mejor relación disolvente-agua depende de la composición de polifenoles presentes en el material vegetal. Además, los compuestos fenólicos también pueden estar asociados con otros componentes de la planta, como los carbohidratos y las proteínas. Por ejemplo, se sabe que los polifenoles simples como los flavonoides (por ejemplo, catequina o epicatequina) están presentes en muchas plantas; son compuestos polares y, por lo tanto, son solubles en agua. En contraste, los polifenoles altamente polimerizados, como los taninos condensados y los asociados con carbohidratos y proteínas, son menos solubles en agua, y una alta relación solvente-agua será más eficiente para su extracción (Galili & Hovav, 2014)

Por ello, para el presente estudio se emplearon como disolventes etanol, metanol y sus mezclas con agua a concentraciones de 25, 50, 75 y 99,8%, debido a su alta polaridad

y su bajo punto de ebullición, lo que facilita su eliminación por evaporación en el proceso de obtención del extracto.

Como se observa en la tabla 3 los mejores rendimientos en la extracción con diferentes disolventes se obtuvieron empleando metanol al 25% y etanol al 75% con 10,492 mg equivalente de AG/g muestra seca y 2,932 mg equivalente de CQ/g muestra seca a una longitud de onda de 760 y 510nm para polifenoles y flavonoides respectivamente. Resultados similares al contenido total de polifenoles se encontraron en hojas de *Coffea arabica*, 10,30 mg AG/g muestra seca utilizando metanol como disolvente y para flavonoides es 1,15 mg QC/g muestra seca (Farias et al., 2018).

Tabla 3: Contenido total de polifenoles y flavonoides a diferentes disolventes y concentraciones.

Disolvente	Concentración*	
	Polifenoles (mg AG/g)	Flavonoides (mg CQ/g)
Agua	5,615 ± 0,350 ^c	0,865 ± 0,179 ^w
Etanol	25%	7,176 ± 0,453 ^d
	50%	6,230 ± 0,248 ^{c:d}
	75%	9,006 ± 1,782 ^e
	99,8%	2,029 ± 0,400 ^a
Metanol	25%	10,492 ± 0,090 ^f
	50%	7,206 ± 1,095 ^d
	75%	7,431 ± 0,949 ^d
	99,8%	3,725 ± 0,375 ^b

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican los mayores rendimientos obtenidos para polifenoles y flavonoides respectivamente.

a, b, c, d, e, f Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P > 0,05) entre concentraciones de polifenoles para cada disolvente.

w, x, y, z Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P > 0,05) entre concentraciones de Flavonoides para cada disolvente.

Por otro lado, el contenido de polifenoles en todos los casos mostró rendimientos mayores que los flavonoides. Además, se observaron comportamientos diferentes para cada disolvente utilizado en la extracción. En el caso de los polifenoles, el rendimiento al utilizar agua fue mayor que el obtenido con los disolventes puros, mientras que en el caso de los flavonoides los rendimientos con los disolventes puros superaron al del agua; lo que sugiere que los polifenoles presentes en el Pussu pato son más polares que los flavonoides. Estas diferencias obtenidas se pueden atribuir principalmente al grado de interacción que muestran los compuestos fenólicos con el disolvente utilizado, lo cual define su grado de solubilidad en el proceso de extracción (Atki et al., 2018).

El análisis estadístico (tabla A1) corroboró que las concentraciones de disolvente seleccionadas como las mejores, tuvieron diferencias significativas con el resto de disolventes probados, por tal motivo metanol 25% y etanol 75% fueron los disolventes que se utilizaron para la optimización de los demás factores.

3.2 Optimización del proceso de extracción – Factor: temperatura

Se probaron temperaturas de 30, 40 50, y 60 °C, utilizando las mejores condiciones determinadas en la optimización del factor: disolvente (metanol 25% y etanol 75% para polifenoles y flavonoides respectivamente). Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Contenido total de polifenoles y flavonoides a diferentes temperaturas.

Temperaturas	Concentración*	
	Polifenoles (mg AG/g)	Flavonoides (mg CQ/g)
	Metanol 25%	Etanol 75%
	30°C	6,320 ± 0,069 ^a
40°C	9,727 ± 0,119 ^b	2,659 ± 0,137 ^p
50°C	10,492 ± 0,090 ^c	3,141 ± 0,036 ^q
60°C	8,061 ± 0,045 ^d	3,068 ± 0,083 ^q

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican los mayores rendimientos obtenidos para polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{a, b, c, d} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de polifenoles para cada temperatura.

^{o, p, q} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de flavonoides para cada temperatura.

Como se puede apreciar, el mayor contenido de polifenoles y flavonoides se obtuvo a 50°C, con un promedio de 10.492 mg AG/g y 3,141 mg CQ/g, respectivamente.

Observándose un incremento de la concentración hasta 50°C, y posterior a esta una disminución del contenido de metabolitos secundarios, lo que indica una posible degradación de los compuestos fenólicos a 60°C. Esto se ha comprobado en estudios en hojas de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a 60°C (Cassiana et al., 2018) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*L.) a 85°C (Cvetanović et al., 2018).

El análisis estadístico mediante Statgraphics (tabla A6) mostró que existieron diferencias significativas entre las temperaturas utilizadas. Mientras que, para flavonoides, se determinó que no existieron diferencias significativas a 50 y 60°C, sin embargo, el mayor rendimiento se obtuvo a 50°C, por lo que se seleccionó como el mejor parámetro, además de que, al trabajar a una menor temperatura, se asegura que no exista una degradación de los metabolitos secundarios.

3.3 Optimización del proceso de extracción – Factor: tiempo

La extracción por ultrasonido es una de las técnicas que mejora el rendimiento de la extracción, reduce la temperatura y aumenta la solubilidad, dependiendo del tipo de componentes a extraer y la matriz vegetal (Bahmani et al., 2017; Patonay et al., 2019). Para el presente análisis las muestras fueron sometidas a 5, 10 y 20min en el ultrasonido, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 5: Contenido total de polifenoles y flavonoides a diferentes tiempos.

Tiempos	Concentración*	
	Polifenoles (mg AG/g)	Flavonoides (mg CQ/g)
	Metanol 25%	Etanol 75%
5 min	10,492 ± 0,090 ^o	3,141 ± 0,036 ^x
10 min	8,886 ± 0,113 ^p	3,393 ± 0,101 ^y
20 min	8,016 ± 0,078 ^q	3,676 ± 0,018 ^z

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican los mayores rendimientos obtenidos para polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{o,p,q} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de polifenoles para cada tiempo.

^{x,y,z} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de flavonoides para cada tiempo.

Como se puede observar en la tabla 5 el contenido mayor de polifenoles se da a un tiempo de ultrasonido de 5 min con 10,492 mg AG/g, en cuanto a flavonoides el mayor contenido se obtuvo con 20 min de extracción, dando un valor de 3,676 mg CQ/g. En cuanto a las tendencias se puede observar que para el contenido de polifenoles los valores descienden al aumentar el tiempo de extracción y para flavonoides la tendencia es opuesta, indicando que un mayor tiempo presenta efectos positivos en el rendimiento. La misma tendencia se obtuvo en hojas de rooibos (*Aspalathus linearis*) (Sousa et al., 2016) donde el contenido de catequina incrementó al duplicar el tiempo de extracción (de 1,57 mg/100g/5 min a 2,04 mg/100g /10 min); y uno de los compuestos fenólicos, el ácido sirínico mostró un comportamiento similar al de los polifenoles totales, en el que el contenido pasó de 4,34 mg/100g durante los primeros 5 min a 4,07 mg/100g a los 10 min de extracción; por lo que podría existir la posibilidad de que en el extracto de Pussu pato exista un porcentaje alto de este u otros compuestos con estructura similar.

Por otra parte, el análisis estadístico (tabla A9) determinó que tanto para polifenoles como para flavonoides existen diferencias significativas en las variantes de tiempos

analizados. Por lo tanto, en base a los mayores rendimientos obtenidos, se seleccionaron como mejores tratamientos, un tiempo de 5 min para polifenoles y 20 min para flavonoides, los cuáles se utilizaron en la etapa de optimización del desgaste del material vegetal.

3.4 Desgaste del material vegetal

Se realizaron varias extracciones de una misma muestra para determinar el contenido máximo de polifenoles y flavonoides que se puede alcanzar al aplicar las condiciones de optimización establecidas. En la tabla 6 se presentan los valores determinados.

Tabla 6: Contenido total de polifenoles y flavonoides obtenidos en extracciones sucesivas a partir del Pussu pato.

Extracciones	Concentración*	
	Metanol (mg AG/g)	Etanol (mg CQ/g)
	Polifenoles	Flavonoides
1	10,492 ± 0,270 ^a	3,561 ± 0,065 ^o
2	6,224 ± 0,180 ^b	1,925 ± 0,048 ^p
3	3,039 ± 0,138 ^c	0,709 ± 0,031 ^q
4	0,790 ± 0,162 ^d	0,394 ± 0,063 ^r
5	0,215 ± 0,170 ^d	0,216 ± 0,079 ^s

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar

^{a, b, c, d} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de polifenoles para cada extracción.

^{o, p, q, r, s} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre concentraciones de flavonoides para cada extracción.

Como se observa en el gráfico 1 el número de extracciones representativas para el extracto metanólico ascienden hasta la cuarta repetición con un porcentaje de recuperación del 98,9% equivalente a 20,545 mg AG/g mientras que para el extracto etanólico el porcentaje de recuperación fue 96,8% equivalente a 6,589 mg CQ/g. Por lo tanto, el número de extracciones seleccionadas tuvo como objetivo aprovechar al

máximo el material vegetal ya que los rendimientos fueron relativamente bajos con una sola extracción.

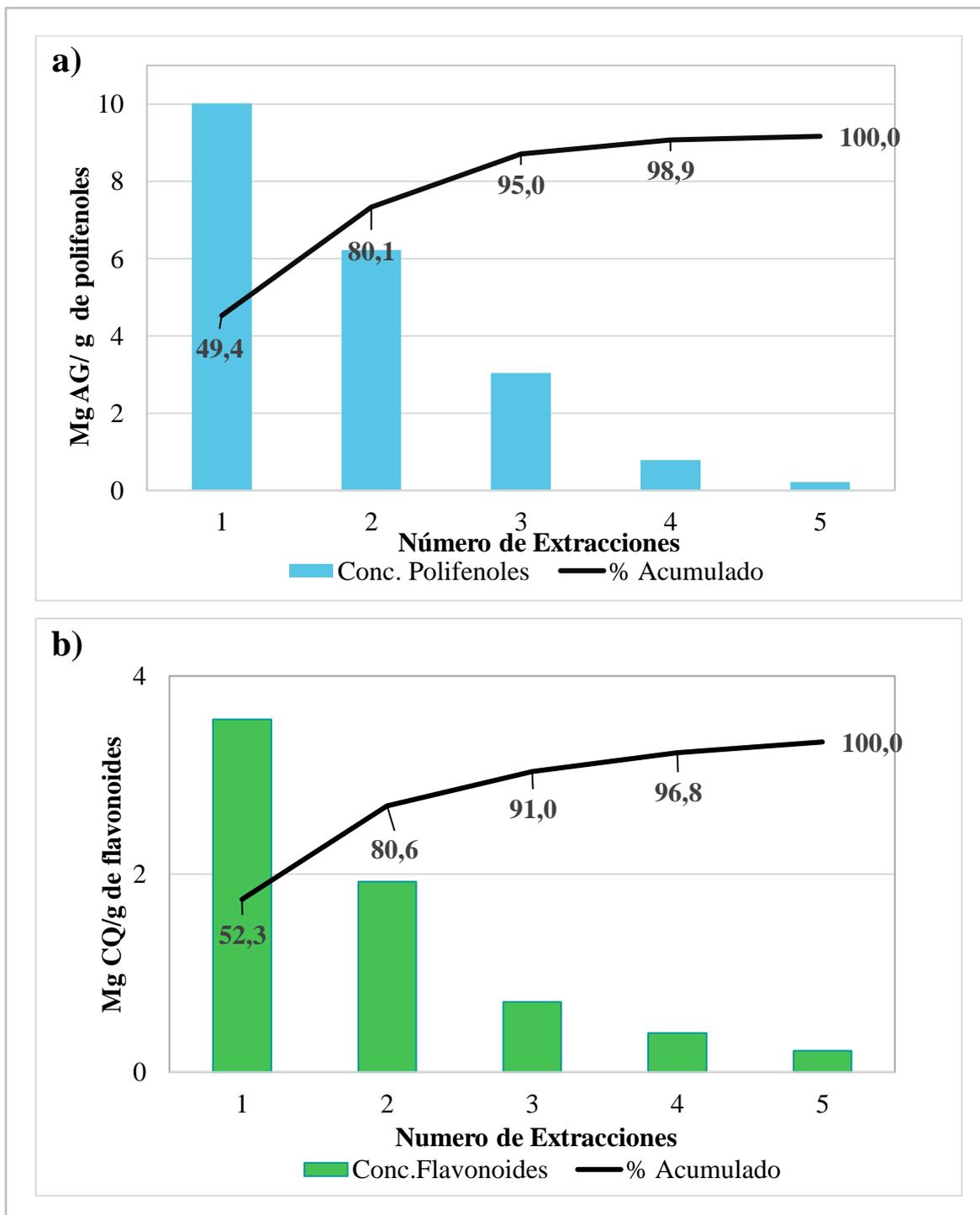


Gráfico 1. Rendimiento acumulado según el número de extracciones. Donde a) cuantificación de polifenoles usando metanol al 25% y b) cuantificación de flavonoides usando etanol al 75%.

Una vez optimizados los extractos, estos fueron secados mediante liofilización y a través de estos se procedió a realizar los análisis de caracterización y actividades biológicas.

3.5 Caracterización

Para la caracterización se realizaron dos tipos de cromatografía: cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

3.5.1 TLC

El análisis cualitativo de extractos de plantas desempeña un papel analítico representativo para la mezcla de sustancias presentes en la matriz (**Bezerra et al., 2017**). Por ello, se determinó la huella cromatográfica de los extractos de Pussu pato mediante cromatografía de capa fina (TLC) en placas de 10 x10 cm recubiertas con sílica gel y utilizando como fase móvil la mezcla de acetato de etilo: tolueno: ácido fórmico en proporción 40:30:4. Los resultados se muestran en el gráfico 2.

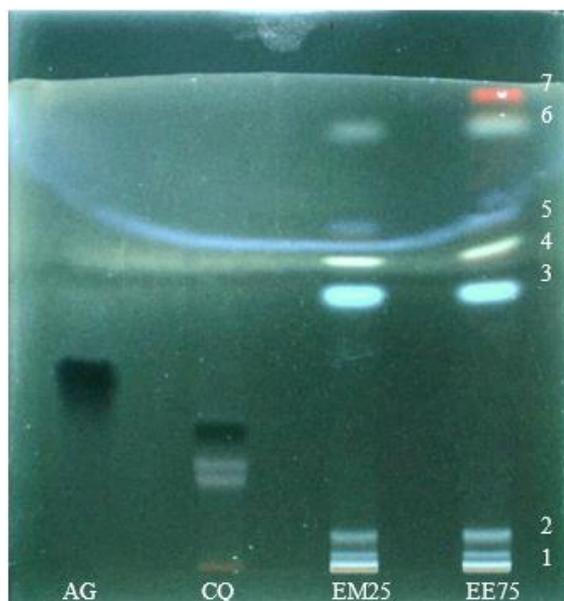


Gráfico 2: Perfil cromatográfico de los estándares y extractos de Pussu pato; donde AG = Acido gálico; CQ = Catequina; EM25 = extracto metanólico al 25%; EE75 = extracto etanólico al 75%

El cromatograma de la muestra presentó un total de 6 bandas para el extracto metanólico y 7 para el extracto etanólico con huellas cromatográficas idénticas en

ambas muestras y con los siguientes factores de retención (Rf), en forma ascendente 1 = 0,03; 2 = 0,07; 3 = 0,55; 4 = 0,62; 5 = 0,69; 6 = 0,89; 7 = 0,95. El factor de retención para los estándares fueron AG = 0,39; CQ = 0,28.

Comparando los factores de retención de los extractos con los estándares (ácido gálico, catequina), se reveló, que estos no estaban presentes en la muestra analizada.

Además, se podría indicar que la mezcla etanólica logra extraer mayor cantidad de compuestos y las bandas que se observan en la base de inyección muestran una elevada polaridad que hace que los compuestos no corran con la fase móvil utilizada.

También se puede observar que la banda del compuesto 3, es de mayor intensidad que el resto, lo que sugiere que este podría estar en mayor concentración en los extractos, y que los compuestos 1 y 2 muestran una polaridad elevada al estar cerca de la base de inyección.

3.5.2 HPLC

Otra de las técnicas empleadas para la caracterización de los extractos fue la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), la cual permite obtener separaciones más eficientes que la cromatografía convencional. HPLC en fase inversa (fase estacionaria no polar) con el uso de disolventes orgánicos como metanol es la más utilizada (**Moreno & Polo, 2003**). Por ello para la caracterización de los extractos se utilizó esta técnica usando diferentes longitudes de onda (214, 254, 280, 320, 360 y 366nm). Los resultados se muestran en la gráfica 4.

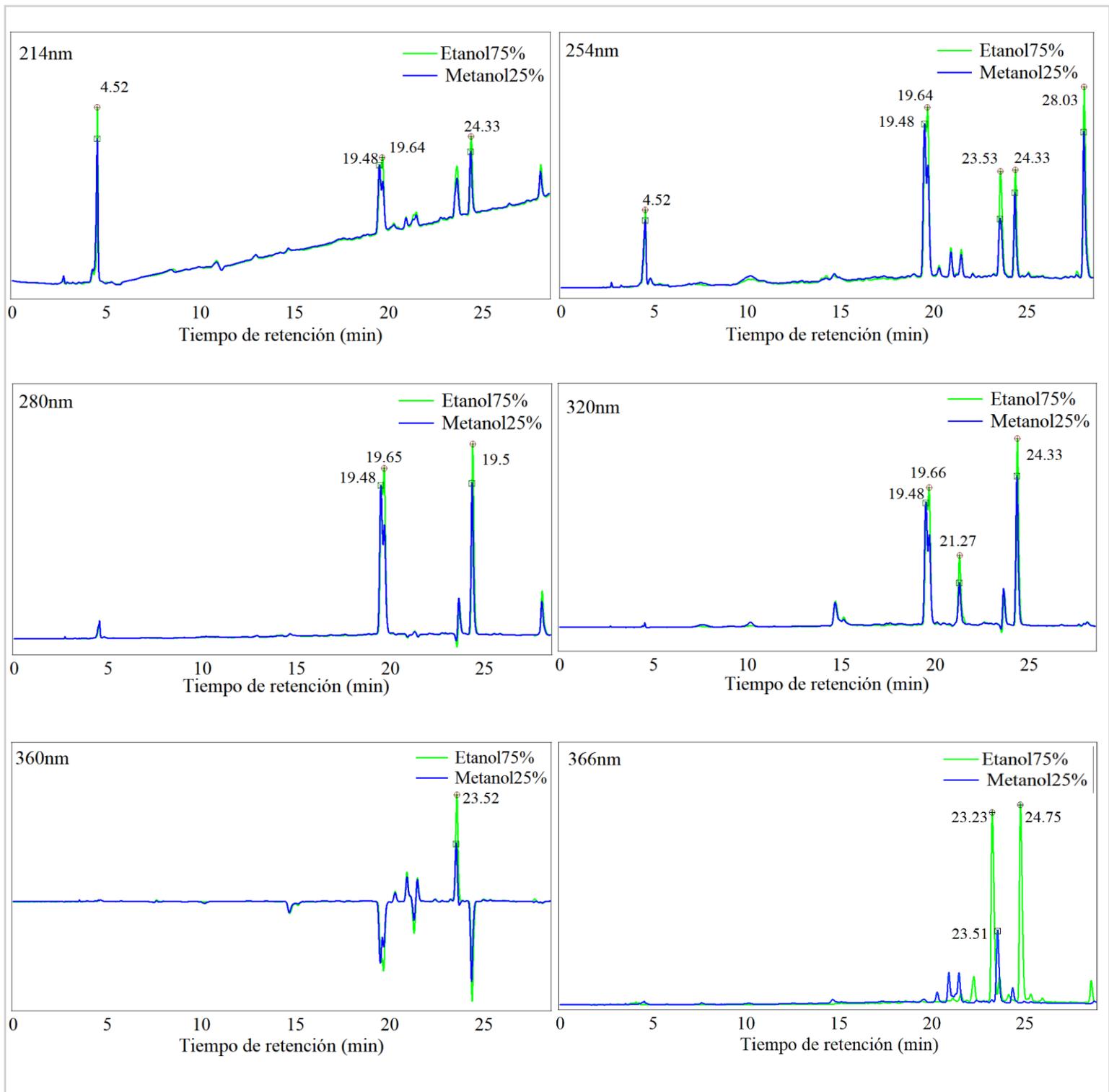


Gráfico 3: Perfil cromatográfico de los extractos de Pussu pato; mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) a diferentes longitudes de onda.

Tabla 7: Tabla comparativa de áreas de los picos observados en los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Longitudes de onda (nm)	Tiempos de retención (min)	Área (mAU.s)*	
		Extracto metanólico (Polifenoles)	Extracto etanólico (Flavonoides)
214	4.52	935,90	903,17
	19.47	605,60	489,59
	19.64	406,01	621,99
	24.33	471,80	580,95
254	4.52	130,40	113,98
	19.48	311,25	260,67
	19.64	195,56	322,56
	23.53	151,80	239,27
	24.33	148,36	184,43
	28.30	266,58	348,60
280	19.48	663,33	556,07
	19.64	423,21	697,75
	24.33	607,89	721,70
320	19.48	232,80	193,56
	19.64	148,21	243,13
	21.27	83,76	194,20
	24.33	250,15	318,09
360	23.52	58,37	108,36
366	23.23	-----	342,63
	23.51	191,11	-----
	24.75	-----	46,85

* Los valores resaltados con color azul indican las mayores áreas en el extracto metanólico, mientras que los valores resaltados con color verde indican las mayores áreas en el extracto etanólico según el reporte emitido por el equipo de HPLC.

Los cromatogramas muestran el mismo perfil de compuestos en ambos extractos, con tiempo de retención iguales que provocan un solapamiento entre los picos. Sin embargo, a 366 nm se pueden observar que el extracto etanólico presenta compuestos

con diferentes tiempos de retención y con una alta intensidad, los cuáles no se aprecian en el extracto metanólico.

Comparando entre las longitudes de onda se puede observar que los picos más representativos se encuentran a 254, 280 y 320 nm, apareciendo a los 19.64 y 24.33 min en el extracto etanólico 75% y a los 19.48 y 24.33 min para el extracto metanólico 25%, lo que indica que existe una mayor cantidad de compuestos apolares en los extractos. Además, mediante la comparación de las áreas de los picos (tabla 7), existe una mayor concentración de los compuestos en el extracto etanólico, lo que sugiere que este es más eficiente al lograr un mayor rendimiento de los compuestos presentes en el Pussu pato.

Por otro lado, al comparar los tiempos de retención de los extractos con los obtenidos por los estándares (ácido gálico y catequina) no se evidencia la presencia de estos dos compuestos corroborando así los resultados obtenidos en el método de TLC.

3.6 Actividades biológicas

Las actividades analizadas fueron actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante.

3.6.1 Actividad antiinflamatoria

Para la actividad antiinflamatoria se probaron los métodos de estabilización de las membranas de los glóbulos rojos y desnaturalización de proteínas.

Método HRBC

La principal acción de los antiinflamatorios no esteroideos como el diclofenaco es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, la cual permite la producción de prostaglandinas y con ello impide el desarrollo de procesos inflamatorios. Debido a que las membranas de los glóbulos rojos (HRBC) son similares a las membranas lisosómicas de las células, la prevención de la lisis de membranas de las células sanguíneas inducida por hipotonicidad se tomó como una medida para estimar la

propiedad antiinflamatoria de los extractos de Pussu pato (Chougala et al., 2017; Saleem et al., 2011).

Tabla 8: Porcentaje de actividad antiinflamatoria de los extractos de Pussu pato y estándar a diferentes concentraciones evaluada por el método HRBC

Concentración del extracto µg/ml	Porcentaje de actividad antiinflamatoria*		
	Diclofenaco	Metanol 25%	Etanol 75%
25	97,0 ± 0,936 ^p	96,6 ± 0,378 ^c	95,9 ± 0,286 ^w
50	97,2 ± 0,682 ^p	95,6 ± 0,286 ^{bc}	95,9 ± 0,094 ^w
75	97,2 ± 0,501 ^p	96,3 ± 1,031 ^{bc}	95,4 ± 0,690 ^w
100	93,5 ± 1,530 ^o	98,6 ± 0,432 ^c	94,0 ± 1,379 ^{vw}
200	93,2 ± 2,792 ^o	95,4 ± 1,081 ^{bc}	93,2 ± 0,286 ^v
500	-	93,5 ± 0,301 ^b	93,4 ± 0,702 ^v
1000	-	87,2 ± 4,063 ^a	87,5 ± 2,072 ^u

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican las mayores actividades obtenidas para polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{o, p} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria en el diclofenaco.

^{a, b, c} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria en el metanol 25%

^{u, v, w} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria etanol 75%

En cuanto a los resultados observados en la tabla 8 se puede evidenciar que a bajas concentraciones las actividades mostradas por los extractos son comparables con la del estándar, con concentraciones de actividad máxima a 25µg/ml (95,9%), 50µg/ml (97,2%), 100µg/ml (98,6 %) para el extracto etanólico, el estándar y el extracto metanólico respectivamente. Estos resultados son notablemente mayores a los reportados en estudios similares en extractos de hojas de *Kleinia grandiflora* a 50µg/ml (11.24%) y 100µg/ml (28.63%) (Selvakumar et al., 2018), hojas de *Mimusops elengi* L a 100µg/ml (65,33%) (Kar et al., 2012), hojas de *Artemisia*

nilagirica a 100 µg/ml (45%) (Parameswari et al., 2018) y *Jatropha gossypifolia* L. a 100 µg/ml (19,1%) (Nagaharika & Rasheed, 2013).

La actividad antiinflamatoria mostrada mediante este método indica que el extracto puede estabilizar las membranas lisosómicas, lo cual es importante para limitar la respuesta inflamatoria al prevenir la liberación de constituyentes lisosomales tales como enzimas bactericidas y proteasas (Azeem et al., 2010).

Método de desnaturalización de proteínas

Se sabe que la desnaturalización de las proteínas de los tejidos es una de las causas de enfermedades inflamatorias y artríticas. Por tanto, se buscó investigar la actividad antiinflamatoria del Pussu pato cuya información en un futuro sería de utilidad para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios, para ello se realizaron análisis utilizando los extractos de la planta a 100, 200, 500 y 1000 µg/ml mediante el método de desnaturalización de albúmina, ya que, una de las características de los antiinflamatorios es la capacidad de prevenirla (Chandra, et al., 2012).

Tabla 9: Porcentaje de actividad antiinflamatoria de los extractos del Pussu pato y el estándar a diferentes concentraciones evaluada por el método de desnaturalización de proteína.

Concentración del extracto µg/ml	Porcentaje de actividad antiinflamatoria*		
	Diclofenaco	Metanol 25%	Etanol 75%
100	24,18 ± 0,96 ^o	36,8 ± 0,783 ^a	32,6 ± 0,888 ^z
200	35,37 ± 2,28 ^p	36,9 ± 1,156 ^a	32,5 ± 1,608 ^z
500	49,96 ± 1,38 ^q	39,5 ± 3,705 ^{ab}	27,1 ± 1,949 ^y
1000	60,02 ± 3,19 ^r	41,4 ± 1,609 ^b	17,8 ± 1,064 ^x

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican las mayores actividades obtenidas para polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{o, p, q, r} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria en el diclofenaco.

^{a, b} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria en el metanol 25%.

^{x, y, z} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antiinflamatoria en el etanol 75%.

Los resultados observados en la tabla 9 muestran tendencias diferentes en la actividad de los extractos alcohólicos del Pussu pato, por un lado, en el extracto metanólico la actividad antiinflamatoria se incrementa a medida que aumenta la concentración, mientras que, en el extracto etanólico la actividad disminuye conforme aumenta la concentración de la planta. Obteniendo así, la máxima actividad a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y a 100 $\mu\text{g/ml}$ con 41,4% y 32,6% respectivamente. Estos resultados son mayores que los reportados en hojas de *Kalanchoe pinnata* a 100 $\mu\text{g/ml}$ (15% actividad antiinflamatoria) (Agarwal & Shanmugam, 2019) y son similares a los obtenidos en hojas de *Wendlandia heynei* (Schult.) a 500 $\mu\text{g/ml}$ (40%) (Maryam et al., 2018).

A una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ los extractos de Pussu pato presentaron una actividad antiinflamatoria superior al diclofenaco, lo cual resultaría de gran utilidad como una alternativa a los compuestos sintéticos. Además, cabe recalcar que a 200 $\mu\text{g/ml}$ tanto los extractos como el estándar mostraron actividad similar.

Por otro lado, el análisis estadístico mostró que no existe diferencia significativa en el uso de los extractos a las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$, con lo que se puede inferir que el uso de estos, a bajas concentraciones presentan resultados similares.

3.6.2 Actividad Antioxidante

Se han demostrado de manera concluyente que la mayor parte de la actividad antioxidante se produce a partir de compuestos polifenólicos en lugar de ácido ascórbico, tocoferol o b-caroteno. (Sakanaka et al., 2005; Wolfe et al., 2003). Por ellos se realizó el análisis de la actividad antioxidante del extracto seco a

concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Porcentaje de actividad antioxidante de los extractos de Pussu pato y estándar a diferentes concentraciones evaluada por el método TBARS.

Concentración del extracto $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de actividad antioxidante*		
	BHT	Metanol 25%	Etanol 75%
100	$82,7 \pm 0,320^a$	$13,9 \pm 1,281^o$	$36,1 \pm 2,708^w$
200	$84,5 \pm 0,572^b$	$26,2 \pm 1,213^p$	$49,5 \pm 3,294^x$
500	$91,4 \pm 1,213^c$	$27,9 \pm 1,533^p$	$55,3 \pm 2,310^y$
1000	$95,5 \pm 0,788^d$	$39,9 \pm 5,667^q$	$61,7 \pm 0,484^z$

*Promedio de tres replicas \pm Desviación estándar. Las condiciones resaltadas con color celeste y verde indican las mayores actividades obtenidas para polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{a, b, c, d} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antioxidante en Butilhidroxitolueno.

^{o, p, q} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antioxidante en el metanol 25%

^{w, x, y, z} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P > 0,05$) entre porcentajes de actividad antioxidante etanol 75%

La actividad antioxidante mostrada por los extractos y el estándar muestra una tendencia dependiente de la concentración, con actividades máximas a 1000 $\mu\text{g/ml}$ con 95,5% para BHT, 39,9% para el extracto metanólico y 61,7% para el extracto etanólico siendo este último el más efectivo de los extractos evaluados. La misma tendencia fue reportada en hojas de *Turnera ulmifolia* L en la que las máximas actividades se obtuvieron a las mayores concentraciones probadas (a 5 $\mu\text{g/ml}$ 50%, a 20 $\mu\text{g/ml}$ 70% y a 40 $\mu\text{g/ml}$ 80%) (Nascimento et al., 2006).

La actividad mostrada puede ser explicada por la capacidad de los polifenoles y en específico de los flavonoides para eliminar los radicales libres (Augusti et al., 2009). De allí que el extracto etanólico, cuyas condiciones fueron las óptimas para la optimización de la extracción de flavonoides haya sido el más eficaz.

En general el análisis estadístico mostró diferencias significativas en todas las muestras a las distintas concentraciones analizadas.

3.7 Metales

Los metales pesados se encuentran entre los principales contaminantes del suministro de alimentos y puede considerarse el problema más importante para el medio ambiente. Considerando el nivel de avance tecnológico en el mundo en desarrollo, se hace muy necesario obtener datos precisos y confiables sobre las concentraciones de estos elementos en los alimentos comúnmente consumidos. Además, la composición proximal de los productos alimenticios difiere de un grupo a otro debido a su diferente naturaleza (Akinyele & Shokunbi, 2015). Así en este estudio se decidió analizar el contenido de 10 minerales: cadmio, calcio, cinc, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel y plomo en hojas de Pussu pato. Los resultados obtenidos se observan en la tabla 11.

Tabla 11: Contenido en mg/100g de metales presentes en hojas de Pussu pato.

Tipo de análisis	Metales	Concentración mg/100g*
Por llama	Calcio (Ca)	1295,2 ± 55,395
	Cinc (Zn)	5,9 ± 1,023
	Cobre (Cu)	1,2 ± 0,093
	Hierro (Fe)	7,9 ± 0,302
	Magnesio (Mg)	493,7 ± 13,543
	Manganeso (Mn)	32,4 ± 0,113
Horno de grafito	Cadmio (Cd)	< LOD
	Cobalto (Co)	< LOD

Tipo de análisis	Metales	Concentración mg/100g*
	Plomo (Pb)	< LOD
	Níquel (Ni)	0,1 ± 0,018

*Promedio de tres replicas ± Desviación estándar, donde LOD = Limite de detección; Cadmio = 0,02; Cobalto = 0,14; Plomo = 0,17. Los valores resaltados con color celeste y verde indican los minerales con las mayores concentraciones obtenidas para polifenoles y flavonoides respectivamente.

El metal de mayor concentración fue el calcio con un valor de 1295,2 mg/100g seguido por el magnesio con 493,7 mg/100g. De estos, el mineral con mayor importancia nutricional es el calcio, el cual es indispensable para el desarrollo y mantenimiento de la salud ósea y en los últimos años se ha descubierto su influencia en múltiples procesos fisiológicos que puede modificar la función o estructura del sistema cardiovascular (**Wang et al., 2012**). Además, este resultado sugiere que podría llegar a ser ingerido por personas veganas y adultos mayores cuya dieta baja en lácteos produce un déficit nutricional de este mineral (**Bolland et al., 2013**). Mientras que el magnesio resulta importante en el manejo del metabolismo óseo, la transmisión nerviosa, el pulso cardíaco, contracción muscular y presión arterial (**Guerrera et al., 2009**).

Por otro lado, las concentraciones obtenidas se encuentran ligeramente por encima de los valores diarios recomendados por el Codex alimentario y la norma ecuatoriana vigente (Mg: 300mg, Cu: 0.9 mg, Ca: 800 mg, Fe: 14mg, Zn: 15mg, Mn: 2,3 mg) (**Codex Alimentarius, 2015; INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización), 2016**, esto no representaría un problema teniendo en cuenta, que si se llegase a elaborar un producto, los valores reportados no serían los mismos ya que los procedimientos de transformación de la materia prima disminuirían su concentración.

Mientras que las concentraciones obtenidas de cadmio, cobalto y plomo al estar por debajo del límite de detención, cumplen la normativa vigente (**Codex Alimentarius, 2015; INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización)** debido a que esta no admite

la presencia de estos metales pesados. Esto resultaría favorable para el Pussu pato en el caso de que se llegase a industrializar.

3.8 Verificación de hipótesis

3.8.1 Factores del proceso de extracción

El análisis estadístico realizado mediante el método de rangos de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de polifenoles y flavonoides a todas las condiciones probadas de los factores del proceso de extracción. Por ello se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

3.8.2 Actividades biológicas: Antiinflamatoria y antioxidante

El análisis estadístico realizado mediante el método de rangos de Tukey mostró que los extractos de Pussu pato presentan actividad biológica antiinflamatoria y antioxidante con diferencias significativas a las diferentes concentraciones probadas. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

3.8.3 Contenido de metales pesados

Los contenidos de cadmio, cobalto y plomo no sobrepasaron los límites establecidos por la normativa nacional vigente. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se optimizaron los procesos de extracción de polifenoles y flavonoides donde las mejores mezclas de disolventes fueron metanol al 25% y etanol al 75% con tiempos de 5 y 20min respectivamente y una temperatura de 50°C para la extracción de polifenoles y flavonoides. La determinación mediante estos parámetros son de gran utilidad ya que permite aprovechar al máximo el material vegetal y es uno de los primeros pasos para la industrialización.

Se determinó la capacidad antiinflamatoria de los extractos del Pussu pato donde el porcentaje de protección contra la desnaturalización de proteínas a concentraciones de 200µg/ml mostró resultados similares al estándar (metanol 25% = 36,9% de protección; etanol 75% = 32,5 de protección; diclofenaco = 35,37% de protección) y para el método HRBC los máximos porcentajes de actividad fueron a 25µg/ml (95,9% en etanol 75%) y 100µg/ml (98,6% en metanol 25%). Lo que sugiere que el extracto hidrometanólico resulta más efectivo por ambos métodos y podría llegar a remplazar a antiinflamatorios químicos como el diclofenaco, en su uso para el tratamiento de inflamaciones.

En cuanto a la actividad antioxidante los porcentajes de los extractos resultaron inferiores a los del estándar a 1000µg/ml (95,5% estándar; 39,9% extracto metanólico; 61,7% extracto etanólico), de los cuáles el extracto hidroetanólico muestra una actividad antioxidante superior al 50% que podría resultar de interés en la industria alimenticia remplazando al BHT.

Se caracterizó el extracto liofilizado mediante cromatografía por TLC y HPLC, donde, aunque no se pudo observar la presencia de ácido gálico y catequina en el Pussu pato, el extracto mostró diferentes picos representativos de otros compuestos. Además, se

encontró que el extracto etanólico logra contener los compuestos fenólicos en una mayor proporción que el extracto metanólico.

En las hojas secas del Pussu pato se evaluó el contenido de minerales presentes, tales como calcio, cinc, cobre, hierro, magnesio, manganeso, cadmio, cobalto, plomo, y níquel, de los cuales, los minerales presentes en mayor cantidad fueron el calcio (1295,2 mg/100g) seguido del magnesio (493,7 mg/100g) y los metales pesados, se encontraron por debajo del límite de detección, lo que resultaría en una buena opción de consumo para personas con problemas en la ingesta de lácteos.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar análisis de actividades biológicas de otras partes del Pussu pato (*G. rimbachii*) como tallo y flores.

Con respecto a la caracterización de los compuestos encontrados, se recomienda un estudio mucho más amplio y la identificación de dichos compuestos utilizando estándares diferentes al ácido gálico y catequina con el fin de tener una mayor información del contenido de metabolitos secundarios en las hojas del Pussu pato.

Se recomienda realizar micro encapsulados de los extractos con el fin de proteger el principio activo que presenta los extractos de esta planta.

Se recomienda realizar un estudio de los minerales existentes en los extractos liofilizados del Pussu pato con el fin de saber si existen pérdidas significativas en el proceso de extracción.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, H., & Shanmugam, V. K. (2019). Informatics in Medicine Unlocked Anti-inflammatory activity screening of Kalanchoe pinnata methanol extract and its validation using a computational simulation approach. *Informatics in Medicine Unlocked*, 14(October 2018), 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2019.01.002>
- Aires, A. (2017). Phenolics in Foods : Extraction, Analysis and Measurements. *Intech Open Science*.
- Akinyele, I. O., & Shokunbi, O. S. (2015). Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *FOOD CHEMISTRY*, 173, 682–684. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.097>
- 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)
- Anosike, C., Obidoa, O., & Ezeanyika, L. (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (Solanum aethiopicum). *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-76>
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., Mcdonald, S., & Robards, K. (2001). Methods for testing antioxidant activity. *Royal Society of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Atki, Y., Aouam, I., EL kamari, F., Taroq, A., Lyoussi, B., Taleb, M., & Abdellaoui, A. (2018). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from Teucrium polium growing wild in Morocco. *Materials Today: Proceedings*, 13, 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.040>
- Augusti, A., Picada, R., Cassel, A., Mansur, M., Janovik, V., Batista, J., ... Linde, M. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of Scutia buxifolia Reiss. *Bioresource Technology*, 100(24), 6592–6598. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.091>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección, 161–172. Retrieved from

<https://scielo.conicyt.cl/pdf/atenea/n494/art10.pdf>

- Azeem, A. K., Dilip, C., Prasanth, S. S., Shahima, V. J. H., Sajeev, K., & Naseera, C. (2010). Anti-inflammatory activity of the glandular extracts of *Thunus alalunga*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(10), 794–796. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60190-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60190-3)
- Bahmani, L., Aboonajmi, M., Arabhosseini, A., & Mirsaeedghazi, H. (2017). Effects of ultrasound pre-treatment on quantity and quality of essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) leaves. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, (October), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.10.002>
- Bajkacz, S., Baranowska, I., Kowalski, B., & Ligor, M. (2018). Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials Using SLE-SPE-UHPLC-MS / MS Method. *Food Analytical Methods*, 3563–3575.
- Balunas, M., & Kinghorn, A. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>
- Bezerra, I. C. F., Ramos, R. T. D. M., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2017). Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.002>
- Bolland, M. J., Leung, W., Tai, V., Bastin, S., Gamble, G. D., Grey, A., & Reid, I. R. (2013). Calcium intake and risk of fracture : systematic review. *British Medical Journal*, (July). <https://doi.org/10.1136/bmj.h4580>
- Brainina, K., Stozhko, N., Bukharinova, M., Khamzina, E., & Vidrevich, M. (2018). Potentiometric method of plant microsuspensions antioxidant activity determination. *Food Chemistry*, 278, 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.098>
- Buchholz, K., Godelmann, B., & Molnar, L. (1982). HIGH-PERFORMANCE LIQUID ANALYTICAL APPLICATIONS CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS, 238, 193–202. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)82726-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)82726-0)
- Capuano, A. M. (2004). Evaluación de desempeño Desempeño por competencias. *Invenio: Revista de Investigación Académica*, 7(13), 139–150. <https://doi.org/http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3350817.pdf>
- Cassiana, P., Santos, K., Palú, F., Filho, L., Silva, C., & Silva, E. (2018). Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (*Syzygium aromaticum*) leaves using supercritical CO₂. *The Journal of*

- Supercritical Fluids*. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.09.009>
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178–S180. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60154-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60154-3)
- Cheng, S., Bhat, S., Lee, C., & Shiea, J. (2018). Thin layer chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry for characterizing herbal compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*, 434, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.09.024>
- Chougala, B., Samundeeswari, S., Holiyachi, M., Naik, N., Shastri, L. A., Dodamani, S., ... Sunagar, V. A. (2017). Green, unexpected synthesis of bis-coumarin derivatives as potent anti-bacterial and anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.072>
- 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>
- Corr, R. (2010). *Ritual and Remembrance in the Ecuadorian Andes : Ritual and Remembrance In the Ecuadorian Andes*. Tucson, UNITED STATES: University of Arizona Press.
- Cvetanović, A., Švarc-gajić, J., Zeković, Z., Jerković, J., Zengin, G., Gašić, U., ... Đurović, S. (2018). The influence of the extraction temperature on polyphenolic profiles and bioactivity of chamomile (*Matricaria chamomilla*L.) subcritical water extracts. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.154>
- De Las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., ... Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 161–166. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00029-4)
- Dominguez, A., & Muscio, M. (2017). LUGARES SAGRADOS Y RITUALES DE LOS PUEBLOS INDÍGENAS DE TUNGURAHUA : UNA PROPUESTA DE CLASIFICACIÓN SACRED PLACES AND RITUALS OF THE

INDIGENOUS PEOPLES OF TUNGURAHUA: A CLASSIFICATION PROPOSAL.

- Dugo, G., Bella, G. Di, Rando, R., Saitta, M., & Messina, U. (2012). *Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples. Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists* (Vol. 4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.10146-2>
- Dutra, R., Campos, M., Santos, A., & Calixto, J. (2016). Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, *112*, 4–29. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.021>
- Edziri, H., Marzouk, B., Mabrouk, H., Garreb, M., Douki, W., Mahjoub, A., ... Mastouri, M. (2018). Phytochemical screening, butyrylcholinesterase inhibitory activity and anti-inflammatory effect of some Tunisian medicinal plants. *South African Journal of Botany*, *114*, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.10.019>
- Farias, R., Salles, T., Thomaziello, R., Breuer, A., Klika, K. D., Ulrich, C., & Owen, R. (2018). Nutraceutical compounds : Echinoids , flavonoids , xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of Coffea arabica trees from three regions of Brazil. *Food Research International*, *115*(September 2018), 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.006>
- Fariss, M., & Reed, D. (1987). High-Performance Liquid Chromatography of Thiols and Disulfides: Dinitrophenol Derivatives. *Methods in Enzymology*, *143*(C), 101–109. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)43018-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)43018-8)
- Ficarra, R., Ficarra, P., Tommasini, S., Calabrò, M. L., Ragusa, S., Barbera, R., & Rapisarda, A. (1995). Leaf extracts of some Cordia species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. *Farmaco (Societa Chimica Italiana: 1989)*, *50*(4), 245—256. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7669169>
- Finkel, T., & Holbrook, N. (2000). Oxidants, oxidative stress and the, *408*(November), 239–247. Retrieved from www.nature.com
- Galarza, N. (2014). *ECOTURISMO EN LA PARROQUIA DE PAPALLACTA, CANTÓN QUIJOS, PROVINCIA DEL NAPO, ESTRATEGIAS DE SOSTENIBILIDAD PARA SU CONSOLIDACION DISERTACIÓN*. Pontificia

- Universidad Católica del Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7219/6.19.000663.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Galili, S., & Hovav, R. (2014). *Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Dry Seeds*. Agricultural Research Organization, The Volcani Center, Bet Dagan. Israel: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397934-6.00016-4>
- García, E. (2016). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de macroalgas de baja California sur, México*. Instituto Politecnico Nacional. Retrieved from <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/garcialop1.pdf>
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... Finglas, P. (2018). Antioxidant activity , total phenolics and flavonoids contents : Should we ban in vitro screening methods ? *Food Chemistry*, 264(April), 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Guerrera, M. P., Volpe, S. L., & Mao, J. U. N. J. (2009). Therapeutic Uses of Magnesium. *American Family Physician*, 80(2).
- 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>
- Gutteridge, J., & Halliwell, B. (1999). *Reactive oxygen species in biological systems*. (D. Colton & C. Gilbert, Eds.). New York.
- Hassan, W. et al. (2017). Oxidative Stress and Antioxidant Potential of One Hundred Medicinal Plants. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1336–1370. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170102125648>
- 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).
- Kar, B., Kumar, R. B. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Pallab, K. (2012). Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976–S980.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60346-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60346-3)

- 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*, *21*, 167–171. <https://doi.org/10.1556/JPC.21.2008.3.2>
- King, R., & Robinson, H. (1975). Studies in the Eupatorieae (Asteraceae) XL. A new genus, Grosvenoria. *Phytologia*, *30*, 221–222.
- 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>
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad PARTE III / PART III. *Antioxidantes: Importancia Biológica y Métodos Para Medir Su Actividad*, 153–155. Retrieved from <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/3/9.129-162.pdf>
- MacLaren, C., Buckley, H. L., & Hale, R. J. (2014). Conservation of forest biodiversity and ecosystem properties in a pastoral landscape of the Ecuadorian Andes. *Agroforestry Systems*, *88*(2), 369–381. <https://doi.org/10.1007/s10457-014-9690-9>
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutricion Hospitalaria*, *17*(6), 271–278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514919>
- Maryam, S., Khan, M., Rashid, Shah, S. A., Zahra, Z., & Zai, J. A. (2018). Evaluation of anti-inflammatory potential of the leaves of *Wendlandia heynei* (Schult.) Santapau & Merchant in Sprague Dawley rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 111849. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111849>
- Matic, P., Sabljic, M., & Jakobek, L. (2017). Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, (21), 1795–1803. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0066>
- Mayne, S. (2003). Antioxidant Nutrients and Chronic Disease: Use of Biomarkers of Exposure and Oxidative Stress Status in Epidemiologic Research. *The Journal of Nutrition*, *133*(3), 933S-940S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.933s>

- Moreno, M., & Polo, M. (2003). High-performance Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 1274–1280.
- Nagaharika, Y., & Rasheed, S. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L . by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60118-3)
- Nascimento, M. A., Silva, A. K., Franca, L. C. B., Quignard, E. L. J., López, J. A., & Almeida, M. G. (2006). *Turnera ulmifolia* L . (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. *Bioresource Technology*, 97, 1387–1391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.009>
- Nivas, D., Sonar, B., Shaikh, S., Patil, U., Gaikwad, D., Chavan, N., ... Chavan, P. (2010). Screening of some coastal plant resources for their antioxidant potential , total polyphenol and flavonoid content. *Pharmacognosy Journal*, 2(7), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80083-5](https://doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80083-5)
- Okada, T., Ide, Y., & Ogawa, M. (2012). Organic-inorganic hybrids based on ultrathin oxide layers: Designed nanostructures for molecular recognition. *Chemistry - An Asian Journal*, 7(9), 1980–1992. <https://doi.org/10.1002/asia.201101015>
- Okada, T., Kumasaki, A., Shimizu, K., Yamagishi, A., & Sato, H. (2016). Application of Hectorite-Coated Silica Gel Particles as a Packing Material for Chromatographic Resolution. *Journal of Chromatographic Science*, 54(7), 1238–1243. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw058>
- Ondua, M., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., & McGaw, L. J. (2018). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.030>
- Parameswari, P., Devika, R., & Vijayaraghavan, P. (2018). In vitro anti-inflammatory and antimicrobial potential of leaf extract from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.005>
- Patonay, K., Szalontai, H., Csug, J., Szabó, O., Kónya, E., & Németh, É. (2019). Comparison of extraction methods for the assessment of total polyphenol content and in vitro antioxidant capacity of horsemint (*Mentha longifolia* (L.) L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2019.100220>

- Premanath, R., & Lakshmidēvi, N. (2010). Studies on Anti-oxidant activity of *Tinospora cordifolia* (Miers .) Leaves using in vitro models, *6*(10), 736–743.
- Prior, R., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Quirós, A. E., Palafox, H., Sáyago, S. G., Ayala, J. F., Bello, L. A., Álvarez, E., ... González, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: Interaction and possible effect after ingestion. *Food and Function*, *5*(6), 1063–1072. <https://doi.org/10.1039/c4fo00073k>
- Reitzer, F., Allais, M., Ball, V., & Meyer, F. (2018). Polyphenols at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, *257*(2017), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.06.001>
- Rodríguez, E. (2015). *Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.
- 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.
- 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>
- Saleem, T. K. M., Azeem, A. K., Dilip, C., Sankar, C., Prasanth, N. V., & Duraisami, R. (2011). Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *1*(2), 147–149. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60014-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60014-2)
- Samsonowicz, M., Regulska, E., Karpowicz, D., & Leśniewska, B. (2018). Antioxidant properties of coffee substitutes rich in polyphenols and minerals. *Food Chemistry*, *278*(October 2018), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.057>

- Sánchez, J., Borrás, I., Sass, A., & Segura, A. (2018). *Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Modern Techniques for Food Authentication*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814264-6.00013-x>
- Sarveswaran, R., Jayasuriya, B., & Suresh, T. (2017). In vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extracts: a review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(17), 131–141. <https://doi.org/10.20959/wjpr201717-10058>
- Shehata, I., El-harshany, E., Abdallah, H., Esmat, A., & Abdel, E. (2018). Anti-inflammatory activity of *Kleinia odora*. *European Journal of Integrative Medicine*, 23, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.10.005>
- Sklenář, P., Dušková, E., & Balslev, H. (2011). Tropical and Temperate: Evolutionary History of Páramo Flora. *The Botanical Review*, 77, 71–108. <https://doi.org/10.1007/s12229-010-9061-9>
- Sousa, J., Turnes, C., Deolindo, P., Antônio, L., Inés, M., Fujita, A., ... Granato, D. (2016). Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). *Food Research International*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.041>
- Spagnol, C. M., Assis, R. P. De, Brunetti, L., Lucia, V., Isaac, B., Regina, H., ... Corrêa, M. A. (2019). In vitro methods to determine the antioxidant activity of caffeic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.04.025>
- 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>
- Villac, E. V. (2012). *ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE CANTÓN PELILEO*. San Pedro de Pelileo.
- Vinson, J., Proch, J., & Bose, P. (2001). *Polyphenol Antioxidants in Foods and Beverages* (Vol. 335).
- Wang, L., Manson, J. E., & Sesso, H. D. (2012). Calcium Intake and Risk of Cardiovascular Disease. A Review of Prospective Studies and Randomized Clinical Trials. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 12(2), 105–116.
- Wolfe, K., Xianzhong, W., & Rui Hail, L. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 609–614.

Zdero, C., Bohlmann, F., & King, R. (1991). DITERPENES AND NORDITERPENES FROM THE ARISTEGUETIA GROUP, *30*(9), 2996.

Zhang, H., Qi, R., & Mine, Y. (2018). The impact of oolong and black tea polyphenols on human health. *Food Bioscience*. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.009>

ANEXOS A

Tablas Estadísticas

Optimización del proceso de extracción – Factor disolvente

Polifenoles

Tabla A1: Análisis Anova para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor disolvente.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	157,707	8	19,7134	29,71	0,0000
Intra grupos	11,944	18	0,663557		
Total (Corr.)	169,651	26			

Tabla A2: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor disolvente.

<i>Disolvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Etanol Puro	3	2,029	X
Metano Puro	3	3,72467	X
Agua	3	5,615	X
Etanol 50%	3	6,23033	XX
Etanol 25%	3	7,176	X
Metanol 50%	3	7,20567	X
Metanol 75%	3	7,431	X
Etanol 75%	3	9,00633	X
Metanol 25%	3	10,492	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A3: Análisis Anova para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor disolvente.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	11,0768	8	1,3846	19,44	0,0000
Intra grupos	1,28185	18	0,0712139		
Total (Corr.)	12,3587	26			

Tabla A4: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor disolvente.

<i>Disolvente</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Agua	3	0,865333	X
Metano Puro	3	0,984	X
Metanol 75%	3	1,68767	X
Etanol Puro	3	1,74667	X
Etanol 50%	3	2,051	XX
Metanol 50%	3	2,25067	X
Metanol 25%	3	2,403	X
Etanol 25%	3	2,40733	X
Etanol 75%	3	3,141	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Optimización del proceso de extracción – Factor: Temperatura

Polifenoles

Tabla A5: Análisis Anova para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción-factor temperatura.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	30,9861	3	10,3287	1423,42	0,0000
Intra grupos	0,05805	8	0,00725625		
Total (Corr.)	31,0442	11			

Tabla A6: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor temperatura.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30°C	3	6,32	X
60°C	3	8,061	X
40°C	3	9,727	X
50°C	3	10,492	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A7: Análisis Anova para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor temperatura.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,84551	3	0,61517	88,02	0,0000
Intra grupos	0,0559133	8	0,00698917		
Total (Corr.)	1,90142	11			

Tabla A8: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor temperatura.

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
30°C	3	2,15567	X
40°C	3	2,659	X
60°C	3	3,06767	X
50°C	3	3,141	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Optimización del proceso de extracción – Factor: Tiempo

Polifenoles

Tabla A9: Análisis Anova para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor tiempo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9,46671	2	4,73336	525,93	0,0000
Intra grupos	0,054	6	0,009		
Total (Corr.)	9,52071	8			

Tabla A10: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor tiempo.

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
20min	3	8,016	X
10min	3	8,886	X
5min	3	10,492	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A11: Análisis Anova para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor tiempo.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,429294	2	0,214647	54,13	0,0001
Intra grupos	0,0237933	6	0,00396556		
Total (Corr.)	0,453087	8			

Tabla 12: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en la optimización del proceso de extracción - factor tiempo.

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5min	3	3,141	×
10min	3	3,39267	×
20min	3	3,67567	×

Método: 95,0 porcentaje LSD

Desgaste de material vegetal

Polifenoles

Tabla A13: Análisis Anova para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en el desgaste del material vegetal.

<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	97,9009	4	24,4752	681,57	0,0000
Intra grupos	0,3591	10	0,03591		
Total (Corr.)	98,26	14			

Tabla A14: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en el desgaste del material vegetal.

<i>Extracciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Quinta	3	0,123	×
Cuarta	3	0,453	×
Tercera	3	1,744	×
Segunda	3	4,145	×
Primera	3	6,936	×

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A15: Análisis Anova para la concentración de flavonoides en los extractos de Pussu pato en el desgaste del material vegetal.

<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	23,4837	4	5,87092	1650,31	0,0000
Intra grupos	0,0355747	10	0,00355747		
Total (Corr.)	23,5193	14			

Tabla A16: Pruebas de múltiples rangos para la concentración de polifenoles en los extractos de Pussu pato en el desgaste del material vegetal.

<i>Extracciones</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Quinta	3	0,216333	X
Cuarta	3	0,394	X
Tercera	3	0,708667	X
Segunda	3	1,92533	X
Primera	3	3,56067	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Actividades biológicas

Actividad antiinflamatoria- Método HRBC

Polifenoles

Tabla A17: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto metanólico de Pussu pato – método HRBC.

<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	230,286	6	38,381	12,79	0,0001
Intra grupos	42,0	14	3,0		
Total (Corr.)	272,286	20			

Tabla A18: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto metanólico de Pussu pato – método HRBC.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1000	3	87,3333	X
500	3	93,3333	X
50	3	95,6667	XX
200	3	95,6667	XX
75	3	96,0	XX
25	3	96,6667	X
100	3	98,3333	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A19: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto etanólico de Pussu pato – método HRBC.

<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	152,0	6	25,3333	24,18	0,0000
Intra grupos	14,6667	14	1,04762		
Total (Corr.)	166,667	20			

Tabla A20: Pruebas de múltiples rangos en el extracto etanólico de Pussu pato – método HRBC.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1000	3	87,6667	X
200	3	93,0	X
500	3	93,3333	X
100	3	94,3333	XX
75	3	95,3333	X
50	3	96,0	X
25	3	96,0	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Diclofenaco

Tabla A21: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco– método HRBC.

<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	51,9668	4	12,9917	5,53	0,0130
Intra grupos	23,484	10	2,3484		
Total (Corr.)	75,4508	14			

Tabla A22: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco– método HRBC.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
200	3	93,1867	X
100	3	93,53	X
25	3	97,0067	X
75	3	97,19	X
50	3	97,2467	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Actividad antiinflamatoria - Método de desnaturalización de proteínas

Polifenoles

Tabla A23: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto metanólico de Pussu pato – método desnaturalización de proteínas.

<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	58,545	3	19,515	4,26	0,0289
Intra grupos	55,005	12	4,58375		
Total (Corr.)	113,55	15			

Tabla A24: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto metanólico de Pussu pato – método desnaturalización de proteínas.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	4	36,85	X
200	4	36,925	X
500	4	39,5	XX
1000	4	41,425	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla A25: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto etanólico de Pussu pato – método desnaturalización de proteínas.

<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	589,072	3	196,357	91,93	0,0000
Intra grupos	25,6325	12	2,13604		
Total (Corr.)	614,704	15			

Tabla A26: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria en el extracto etanólico de Pussu pato – método desnaturalización de proteínas.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1000	4	17,725	X
500	4	27,05	X
200	4	32,525	X
100	4	32,625	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Diclofenaco

Tabla A27: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco – desnaturalización de proteínas.

<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	36,3274	8	4,54092		
Total (Corr.)	2283,84	11			

Tabla 28A: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antiinflamatoria del diclofenaco – desnaturalización de proteínas.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	24,1833	X
200	3	35,37	X
500	3	49,9633	X
1000	3	60,0267	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Actividad antioxidante

Polifenoles

Tabla 29A: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antioxidante en el extracto metanólico de Pussu pato.

<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	1021,16	3	340,386	36,21	0,0001
Intra grupos	75,1951	8	9,39938		
Total (Corr.)	1096,35	11			

Tabla 30A: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante en el extracto metanólico de Pussu pato.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	13,86	X
200	3	26,17	X
500	3	27,9433	X
1000	3	39,89	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Flavonoides

Tabla 31A: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antioxidante en el extracto etanólico de Pussu pato.

<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	1072,05	3	357,349	60,13	0,0000
Intra grupos	47,5457	8	5,94321		
Total (Corr.)	1119,59	11			

Tabla 32A: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante en el extracto etanólico de Pussu pato.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	36,0567	X
200	3	49,4933	X
500	3	55,2667	X
1000	3	61,6833	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Butilhidroxitolueno

Tabla 33A: Análisis Anova para el porcentaje de actividad antioxidante en el BHT.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	321,083	3	107,028	169,22	0,0000
Intra grupos	5,0598	8	0,632475		
Total (Corr.)	326,143	11			

Tabla 34A: Pruebas de múltiples rangos para el porcentaje de actividad antioxidante en el BHT.

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	82,7467	X
200	3	84,5233	X
500	3	91,4267	X
1000	3	95,54	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

ANEXOS B

Datos de la experimentación

Optimización del proceso de extracción – Factor disolvente

Polifenoles

Tabla 1B: Valores obtenidos de la cuantificación de polifenoles - factor disolvente

POLIFENOLES									
Agua								Promedio	Desv. Estand
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alicuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)		
GA1	0,1000	5	50	5	1	0,157	5,225	5,615	0,350
GA2	0,1000	5	50	5	1	0,168	5,720		
GA3	0,1000	5	50	5	1	0,172	5,900		
Etanol 75%									
G75.1	0,1000	5	50	5	1	0,238	8,871	9,006	1,782
G75.2	0,1000	5	50	5	1	0,282	10,852		
G75.3	0,1000	5	50	5	1	0,203	7,296		
Etanol 50%									
G50.1	0,1000	5	50	5	1	0,185	6,486	6,230	0,248
G50.2	0,1000	5	50	5	1	0,179	6,215		
G50.3	0,1000	5	50	5	1	0,174	5,990		
Etanol 25%									
G25.1	0,1000	5	50	5	1	0,211	7,656	7,176	0,453
G25.2	0,1000	5	50	5	1	0,191	6,756		
G25.3	0,1000	5	50	5	1	0,199	7,116		
Etanol puro									
GP.1	0,1000	5	50	5	1	0,079	1,714	2,029	0,400
GP.2	0,1000	5	50	5	1	0,083	1,894		
GP.3	0,1000	5	50	5	1	0,096	2,479		
Metanol 25%									
G25.1	0,1000	5	50	5	1	0,272	10,402	10,492	0,090
G25.2	0,1000	5	50	5	1	0,276	10,582		
G25.3	0,1000	5	50	5	1	0,274	10,492		
Metanol 50%									
G50.1	0,1000	5	50	5	1	0,213	7,746	7,206	1,095
G50.2	0,1000	5	50	5	1	0,217	7,926		
G50.3	0,1000	5	50	5	1	0,173	5,945		
Metanol 75%									
G75.1	0,1000	5	50	5	1	0,208	7,521	7,431	0,949
G75.2	0,1000	5	50	5	1	0,184	6,441		
G75.3	0,1000	5	50	5	1	0,226	8,331		
Metanol puro									
GP.1	0,1000	5	50	5	1	0,121	3,605	3,725	0,375
GP.2	0,1000	5	50	5	1	0,117	3,424		
GP.3	0,1000	5	50	5	1	0,133	4,145		

Flavonoides

Tabla 2B: Valores obtenidos de la cuantificación de flavonoides - factor disolvente

FLAVONOIDES												
Agua										Promedio		Desv. Estand
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alicuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500 nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Abs 500 nm	Abs 510 nm	Abs 510 nm
G1	0,100	5	250	5	1	0,090	1,031	-	-	0,865		0,179
G2	0,100	5	250	5	1	0,080	0,676	-	-			
G3	0,100	5	250	5	1	0,086	0,889	-	-			
Etanol 75%												
G75.1	0,100	5	250	5	1	0,110	1,740	0,105	3,162	1,729	3,141	0,036
G75.2	0,100	5	250	5	1	0,111	1,776	0,105	3,162			
G75.3	0,100	5	250	5	1	0,108	1,669	0,103	3,099			
Etanol 50%												
G50.1	0,100	5	250	5	1	0,079	0,640	0,075	2,219	0,428	2,051	0,158
G50.2	0,100	5	250	5	1	0,068	0,250	0,065	1,904			
G50.3	0,100	5	250	5	1	0,072	0,392	0,069	2,030			
Etanol 25%												
G25.1	0,100	5	250	5	1	0,094	1,173	0,087	2,596	0,924	2,407	0,166
G25.2	0,100	5	250	5	1	0,083	0,782	0,077	2,282			
G25.3	0,100	5	250	5	1	0,084	0,818	0,079	2,344			
Etanol puro												
GP.1	0,100	5	250	5	1	0,056	-0,176	0,054	1,558	0,037	1,747	0,250
GP.2	0,100	5	250	5	1	0,059	-0,069	0,057	1,652			
GP.3	0,100	5	250	5	1	0,071	0,357	0,069	2,030			
Metanol 25%												
G25.1	0,100	5	250	5	1	0,100	2,729	0,094	2,438	2,706	2,403	0,196
G25.2	0,100	5	250	5	1	0,093	2,488	0,087	2,192			
G25.3	0,100	5	250	5	1	0,105	2,900	0,098	2,579			
Metanol 50%												
G50.1	0,100	5	250	5	1	0,102	2,797	0,097	2,544	2,511	2,251	0,420
G50.2	0,100	5	250	5	1	0,100	2,729	0,094	2,438			
G50.3	0,100	5	250	5	1	0,079	2,007	0,075	1,770			
Metanol 75%												
G75.1	0,100	5	250	5	1	0,069	1,663	0,065	1,418	1,949	1,688	0,264
G75.2	0,100	5	250	5	1	0,085	2,213	0,080	1,946			
G75.3	0,100	5	250	5	1	0,078	1,972	0,073	1,699			
Metanol puro												
GP.1	0,100	5	250	5	1	0,050	1,010	0,049	0,855	1,147	0,984	0,223
GP.2	0,100	5	250	5	1	0,050	1,010	0,049	0,855			
GP.3	0,100	5	250	5	1	0,062	1,422	0,060	1,242			

Optimización del proceso de extracción – Factor temperatura

Polifenoles

Tabla 3B: Valores obtenidos de la cuantificación de polifenoles - factor temperatura.

POLIFENOLES									
Metanol 25%									
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio	Desv. Estand
30°C									
G2530.1	0,1000	5	50	5	1	0,180	6,260	6,320	0,069
G2530.2	0,1000	5	50	5	1	0,183	6,395		
G2530.3	0,1000	5	50	5	1	0,181	6,305		
40°C									
G2540.1	0,1000	5	50	5	1	0,258	9,772	9,727	0,119
G2540.2	0,1000	5	50	5	1	0,259	9,817		
G2540.3	0,1000	5	50	5	1	0,254	9,592		
50°C									
G2550.1	0,1000	5	50	5	1	0,272	10,402	10,492	0,090
G2550.2	0,1000	5	50	5	1	0,276	10,582		
G2550.3	0,1000	5	50	5	1	0,274	10,492		
60°C									
G2560.1	0,1000	5	50	5	1	0,221	8,106	8,061	0,045
G2560.2	0,1000	5	50	5	1	0,220	8,061		
G2560.3	0,1000	5	50	5	1	0,219	8,016		

Flavonoides

Tabla 4B: Valores obtenidos de la cuantificación de flavonoides - factor temperatura.

FLAVONOIDES										Promedio		Desv. Estand
Etanol 75%												
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500 nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Abs 500 nm	Abs 510 nm	Abs 510 nm
30 °C												
G2530.1	0,1000	5	250	5	1	0,078	0,605	0,074	2,187	0,581	2,156	0,031
G2530.2	0,1000	5	250	5	1	0,076	0,534	0,072	2,124			
G2530.3	0,1000	5	250	5	1	0,078	0,605	0,073	2,156			
40°C												
G2540.1	0,1000	5	250	5	1	0,099	1,350	0,094	2,816	1,173	2,659	0,137
G2540.2	0,1000	5	250	5	1	0,091	1,066	0,086	2,565			
G2540.3	0,1000	5	250	5	1	0,092	1,102	0,087	2,596			
50°C												
G2550.1	0,1000	5	250	5	1	0,110	1,740	0,105	3,162	1,729	3,141	0,036
G2550.2	0,1000	5	250	5	1	0,111	1,776	0,105	3,162			
G2550.3	0,1000	5	250	5	1	0,108	1,669	0,103	3,099			
60°C												
G2560.1	0,1000	5	250	5	1	0,111	1,776	0,105	3,162	1,634	3,068	0,083
G2560.2	0,1000	5	250	5	1	0,106	1,598	0,101	3,036			
G2560.3	0,1000	5	250	5	1	0,104	1,527	0,100	3,005			

Optimización del proceso de extracción – Factor tiempo

Polifenoles

Tabla 5B: Valores obtenidos de la cuantificación de flavonoides - factor tiempo.

POLIFENOLES									
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio	Desv. Estand
Metanol 25% a 50°C x 5 min									
GM05.1	0,1000	5	50	5	1	0,272	10,402	10,492	0,090
GM05.2	0,1000	5	50	5	1	0,276	10,582		
GM05.3	0,1000	5	50	5	1	0,274	10,492		
Metanol 25% a 50°C x 10 min									
GM10.1	0,1000	5	50	5	1	0,241	9,006	8,886	0,113
GM10.2	0,1000	5	50	5	1	0,236	8,781		
GM10.3	0,1000	5	50	5	1	0,238	8,871		
Metanol 25% a 50°C x 20 min									
GM20.1	0,1000	5	50	5	1	0,218	7,971	8,016	0,078
GM20.2	0,1000	5	50	5	1	0,218	7,971		
GM20.3	0,1000	5	50	5	1	0,221	8,106		

Flavonoides

Tabla 6B: Valores obtenidos de la cuantificación de flavonoides - factor tiempo.

FLAVONOIDES										Promedio		Desv. Estand
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 500 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Abs 500nm	Abs 510nm	Abs 500nm
Etanol 75% a 50°C x 5 min												
GE05.1	0,1000	5	250	5	1	0,110	1,740	0,105	3,162	1,729	3,141	0,054
GE05.2	0,1000	5	250	5	1	0,111	1,776	0,105	3,162			
GE05.3	0,1000	5	250	5	1	0,108	1,669	0,103	3,099			
Etanol 75% a 50°C x 10 min												
GE10.1	0,1000	5	250	5	1	0,120	2,095	0,116	3,508	1,989	3,393	0,094
GE10.2	0,1000	5	250	5	1	0,116	1,953	0,111	3,351			
GE10.3	0,1000	5	250	5	1	0,115	1,918	0,110	3,319			
Etanol 75% a 50°C x 20 min												
GE20.1	0,1000	5	250	5	1	0,126	2,308	0,121	3,665	2,308	3,676	0,035
GE20.2	0,1000	5	250	5	1	0,127	2,344	0,121	3,665			
GE20.3	0,1000	5	250	5	1	0,125	2,273	0,122	3,697			

Actividades Biológicas

Actividad antiinflamatoria - Método HRBC

Tabla 7B: Valores obtenidos de actividad antiinflamatoria en los extractos metanólico y etanólico de Pussu pato – método HRBC.

Muestra	Concentración ug/ml	Absorbancias			Promedio Control			% Promedio			Desviación Estándar
		540 nm	560 nm	580 nm	540nm	560nm	580nm	540nm	560nm	580nm	
Control	0	1,079	0,648	1,022	1,069	0,642	1,011	540nm	560nm	580nm	540 nm
		1,058	0,635	1,000							
		0,037	0,026	0,035							
Grosvenoria_Polifenoles Metanol 25%	25	0,040	0,027	0,038	96	96	96	96,6	96	97	0,378
		0,032	0,031	0,033	97	95	97				
		0,055	0,038	0,052	95	94	95				
	50	0,029	0,041	0,058	97	94	94	95,6	94	95	1,462
		0,057	0,037	0,053	95	94	95				
		0,029	0,026	0,030	97	96	97				
	75	0,051	0,037	0,047	95	94	95	96,3	95	96	1,031
		0,039	0,028	0,036	96	96	96				
		0,018	0,015	0,018	98	98	98				
	100	0,018	0,007	0,017	98	99	98	98,6	98	98	0,432
		0,01	0,008	0,011	99	99	99				
		0,056	0,041	0,052	95	94	95				
200	0,036	0,026	0,033	97	96	97	95,4	95	95	1,081	
	0,056	0,036	0,052	95	94	95					
	0,072	0,053	0,066	93	92	93					
500	0,071	0,053	0,065	93	92	94	93,5	92	94	0,301	
	0,066	0,05	0,060	94	92	94					
	0,185	0,123	0,170	83	81	83					
1000	0,124	0,086	0,112	88	87	89	87,2	85	88	4,063	
	0,101	0,079	0,089	91	88	91					
	0,041	0,026	0,038	96	96	96					
25	0,043	0,027	0,040	96	96	96	95,9	96	96	0,286	
	0,047	0,031	0,046	96	95	95					
	0,045	0,032	0,042	96	95	96					
50	0,044	0,028	0,040	96	96	96	95,9	95	96	0,094	
	0,043	0,029	0,040	96	95	96					
	0,041	0,029	0,038	96	95	96					
75	0,052	0,034	0,048	95	95	95	95,4	95	96	0,690	
	0,055	0,038	0,050	95	94	95					
	0,048	0,034	0,044	96	95	96					
100	0,067	0,049	0,063	94	92	94	94,0	93	94	1,379	
	0,077	0,057	0,072	93	91	93					
	0,076	0,066	0,067	93	90	93					
200	0,070	0,051	0,065	93	92	94	93,2	91	93	0,286	
	0,072	0,053	0,067	93	92	93					
	0,075	0,054	0,069	93	92	93					
500	0,075	0,054	0,069	93	92	93	93,4	92	94	0,702	
	0,062	0,050	0,055	94	92	95					
	0,108	0,103	0,117	90	84	88					
1000	0,143	0,098	0,101	87	85	90	87,5	84	88	2,072	
	0,149	0,103	0,134	86	84	87					

Tabla 8B: Valores obtenidos de actividad antiinflamatoria del diclofenaco – método HRBC.

Muestra	Concentración ug/ml	Absorbancias			Promedio control 540nm				
		540 nm	560 nm	580 nm					
Control	0	1,253	0,757	1,188	1,247	$\% \text{ Protección} = 100 - \left(\frac{\text{abs. muestra}}{\text{abs. control}} \times 100 \right)$			
		1,254	0,784	1,315					
		1,235	0,774	1,295					
					%Act. Antiinflamatoria a 540 nm	%Act. Antiinflamatoria Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación	
Diclofenaco	25	0,050	0,045	0,050	95,99	97,0	0,936	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	97,2	0,682	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	97,2	0,501	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	93,5	1,530	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	93,2	2,792	0,030		
	0,074	0,070	0,079	94,07					
	0,124	0,118	0,127	90,06					

Actividad antiinflamatoria - Desnaturalización de proteína

Tabla 9B: Valores obtenidos de actividad antiinflamatoria en los extractos metanólico y etanólico de Pussu pato – método desnaturalización de proteína.

Muestra	Conc. del extracto en el tubo	ml de sol. de extracto	Réplica	ml de sol. de albúmina 1mM en buffer pH 6,4	Abs. 660 nm	Abs. 660 nm Promedio	$\% \text{ de Protección} = 100 - \left(\frac{\text{abs.muestra}}{\text{abs.control}} \times 100 \right)$		
Control	0 ug/ml	0	C1	2	1,355	1,238			
			C2		1,288				
			C3		1,193				
			C4		1,116				
						% de protección (C1)	Promedio del % de Protección	Desv. Estand	
Metanol 25%	100 ug/ml	2	1	2	0,788	36,3	36,8	0,783	
			2		0,789	36,3			
			3		0,783	36,8			
			4		0,768	38,0			
	200 ug/ml	2	1	2	0,799	35,5	36,9	1,156	
			2		0,784	36,7			
			3		0,776	37,3			
			4		0,765	38,2			
	500 ug/ml	2	1	2	0,696	43,8	39,5	3,705	
			2		0,747	39,7			
			3		0,808	34,7			
			4		0,745	39,8			
	1000 ug/ml	2	1	2	0,723	41,6	41,4	1,609	
			2		0,698	43,6			
			3		0,742	40,1			
			4		0,738	40,4			
Etanol 75%	100 ug/ml	2	1	2	0,823	33,5	32,6	0,888	
			2		0,835	32,6			
			3		0,83	33,0			
			4		0,849	31,4			
	200 ug/ml	2	1	2	0,854	31,0	32,5	1,608	
			2		0,809	34,7			
			3		0,847	31,6			
			4		0,832	32,8			
	500 ug/ml	2	1	2	0,918	25,8	27,1	1,949	
			2		0,915	26,1			
			3		0,912	26,3			
			4		0,867	30,0			
	1000 ug/ml	2	1	2	1,032	16,6	17,8	1,064	
			2		1,006	18,7			
			3		1,027	17,0			
			4		1,008	18,6			

Tabla 10B: Valores obtenidos de la actividad antiinflamatoria en el diclofenaco utilizado como estándar – método desnaturalización de proteína.

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

Actividad antioxidante

Tabla 11B: Valores obtenidos de actividad antioxidante de los extractos metanólico, etanólico del Pussu pato y del estándar BHT.

		532 nm		Promedio	$Act. = \frac{(Ab.muestra - Ab.control)}{(Ab.aceite\ sin\ oxidar - Ab.control)} * 100$				
		R1	R2						
Disolvente	CONTROL (Aceite Oxidado)	0,977	0,928	0,953					
	Aceite sin oxidar	0,129	0,124	0,127	% Ac. Antioxidante				
	Muestras	R1	R2	R3	R1	R2	R3	Promedio	Desv. estándar
Metanol	100	0,842	0,826	0,846	13,378	15,315	12,893	13,862	1,281
	200	0,726	0,737	0,746	27,421	26,090	25,000	26,170	1,213
	500	0,708	0,724	0,733	29,600	27,663	26,574	27,946	1,533
	1000	0,648	0,652	0,569	36,864	36,380	46,429	39,891	5,667
Etanol	100	0,679	0,650	0,635	33,111	36,622	38,438	36,057	2,708
	200	0,530	0,575	0,526	51,150	45,702	51,634	49,496	3,294
	500	0,484	0,486	0,518	56,719	56,477	52,603	55,266	2,310
	1000	0,439	0,443	0,447	62,167	61,683	61,199	61,683	0,484
BHT	B100	0,268	0,267	0,272	82,869	82,990	82,385	82,748	0,320
	B200	0,249	0,256	0,258	85,169	84,322	84,080	84,524	0,572
	B500	0,205	0,186	0,201	90,496	92,797	90,981	91,425	1,213
	B1000	0,163	0,170	0,157	95,581	94,734	96,308	95,541	0,788

ANEXOS C

Fotografías

Muestreo

Fotografía 1C: Ascenso al cerro Teligote, equipo de trabajo, recolección de hojas de Pussu pato y pretratamiento de las muestras.



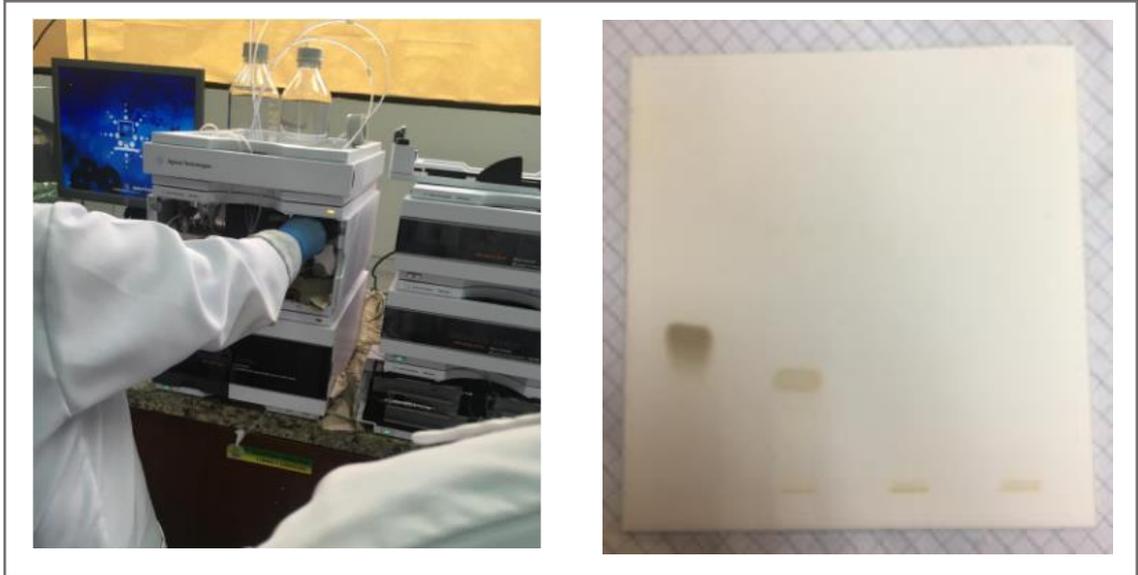
Cuantificación

Fotografía 2C: Muestras de los extractos, cuantificación de polifenoles (derecha) y flavonoides (izquierda).



Caracterización

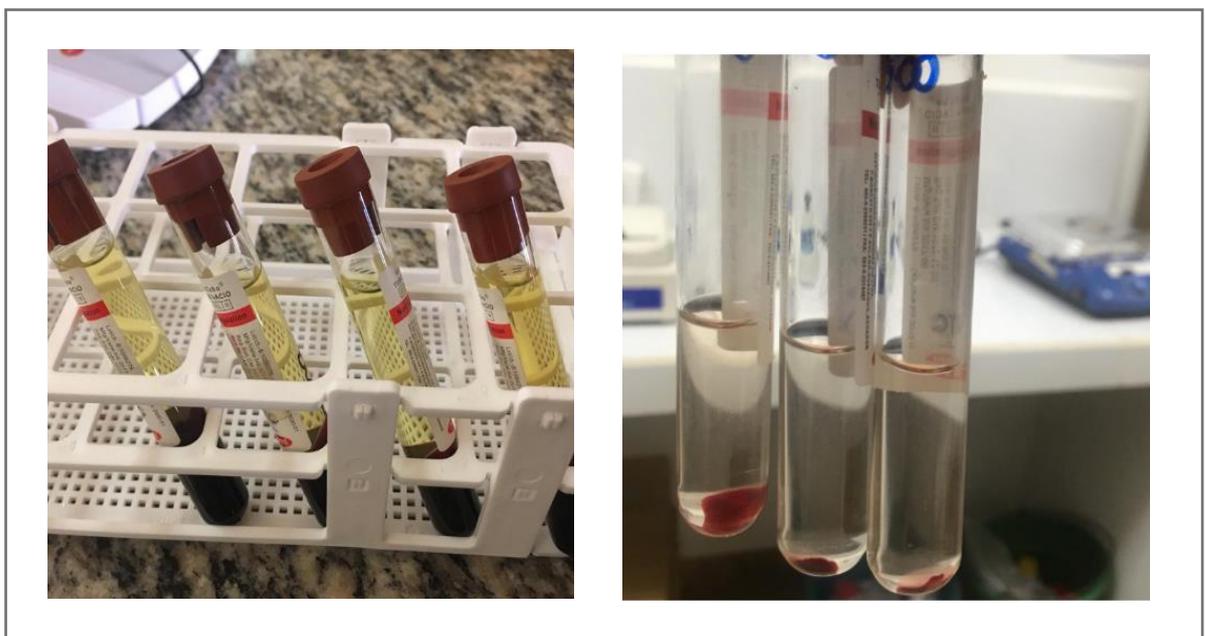
Fotografía 3C: Preparación del equipo HPLC previo al análisis de las muestras, placa de sílica gel después de la siembra y recorrido de las muestras.



Actividades Biológicas

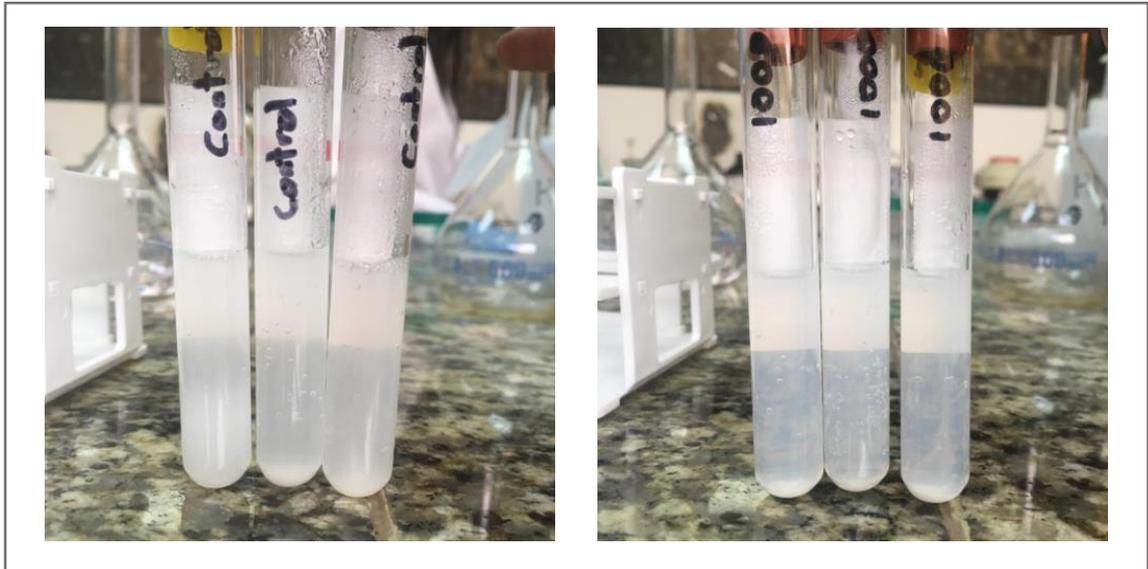
Actividad antiinflamatorio - Método HRBC

Fotografía 4C: Muestras de sangre en solución Alsever previo al análisis; muestras después de la incubación y centrifugación.



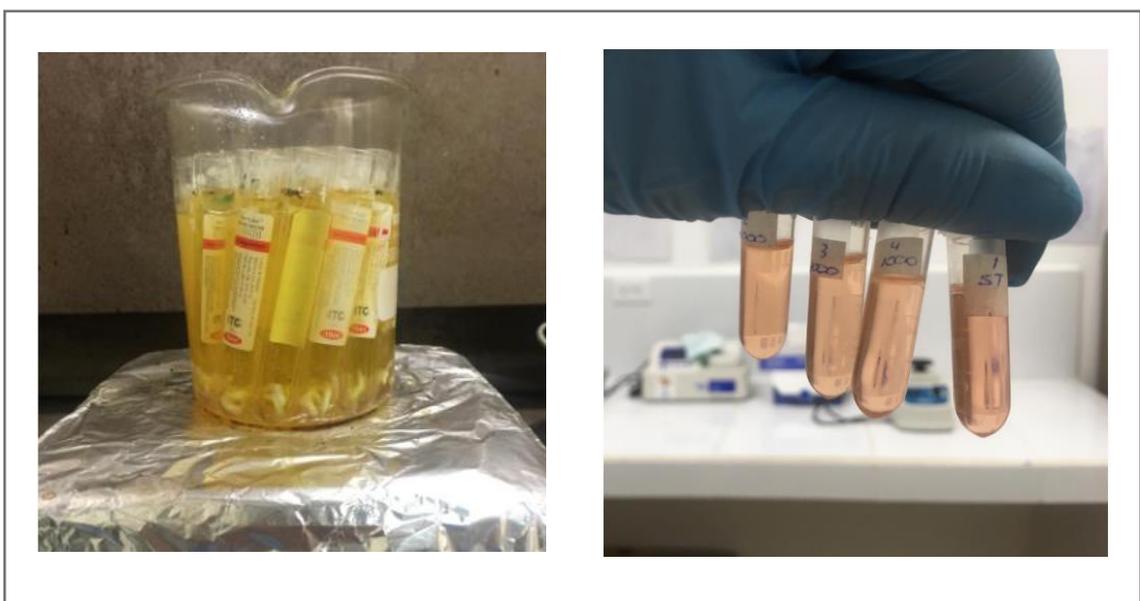
Actividad antiinflamatoria – Método desnaturalización de proteína

Fotografía 5C: Muestras sometidas a desnaturalización de la proteína de la albúmina listas para su medición.



Actividad antioxidante

Fotografía 6C: Extractos sometidos a oxidación junto al aceite de oliva; muestras listas para su medición luego de la reacción del aceite oxidado con ácido tiobarbitúrico.



Metales

Fotografía 7C: Pesado de hojas de Pussu pato; proceso de digestión de las muestras para la determinación de metales.

