



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



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Extracción, cuantificación y caracterización de compuestos fenólicos extraídos a partir de la Arquitecta (*Lasiocephalus ovatus* Schltdl.), planta nativa del Cerro Teligote.

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

Trabajo que forma parte del proyecto: Estudio del perfil de polifenoles y encapsulamiento 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 y Biotecnología. Aprobado por el honorable consejo universitario y financiado por el Centro de Investigaciones de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0206-CU-P-2018.

Autora: Melany Noemi Espinosa Panchi

Tutora: PhD. Dayana Cristina Morales

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, 11 de diciembre del 2019



PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I. 180413557-0

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Melany Noemi Espinosa Panchi, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Melany Noemi Espinosa Panchi


C.I. 172326784-3

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

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


Para constancia firman:


.....
Presidente del Tribunal


.....

MSc. Walter Aurelio Simbaña Ayo

C.I.170918085


.....

Ph.D. Freddy David Escobar Terán

C.I. 171529005-0

Ambato, 10 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, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

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



Melany Noemi Espinosa Panchi

C.I. 172326784-3

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz de esperanza en los momentos más difíciles de mi vida.

A las personas que siempre creyeron en mí, principalmente a mi mami Cristina por ser esa amiga incondicional, un apoyo constante y un ejemplo de lucha, ya que gracias a ti he alcanzado a cumplir este sueño, a mis tíos por su confianza.

A mis hermanos Cris e Isma por siempre hacerme reír y estar pendientes de mis logros y fracasos siendo siempre un gran apoyo.

GRACIAS POR ESTAR CONMIGO

AGRADECIMIENTO

A la comunidad del Teligote por permitirme explorar su naturaleza, de esta manera poder desarrollar mi trabajo de investigación con Arquitecta (*Lasiocephalus ovatus*)

Al proyecto: Estudio del perfil de polifenoles y encapsulamiento 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 y Biotecnología. Aprobado por el honorable consejo universitario y financiado por el Centro de Investigaciones de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 0206-CU-P-2018.

Al proyecto de canje de deuda Ecuador – España, al laboratorio de análisis instrumental y a los ingenieros Mónica y Mario por permitirme trabajar allí.

A la doctora Dayana, por darme la oportunidad de pertenecer a esta investigación, por brindarme su sabiduría y conocimiento, quien con su guía y paciencia me ha permitido cumplir esta meta.

A Dianita Muñoz por ser la mejor amiga, compañera y confidente, que siempre me tuvo paciencia y me ayudó cuando más lo necesitaba, te quiero mucho.

A André Rosero por ser la persona que me ha prestado su ayuda incondicionalmente en cualquier situación, por su tiempo, su paciencia y su apoyo. Gracias por brindarme tu amistad y espero tenerla siempre.

A Ximena Mendoza y a todos los que conformaron el grupo polifenoles, los cuales me han traído muchas risas y nuevas amistades que espero perduren con el tiempo.

A Daniel quien se desvelaba conmigo acompañándome a terminar mis tareas y siempre me hacía reír para no dormirme, gracias por estar conmigo.

Índice

APROBACIÓN DEL TUTOR-----	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD-----	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO-----	ii
DERECHOS DE AUTOR-----	iii
DEDICATORIA-----	iv
AGRADECIMIENTO-----	v
RESUMEN-----	1
ABSTRACT-----	2
Capítulo I-----	3
1. Marco teórico-----	3
1.1. Antecedentes Investigativos-----	3
1.1.1. Plantas medicinales-----	3
1.1.2. Plantas medicinales en el Ecuador-----	4
1.1.3. <i>Lasiocephalus</i> -----	5
1.1.4. <i>Lasiocephalus ovatus</i> -----	6
1.1.5. Metabolitos secundarios-----	7
1.2. Objetivos-----	12
1.2.1. Objetivo General-----	12
1.2.2. Objetivo Especifico-----	12
1.3. Hipótesis-----	13
1.3.1. Hipótesis nula-----	13
1.3.2. Hipótesis Alternativa-----	13
1.4. Señalamiento de las Variables-----	13
1.4.1. Variable Independientes-----	13

1.4.2.	Variables Dependientes	14
Capítulo II		15
2.	Metodología	15
2.1.	Materiales	15
2.1.1.	Materiales	15
2.1.2.	Equipos	16
2.1.3.	Reactivos	16
2.2.	Métodos	17
2.2.1.	Material vegetal y Materia prima	17
2.2.2.	Preparación del material vegetal	18
2.2.3.	Optimización del proceso de extracción de metabolitos secundarios de Arquitecta	18
2.2.4.	Cuantificación de compuestos fenólicos	19
2.2.5.	Desgaste del material vegetal	20
2.2.6.	Liofilizado	20
2.2.7.	Caracterización de los extractos	20
2.3.	Actividades biológicas	22
2.3.1.	Actividad antiinflamatoria	22
2.3.2.	Actividad antioxidante	25
Capítulo III		27
3.	Resultados y discusión	27
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	27
3.1.1.	Determinación de polifenoles	27
3.1.2.	Optimización del proceso de extracción	27
3.1.3.	Optimización del solvente	28
3.1.4.	Optimización de la temperatura.	30
3.1.5.	Optimización del tiempo.	32

3.1.6.	Desgaste del material vegetal.	34
3.2.	Caracterización de metabolitos secundarios	35
3.2.1.	TLC	35
3.2.2.	HPLC	37
3.2.3.	Actividad antiinflamatoria	39
3.2.4.	Actividad Antioxidante	45
Capitulo IV		48
4.	Conclusiones y Recomendaciones	48
4.1.	Conclusiones	48
4.2.	Recomendaciones	49
5.	Materiales de referencia	50
5.1.	Referencias Bibliográficas	50
5.2.	ANEXOS	61
5.2.1.	Optimización para la extracción.	61
5.2.2.	Desgaste del material vegetal	69
5.2.3.	Análisis de varianza	71
5.2.4.	Curva de calibrado para HPLC	74
5.2.5.	Datos actividad antiinflamatoria	75
5.2.6.	Datos actividad antioxidante	79
5.3.	Fotografías	80

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Lasiocephalus ovatus</i> Schltdl.....	7
Tabla 2. Datos de optimización de solvente para polifenoles y flavonoides.	29
Tabla 3. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento solventes por concentración	30
Tabla 4. Datos de optimización de temperatura para polifenoles	31
Tabla 5. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento temperatura por concentración	32
Tabla 6. Datos de optimización para el variante tiempo.....	33
Tabla 7. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento tiempo por concentración	34
Tabla 8. Valores de Rf para bandas de polifenoles y flavonoides registradas en el perfil cromatográfico.....	36
Tabla 9. Inhibición de la desnaturalización de la proteína para flavonoides	39
Tabla 10. Pruebas de rangos múltiples para la desnaturalización de proteínas por concentración	41
Tabla 11. Datos para la protección contra lisis de glóbulos rojos.....	43
Tabla 12. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento de la estabilización de glóbulos rojos y concentración	44
Tabla 13. Datos de actividad antioxidante	46
Tabla 14. Pruebas de rangos múltiples para tratamientos de actividad antioxidante por concentración.	47

Tabla 15. Optimización del Solvente para flavonoides a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).....	61
Tabla 16. Optimización del Solvente para polifenoles a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).....	63
Tabla 17. Optimización de la temperatura para flavonoides a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).....	65
Tabla 18. Optimización de la temperatura para polifenoles a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).....	66
Tabla 19. Optimización del tiempo para flavonoides a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).	67
Tabla 20. Optimización del tiempo para polifenoles a partir de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura).	68
Tabla 21. Desgaste del material vegetal de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura) para flavonoides	69
Tabla 22. Desgaste del material vegetal de <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Arquitectura) para polifenoles	70
Tabla 23. Análisis de Varianza para el tratamiento flavonoides por Solventes.....	71
Tabla 24. Análisis de Varianza para el tratamiento polifenoles por Solventes.....	71
Tabla 25. Análisis de Varianza para el tratamiento polifenoles por tiempo	71
Tabla 26. Análisis de Varianza para el tratamiento flavonoides por tiempo	72
Tabla 27. Análisis de varianza para el tratamiento de inhibición de la desnaturalización de proteínas por concentración para flavonoides	72

Tabla 28. Análisis de varianza para el tratamiento de inhibición de la desnaturalización de proteínas por concentración para polifenoles.....	72
Tabla 29. Análisis de varianza para el tratamiento HRBC polifenoles por concentración	73
Tabla 30. Análisis de varianza para el tratamiento HRBC flavonoides por concentración	73
Tabla 31. Análisis de varianza para el tratamiento antioxidante para flavonoides por concentración	73
Tabla 32. Análisis de varianza para el tratamiento antioxidante para polifenoles por concentración	74
Tabla 33. Datos de desnaturalización de proteínas para polifenoles	75
Tabla 34. Datos de desnaturalización de proteínas para flavonoides.....	76
Tabla 35. Dato de desnaturalización de proteínas para estándar diclofenaco.....	77
Tabla 36. Datos de método in vitro HRBC	78
Tabla 37. Réplicas para actividad antioxidante.....	79

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Lasiocephalus ovatus</i> (Fuente: Simbaña, 2017)	6
Figura 2. Estructuras comunes de 5 ácidos fenólicos	8
Figura 3. Estructura básica del esqueleto fenólico	9
Figura 4. Reacción del ácido gálico y el reactivo Folin-Ciocalteu.	10
Figura 5. Reacción de flavonoides con tricloruro de aluminio (O’Coinceanainn et al, 2003).	11
Figura 6. Curva de calibrado para la cuantificación de polifenoles (a) y flavonoides (b).	27
Figura 7. Desgaste el material vegetal para (a) polifenoles y (b) flavonoides.	35
Figura 8. Perfil de metabolitos secundarios obtenidos por TLC a longitudes de onda de 254 y 366nm presentes en los extractos hidroelánólicos de <i>Arquitectura</i>	36
Figura 9. Cromatograma de los extractos hidroalcoholicos de <i>Arquitectura</i> . a) 214, b) 218, c) 360 y d) 366	38
Figura 10. Porcentaje de inhibición versus diferentes concentraciones de flavonoides, polifenoles y diclofenaco (estándar)	41
Figura 11. Comparación entre los porcentajes de inhibición de flavonoides, polifenoles y diclofenaco (estándar).	44
Figura 12. Comparación entre los porcentajes de actividad antioxidante de los datos obtenidos para polifenoles y flavonoides.	47
Figura 13. Curva de calibración para ácido gálico y catequina	74
Figura 14. Llegada al cerro Teligote	80

Figura 15. Ascenso al pajonal del cerro Teligote para la obtención de Arquitecta con el guía Juanito.	80
Figura 16. Tratamiento de la muestra Arquitecta.....	81
Figura 17. Extractos con las condiciones óptimas para polifenoles (a) y flavonoides (b).....	81
Figura 18. Desgaste del material vegetal, del extracto (a) y con las pruebas para flavonoides (b) y polifenoles (c)	81
Figura 19. Proceso de liofilización de Arquitecta.....	81
Figura 20. Desnaturalización de proteína.....	81
Figura 21. Muestra de sangre para prueba de estabilización de glóbulos rojos.....	81
Figura 22. Actividad antioxidante tubos con aceite y muestras en termo bloque.....	81

RESUMEN

Se evaluó la extracción, cuantificación y caracterización de los compuestos fenólicos mediante el secado y trituración de las hojas de *Lasiocephalus ovatus* Schldl. (Asteraceae), planta nativa que crece en el cerro Teligote, provincia de Tungurahua, Ecuador. Los lugareños utilizan la infusión de toda la planta como diurético y depurativo. Después de optimizar las variables del proceso de extracción como solventes (agua, metanol y etanol), tiempo (5, 10, 20 min) y temperatura (30, 40, 50, 60 °C), se determinó que las mejores condiciones para extraer flavonoides en la matriz de *L. ovatus* fue etanol al 50%, a 50°C de T° y 20 min, y para polifenoles fueron etanol al 50%, a 60°C de T° y 5 min. El agotamiento del material vegetal se realizó con 4 y 5 extracciones sucesivas, para polifenoles y flavonoides, respectivamente. La caracterización de los compuestos fenólicos fue estudiado a través de las técnicas de TLC y HPLC. Además, la actividad antiinflamatoria fue probada *in vitro* mediante HRBC, obteniéndose valores de $98,04 \pm 0,44$ para flavonoides y $97,29 \pm 0,12$ para polifenoles y por el método de desnaturalización de proteínas con valores de $36,30 \pm 0,29$ para polifenoles y $28,71 \pm 0,63$ para flavonoides. La actividad antioxidante mostró valores de $86,46 \pm 0,83$ y $84,18 \pm 0,57$ para polifenoles y flavonoides respectivamente. *L. ovatus* presenta en su estructura componentes fenólicos que le confieren importantes actividades biológicas (actividad antiinflamatoria y antioxidante), respaldando así su uso dentro y fuera de la comunidad de Teligote como una posible alternativa natural.

Palabras claves: Arquitecta, polifenoles, flavonoides, actividades biológicas, optimización, material vegetal.

ABSTRACT

L. ovatus is a native plant from Teligote's hill (1°22'39.2"S; 78°33'54.7"O; 3633 m.s.n.m.). It has used by locals people as diuretic and depurative. The aim of this research study was extract, quantify and characterize phenolic compounds obtained from *L. ovatus*. Dried and crushed leaves were used from the first step of optimization processed that consist of choosing the major solvent (water, methanol and ethanol), time (5, 10, 20 min) and temperature (30, 40, 50, 60 °C). The best conditions to extract polyphenols in *L. ovatus* matrix were ethanol 50% (v/v), 50°C and 20 min, while by flavonoids were ethanol 50% (v/v), 60°C and 5 min. Depletion of vegetal material was made with 4 and 5 successive extractions for polyphenols and flavonoids, respectively. TLC and HPLC techniques were used to characterize phenolic compounds in the extracts of *L. ovatus*. Furthermore, anti-inflammatory activity was tested *in vitro* by HRBC obtained of were $98,04 \pm 0,44$ for flavonoids and $97,29 \pm 0,12$ for polyphenols and protein denaturation method with values of $36,30 \pm 0,29$ for polyphenols and $28,71 \pm 0,63$ for flavonoids. Antioxidant activity showed values $86,46 \pm 0,83$ y $84,18 \pm 0,57$ for polyphenols and flavonoids respectively. In this way it was concluded that *L. ovatus* presents in its structure phenolic components that confer important biological activities (anti-inflammatory and antioxidant activity) thus supporting its use inside and outside the community of Teligote as a possible natural alternative.

Keyword: Arquitecta, polyphenols, flavonoids, biological activities, optimization, vegetal material

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Plantas medicinales

La medicina natural se origina gracias al uso de plantas con propiedades medicinales o curativas por parte de curanderos o shamanes. Los curanderos aprendieron de forma empírica a usar las plantas de su entorno para combatir diversos males que atacaban a la comunidad. Este conocimiento rudimentario de los beneficios de las plantas generó la medicina popular que cambió la perspectiva ancestral del correcto uso de las plantas medicinales, haciéndolo algo más complejo (**Pérez, 2018**).

Tras sus beneficios, los atributos de ciertas plantas, material vegetal, preparaciones y productos naturales, han trascendido a través de las generaciones, al jugar un papel importante en la mejoría de diversos malestares como: irritaciones de la piel, heridas, picaduras de insectos y mordeduras de víboras, demostrando que su uso resulta inocuo y eficaz (**Gallegos, 2016**). Según **Casamayor et al. (2014)**, las plantas medicinales presentan en su estructura ciertas sustancias químicas como metabolitos secundarios que producen un impacto directo sobre la actividad fisiológica del ser humano, dando alivio a dolencias específicas. A nivel mundial, muchas de estas plantas medicinales (p. e. *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. y *Chromolaena laevigata* (Lam.) R.M. King & H. Rob.; Valarezo et al., 2014, 2015) son usadas de forma industrial para la elaboración de fármacos específicos, tales como aceites esenciales. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 80% de la población de países en vías de desarrollo cuidan su salud a través de la medicina tradicional, mientras del 20% restante, arriba del 25% de los casos utilizan fármacos derivados de productos naturales. En el caso de nuestro país, no es la excepción. Según **de la Torre et al. (2008)**, de 5172 especies utilizadas en el Ecuador, 60% son medicinales, el 55% son utilizados para la construcción, el 30% son comestibles, y el 20% tienen usos sociales, o sea, incluyen ritos religiosos y prácticas similares. Aunque la suma de los porcentajes es arriba del 100%, se ha sugerido que varias de las especies de plantas poseen múltiples usos, y quizás estén siendo actualmente sobreexplotadas. Ventajosamente,

mediante el objetivo 3: Mejorar la calidad de vida de la población - Plan Nacional 2013 – 2017, Ecuador incorporó el término salud intercultural. El mismo busca destinar protocolos para facilitar la implementación paulatina de la medicina ancestral y alternativa con una visión holística, en los servicios de salud pública y privada (**Gallegos, 2016**), pero manejando de forma sustentable el recurso biológico del cual puede extraerse principios activos con fines medicinales.

1.1.2. Plantas medicinales en el Ecuador

En el Ecuador, las plantas nativas desempeñan un papel fundamental en el avance de las culturas ecuatorianas, mediante el uso de los recursos vegetales, ya sea con fines de medicina, alimento, combustibles, materiales de construcción y herramientas de todo tipo, y creencias y ritos (**Balslev et al. 2008**).

Ecuador alberga 17.548 especies de plantas vasculares, de las cuales, 5.480 esta restringidas al territorio ecuatoriano (**Ulloa Ulloa et al. 2017**). Esta es la prueba de la histórica adaptación a medios diversos de coevolución con otras especies y de la dinámica de la superficie terrestre que posee (**Jorgensen & León 1999, Ulloa & Neill 2005**).

Geográficamente, Ecuador está dividido en cuatro regiones naturales: Costa, Sierra, Amazonía y las Islas Galápagos. En la serranía ecuatoriana, los Andes se extienden de norte a sur, estableciendo dos cadenas montañosas paralelas, la oriental y occidental. Entre estas dos cadenas, muchos volcanes y cerros enlazan las dos cordilleras delimitando los valles interandinos (**García et al., 2014**).

La versatilidad botánica del ecosistema ecuatoriano ha permitido el nacimiento y desarrollo de culturas como el Paleoindio. Esta cultura se basó en la interacción de los diversos entornos presentes en el país y en la utilización de plantas endémicas e introducidas de forma medicinal mediante un conocimiento empírico (**Bocanegra et al., 2012**).

La utilización ancestral de plantas sigue estando vigente en diversas culturas del Ecuador, particularmente en la serranía ecuatoriana. Este es el caso de la Comunidad

de Teligote, ubicada al sur oeste del cantón San Pedro de Pelileo, provincia de Tungurahua. En el pasado varias comunidades aledañas al cerro, incluyendo Teligote, se beneficiaron de varias plantas medicinales nativas y quizás endémicas del lugar para tratar diversas enfermedades. No obstante, el conocimiento etnobotánico de los lugareños de Teligote ha sido solamente empírico, y más no comprobado científicamente.

El Cerro Teligote, es sagrado para la comunidad del mismo nombre. Sus 207 hectáreas son el hogar de una gran biodiversidad de especies de flora y fauna andina. En el caso de vegetación se han identificado arriba de 200 especies de plantas (W. Simbaña, *en preparación*), de las cuales, 160 de estas especies eran usadas por sabios del Teligote para curar diversas dolencias (**Tungurahua.gob, 2018**). Ocupan un rango altitudinal desde los 3291 hasta los 3673 m.s.n.m. Según **Jørgensen & León-Yanez (1999)**, la vegetación pertenece a un Bosque Nublado.

Dentro de este grupo de especies sobresale una planta conocida por los nativos de Teligote como “Arquitecta” o “Arquitecto” en otras etnias de la Sierra (**de la Torre, et al. 2008**). Científicamente conocida como, *Lasiocephalus ovatus* Schldl., de la familia Asterácea, es la única especie del género *Lasiocephalus* Willd. Ex Schldl. reportada para Ecuador (**Jørgensen & León-Yanez, 1999**). Esta planta de hábito semi erecto, nativa de Ecuador y Colombia. En el Ecuador está distribuida en las provincias de Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Napo, Pichincha y Tungurahua (**Jørgensen & León-Yanez, 1999**).

1.1.3. *Lasiocephalus*

El género *Lasiocephalus* presenta una interesante diversidad en sus formas de crecimiento. Se presenta como trepadora, hasta subarbustos de hojas estrechas y subcoriáceas, teniendo una estrecha relación con el tipo de ambiente y hábitat al que pertenecen. En particular el género *Lasiocephalus* presenta hasta 25 especies, distribuidas a lo largo de la cordillera de los Andes, desde Venezuela hasta Bolivia y Perú, con una mayor riqueza de especies en Ecuador; país en el que también hay un gran número de taxa endémicas (**Moure et al. 2014**).

1.1.4. *Lasiocephalus ovatus*

L. ovatus mide 0,8m, presenta un grueso indumento aracnoide, gris-blanquecino sobre todo en las partes jóvenes, sus hojas se encuentran en espiral, presentando entrenudos muy cortos, sus hojas se encuentran muy cercas unas a otras y son de forma ovaladas, tienen un largo de 0.8 – 1 cm de largo, gruesas y el haz tiene un color verde brillante, mientras que el envés está completamente cubierto por pelitos de color gris-blanquecino, sus flores son tubulares y de color amarillas (Figura 1).



Figura 1. *Lasiocephalus ovatus* (Fuente: Simbaña, 2017)

Moure et al. (2014), mencionan que, posiblemente, *Lasiocephalus* muestra una tendencia evolutiva en la adaptación a la falta de agua. Sus hojas poseen paredes celulares elásticas que en plena turgencia pueden contener una mayor cantidad de agua que es liberada para impedir un rápido marchitamiento. Esta cualidad le permite encontrarse en varios tipos de hábitats del superpáramo, conservando una extensa distribución ecológica, presentando afloramientos entre rocas y suelos arenosos (**Vaca, 2011**).

L. ovatus, es reportada como medicinal (**J. Moreno, com. per., 2016; W. Simbaña, obs. pers.**). Esta especie (de hoy en adelante citada en el texto como Arquitecta) ha sido pobremente investigada en el país. Se han encontrado muy pocos estudios de tipo

taxonómicos (Cuatrecasas, 1978; Jørgensen & León-Yanez, 1999; Jørgensen & Ulloa, 1994), etnobotánicos (de la Torre et al., 2008), fitoquímicos (Castillo et al., 2014), ecológicos (Almeida et al., 2013), y en relación con la actividad antimicrobiana del aceite esencial de esta planta (Carvajal & Vimos, 2017), pero ninguno a cerca de sus compuestos fenólicos.

De esta forma *Arquitectura* gracias a los metabolitos secundarios presentes en su estructura es utilizada en Colombia para lavados vaginales para regular el flujo. En Ecuador, las hojas se usan en forma de decocción como: diurético, depurativo y para tratar la sífilis; y por vía tópica para el tratamiento de algunas afecciones inflamatorias de la piel (Aquino et al., 2002). La Tabla 1 describe la taxonomía de esta especie.

Tabla 1. Taxonomía de *Lasiocephalus ovatus* Schldtl

Clase:	Equisetopsida C. Agardh
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	<i>Lasiocephalus</i>
Especie:	<i>Lasiocephalus ovatus</i>
Nombre Científico:	<i>Lasiocephalus ovatus</i> ex Schldtl.
Sinónimos:	<i>Culcitium ovatum</i> (Schldtl.)

Recuperado de: Tropicos.org, 2019 <http://tropicos.org/Name/2733537>

1.1.5. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos que se sintetizan en el metabolismo de las plantas y que no son necesarios para su supervivencia. Ciertos metabolitos secundarios (p. e. cumarinas, flavonoides, lignina y sustancias tánicas.) son conocidos como compuestos fenólicos siendo el conjunto más amplio de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. Estos compuestos poseen la capacidad de modular la actividad de diferentes enzimas, para interferir constantemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares.

1.1.5.1. Polifenoles

Los polifenoles son sintetizados en plantas, como producto de su metabolismo secundario. Según **Valencia et al. (2017)**, el contenido de polifenoles tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento del producto vegetal. Algunos llegan a ser imprescindibles para las funciones fisiológicas vegetales, o participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (**Quiñones et al., 2012**).

Dentro de estos compuestos polifenólicos más representativos se encuentran los ácidos fenólicos, que contienen dos marcos de carbono constitutivos distintivos: estructuras hidroxicinámicas e hidroxibenzoicas. Los ácidos hidroxibenzoicos tienen una estructura C6 – C1 común e incluyen ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecico, vanílico y sirídico, mientras que los ácidos hidroxicinámicos, son compuestos aromáticos con una cadena lateral de tres carbonos (C6-C3), siendo los ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico los más comunes (Figura 2) (**Ajila et al., 2011**).

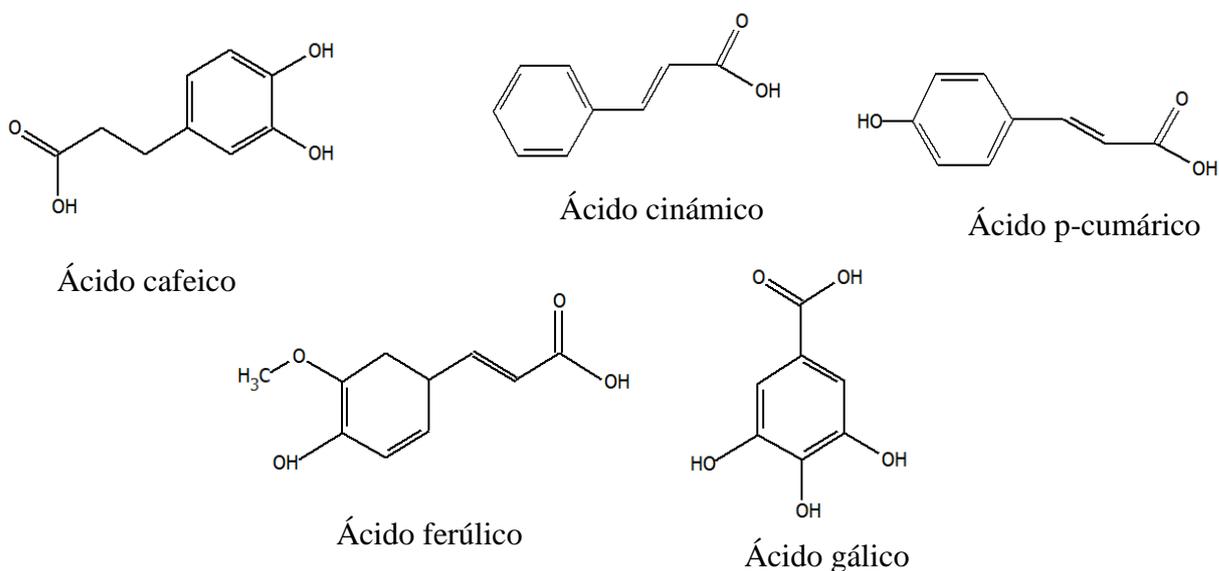


Figura 2. Estructuras comunes de 5 ácidos fenólicos

1.1.5.2. Flavonoides

Según **López (2002)**, los flavonoides se encuentran distribuidos entre los vegetales superiores, principalmente en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores. Son la clase más abundante de compuestos fenólicos derivados de aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina. Estos compuestos de bajo peso molecular son necesarios para el desarrollo de vegetales. Aparentemente se debe a que pueden actuar como señaladores químicos y tienen efectos sobre algunas enzimas ligadas a la fisiología y metabolismo del vegetal (**Flores et al., 2017**). Químicamente presentan una naturaleza fenólica y destacan por tener dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (**Cartaya & Reynaldo, 2001; Figura 3**).

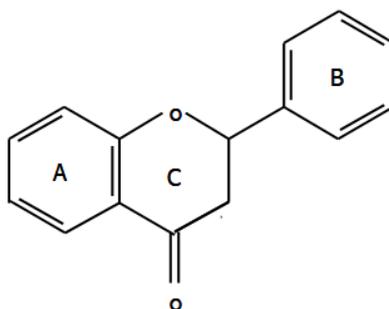


Figura 3. Estructura básica del esqueleto fenólico

Existen diversos métodos para cuantificar metabolitos secundarios. Sin embargo, los más representativos son: el ensayo de Folin-Ciocalteu y el método de cloruro de aluminio.

1.1.5.3. Métodos de cuantificación de polifenoles totales.

Uno de los principales métodos es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se basa en una reacción de óxido-reducción del molibdato de sodio y wolframato de sodio en medio alcalino. Esto da lugar a un anión fenolato que es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu y produce la formación de un complejo Mo(V) lo que forma un complejo de color azul (Figura 4), susceptible de ser determinado espectrofotométricamente a 765nm (García et al., 2014).

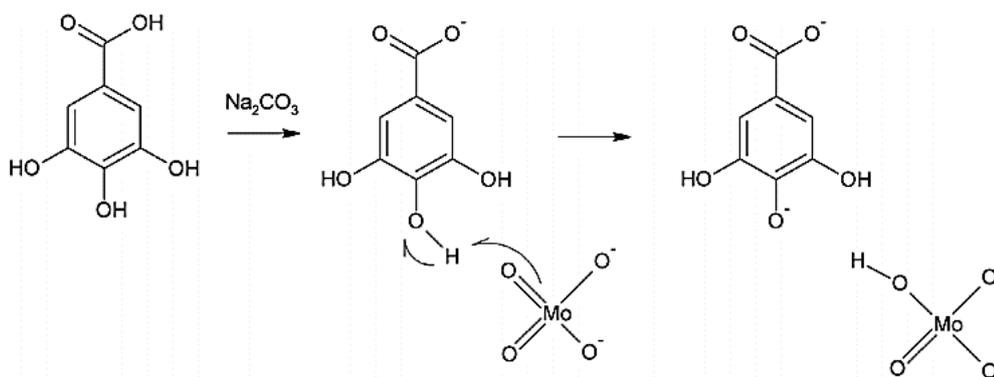


Figura 4. Reacción del ácido gálico y el reactivo Folin-Ciocalteu. (Muñoz et al., 2017; Huang et al., 2005).

1.1.5.4. Métodos de cuantificación de flavonoides

Para determinar cuantitativamente el contenido de flavonoides se usa el método colorimétrico de cloruro de aluminio. En este método, el catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides, los cuales son revelados por un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores generando una intensificación de la absorción (Figura 5). El complejo formado es de color rojo y se lo mide espectrofotométricamente a 510 nm (Pekal & Pyrzynska, 2014).

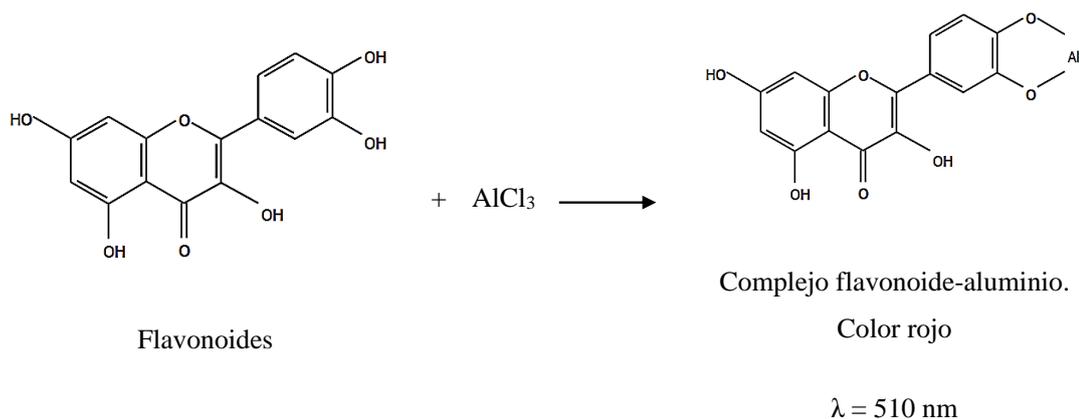


Figura 5. Reacción de flavonoides con tricloruro de aluminio (O’Coinceanainn et al, 2003).

1.1.5.5. Técnicas de caracterización de metabolitos secundarios

Existen diversos ensayos para poder caracterizar los metabolitos secundarios de las plantas, tal es el caso de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Esta técnica permite la separación de los diferentes compuestos que presenta la planta al hacerlas interactuar simultáneamente con una fase estacionaria y una fase móvil. La identificación de dichos componentes se da a través del uso de patrones que facilitan la caracterización tanto cualitativa como cuantitativa. De forma similar trabaja la técnica de cromatografía de capa fina (TLC), donde la caracterización es netamente cualitativa y permite obtener una “huella dactilar” del material vegetal.

1.1.5.6. Actividades biológicas

Los metabolitos secundarios presentan gran importancia por sus actividades biológicas englobando sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias. Se basan respectivamente en la capacidad de reducir radicales libres impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres, y el cuidado que pueden otorgar los extractos de las plantas contra procesos inflamatorios (López, 2002).

Más específicamente, sus características físico-químicas les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Una de ellas es el estrés oxidativo que conduce progresivamente a una disfunción celular, generando así un desequilibrio entre los radicales libres y los sistemas antioxidantes del organismo. Estos radicales libres son responsables del daño celular produciendo de manera indirecta el deterioro oxidativo de ácidos grasos insaturados y del ADN. Por tal razón, la importancia de una ingesta rica en vitaminas y compuestos fenólicos favorece la defensa del organismo frente a estos radicales libres (**Peñarrieta et al., 2014**).

Por otra parte, los procesos inflamatorios son una respuesta biológica que surge de la reacción de un organismo ante un daño o lesión externa, generando a su vez una respuesta antiinflamatoria, la cual, es un equilibrio entre factores celulares e intermediarios de la inflamación. Diversas plantas con estas características presentan efectos inhibitorios sobre enzimas que actúan en las vías implicadas en procesos inflamatorios (**Acostupa et al., 2017**). El método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos (HRBC) se usa como prueba *in vitro* para comprobar esta actividad y se basa en la estabilización de la membrana de los eritrocitos al privar la tensión producida por una solución hipotónica que induce la lisis de los glóbulos rojos (**Kumar et al., 2011**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Extraer, cuantificar y caracterizar los compuestos fenólicos obtenidos a partir de *L. ovatus*.

1.2.2. Objetivo Especifico

- Optimizar el proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de *L. ovatus* basándose en el contenido de polifenoles totales y flavonoides totales.

- Caracterizar los compuestos fenólicos presentes en el extracto de *L. ovatus*, mediante cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).
- Determinar la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos obtenidos a partir de *L. ovatus* mediante los métodos de: sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), estabilización de glóbulos rojos humanos (HRBC) y desnaturalización de proteína, respectivamente.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

H₀1: Los parámetros de extracción como solvente, tiempo y temperatura no influyen en el contenido de los compuestos fenólicos presentes en *L. ovatus*.

H₀2: Las concentraciones de los extractos no afectan las actividades biológicas (capacidad antioxidante y anti-inflamatoria) presentes en *L. ovatus*

1.3.2. Hipótesis Alternativa

H₁: Los parámetros de extracción como solvente, tiempo y temperatura influyen en el contenido de los compuestos fenólicos presentes en *L. ovatus*.

H₂: Las concentraciones de los extractos afectan las actividades biológicas (capacidad antioxidante y anti-inflamatoria) presentes en *L. ovatus*

1.4. Señalamiento de las Variables

1.4.1. Variable Independientes

- Tipo de solvente (etanol, metanol, agua)
- Concentración del solvente (25, 50, 75, puro)
- Tiempo (5, 10, 20 min)

- Temperatura (30, 40, 50, 60 °C)

1.4.2. Variables Dependientes

- Contenido de polifenoles y flavonoides
- Actividades biológicas

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales

- Balones de aforo de 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml
- Vasos de precipitación 100 ml, 250 ml
- Celdas de vidrio y plástico para el espectrofotómetro
- Desecador
- Embudos de vidrio
- Frascos de plástico estériles de 100 ml
- Frascos de vidrio de 10 ml
- Gradilla para tubos eppendorf
- Gradilla para tubos falcón
- Micropipeta de 100 a 1000 μ l
- Micropipeta de 20 a 200 μ l
- Pipetas Pasteur
- Pissetas
- Platillos para el determinador de humedad
- Probetas de 10 ml
- Triturador eléctrico
- Tubos eppendorf de 2 ml
- Tubos falcón de 50 ml
- Tubos VanTubo 10 ml
- Viales de 2ml HPLC
- Columna HPLC ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5 μ m Agilent Technologies
- Filtros 0,45 μ m
- Filtros de celulosa

- Placas HPLC
- Cámaras Cromatográficas

2.1.2. Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo XSE205, USA
- Balanza de precisión Mettler Toledo X54002S, USA
- Cromatógrafo HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity
- Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201, España
- Estufa BINDER ED 240L, Alemania
- Liofilizador LABCONCO – FREEZONE4.5
- Microcentrifuga refrigerante BUNSEN FINSEN-R 1800RPM 24088 XG, España
- Plancha de calentamiento con agitación magnética IKA C-MAG HS7, USA
- Rotavapor ELEYA
- Sistema para obtención de agua Milli Q Thermo Scientific, Inglaterra, UK
- Congelador de ultra-baja temperatura -80°C BINDER UF V 500, USA
- Ultrasonido BRANSON 2800, México
- Visualizador CAMAG de placas para TLC
- Vórtex Labnet Vortex Mixer S0200, USA

2.1.3. Reactivos

- Acetato de etilo, Fisher Scientific
- Ácido acético glacial, Fisher Scientific, USA
- Ácido cítrico grado reactivo
- Ácido clorhídrico 34-37%, Fisher ChemAlert
- Ácido fórmico 90%, AmlaR
- Ácido gálico 97,5 – 102.5%, SIGMA-ALDRICH, China
- Ácido nítrico 67-70%, Fisher Scientific
- Ácido tiobarbiturico, A4670,0100
- Alcohol etílico absoluto 99,85%, J.T. BAKER, USA
- Butil hidroxil tolueno (BHT), SIGMA-ALDRICH, USA

- Carbonato de sodio 99.5%, MERCK, Alemania
- Catequina 98%, SIGMA
- Citrato de sodio, 99.8%, MALLINCKRODT
- Cloruro de aluminio 99,0%, LOBA CHEMIE, India
- Cloruro de sodio grado reactivo
- Folin & Cicalteu 2N, SIGMA-ALDRICH, USA
- Fosfato dibásico de sodio 99.1% BAKER CHEMICAL
- Fosfato monobásico de sodio 99.1% BAKER CHEMICAL
- Glucosa grado analítico
- Hidróxido de sodio 99.0%, PANREAC
- Metanol 99.98% MERCK EMSURE, Darmsradt,
- Metanol grado cromatográfico 99.99% MERCK EMSURE, Darmsradt, Alemania
- Nitrito de Sodio 98,0%, LOBA CHEMIE, India
- Tolueno, MERCK KGaA

2.2. Métodos

2.2.1. Material vegetal y Materia prima

Las hojas adultas de *Arquitectura* fueron colectadas en el sector El Pajonal (1°22'39.2"S; 78°33'54.7"O; 3633 m.s.n.m.), cumbre del Cerro Teligote, cantón San Pelileo, Provincia de Tungurahua, durante el mes de abril del 2018. Posteriormente, las hojas se guardaron dentro de fundas de papel y transportadas al laboratorio de investigación de Análisis Instrumental de Canje de Deuda “Ecuador – España” de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA). La identificación taxonómica de la especie fue realizada por Walter Simbaña (docente investigador FCIAB-UTA), y un espécimen botánico como colección de referencia fue depositada en el Herbario Misael Acosta Solís (AMAS) de la UTA, Ecuador.

2.2.2. Preparación del material vegetal

Una vez en el laboratorio, el material vegetal fue limpiado y secado en una estufa Blinder a 40 °C por un tiempo de 72 horas. Luego se trituró en una procesadora de café marca Oster hasta obtener un pulverizado fino y se almacenó en bolsas herméticas hasta su posterior uso.

2.2.3. Optimización del proceso de extracción de metabolitos secundarios de Arquitecta

El tratamiento del material vegetal se lo realizó tomando en cuenta tres factores de variabilidad:

- Solventes: agua, etanol y metanol. De los dos últimos se probaron varias concentraciones: 25%, 50%, 75% (v/v) y el disolvente puro.
- Temperatura: 30, 40, 50 y 60°C
- Tiempo: 5, 10 y 20 min

2.2.3.1. Solvente

Se pesaron 0,1 g de material seco y pulverizado y se añadió 1 ml del solvente. La mezcla fue llevada a un baño de ultrasonido (BRANSON 2800) a 50°C por 5 min. Posteriormente, fue centrifugada a 1400rpm por 5 min en una microcentrífuga marca BUNSEN FINSEN-R 1800RPM 24088 XG a 10°C. El sobrenadante fue llevado a una estufa a 40°C por 2 horas y 30 min para evaporar el solvente orgánico, el remanente se llevó a volumen constante.

2.2.3.2. Temperatura

Tras la selección del mejor solvente se procedió a variar la temperatura del ultrasonido trabajando con 30, 40, 50 y 60°C durante 5 min.

2.2.3.3. Tiempo

Por último, se varió el tiempo trabajando a 5, 10 y 20 min en el ultrasonido con la temperatura y solvente optimizados.

2.2.4. Cuantificación de compuestos fenólicos

2.2.4.1. Determinación de polifenoles

Para la cuantificación de polifenoles totales se realizó una curva de calibrado utilizando ácido gálico como estándar, se usó una solución madre de 4000ppm, a partir de la cual se preparó una solución intermedia de 200ppm y de esta última se tomaron diferentes alícuotas para obtener concentraciones estándares en un rango de 1 a 6 ppm.

La cuantificación de polifenoles se realizó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu tomando 50 µl de los extractos llevados a volumen constante (5ml) y 100 µl del reactivo de Folin & Cicalteu 2N (SIGMA-ALDRICH). La mezcla se agita por 3 min y se añadió 2 ml de carbonato de sodio (75 g/L), se aforó a un volumen de 5 ml y la reacción se mantuvo en reposo por dos horas. El complejo formado se midió a 760nm en una celda de cuarzo en el espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific Evolution 201).

2.2.4.2. Determinación de flavonoides

Para la cuantificación de flavonoides se realizó una curva de calibrado utilizando catequina como estándar de referencia, se preparó una solución madre de 5000ppm en metanol al 99%, de la cual se tomaron diferentes alícuotas para obtener concentraciones estándares de 5, 10, 15, 20 y 25 ppm.

La cuantificación de flavonoides se trabajó mediante la reacción de cloruro de aluminio ($AlCl_3$). Se mezclaron 250 µl de extracto con 1,25 ml de agua y 75 µl de nitrato de sodio al 5%, se esperó 6 min y se colocó 150 µl de cloruro de aluminio al 10%, se dejó reposar por 5 min para finalmente colocar 500 µl de hidróxido de sodio 1M y aforar a 5 ml. El complejo se midió de forma inmediata a 510 nm en el espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific Evolution 201).

2.2.5. Desgaste del material vegetal

Con la finalidad de obtener la concentración máxima de metabolitos secundarios en el extracto, se llevó a cabo el desgaste del material vegetal. Las mejores condiciones de extracción fueron evaluadas mediante cinco procesos consecutivos. El sobrenadante fue recogido para su posterior cuantificación de polifenoles y flavonoides. Este procedimiento permitió definir el número de extracciones necesarias para alcanzar un rendimiento > 95%.

2.2.6. Liofilizado

Los extractos obtenidos con las mejores condiciones del proceso se liofilizaron luego de haber eliminado el disolvente orgánico mediante evaporación en un rotavapor ELEYA a 40°C, y haberlos congelado a -80°C.

2.2.7. Caracterización de los extractos

La caracterización de los extractos se realizó mediante dos técnicas de separación: cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés).

2.2.7.1. TLC

La cromatografía de capa fina (TLC), se realizó con placas de vidrio HTPLC de 10x10 cm, recubiertas de gel de sílica 60 con revelador de fluorescencia F₂₅₄, estas fueron activadas a 105°C por 2 horas previamente y almacenadas en el desecador hasta su uso.

2.2.7.1.1. Preparación de la muestra

Se trabajó con una concentración de 5mg/ml, tanto para la muestra como los estándares de ácido gálico y catequina, pesando 5 mg del extracto liofilizado de *Arquitectura* y se disolvió metanol al 50% (v/v). Para los estándares se usó como disolvente agua y metanol puro, respectivamente.

2.2.7.1.2. Preparación de fase móvil

El sistema usado estuvo compuesto por solventes orgánicos como tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en proporción 40:40:4. Esta mezcla se colocó en una cámara cromatográfica de vidrio con tapa y se esperó hasta su saturación a temperatura ambiente.

2.2.7.1.3. Inyección de las muestras y estándar

Las muestras y los estándares previamente preparados se inyectaron en la placa de sílica mediante un muestreador automático marca CAMAG TLC 4. Se colocaron 8µl de los estándares y 6µl de la muestra, se realizó una codificación mediante el programa WinCATS, especificando el número de bandas, longitud de banda (0,8mm) y distancia entre bandas.

2.2.7.1.4. Corrida y revelado de la placa

Se corrió de forma manual colocando las placas sembradas en la cámara cromatográfica saturada. La placa fue retirada cuando la línea del solvente se encontraba aproximadamente a 1 cm del borde superior. Finalmente, la placa seca se colocó en el Visualizador CAMAG y los compuestos se visualizaron a 254 y 366 nm.

2.2.7.2. HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en el equipo Agilent Technologies 1260 Infinity con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4,6x250mm, con tamaño de poro de 5µm y se trabajó con el software Open LAB Chromatography Data System.

2.2.7.2.1. Preparación de la muestra

Se preparó una solución de concentración 0,3mg/ml a partir de los extractos liofilizado con etanol al 50% (v/v) y se colocó en un vial para su posterior inyección.

2.2.7.2.2. Fase móvil

Se trabajó con una mezcla de agua y metanol absoluto grado HPLC en modo gradiente y a un flujo de 0.8ml/min. El tiempo total de la corrida cromatográfica fue de 45 min y las longitudes de onda usadas para la identificación de compuestos fueron: 214, 254, 280, 320, 360, 366 (nm).

2.2.7.2.3. Curva de calibrado ácido gálico y catequina

Se usaron estándares de ácido gálico y catequina en un rango de concentración de 10 – 30 µl/ml. La separación se realizó aplicando un volumen de inyección de 10µl y trabajando a un flujo de 0,8ml/min. El tiempo total de la corrida cromatografica fue de 45 min y la columna se mantuvo a 20°C. Se trabajó con un blanco de inicio y tres blancos entre cada patrón utilizado para ayudar a la limpieza de la columna.

2.3. Actividades biológicas

2.3.1. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria fue evaluada mediante la desnaturalización de proteínas. Para ello, la metodología a seguir está descrita en Alhakmani et al. (2013) con modificaciones; y la estabilización de glóbulos rojos humanos (HRBC) a través de las metodologías detalladas en Aleykutty et al. (2013), Kumar et al. (2011), Nagaharika et al. (2013), y Vadivu & Lakshmi,(2012).

2.3.1.1. Desnaturalización de Proteínas

2.3.1.1.1. Preparación de la muestra, estándar y solución albumina de huevo

Se preparó una solución madre de 2000µg/ml del extracto liofilizado en agua. A partir de esta solución se prepararon patrones de concentración a 100, 200, 500 y 1000 (µg/ml). De forma similar se partió de una solución madre de 5000µg/ml del estándar diclofenaco marca MK (75 mg/3ml) con agua y se prepararon patrones de las mismas concentraciones que los extractos.

La solución de albúmina de huevo (1mM) se realizó pesando 16.75g de albúmina de huevo fresco y se aforo en un balón de 250ml con buffer fosfato pH 6.4 y se homogenizó mediante inmersión.

2.3.1.1.2. Procedimiento

Se tomó 2ml de solución de albúmina de huevo (1mM) se añadió 2ml de las diferentes concentraciones del extracto, la mezcla se sometió a baño maría a 37°C por 15 min, luego se trasladó a otro baño maría a 70°C por 10 min, se enfrió las muestras y se midió la densidad óptica a 660nm en una celda de plástico usando el espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific Evolution 201). La prueba se realizó por triplicado para cada concentración y se usó como blanco la solución de albumina que no contenía ni el extracto ni el estándar.

El porcentaje de protección de la proteína por parte del extracto se determinó mediante la ecuación 1.

$$\% \text{ Protección ante la desnaturalización de proteina} = 100 - \left(\frac{Ab_{est}}{Ab_{bl}} * 100 \right)$$

Ecuación 1

Dónde:

Ab_{est} : Absorbancia del extracto o estándar de referencia

Ab_{bl} : Absorbancia del blanco

2.3.1.2. Estabilización de glóbulos rojos (HRBC)

2.3.1.2.1. Preparación de la muestra de sangre

La sangre fue colocada en tubos VanTubo estériles de 10ml en una solución de Alsever en proporción 1:1. Adicionalmente, fue centrifugada por 10 min a 3000rpm y se retiró el sobrenadante.

Para el lavado de la sangre se colocó una solución isosalina al 0.85% (p/v). El proceso se repitió 3 veces obteniendo un sobrenadante transparente. La solución de sangre al 10% (v/v) se realizó tomando una alícuota de sangre lavada con 9ml de isosalina en un tubo estéril.

2.3.1.2.2. Preparación de la muestra

Se preparó una solución madre de 2000 μ g/ml del extracto liofilizado con buffer fosfato 0.15M a pH 7.4. A partir de esta solución se preparó patrones de concentración 25, 50, 75, 100, 200, 500 y 1000 μ g/ml. De forma similar se partió de una solución madre de 5000 μ g/ml del estándar diclofenaco marca MK (75 mg/3ml) con buffer fosfato 0.15M a pH 7.4 preparando los mismos patrones de prueba que los extractos.

2.3.1.2.3. Procedimiento

Se colocó 1 ml de las diferentes concentraciones del extracto y del estándar en un tubo VanTubo de 10ml. y se añadió 1ml de buffer fosfato 0.15M a pH 7.4, 2ml de hiposalina al 0.36% (p/v) y 0.5ml de solución de sangre al 10% (v/v). Subsecuentemente se llevó a incubación a 37°C por 30 min en baño maría y se centrifugó por 3 min a 2000 rpm. Finalmente, el contenido de hemoglobina del sobrenadante fue estimado a una longitud de onda de 560 nm en una celda de plástico mediante un espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific Evolution 201). El ensayo fue realizado por triplicado y el control se preparó usando 2ml de agua destilada sustituyendo el extracto o el estándar.

El porcentaje de actividad antiinflamatoria expresado en términos de protección de los glóbulos rojos contra la lisis celular se determinó mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ Protección de lisis celular} = 100 - \left(\frac{Ab_{est}}{Ab_{bl}} * 100 \right)$$

Ecuación 2

Dónde:

Ab_{est} : Absorbancia del extracto o estándar de referencia

Ab_{bl} : Absorbancia del blanco

2.3.2. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos se midió mediante el método de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), siguiendo la metodología descrita por **Rojano et al. (2008)**, con modificaciones.

2.3.2.1. Preparación de la muestra y estándar

Se pesaron 1, 2, 5, 10 mg de extracto de arquitecta liofilizado y del estándar BHT, para obtener concentraciones de 100, 200, 500 y 1000 µg/ml y se colocó 9,16g de aceite de oliva marca “El Arbolito” en un tubo VanTubo de 10ml.

2.3.2.2. Experimentación

Los tubos con las diversas concentraciones se llevaron a un Shaker horizontal a 75°C por 7 días. Una vez transcurrido el tiempo, se enfrió y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en un eppendorf 0,9ml del aceite y 0,9ml de una solución de TBA 1mM, la cual se preparó con ácido acético 50% (v/v). Subsecuentemente, el eppendorf se llevó a un termobloque a 100°C por 1 hora y se centrifugó a 4°C por 15 min; se eliminó el sobrenadante y el contenido acuoso se

midió a una longitud de onda de 532nm. La prueba se realizó por triplicado, se usó como control aceite oxidado y aceite sin oxidar.

Los resultados del porcentaje de actividad antioxidante expresado en términos de capacidad antioxidante contra la peroxidación lipídica se determinó mediante la ecuación 3.

$$\% \text{ Actividad Antioxidante} = \left(\frac{A_m - A_c}{A_o - A_c} \right) * 100$$

Ecuación 3

Dónde:

A_m : Absorbancia muestra de aceite

A_o : Absorbancia aceite sin oxidar

A_c : Absorbancia del control

2.3.2.3. Análisis de Resultados mediante el ANOVA

El análisis de varianza (ANOVA) fue analizado con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I, presentados con la media de tres repeticiones \pm la desviación estándar para la optimización, actividad antioxidante y antiinflamatoria. El análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples se aplicaron a un nivel de confianza de 95% para la determinación de diferencias significativas y los mejores tratamientos de cada ensayo.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Determinación de polifenoles

La Figura 6 ilustra la curva de calibración utilizando rangos estándares de ácido gálico (de 0 a 6 ppm) y catequina (de 5 a 25 ppm) en la determinación de polifenoles totales y flavonoides. El coeficiente de determinación 0,9935494 registrado para los polifenoles y 0,9947686 para flavonoides, indican un ajuste lineal aceptable entre la concentración del estándar y la señal analítica (absorbancia) del complejo coloreado formado en la experimentación, sugiriendo seguridad y valides al estudio.

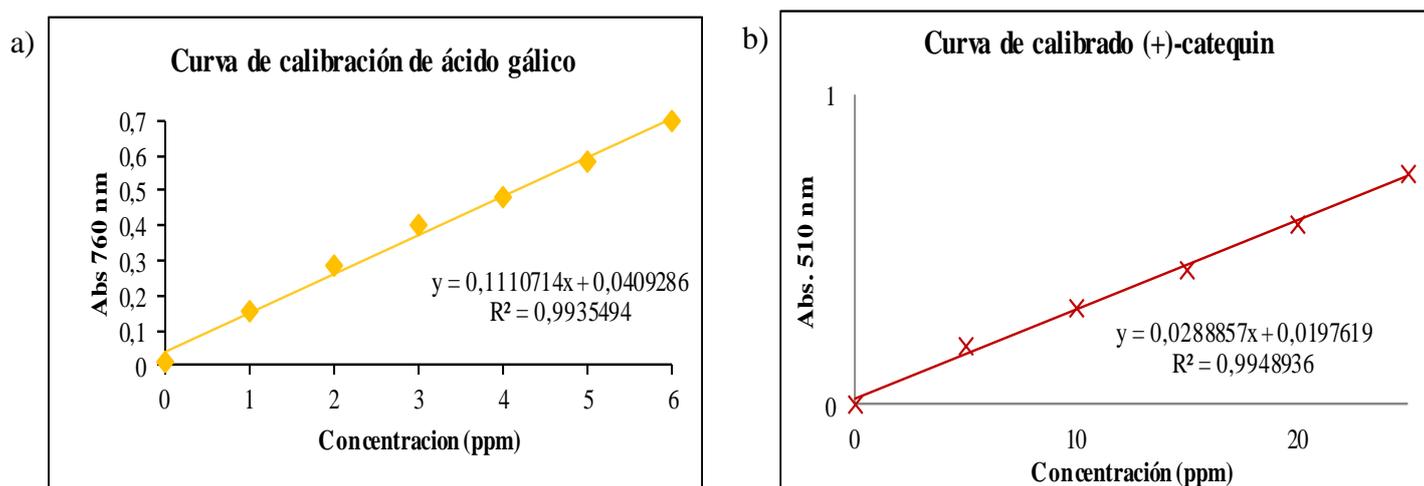


Figura 6. Curva de calibrado para la cuantificación de polifenoles (a) y flavonoides (b).

3.1.2. Optimización del proceso de extracción

Los analitos contenidos en órganos o células vegetales, deben ser sometidos a un proceso lo suficientemente fuerte como para romper las paredes celulares y permitir que el disolvente actúe extrayéndolos. (Cao, 2009)

Arquitectura fue expuesta a un proceso de molienda previa para originar una ruptura de las paredes celulares; con el objetivo de que el analito de interés de las células rotas se

esparsan directo en el disolvente (**Camel, 2014**). Tras este proceso no todas las células van a tener una ruptura total, por tanto, se procedió al uso de un baño de ultrasonido, creando condiciones de erosión, fragmentación y desagregación de la muestra, permitiendo la máxima ruptura del material vegetal (**Khodadoust et al., 2017**). Según **Ajila et al., (2011)**, en la mayoría de los casos, la asistencia ultrasónica permitió la simplificación de las condiciones de manipulación y preparación.

3.1.3. Optimización del solvente

Camel, (2014) menciona que la polaridad del solvente debe coincidir con la del soluto de interés. Los solventes de polaridad media extraen tanto compuestos apolares como polares. Para alcaloides, flavonas, polifenoles y saponinas, se recomienda solventes polares como etanol, acetona y metanol.

Las hojas de *Arquitectura* fueron sometidas a un baño de ultrasonido usando como solventes agua, etanol y metanol, a diversas concentraciones (25%, 50%, 75% (v/v) y absoluto), a una temperatura constante de 50°C por 5 min.

Los resultados de concentraciones para los polifenoles y flavonoides de la *Arquitectura* son presentados en la Tabla 2. La mayor concentración correspondió al trabajar con etanol al 50% (v/v) ($30.65 \pm 0,34$ mg equivalentes de ácido gálico/ g *Arquitectura* y $30,01 \pm 0,14$ mg equivalentes catequina/ g *Arquitectura*), seguido de metanol al 50% (v/v) y etanol al 75% (v/v). Al usar estos solventes en estado puro, la cantidad de metabolitos secundarios extraídos fue mínima comparada con los que tenían un porcentaje de agua en su composición. Aparentemente, se debió a que la adición de agua causa que el material vegetal se hinche, permitiendo así que el solvente penetre fácilmente en la matriz sólida y aumente la capacidad de extracción (**Mukhopadhyay et al., 2006**). Según **Dent et al. (2013)**, las mezclas de agua / etanol son posiblemente el sistema de solventes más adecuados para la extracción de compuestos fenólicos en la mayoría de matrices vegetales debido a las diferentes polaridades de los componentes bioactivos y la aceptabilidad de este sistema de solventes para el consumo humano.

Tabla 2. Datos de optimización de solvente para polifenoles y flavonoides.

Código de Muestra	Polifenoles (mg equivalentes ácido gálico/g de Arquitecta).	Flavonoides (mg equivalentes catequina/ g de Arquitecta)
Arq_Agua	24,00 ± 0,64	14,13 ± 0,55
Arq_EtOH25%	21,57 ± 0,27	19,72 ± 0,65
Arq_EtOH50%	30,65 ± 0,34	30,01 ± 0,24
Arq_EtOH75%	25,19 ± 0,52	23,63 ± 0,32
Arq_EtOH.Absol.	6,38 ± 0,15	7,72 ± 0,08
Arq_MetOH25%	24,61 ± 0,41	21,82 ± 0,37
Arq_MetOH50%	27,90 ± 0,87	18,28 ± 0,48
Arq_MetOH75%	22,29 ± 0,57	16,73 ± 0,55
Arq_MetOH.Absol.	16,83 ± 0,93	12,61 ± 0,56

Los valores que se reflejan en la tabla son la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019.

Una forma similar de extracción usando etanol como solvente se registra en el estudio de **Chandra et al., (2012)**. Ellos usan etanol al 50% para la extracción de compuestos fenólicos de *Mikania scandens* (L.) Willd. (Asteraceae) colectado desde la India, obteniendo una concentración de 31.25% en estos compuestos. Durante el presente estudio, un valor similar fue obtenido en la Arquitecta con valores de 30,65% y 30,01 para polifenoles y flavonoides, respectivamente. Por su parte **Gomes et al., (2015)**, quienes analizan los compuestos fenólicos de *Santolina semidentata* (Asteraceae) proveniente de Portugal, trabajando con etanol al 50%, obtuvieron valores de $23.16 \pm 0,49$ y $11.86 \pm 0,12$ equivalentes de ácido gálico y catequina, respectivamente. Estos valores son menores a los obtenidos para Arquitecta, y quizá se debió a las condiciones de trabajo. Para finalizar el estudio de **Aquino et al., (2002)** trabajaron con material vegetal de *Culcitium reflexum* Kunth (Asteraceae) proveniente de Ecuador en una proporción de etanol y agua (7:3); obtuvieron 4,96 g de equivalentes de rutina/mg muestra, enfocándose en la cantidad de flavonoides específicamente.

A partir de los resultados obtenidos (Tabla 2), se realizó un análisis de varianza independiente para polifenoles y flavonoides (Anexo: Tabla 24 y 25). Los mismos, reflejan que existe diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos evaluados a un 95% de confianza. Además, la prueba de rangos múltiples muestra dos factores homogéneos con los solventes etanol al 25% y metanol al 75% en polifenoles, sin embargo, el mejor solvente fue etanol al 50% teniendo las medias más altas (Tabla 3).

Tabla 3. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento solventes por concentración

Solventes	Casos	Media polifenoles	Grupos Homogéneos polifenoles	Media flavonoids	Grupos Homogéneos flavonoides
Arq_EtOH_Abs.	3	6,379	X	7,82733	X
Arq_MetOH_Abs	3	16,8333	X	12,763	X
Arq_EtOH_25%	3	21,566	X	19,7663	X
Arq_MetOH_75%	3	22,2937	X	16,721	X
Arq_Agua	3	23,997	X	14,1297	X
Arq_MetOH_25%	3	24,61	XX	22,0277	X
Arq_EtOH_75%	3	25,1927	X	24,309	X
Arq_MetOH_50%	3	27,901	X	18,1857	X
Arq_EtOH_50%	3	30,6467	X	30,6617	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. m

Finalmente se seleccionó como mejor solvente al sistema binario etanol-agua a una concentración del 50%. Esta concentración permitió obtener el máximo de rendimiento para estos metabolitos secundarios.

3.1.4. Optimización de la temperatura.

Los resultados más favorables se obtuvieron a 60°C y 50°C respectivamente para polifenoles y flavonoides (31,61 ± 0,24 mg equivalentes de ácido gálico/ g Arquitecta y 30,65 ± 0,24 mg equivalentes de catequina/ g Arquitecta) como se aprecia en la Tabla 4.

La temperatura más favorable para extraer los polifenoles de *Arquitectura* fue a 60°C (31,61 ± 0,24 mg equivalentes de ácido gálico/ g *Arquitectura*), y 50°C (30,65 ± 0,24 mg equivalentes de catequina/ g *Arquitectura*) para los flavonoides (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de optimización de temperatura para polifenoles

Código de muestra	Polifenoles (mg equivalentes ácido gálico/g de <i>Arquitectura</i>).	Flavonoides (mg equivalentes catequina/ g de <i>Arquitectura</i>)
Arq_EtOH50%_30°C	24,77 ± 0,28	29,40 ± 0,32
Arq_EtOH50%_40°C	28,43 ± 0,52	29,67 ± 0,34
Arq_EtOH50%_50°C	30,39 ± 0,41	30,65 ± 0,24
Arq_EtOH50%_60°C	31,61 ± 0,24	29,76 ± 0,26

Los valores que se reflejan en la tabla son la media de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019.

Durante la selección de la mejor temperatura se tomó en cuenta la prueba de rangos múltiples. La misma se enfoca en el procedimiento de la diferencia mínima significativa mediante la discriminación entre las medias de los tratamientos formando grupos homogéneos. En la Tabla 5 se puede mirar que para la extracción de polifenoles no existe homogeneidad entre las temperaturas aplicadas. Así, a 60°C se obtiene la mayor concentración de estos metabolitos (31.01 ± 0,24). En el caso de los flavonoides se determinó la existencia de tres grupos homogéneos, sugiriendo la no existencia de diferencias significativas (29,402, 29.666 y 29,75) entre las temperaturas 30, 40 y 50°C, pero si en relación con la temperatura a 60°C. Con la última temperatura se obtuvo el mejor rendimiento (30,65 ± 0,24). **Tanase et al. (2019)**, estudiando los polifenoles y flavonoides del material vegetal de *Flourensia cernua* D. C. (Asteraceae) colectada en Inglaterra y utilizando similares condiciones de extracción por ultrasonido y con etanol, obtuvo un contenido en un rango de 96.69–334.87 mg de ácido gálico equivalente/ g de muestra, a una temperatura entre 50-60°C. Por su parte, **Kennouche et al., (2016)** extrajeron contenidos fenólicos de *Chrysanthemum segetum* L. (Asteraceae) desde Argelia, usando etanol al 96%, una temperatura de 55°C y un tiempo de 24h de maceración, reportaron resultados en un rango de 42,70 a 216.18 equivalentes de ácido gálico/ g de muestra. Estos valores son mayores a los obtenidos

para Arquitecta, y quizás debido a que factores como solvente de diferente concentración y tiempo afecta el contenido de estos compuestos.

Tabla 5. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento temperatura por concentración

Temperatura	Casos	Media polifenoles	Grupos Homogéneos polifenoles	Media flavonoides	Grupos Homogéneos flavonoides
Arq_EtOH50%_30°C	3	24,772	X	29,402	X
Arq_EtOH50%_40°C	3	28,426	X	29,666	X
Arq_EtOH50%_50°C	3	30,3943	X	29,7593	X
Arq_EtOH50%_60°C	3	31,6143	X	30,6517	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Por otro lado, **Durling et al., (2007)** señala que manejar temperaturas elevadas durante la extracción de compuestos fenolicos permiten que el proceso sea rápido y eficiente, porque mejora la solubilidad, aumenta el coeficiente de difusión, reduce la viscosidad y mejora la absorción de los solutos de la matriz. A temperaturas mayores de 60°C existe una afectación a los diversos compuestos bioactivos provocando degradaciones por hidrólisis, reacciones redox internas y polimerización afectando al rendimiento de estos compuestos fenólicos (**Puri et al., 2012**). En base a estas referencias se decidió trabajar con las temperaturas de 50°C y 60°C para flavonoides y polifenoles respectivamente, ya que a estas temperaturas se obtuvo la máxima cantidad de mg equivalentes de ácido gálico y catequina sin tener una afectación de los compuestos presenten en la matriz Arquitecta.

3.1.5. Optimización del tiempo.

Con 5 minutos de extracción se obtuvo la mayor concentración ($31,69 \pm 0,28$) de polifenoles. No obstante, a medida que se aumentó el tiempo de extracción, el rendimiento del extracto y la recuperación total de fenoles muestran un descenso (Tabla 6), y quizás puede estar relacionada a la alta temperatura usada de 60°C. **Nacz & Shahidi, (2004)**, manifiestan que un tiempo de extracción más prolongado puede

aumentar las posibilidades de oxidación de estos compuestos, a menos que se agreguen agentes reductores al sistema de solventes.

En el caso de los flavonoides sucedió lo opuesto, ya que fueron necesarios 20 min para obtener la mayor concentración ($32,16 \pm 0,13$) y al ascender fue disminuyendo la concentración como se muestra en la Tabla 6. Este comportamiento posiblemente se deba a que al estar $<50^{\circ}\text{C}$ de temperatura, necesita un mayor tiempo para poder obtener el máximo rendimiento, favoreciendo el aumento del tiempo en la extracción de flavonoides. (García et al., 2016).

Tabla 6. Datos de optimización para el variante tiempo.

Código de muestra	Polifenoles (mg ácido gálico/g de Arquitecta).	Código de muestra	Flavonoides (mg catequina/ g de Arquitecta)
Arq_EtOH50%_60°C_ 5 min	$31,69 \pm 0,28$	Arq_EtOH50%_50°C_ 5 min	$30,57 \pm 0,34$
Arq_EtOH50%_60°C_ 10min	$30,10 \pm 0,65$	Arq_EtOH50% 50°C_10min	$30,74 \pm 0,93$
Arq_EtOH50%_60°C_ 20 min	$30,48 \pm 0,22$	Arq_EtOH50%_50°C_ 20 min	$32,16 \pm 0,13$

Los valores que se reflejan en la tabla son la media de 3 mediciones \pm la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de rangos múltiples (Tabla 26 y 27), observándose la existencia de grupos homogenios entre 5 - 10 min para flavonoides y 10 - 20 min para polifenoles. Sin embargo, a un tiempo de 20 y 5 minutos para estos compuestos se da la máxima concentración (Tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento tiempo por concentración

Tiempo	Casos	Media flavonoides	Grupos Homogéneos flavonoides	Tiempo	Media polifenoles	Grupos Homogéneos polifenoles
Arq_EtOH50%_50°C_5 min	3	30,571	X	Arq_EtOH50%_60°C_10 min	30,097	X
Arq_EtOH50%_50°C_10 min	3	30,744	X	Arq_EtOH50%_60°C_20 min	30,475	X
Arq_EtOH50%_50°C_20 min	3	32,159	X	Arq_EtOH50%_60°C_5 min	31,688	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Temkov et al. (2015), analizando el material de *Helianthus tuberosus* L. (Asteraceae) desde Bulgaria, y trabajando con etanol mediante una extracción por ultrasonido a un tiempo de 20 min., reportaron un 22% de compuestos fenólicos en esta matriz, siendo menor al obtenido con este mismo tiempo para la Arquitecta. Tal vez pudo deberse a que los metabolitos secundarios de *H. tuberosus* se degradaron al estar en el ultrasonido por este tiempo. Considerando los resultados de este estudio, se seleccionó como mejor tiempo a 5 min y 20 min para polifenoles y flavonoides respectivamente, ya que, con estos parámetros se obtuvo el máximo rendimiento para compuestos fenólicos en las hojas de Arquitecta.

3.1.6. Desgaste del material vegetal.

Con los factores optimizados se realizaron cinco ciclos de extracción para conseguir la máxima recuperación del analito en la matriz Arquitecta.

Se determinó que con 4 ciclos de extracción se obtiene el 99% de polifenoles, (Figura 7a), mientras que para flavonoides fue necesario realizar los 5 ciclos de extracción para obtener un 99% de este analito (Figura 7b). **Camel (2014)**, encontró que la ganancia en la cantidad extraída es bastante rápida al principio, donde el proceso se rige por la solubilidad del compuestos en el solvente, es decir, la división del soluto entre el solvente y la muestra. Posteriormente, a medida que avanza la extracción, la cantidad

extraída se nivela, ya que el paso está limitado por la difusión y la desorción de la matriz. Tal vez por este motivo se da la diferencia del número de extracciones tanto para polifenoles y flavonoides, aunque ningún estudio ha sido realizado, al respecto.

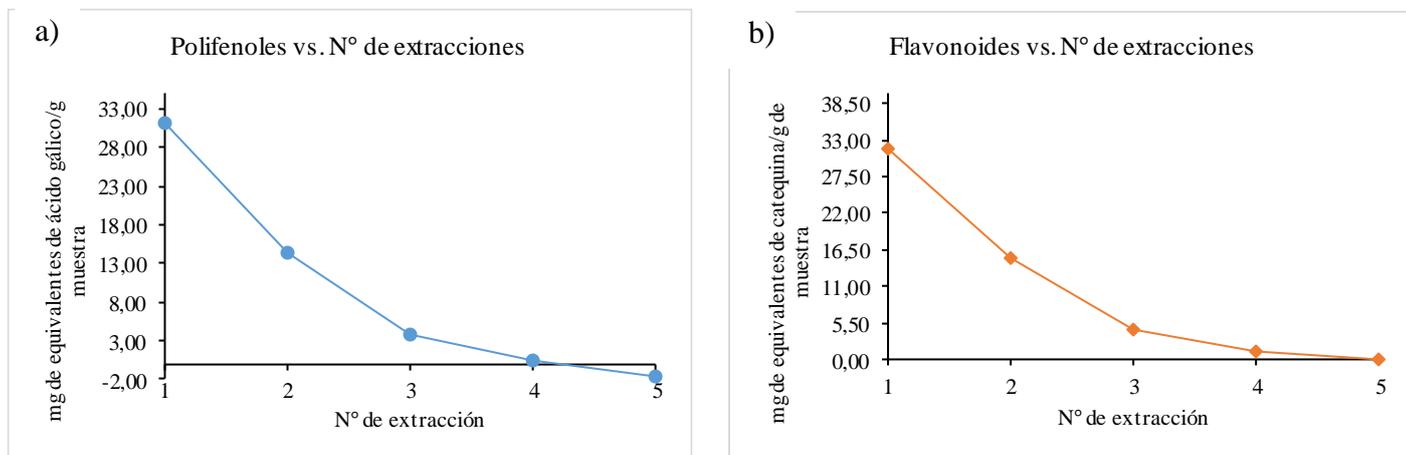


Figura 7. Desgaste el material vegetal para (a) polifenoles y (b) flavonoides.

3.2. Caracterización de metabolitos secundarios

3.2.1. TLC

El revelado de la placa ilustrado en la Figura 8, muestra varias bandas para los dos extractos obtenidos bajo las condiciones de extracción optimizadas con un perfil muy similar. Aquí se pueden distinguir colores como verdes, azules y amarillo-verdoso. Según **Wagner & Bladt (2015)**, todos los compuestos fenólicos presentan fluorescencia (amarillo oscuro, verde o azul) dependiendo de su estructura. Sin embargo, extractos como los flavonoides a menudo contienen fenoles con ácidos carboxílicos como ácidos caféico y clorogénico, y cumarinas que provocan zonas azul fluorescentes; los flavonoles como quercetina y myricetina y sus glúcidos presentan fluorescencia naranja-amarillo; mientras que flavonas como apigenina y sus glúcidos muestran fluorescencia amarillo-verde.

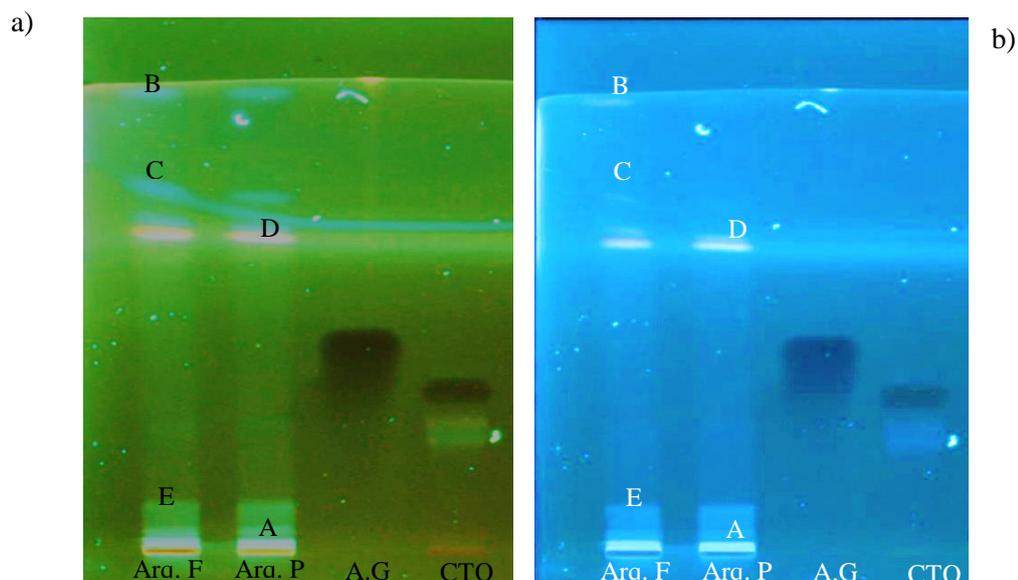


Figura 8. Perfil de metabolitos secundarios obtenidos por TLC a longitudes de onda de 254 y 366nm presentes en los extractos hidroelánicos de Arquitecta.

Los estándares de ácido gálico y catequina presentan un R_f de 0,444 y 0,350, respectivamente, aunque la matriz Arquitecta presentó otros compuestos que no coinciden con los estándares (Tabla 8). Según **Jesionek et al., (2015)** entre más polar sea el compuesto, mayor será su retención en el absorbente, y por ende menor será su R_f . El menor R_f se da en las bandas A y E mostrando compuestos de mayor polaridad, mientras que las bandas B, C, D presentan una menor polaridad.

Tabla 8. Valores de R_f para bandas de polifenoles y flavonoides registradas en el perfil cromatográfico

Bandas	RF
A	0,032
B	0,958
C	0,758
D	0,659
E	0,100
A.G	0,444
CTQ	0,350

3.2.2. HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento presenta diversas ventajas en el análisis químico de plantas medicinales dando una alta reproducibilidad, buena resolución y linealidad gracias a la capacidad para analizar múltiples componentes y facilidad de automatización (Zhang & Ye, 2009).

Al usar la técnica de HPLC se logró separar polifenoles y flavonoides con un nivel de resolución y sensibilidad mucho mayor que en la cromatografía de capa fina. La Figura 9 muestra los distintos picos que se obtuvieron con la muestra de Arquitecta trabajando a 214, 280, 360. 366 nm, tanto para polifenoles y flavonoides. En la curva de calibrado se observó que los estándares presentaron tiempos de retención de 8 y 15 min para el ácido gálico y la catequina, respectivamente, a una señal de 280 nm (Figura 9), picos que no fueron detectados en los extractos analizados. Sin embargo, existen otros compuestos en la matriz Arquitecta que eluyeron a tiempos de retención de 4,5; 14,8; 21; 23,5; 25,3 y 26,3 (min) para polifenoles y 4,49; 15,17; 15,50; 21;65, 23,52; 25,25; 29,02; (min) para flavonoides a una señal de 280nm. Para **Cartaya et al. (2001)**, el análisis de flavonoides por HPLC es recomendable llevarlo a cabo a 280 nm, debido que muchos de estos compuestos presentan un máximo de absorción entre 270 y 290 nm.

Además, se observa que el perfil cromatográfico es el mismo para polifenoles y flavonoides. La señal de 214 nm muestra que existe un pico en el tiempo de retención 28,99 min para las condiciones de polifenoles, aunque este mismo pico solapa el pico de flavonoides al tener el mismo tiempo de retención y similar área (1027,464487 1140,305765). Por lo tanto, los compuestos extraídos para estas condiciones son los mismo. En el cromatograma de longitud 280 y 366 nm, se destaca dos picos que presentan un ligero desplazamiento en los tiempos de retención 15,15; 14,79 y 15,19; 15,11min para el cromatograma a una señal de 280 y 366nm, respectivamente (Figura 9).

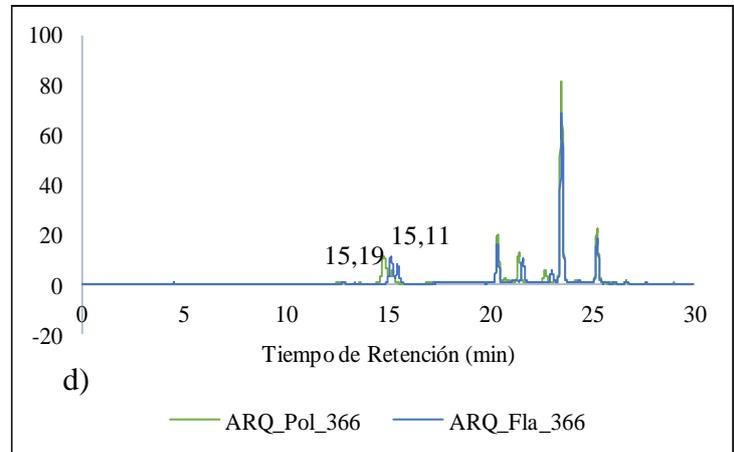
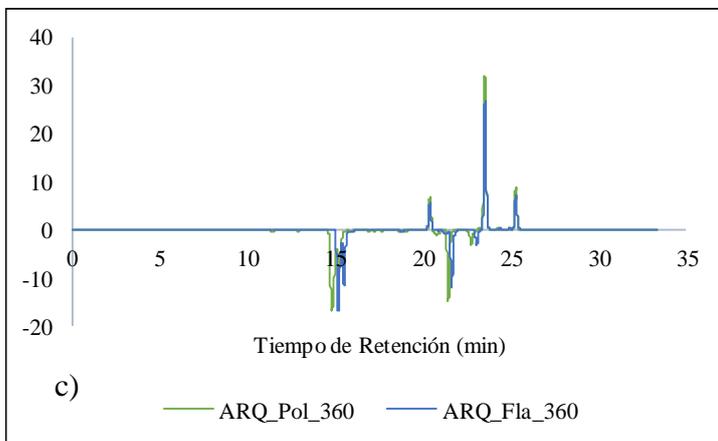
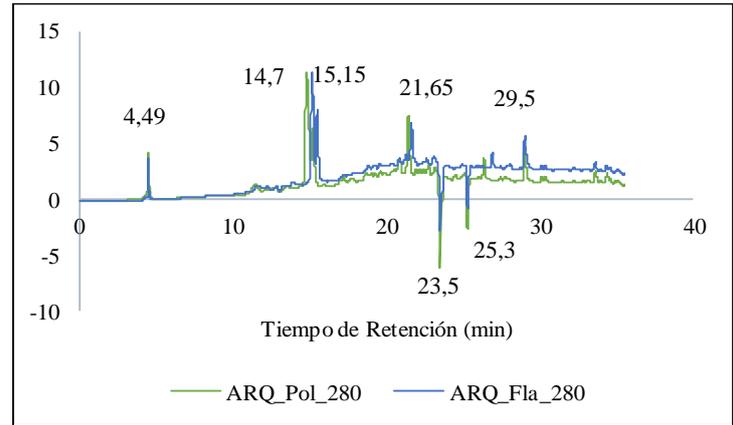
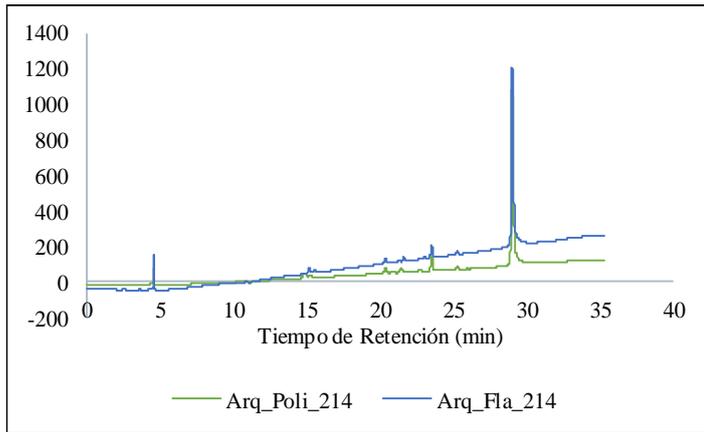


Figura 9. Cromatograma de los extractos hidroalcohólicos de *Arquitectura*. a) 214, b) 218, c) 360 y d) 366

Estudios similares de **Aquino et al. (2002)**, muestran que *Arquitectura* presenta diversos ácidos polifenólicos como: ácido cafeico a un tiempo de retención de 16.98 min, ácido ferúlico a 19.13 min, ácido p -cumarico a 27.24 min, y ácido cinámico a 48.56 min, detectados a una señal de 330nm, trabajando con una fase móvil de agua / tetrahidrofurano 82:18 y 2% de ácido acético y un caudal de 1.0ml / min. Analizando los espectros de absorción de este estudio se puede decir que la mayoría de estos compuestos podría pertenecer al mismo grupo fenólico, excluyendo flavonoides, ya que no absorben a esta longitud de onda (**Silva et al., 2006**).

3.2.3. Actividad antiinflamatoria

El estudio de las propiedades de las plantas es un punto importante para definir si estas ofrecen beneficios para la salud. Para ello, se evaluaron las propiedades antiinflamatorias de *Arquitectura*. La inflamación es un proceso complejo de respuesta fisiopatológica a una lesión, infección o destrucción caracterizado por dolor, hinchazón, calor, enrojecimiento y funciones alteradas, lo que implica el aumento de la permeabilidad vascular, el aumento de la desnaturalización de proteínas y la alteración de la membrana (Chandra et al., 2012). Esta actividad biológica se evaluó mediante dos métodos *in vitro*.

3.2.3.1. Desnaturalización de Proteína

La desnaturalización de proteínas es una de las causas asociadas a enfermedades artríticas, siendo probablemente los mecanismos de desnaturalización la alteración del hidrógeno electrostático, uniones hidrofóbicas y disulfuro, (Singh & Nainwani, 2013). En el ensayo se observó que el extracto liofilizado de *Arquitectura* presentó una máxima protección contra la desnaturalización de proteínas de 28.71 ± 0.63 a una concentración de 500 ug/ml para el caso de flavonoides, mientras que para polifenoles fue de $36,30 \pm 0,29$ a una concentración de 200 ug/ml (Tabla 9). El estándar usado de diclofenaco mostró un porcentaje de protección máximo de $61,40 \pm 3,08$ a una concentración de 1000 ug/ml (Tabla 9).

Tabla 9. Inhibición de la desnaturalización de la proteína para flavonoides

Concentración (ug/ml)	Inhibición de la desnaturalización de la proteína (%)		
	flavonoides	polifenoles	diclofenaco
100	22.04 ± 0.45	$35,27 \pm 0,83$	$26,80 \pm 0,93$
200	24.02 ± 0.56	$36,30 \pm 0,29$	$37,60 \pm 2,20$
500	28.71 ± 0.63	$32,83 \pm 0,43$	$51,69 \pm 1,33$
1000	23.26 ± 0.36	$24,24 \pm 0,43$	$61,40 \pm 3,08$

Los valores que se reflejan en la tabla son el promedio del porcentaje de 3 mediciones \pm la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019.

A partir de los valores obtenidos se observa que los extractos presentan propiedades de protección contra la desnaturalización de proteínas en analogía al diclofenaco sódico sobre todo a concentraciones bajas. Esto permite inferir que *Arquitectura* podría presentar una actividad antiartrítica gracias a los principios activos presentes en los extractos (contenido polifenólico, triterpenoides, alcaloides y flavonoides) (**Kumari et al., 2015**). Es importante mencionar que la actividad antiinflamatoria *in vitro* de *Arquitectura* se atribuye al alto contenido de compuestos fenólicos, esto debido a que existe un efecto sinérgico más que de un solo componente (**Chandra et al., 2012**).

Se ha informado que una de las características de varios medicamentos antiinflamatorios no esteroideos es su capacidad para estabilizar (prevenir la desnaturalización) de la albumina tratada térmicamente **Mitzushima & Kobayashi (1968)**, menciona que los medicamentos como el diclofenaco sódico al ser una droga no esteroide a bajas concentraciones no altera la conformación directa de proteínas ni inhiben fuertemente la combinación específica de proteínas, pero influye en sus cambios conformacionales. Por lo tanto, presenta un porcentaje de inhibición alta a bajas concentraciones. De una forma similar se observó en el extracto (Figura 10) teniendo valores similares a concentraciones entre 100 y 200 (ug/ml) con el estándar diclofenaco.

También existe un incremento del porcentaje de inhibición conforme aumenta la concentración del estándar, mientras que para flavonoides la máxima actividad se obtuvo a 200 ug/ml y en polifenoles a 500 ug/ml. De acuerdo a **García et al. (2017)**, el declive del porcentaje al llegar a una determinada concentración podría deberse a que se alcanzó el máximo de las interacciones electrostáticas entre los aminoácidos con carga opuesta de la albúmina y las macromoléculas aniónicas, provocando que no se mantenga la estructura secundaria y las propiedades conformacionales de la albúmina provocando su desnaturalización.

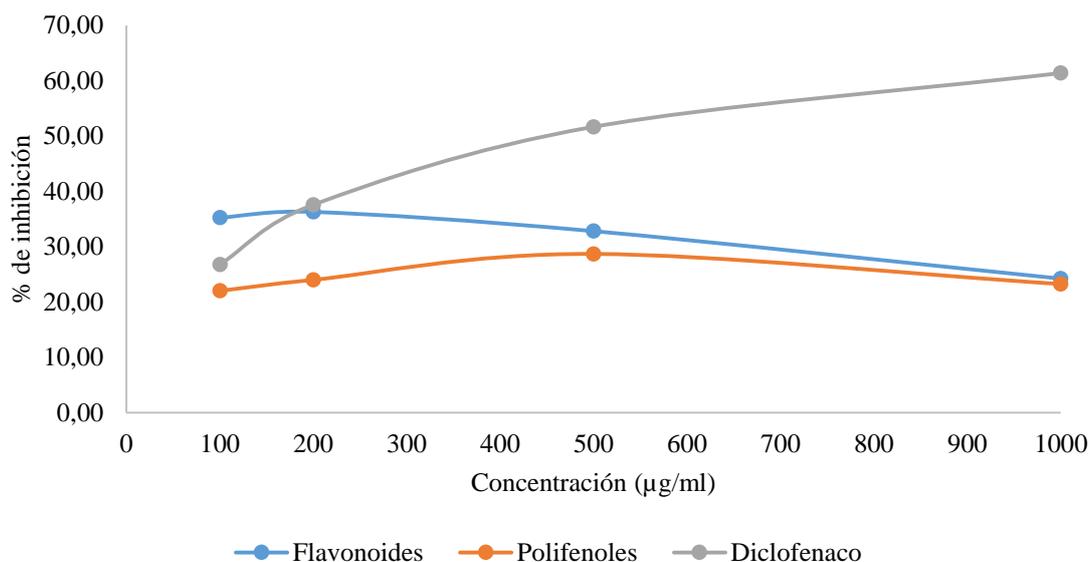


Figura 10. Porcentaje de inhibición versus diferentes concentraciones de flavonoides, polifenoles y diclofenaco (estándar)

La Tabla 10 presenta los resultados de la prueba de rangos múltiples, mostrando que para polifenoles existe una diferencia significativa entre las concentraciones usadas del extracto de *Arquitectura* y la actividad antiinflamatoria, presentando una inhibición de la desnaturalización de proteínas (albúmina) dependiente de la concentración (Osadebe & Okoye, 2003). Mientras que para flavonoides existe una homogeneidad entre las concentraciones de 200 y 1000 ug/ml (Tabla 10).

Tabla 10. Pruebas de rangos múltiples para la desnaturalización de proteínas por concentración

Concentración ug/ml	Casos	Media flavonoides	Grupos Homogéneos flavonoides	Media polifenoles	Grupos Homogéneos polifenoles
100	3	22,0	X	35,2667	X
1000	3	23,2667	X	24,2333	X
200	3	24,0	X	36,3	X
500	3	28,7	X	32,8	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

3.2.3.2. Estabilización de glóbulos rojos

Durante la inflamación, hay lisis de lisosomas que liberan componentes enzimáticos, como la enzima fosfolipasa A₂ que actúa sobre los fosfolípidos asociados a la membrana liberando lisolecitina. La lisolecitina actúa sobre la membrana de glóbulos rojos lo que causan una hemólisis que produce una variedad de trastornos. Esta lisis lisosomal se puede dar por sustancias nocivas como el medio hipotónico, el calor, etc. **(De, Sarkar, & Mukhophadhyay, 2017).**

La membrana de los glóbulos rojos humanos tiene una similitud con la membrana lisosomal. En este sentido, se trabajó con muestras de sangre, lo que permitió observar la actividad antiinflamatoria de *Arquitectura* mediante la inhibición hipotónica y la respuesta a la lisis inducida por calor a la membrana de los glóbulos rojos **(Anosike et al., 2018).**

El extracto liofilizado de *Arquitectura* mostró una elevada estabilización de la membrana y esta propiedad fue dependiente de la concentración (Tabla 11), protegiendo a los glóbulos rojos de la lisis inducida a todas las concentraciones utilizadas, siendo el porcentaje máximo de protección de la membrana de $98,04 \pm 0,44$ a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ para flavonoides y de $97,29 \pm 0,25$ a una concentración de 75 $\mu\text{g/ml}$ para polifenoles. También se puede ver que a partir de una concentración de 200 tanto para polifenoles y flavonoides empieza a ver un descenso en el porcentaje de protección, esto puede ser causado por un nivel y capacidad crecientes de ciertos agentes caotrópicos que desestabilizan la membrana **(Chikezie & Uwakwe, 2011)**

Los extractos de *Arquitectura* lograron estabilizar la membrana de los glóbulos rojos al evitar la liberación de enzimas líticas y mediadores activos de la inflamación. Según **Anosike et al. (2018)**, el efecto hemolítico de la solución hipotónica está relacionado con la acumulación excesiva de líquido dentro de la célula, lo que resulta en la ruptura de su membrana. La lesión de la membrana de los glóbulos rojos hará que la célula sea más susceptible al daño secundario a través de la peroxidación lipídica inducida por radicales libres.

Los porcentajes de protección conseguidos, muestran que Arquitecta es capaz de estabilizar la membrana de los glóbulos rojos previniendo fugas de proteínas y fluidos séricos en los tejidos durante un período de mayor permeabilidad causada por mediadores inflamatorios (**Labu et al., 2015**)

Tabla 11. Datos para la protección contra lisis de glóbulos rojos

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Protección contra lisis glóbulos rojos (%)		
	flavonoides	Polifenoles	diclofenaco
25	$94,77 \pm 0,12$	$96,84 \pm 0,50$	$97,38 \pm 0,84$
50	$95,03 \pm 0,98$	$97,25 \pm 0,31$	$97,62 \pm 0,59$
75	$95,29 \pm 0,21$	$97,29 \pm 0,25$	$97,54 \pm 0,48$
100	$95,47 \pm 0,86$	$97,29 \pm 0,65$	$94,74 \pm 0,24$
200	$98,04 \pm 0,44$	$97,29 \pm 0,12$	$93,25 \pm 0,31$
500	$95,52 \pm 0,88$	$96,92 \pm 0,12$	$92,38 \pm 1,45$
1000	$93,69 \pm 2,49$	$92,12 \pm 0,65$	$92,04 \pm 1,58$

Los valores que se reflejan en la tabla son el promedio de 3 mediciones \pm la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019

El estándar diclofenaco mostró una protección significativa de los glóbulos rojos humanos contra el efecto dañino de la solución hipotónica y el calor como se observa en la Tabla 11, mostrando su máximo de protección a una concentración de $50 \mu\text{g/ml}$, teniendo un porcentaje de $97,62 \pm 0,59$. De esta manera se puede observar que el extracto de Arquitecta es comparable y posiblemente puede ser utilizada como un sustituto de los antiinflamatorios no esteroides (**Tantary et al., 2016**).

Los resultados también mostraron una actividad de estabilización de la membrana que es dependiente de la concentración a la que se utiliza, Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando un análisis Anova y una prueba de rangos multiples. Se puede ver que tanto para polifenoles como para flavonoides hay una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones usadas (Anexo: Tabla 33). Sin embargo para las concentraciones de 75, 100 y 200 ($\mu\text{g/ml}$) en polifenoles no existen diferencias estadísticamente significativas como se muestra en la Tabla 12, ya que

comparten una misma columna de X's, mostrando que se puede trabajar con la concentración más baja sin alterar su efectividad (**Benil et al., 2018**).

Tabla 12. Pruebas de rangos múltiples para el tratamiento de la estabilización de glóbulos rojos y concentración

Concentración	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1000	3	92,12	X
25	3	96,84	X
500	3	96,92	X
50	3	97,25	X
75	3	97,29	X
200	3	97,29	X
100	3	97,29	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

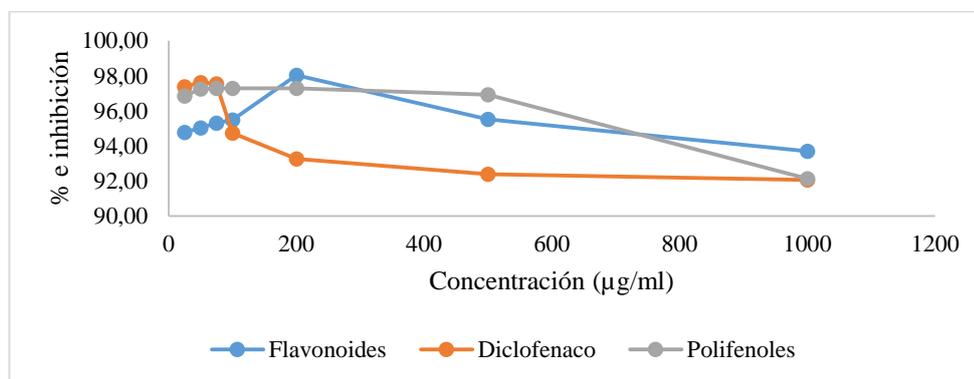


Figura 11. Comparación entre los porcentajes de inhibición de flavonoides, polifenoles y diclofenaco (estándar).

El análisis de datos para polifenoles y flavonoides en concentraciones bajas de 25, 50, y 75 µg/ml, sugieren que existe una protección de la membrana eritrocitaria humana contra la lisis inducida por la solución hipotónica y el calor, similar a la que ejercen los antiinflamatorios no esteroideos como es el diclofenaco (Figura 11). Evitando de forma similar la lisis de lisosomas, los cuales liberan sus componentes enzimáticos que producen una variedad de trastornos (**Anosike et al., 2018**).

Además, se muestra que para flavonoides existe un mayor porcentaje de protección comparado con el estándar. Según **Oguntibeju, (2018)** estudios han informado que compuestos como alcaloides, taninos y flavonoides presentes en plantas medicinales permite que estas tengan una mayor actividad antiinflamatoria. **Hayet, Hocine, & Meriem, (2017)** mencionan que el daño oxidativo de la membrana de los glóbulos rojos es la causa principal de la capacidad reducida para resistir el estrés mecánico y osmótico. Fitoquímicos antioxidantes como flavonoides y taninos previenen el daño oxidativo colaborando a que la actividad antiinflamatoria sea mayor (**Zhang et al., 2011**).

Acostupa et al., (2017) trabajó con material vegetal de *Perezia coerulescens* Wedd (Asteraceae), desde Perú realizando un estudio similar con el efecto antiinflamatorio *in vitro*, trabajando con etanol (1:10), temperatura ambiente y durante 14 días con agitación constante, obteniendo valores de protección contra la lisis de la membrana del glóbulo rojo de $68,8 \pm 0,9\%$ a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, siendo menor al porcentaje obtenido con las condiciones y la matriz Arquitecta.

3.2.4. Actividad Antioxidante

Las plantas medicinales muestran propiedades antioxidantes relacionadas con la cantidad de polifenoles totales presentes en su estructura. Este enfoque más 'natural' permite obtener una capacidad antioxidante de compuestos que no simplemente están relacionados con la eliminación directa de especies oxidantes reactivas, sino también a la inhibición de fuentes enzimáticas de estrés oxidativo (**Bhattacharya, 2011**).

Arquitecta presenta niveles de protección contra la peroxidación lipídica comparables con los valores del estándar BHT. Se observa una máxima actividad a 500 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta concentración la máxima tanto para polifenoles y flavonoides con valores de $86,46 \pm 0,83$ y $84,18 \pm 0,57$ respectivamente (Tabla 13). Estos valores muestran que existe una actividad antioxidante al momento que se produce una oxidación controlada del aceite, presentando un bajo nivel de diferentes aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos, en especial de malondialdehído (MDA) el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación

(Ródenas et al., 2001). Estepa et al. (2001), menciona que esta prueba permite cuantificar de forma específica a MDA, ya que existe un ataque nucleofílico por parte del reactivo TBA al carbonilo del aldehído MDA a un pH bajo. En los seres vivos esta propiedad antioxidante presenta efectos vasodilatadores, capaces de mejorar el perfil lipídico y atenuar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Quiñones et al., 2012).

Tabla 13. Datos de actividad antioxidante

Muestras	Actividad Antioxidante (%)		
	polifenoles	flavonoides	BHT
Arq 100	56,62 ± 0,83	61,14 ± 0,92	83,26 ± 0,29
Arq 200	68,42 ± 0,67	63,97 ± 0,94	84,88 ± 0,52
Arq 500	86,46 ± 0,83	84,18 ± 0,57	91,17 ± 1,10
Arq 1000	48,61 ± 0,78	65,88 ± 2,88	94,91 ± 0,72

Los valores que se reflejan en la tabla son el promedio de 3 mediciones ± la desviación estándar.

Fuente: Laboratorio de investigación Canje de Deuda FCIAB, 2019.

Los flavonoides presentan a su vez un importante efecto antioxidante ya que neutralizan y disminuyen la formación de O₂⁻. Estudios como los reportados por Sun & Ho, (2005), Vladimir-Knežević et al., (2011) realizados en animales y ensayos clínicos demuestran que los flavonoides reducen los niveles de MDA. Este metabolito que se forma cuando las especies reactivas de oxígeno y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas atacan los ácidos grasos de las membranas celulares (Balbi et al., 2018; Quiñones et al., 2012). Así mismo, se observa que el estándar a una menor concentración muestra una similitud con el porcentaje de actividad antioxidante de *Arquitectura* tanto para polifenoles y flavonoides.

Los resultados también mostraron una actividad antioxidante dependiente de la concentración a la que se utiliza. Adicionalmente, se analizaron estadísticamente mediante una prueba de rangos múltiples, la que muestra que existen grupos homogéneos entre las medias de polifenoles y flavonoides. Sin embargo, a una

concentración de 1000 y 200 $\mu\text{g/ml}$ hay una diferencia significativa, siendo estas las que presentan las medias más altas (Tabla 14).

Tabla 14. Pruebas de rangos múltiples para tratamientos de actividad antioxidante por concentración.

Concentración	Casos	Media polifenoles	Grupos Homogéneos polifenoles	Media flavonoides	Grupos Homogéneos flavonoides
1000	3	92,12	X	93,69	X
25	3	96,84	X	94,7667	X
500	3	96,92	X	95,5233	X
50	3	97,25	X	95,0267	X
75	3	97,29	X	95,29	X
200	3	97,29	X	98,0367	X
100	3	97,29	X	95,47	X

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Jachmanián, (2014) afirma que la eficiencia de todos los antioxidantes disminuye con el incremento de la concentración como se muestra en la Figura 12 lo que corrobora lo antes mencionado, ya que a una concentración de 500 se ve un decaimiento de la actividad antioxidante para polifenoles y flavonoides.

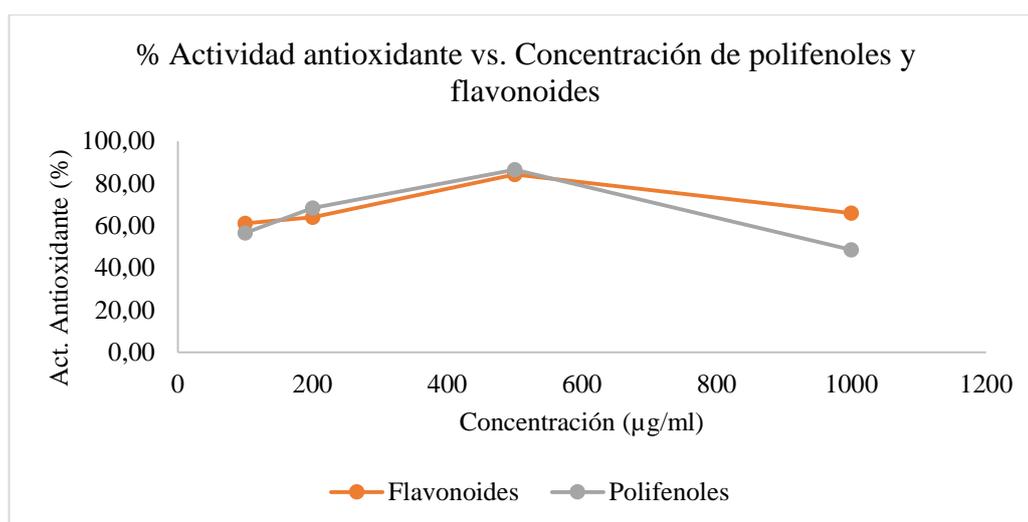


Figura 12. Comparación entre los porcentajes de actividad antioxidante de los datos obtenidos para polifenoles y flavonoides.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

El presente estudio es el primer reporte de la extracción y caracterización de flavonoides y polifenoles totales del material vegetal de *L. ovatus*. Su extracción se realizó con etanol al 50%, a temperaturas de 50°C y 60°C y a tiempos de 20 y 5min respectivamente, obteniendo valores de $31,69 \pm 0,28$ mg equivalentes de ácido gálico/g de Arquitecta y $32,16 \pm 0,13$ mg equivalentes de catequina/ g de Arquitecta. Esto sugiere que las hojas de Arquitecta presentan compuestos fenólicos que respaldan sus propiedades medicinales siendo estas utilizadas de forma diurética, depurativa y para el tratamiento de sífilis.

Aunque la Arquitecta no presento los patrones empleados en la investigación como fueron, ácido gálico y catequina, tanto en las cromatografías de capa fina y líquida de alto rendimiento, presentó otros compuestos. Los mismos se hicieron presentes por la coloración fluorescente amarilla oscuro, verde y azul. Además, mostraron diversos compuestos a tiempos de retención 4, 5; 14,8; 21; 23,5; 25,3 y 26,3 min para polifenoles y 4,49; 15,17; 15,50; 21,65, 23,52; 25,25; 29,02; min para flavonoides.

La actividad antiinflamatoria por los métodos *in vitro*, mostraron que los extractos para flavonoides y polifenoles presentaron la máxima actividad ($98,04 \pm 0,44$ y $97,29 \pm 0,12$) a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ con el método de estabilización de la membrana de los glóbulos rojos. Por el contrario, con el método de desnaturalización de proteínas fue a 500 $\mu\text{g/ml}$ ($28,71 \pm 0,63$) y 200 $\mu\text{g/ml}$ ($36,30 \pm 0,29$) respectivamente. Para la actividad antioxidante se obtuvo valores similares para polifenoles y flavonoides ($86,46 \pm 0,83$ y $84,18 \pm 0,57$). Estos resultados revelan los beneficios de Arquitecta como un potencial fármaco natural.

4.2. Recomendaciones

Durante la preparación de la muestra es recomendable dejar secar bien la planta para poder obtener un polvo fino de las hojas.

Para la extracción de compuestos fenólicos es importante el uso exclusivo del material vegetal, específicamente las hojas, con el objetivo de evitar la presencia de los densos y sedosos tricomas blancos presentes en el tallo y en el haz y envés de las hojas, ya que disminuye la cantidad de estos compuestos.

Para la identificación de los principales picos presentes en la matriz Arquitecta se recomienda usar patrones como: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p -cumarico y ácido cinámico.

Se recomienda obtener las fracciones de los compuestos de Arquitecta y realizar un análisis de las actividades biológicas, para poder conocer que compuestos gobiernan estas actividades.

Hacer estudios de la misma especie, pero en diferentes etapas del año y recolectados de diversos lugares, para determinar la variación de compuestos fenólicos vinculados a factores ambientales.

Emplear los extractos optimizados de la matriz Arquitecta en la creación e innovación de nuevos productos.

5. MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. Referencias Bibliográficas

- Acostupa, F. D. M., Chávez, A., Mejía, S. E., Pauta, M. M., & Tucunango, J. L. (2017). Artículo original Efecto antiinflamatorio in vitro de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas In Vitro Anti-Inflammatory Effect Of Four Peruvian Medicinal Herbs Ethanolic Extracts *Materiales y métodos Material vegetal*. 2(2), 79–85.
- Almeida, J. P., Montúfar, R., & Anthelme, F. (2013). Patterns and origin of intraspecific functional variability in a tropical alpine species along an altitudinal gradient. *Plant Ecology and Diversity*, 6(3–4), 423–433. <https://doi.org/10.1080/17550874.2012.702137>
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227–249. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513677>
- Aleykutty, N. A., Bindu, A. R., Sangeetha, S., & Jiljit, G. (2013). Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Wrightia Tinctoria Leaves . *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 1(1), 33–41. <https://doi.org/10.1080/22311866.2011.10719071>
- Alhakmani, F., Kumar, S., & Khan, S. A. (2013). Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), 623–627. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60126-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60126-4)
- Anosike, C. A., Igboegwu, O. N., & Nwodo, O. F. C. (2018). Antioxidant properties and membrane stabilization effects of methanol extract of Mucuna pruriens leaves on normal and sickle erythrocytes. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.08.002>

- Aquino, R., Morelli, S., Tomaino, A., Pellegrino, M., Saija, A., Grumetto, L., ... Bonina, F. (2002). Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00379-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00379-8)
- Balbi, M. E., Tonin, F. S., Mendes, A. M., Borba, H. H., Wiens, A., Fernandez-Llimos, F., & Pontarolo, R. (2018). Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0318-5>
- Balslev, H., Navarrete, H., de la Torre, L. & Macía, M. J. (2008). Introducción. En de la Torre, L., H. Navarrete, P. Muriel M., M.J. Macía & H. Balslev (eds.). 2008. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
- Benil, P., Indu, A., Rajakrishnan, R., Farahan, A., & Obaid, S. Al. (2018). Elephantopus Scaber Linn. Enhances Membrane Stability in Human Erythrocytes in in Vitro Models. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(6), 53–63. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.096172>
- Bocanegra, A., Javier, F., Mora, R., Javier, F., Bocanegra, A., & Mora, S. R. (2012). Del Paleoindio al Formativo: 10.000 años para la historia de la tecnología lítica en Colombia. *Boletín de Antropología*, 26(43), 124–156.
- Bhattacharya, S. (2011). Are we in the polyphenols era. *Pharmacognosy Research*, 3(2), 147. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.81966>
- Camel, V. (2014). Extraction Methodologies in Plants: General Introduction. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9902>

- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Casamayor, D., Campos, Y., Guerrero, I., Coloma, I., & Heredia, E. (2014). Historia de la Medicina. *Medisan*, 18(10), 1467–1474. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v18n10/san191810.pdf>
- Cao, X., Ye, X., Lu, Y., Yu, Y., & Mo, W. (2009). Ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction of piperine from white pepper. *Analytica Chimica Acta*, 640(1–2), 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.029>
- Castillo, M., Quinatoa, E., Risco, D., & Arnelas, I. (2014). Preliminary phytochemical screening of some andean plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 28(2), 35–37.
- Carvajal, L., & Vimos, K. (2017). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* Schltld. (Asteraceae) que crecen en Ecuador, en el período Abril – Agosto 2017”. Retrieved from <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/4160/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2017-0014.pdf>
- Chandra, S., Dey, P., Bhattacharya, S., Division, P., & Bengal, W. (2012). Preliminary in vitro assessment of anti-inflammatory property of *Mikania scandens* flower extract. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2(1), 25–31.
- Chikezie, P. C., & Uwakwe, A. A. (2011). Membrane stability of sickle erythrocytes incubated in extracts of three medicinal plants: *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, and *Terminalia catappa*. *Pharmacognosy Magazine*, 7(26), 121–125. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.80669>
- Cuatrecasas, J. 1978. Studies in Neotropical Senecioneae, Compositae. I. Reinstatement of genus *Lasiocephalus*. *Phytologia* 40: 307-312.

- de la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. In M. J. M. Balslev, & H. Balslev (Eds.), *Herbario QCA & Herbario AAU*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_del_Ecuador/download
- De, P., Sarkar, S., & Mukhophadhyay, M. J. (2017). Study the antioxidant and In vitro Anti-inflammatory activity by membrane stabilization method of *Amaranthus gangeticus* leaf extract. 6(4), 103–105.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnić, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 84–91.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., & Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101(4), 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.050>
- Estepa, V., Ródenas, S., & Martín, M. C. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anales de La Real Academia de Farmacia*, 67(3), 447–461.
- Flores, H., Valencia, E., Figueroa, I., Martínez, E., Camacho, M. del C., Flores, H., & García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29. Retrieved from http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2_1583-4794-2-PB.pdf

- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- García, M., Parra, D. & Mena, P. (2014). El país de la Biodiversidad: Ecuador. Fundación Botánica de los Andes, Ministerio del Ambiente y Fundación EcoFondo. Quito.
- García Candela, J. L. E., Pariona Velarde, C. D., & Londoño Bailon, R. P. (2017). Artículo original Actividad antiinflamatoria in vitro de los polisacáridos sulfatados de *Patallus mollis* extraídos mediante digestión enzimática In vitro anti-inflammatory effect of *Patallus mollis* sulphated polysaccharides extracted by enzymatic digestio. 2(3), 759–764.
- García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Gomes, A., Pimpão, R. C., Fortalezas, S., Figueira, I., Miguel, C., Aguiar, C., ... Santos, C. N. (2015). Chemical characterization and bioactivity of phytochemicals from Iberian endemic *Santolina semidentata* and strategies for ex situ propagation. *Industrial Crops and Products*, 74, 505–513. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.037>
- Hayet, E. K., Hocine, L., & Meriem, E. K. (2017). Chemical composition and biological activities of the essential oils and the Methanolic extracts of *Bunium Incrassatum* and *Bunium Alpinum* from Algeria. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 62(1), 3335–3341. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072017000100006>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

- Jachmanián, I. (2014). Estudio de los factores determinantes de la estabilidad oxidativa del biodiesel y diseño de métodos integrales para su adecuada estabilización.
- Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2015). Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC-MS, and TLC-DPPH. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38(11), 1147–1153. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1028295>
- Jørgensen P. M. & Ulloa Ulloa, C. (1994). Seed Plants of the High Andes of Ecuador. A Check-List. *AAU Reports* 34: 1-443.
- Jørgensen P. M., León-Yáñez S. (eds.). (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 75: i–viii, 1–1182.
- Kennouche, S., Bicha, S., Bentamene, A., Crèche, J., Benayache, F., & Benayache, S. (2016). In vitro antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of different polarity extracts from *Chrysanthemum segetum* L. growing in Algeria. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(9), 1522–1525.
- Khodadoust, S., Sadeghi, H., Pebdani, A. A., Mohammadi, J., & Salehi, A. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of colchicine compound from *Colchicum haussknechtii* by using response surface methodology. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.05.004>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Bohra, P., & Sheela, S. (2011). In-vitro anti-inflammatory activity of leaf extracts of *basella alba* linn. var. *alba*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(2), 176–179.
- Kumari, C. S., Yasmin, N., Hussain, M. R., & Babuselvam, M. (2015). Invitro anti-inflammatory and anti-artheritic property of *rhizopora mucronata* leaves. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6(3), 482–485.

- Labu, Z. K., Laboni, F. R., Tarafdar, M., Howlader, M. S. I., & Rashid, M. H. (2015). Membrane stabilization as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondias pinanata* (Family: Anacardiaceae). *Pharmacologyonline*, 2, 44–51.
- López, L. (2002). Flavonoides. *Offarm*, 21, 11–164. Retrieved from <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951>
- Mitzushima, Y., & Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169–173. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1968.tb09718.x>
- Moure, K., Torrecilla, P., & Lapp, M. (2014). ESPECIES DE *Lasiocephalus* WILLD . EX SCHLTDL . (ASTERACEAE) Y SUS. (July 2015).
- Mukhopadhyay, S., Luhria, D. L., & Robbins, R. J. (2006). Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 156–162. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2326>
- Muñoz, Ó. A., Torres, G. A., Núñez, J. A., de la Rosa, L. A., García, J., Ayala, F., & Álvarez, E. (2017). Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). *Extraction and analysis of phenolics in food*. 1054, 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Nagaharika, Y., Kalyani, V., Rasheed, S., & Ramadoskarthikeyan. (2013). Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by hrbc membrane stabilization method. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 156–158. [https://doi.org/10.1016/s2221-6189\(13\)60118-3](https://doi.org/10.1016/s2221-6189(13)60118-3)

- O'Coinceanainn, M., Astill, C., & Baderschneider, B. (2003). Coordination of aluminium with purpurogallin and theaflavin digallate. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96(4), 463–468. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00248-4)
- Oguntibeju, O. O. (2018). Medicinal plants with anti-inflammatory activities from selected countries and regions of africa. *Journal of Inflammation Research*, 11, 307–317. <https://doi.org/10.2147/JIR.S167789>
- Osadebe, P. O., & Okoye, F. B. C. (2003). Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of Alchornea cordifolia leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00195-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00195-8)
- Pérez, I. (2018). El uso de las plantas medicinales. Recuperado de: https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/8921/tra6_p23-26_2010-0.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776–1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Peñarrieta, J., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J., & Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Bolivian Journal of Chemistry*, 31(2), 68–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., & Tiwary, A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from Stevia rebaudiana leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.063>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp. Nutr Hosp*, 2727(1), 76–8976. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>

- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves. *Food Science and Technology InterNational*, 12(5), 385–396. <https://doi.org/10.1177/1082013206070166>
- Simbaña, W. & Vargas, J. H. (2020). Catálogo preliminar de la flora del Cerro Teligote, San Pedro de Pelileo, Ecuador. *En preparación*.
- Singh, D., & Nainwani, R. (2013). In-Vitro Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Activity of Hydroalcoholic Extract of *Pongamia Pinnata* (L .) Pierre Seed International Journal of Pharma Research & Review , Dec 2013 ; 2 (12): 20-25. 2(April 2012), 20–25.
- Sun, T., & Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90(4), 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.035>
- Tanase, C., Cosarcă, S., & Muntean, D. (2019). A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules*, (March). <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>
- Tantary, S., Masood, A., Bhat, A. H., Dar, K. B., Zargar, M. A., & Ganie, S. A. (2016). In vitro Antioxidant and RBC membrane Stabilization Activity of *Euphorbia wallichii*. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(1), 13–22. <https://doi.org/10.5530/fra.2017.1.3>
- Temkov, M., Petkova, N., Denev, P., & Krastanov, A. (2015). Characterization of inulin from *Helianthus tuberosus* L. obtained by different extraction methods-comparative study. *Scientific Works of University of Food Technologies*, (October), 461–464. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4093.7040>
- Tungurahua. (2018). En la comunidad Teligote de Pelileo. Recuperado de: <https://www.tungurahua.gob.ec/index.php/informativo-hgpt/principales/3838-en-la-comunidad-teligote-de-pelileo>

- Ulloa, C. & Neill, D. (2005). *Cinco años de Adiciones a la Flora del Ecuador 1999-2004*. UTPL, Loja, Ecuador.
- Ulloa Ulloa, C., Acevedo-Rodríguez P., Beck, S., Belgrano, M. J., Bernal, R., Berry, P. E., Brako, L., Celis, M., Davidse, G., Forzza, R. C., Gradstein, S. R., Hokche, O., León, B., León-Yáñez, S., Magill, R. E., Neill, D. A., Nee, M., Raven, P. H., Stimel, H., Strong, M. T., Villaseñor, J. L., Zarucchi, J. L., Zuluoga, F. O. Jørgensen, P. M. (2017). An integrated assessment of the vascular plants species of the Americas. *Science*, 358, 1614-1617.
- Vaca, J. P. A. (2011). Mecanismos de colonización de *Lasiocephalus ovatus* Schldl. (Asteraceae) en el superpáramo del Antisana. Plasticidad fenotípica, estructura genética e interacciones con otras especies. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR FACULTAD. Retrieved from <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/3281/T-PUCE-3542.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Valarezo, E., Rosilloa, M., Cartuchea, L., Malagóna, O., Meneses, M. & Morocho, V. (2015). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 2 (3), 212-216.
- Valarezo, E., Arias, A., Cartuche, L., Meneses, M., Ojeda, S. & Morocho, M. (2016) Biological Activity and Chemical Composition of the Essential Oil from *Chromolaena laevigata* (Lam.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae) from Loja, Ecuador, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19 (2), 384-390.
- Vadivu, R., & Lakshmi, K. S. (2012). In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 3(2). <https://doi.org/10.3329/bjp.v3i2.956>

- Valencia, E., Flores, H., Figueroa, I., Martínez, E., Camacho, M. del C., Flores, H., & García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas
Polyphenols: antioxidant and toxicological properties. *Revista de La Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29. Retrieved from http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2_1583-4794-2-PB.pdf
- Vladimir-Knežević, 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>
- Wagner, H., & Bladt, S. (2015). Plant drugs analysis A thin Layer Chromatography Atlas. In *Clinical Cardiac Electrophysiology in the Young: Second Edition* (Second Edi). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2739-5>
- Zhang, Q., & Ye, M. (2009). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *Journal of Chromatography A*, 1216(11), 1954–1969. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.072>

5.2. ANEXOS

5.2.1. Optimización para la extracción.

Tabla 15. Optimización del Solvente para flavonoides a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitecta)

FLAVONOIDES								
AGUA								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 500nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio 510 nm
ARQ.R1	0.1000	5	250	5	1	0.455	14.752	
ARQ.R2	0.1000	5	250	5	1	0.425	13.734	14.130
ARQ.R3	0.1000	5	250	5	1	0.430	13.903	
Etanol 25%								
ARQ1.75	0.1005	5	250	5	1	0.600	19.578	
ARQ2.75	0.1000	5	250	5	1	0.585	19.166	19.727
ARQ3.75	0.1001	5	250	5	1	0.623	20.436	
Etanol 50%								
ARQ1.50	0.1001	5	250	5	1	0.898	29.764	
ARQ2.50	0.1001	5	250	5	1	0.906	30.036	30.013
ARQ3.50	0.1001	5	250	5	1	0.912	30.239	
Etanol 75%								
ARQ1.25	0.1000	5	250	5	1	0.716	23.614	
ARQ2.25	0.1000	5	250	5	1	0.707	23.309	23.626
ARQ3.25	0.1000	5	250	5	1	0.726	23.954	
Etanol puro								
ARQ1.P	0.1002	5	250	5	1	0.246	7.641	
ARQ2.P	0.1007	5	250	5	1	0.252	7.805	7.719
ARQ3.P	0.1006	5	250	5	1	0.249	7.711	
Metanol 25%								
ARQ1.25	0.1009	5	250	5	1	0.704	21.455	
ARQ2.25	0.1002	5	250	5	1	0.723	22.203	21.824
ARQ3.25	0.1004	5	250	5	1	0.712	21.813	

Metanol 50%								
ARQ1.50	0.1004	5	250	5	1	0.586	17.855	
ARQ2.50	0.1003	5	250	5	1	0.596	18.187	18.280
ARQ3.50	0.1004	5	250	5	1	0.616	18.797	
Metanol 75%								
ARQ1.75	0.1001	5	250	5	1	0.553	16.869	
ARQ2.75	0.1000	5	250	5	1	0.563	17.201	16.733
ARQ3.75	0.1000	5	250	5	1	0.529	16.129	
Metanol puro								
ARQ1.P	0.1000	5	250	5	1	0.428	12.943	
ARQ2.P	0.1000	5	250	5	1	0.397	11.966	12.613
ARQ3.P	0.1001	5	250	5	1	0.428	12.930	

Tabla 16. Optimización del Solvente para polifenoles a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitecta).

Polifenoles								
AGUA								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ.R1	0.1000	5	250	5	1	0.561	23.412	
ARQ.R2	0.1000	5	250	5	1	0.589	24.672	23.997
ARQ.R3	0.1000	5	250	5	1	0.572	23.907	
Etanol 25%								
ARQ1.75	0.1005	5	250	5	1	0.524	21.638	
ARQ2.75	0.1000	5	250	5	1	0.513	21.251	21.523
ARQ3.75	0.1001	5	250	5	1	0.523	21.679	
Etanol 50%								
ARQ1.50	0.1001	5	250	5	2	0.379	30.407	
ARQ2.50	0.1001	5	250	5	2	0.386	31.036	30.647
ARQ3.50	0.1001	5	250	5	2	0.380	30.497	
Etanol 75%								
ARQ1.25	0.1000	5	250	5	1	0.590	24.717	
ARQ2.25	0.1000	5	250	5	1	0.608	25.527	25.242
ARQ3.25	0.1000	5	250	5	1	0.607	25.482	
Etanol puro								
ARQ1.P	0.1002	5	250	5	1	0.186	6.518	
ARQ2.P	0.1007	5	250	5	1	0.184	6.396	6.379
ARQ3.P	0.1006	5	250	5	1	0.180	6.223	
Metanol 25%								
ARQ1.25	0.1009	5	250	5	1	0.582	24.140	
ARQ2.25	0.1002	5	250	5	1	0.594	24.847	24.610
ARQ3.25	0.1004	5	250	5	1	0.595	24.843	
Metanol 50%								
ARQ1.50	0.1004	5	250	5	1	0.641	26.905	
ARQ2.50	0.1003	5	250	5	1	0.671	28.279	27.901

ARQ3.50	0.1004	5	250	5	1	0.677	28.519	
Metanol 75%								
ARQ1.75	0.1001	5	250	5	1	0.549	22.849	
ARQ2.75	0.1000	5	250	5	1	0.537	22.331	22.294
ARQ3.75	0.1000	5	250	5	1	0.523	21.701	
Metanol puro								
ARQ1.P	0.1000	5	250	5	1	0.402	16.254	
ARQ2.P	0.1000	5	250	5	1	0.404	16.344	16.833
ARQ3.P	0.1001	5	250	5	1	0.439	17.902	

Tabla 17. Optimización de la temperatura para flavonoides a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitectura).

Flavonoides con etanol al 50%								
30°C								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ.Et.1.30	0,1008	5	250	5	1	0,862	28,345	
ARQ.Et.2.30	0,1008	5	250	5	1	0,866	28,480	29,402
ARQ.Et.3.30	0,1005	5	250	5	1	0,878	28,970	
40°C								
ARQ40.1	0,1010	5	250	5	1	0,870	28,558	
ARQ40.2	0,1007	5	250	5	1	0,891	29,351	29,666
ARQ40.3	0,1011	5	250	5	1	0,877	28,765	
50°C								
ARQ50.1	0,1002	5	250	5	1	0,898	29,735	
ARQ50.2	0,1000	5	250	5	1	0,906	30,066	30,652
ARQ50.3	0,1002	5	250	5	1	0,912	30,209	
60°C								
ARQ1.60	0,1003	5	250	5	2	0,457	29,552	
ARQ2.60	0,1006	5	250	5	2	0,450	28,991	29,759
ARQ3.60	0,1008	5	250	5	2	0,455	29,270	

Tabla 18. Optimización de la temperatura para polifenoles a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitectura).

Polifenoles con etanol al 50%								
30°C								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ.Et.1.30	0,1008	5	50	5	2	0,318	24,747	
ARQ.Et.2.30	0,1007	5	50	5	2	0,315	24,504	24,772
ARQ.Et.3.30	0,1006	5	50	5	2	0,321	25,065	
40°C								
ARQ40.1	0,1005	5	50	5	2	0,352	27,867	
ARQ40.2	0,1010	5	50	5	2	0,365	28,888	28,426
ARQ40.3	0,1004	5	50	5	2	0,359	28,523	
50°C								
ARQ50.1	0,1012	5	50	5	2	0,379	30,076	
ARQ50.2	0,1007	5	50	5	2	0,386	30,852	30,394
ARQ50.3	0,1009	5	50	5	2	0,380	30,255	
60°C								
ARQ1.60	0,1008	5	50	5	2	0,398	31,893	
ARQ2.60	0,1008	5	50	5	2	0,393	31,446	31,614
ARQ3.60	0,1009	5	50	5	2	0,394	31,504	

Tabla 19. Optimización del tiempo para flavonoides a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitecta).

Flavonoides con etanol al 50%								
50°C - 5 min								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ.50.1	0,1008	5	250	5	1	0,898	29,558	
ARQ.50.2	0,1003	5	250	5	1	0,906	29,976	30,571
ARQ.50.3	0,1001	5	250	5	1	0,912	30,239	
50°C - 10 min								
ARQ.50.10.1	0,1004	5	250	5	1	0,910	30,081	
ARQ.50.10.2	0,1001	5	250	5	1	0,940	31,189	30,744
ARQ.50.10.3	0,1007	5	250	5	1	0,882	29,047	
50°C - 20 min								
ARQ.50.20.1	0,1000	5	250	5	1	0,952	31,628	
ARQ.50.20.2	0,1008	5	250	5	1	0,957	31,545	32,159
ARQ.50.20.3	0,1007	5	250	5	1	0,945	31,172	
60°C - 5 min								
ARQ.60.5.1	0,1005	5	250	5	2	0,457	29,493	
ARQ.60.5.2	0,1008	5	250	5	2	0,450	28,934	29,749
ARQ.60.5.3	0,1005	5	250	5	2	0,455	29,358	
60°C - 10 min								
ARQ.60.10.1	0,1004	5	250	5	1	0,914	30,216	
ARQ.60.10.2	0,1001	5	250	5	1	0,911	30,205	30,714
ARQ.60.10.3	0,1003	5	250	5	1	0,900	29,773	
60°C - 20 min								
ARQ.60.20.1	0,1007	5	250	5	1	0,933	30,767	
ARQ.60.20.2	0,1005	5	250	5	1	0,925	30,558	31,216
ARQ.60.20.3	0,1002	5	250	5	1	0,913	30,243	

Tabla 20. Optimización del tiempo para polifenoles a partir de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitecta).

Polifenoles con etanol al 50%								
50°C - 5 min								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ.50.1	0,1008	5	50	5	2	0,379	30,196	
ARQ.50.2	0,1003	5	50	5	2	0,386	30,975	30,556
ARQ.50.3	0,1001	5	50	5	2	0,380	30,497	
50°C - 10 min								
ARQ.50.10.1	0,1004	5	50	5	1	0,706	29,820	
ARQ.50.10.2	0,1001	5	50	5	1	0,724	30,718	29,836
ARQ.50.10.3	0,1007	5	50	5	1	0,689	28,971	
50°C - 20 min								
ARQ.50.20.1	0,1000	5	50	5	2	0,377	30,257	
ARQ.50.20.2	0,1008	5	50	5	2	0,379	30,196	29,690
ARQ.50.20.3	0,1007	5	50	5	2	0,361	28,616	
60°C - 5 min								
ARQ.60.5.1	0,1005	5	50	5	2	0,398	31,988	
ARQ.60.5.2	0,1008	5	50	5	2	0,393	31,446	31,688
ARQ.60.5.3	0,1005	5	50	5	2	0,394	31,630	
60°C - 10 min								
ARQ.60.10.1	0,1001	5	50	5	2	0,370	29,597	
ARQ.60.10.2	0,1002	5	50	5	2	0,384	30,826	30,097
ARQ.60.10.3	0,1004	5	50	5	2	0,374	29,868	
60°C - 20 min								
ARQ.60.20.1	0,1007	5	50	5	2	0,379	30,226	
ARQ.60.20.2	0,1005	5	50	5	2	0,383	30,644	30,475
ARQ.60.20.3	0,1002	5	50	5	2	0,381	30,556	

5.2.2. Desgaste del material vegetal

Tabla 21. Desgaste del material vegetal de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitectura) para flavonoides

Flavonoides con etanol al 50%								
60°C - 5 min								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ. R1	0,1002	5	250	5	2	0,495	32,157	
ARQ. R1	0,1002	5	250	5	2	0,489	31,750	32,194
ARQ. R1	0,1002	5	250	5	2	0,482	31,276	
ARQ. R2	0,1002	5	250	5	1	0,467	15,130	
ARQ. R2	0,1002	5	250	5	1	0,469	15,197	15,786
ARQ. R2	0,1002	5	250	5	1	0,477	15,468	
ARQ. R3	0,1002	5	250	5	1	0,165	4,896	
ARQ. R3	0,1002	5	250	5	1	0,148	4,320	4,672
ARQ. R3	0,1002	5	250	5	1	0,151	4,421	
ARQ. R4	0,1002	5	250	5	1	0,056	1,202	
ARQ. R4	0,1002	5	250	5	1	0,052	1,067	1,264
ARQ. R4	0,1002	5	250	5	1	0,062	1,405	
ARQ. R5	0,1002	5	250	5	1	0,022	0,050	
ARQ. R5	0,1002	5	250	5	1	0,025	0,152	0,146
ARQ. R5	0,1002	5	250	5	1	0,026	0,186	

Tabla 22. Desgaste del material vegetal de *Lasiocephalus ovatus* (Arquitecta) para polifenoles

Polifenoles con etanol al 50%								
50°C - 20 min								
Código	Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510 nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio
ARQ. R1	0,1000	5	50	5	2	0,388	31,248	
ARQ. R1	0,1000	5	50	5	2	0,382	30,707	31,128
ARQ. R1	0,1000	5	50	5	2	0,390	31,428	
ARQ. R2	0,1000	5	50	5	1	0,358	14,273	
ARQ. R2	0,1000	5	50	5	1	0,364	14,543	14,378
ARQ. R2	0,1000	5	50	5	1	0,359	14,318	
ARQ. R3	0,1000	5	50	5	1	0,122	3,650	
ARQ. R3	0,1000	5	50	5	1	0,127	3,875	3,770
ARQ. R3	0,1000	5	50	5	1	0,125	3,785	
ARQ. R4	0,1000	5	50	5	1	0,049	0,363	
ARQ. R4	0,1000	5	50	5	1	0,056	0,678	0,423
ARQ. R4	0,1000	5	50	5	1	0,046	0,228	
ARQ. R5	0,1000	5	50	5	1	0,005	-1,617	
ARQ. R5	0,1000	5	50	5	1	0,010	-1,392	-1,512
ARQ. R5	0,1000	5	50	5	1	0,007	-1,527	

5.2.3. Análisis de varianza

Tabla 23. Análisis de Varianza para el tratamiento flavonoides por Solventes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1094,64	8	136,83	679,78	0,0000
Intra grupos	3,62314	18	0,201286		
Total (Corr.)	1098,26	26			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 24. Análisis de Varianza para el tratamiento polifenoles por Solventes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1204,02	8	150,503	451,69	0,0000
Intra grupos	5,99757	18	0,333198		
Total (Corr.)	1210,02	26			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 25. Análisis de Varianza para el tratamiento polifenoles por tiempo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7,80751	5	1,5615	4,03	0,0223
Intra grupos	4,64898	12	0,387415		
Total (Corr.)	12,4565	17			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 26. Análisis de Varianza para el tratamiento flavonoides por tiempo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9,49678	5	1,89936	9,90	0,0006
Intra grupos	2,30239	12	0,191866		
Total (Corr.)	11,7992	17			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 27. Análisis de varianza para el tratamiento de inhibición de la desnaturalización de proteínas por concentración para flavonoides

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	76,9825	3	25,6608	100,30	0,0000
Intra grupos	2,04667	8	0,255833		
Total (Corr.)	79,0292	11			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 28. Análisis de varianza para el tratamiento de inhibición de la desnaturalización de proteínas por concentración para polifenoles

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	270,097	3	90,0322	314,07	0,0000
Intra grupos	2,29333	8	0,286667		
Total (Corr.)	272,39	11			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 29. Análisis de varianza para el tratamiento HRBC polifenoles por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	65,6265	6	10,9377	59,64	0,0000
Intra grupos	2,5674	14	0,183386		
Total (Corr.)	68,1939	20			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 30. Análisis de varianza para el tratamiento HRBC flavonoides por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	31,3464	6	5,2244	4,08	0,0142
Intra grupos	17,9411	14	1,2815		
Total (Corr.)	49,2875	20			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 31. Análisis de varianza para el tratamiento antioxidante para flavonoides por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	981,51	3	327,17	126,81	0,0000
Intra grupos	20,6399	8	2,57999		
Total (Corr.)	1002,15	1			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 32. Análisis de varianza para el tratamiento antioxidante para polifenoles por concentración

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2433,65	3	811,218	1328,15	0,0000
Intra grupos	4,8863	8	0,610787		
Total (Corr.)	2438,54	1			

Valor-P < 0,05 = estadísticamente significativa, con un nivel del 95,0% de confianza.

5.2.4. Curva de calibrado para HPLC

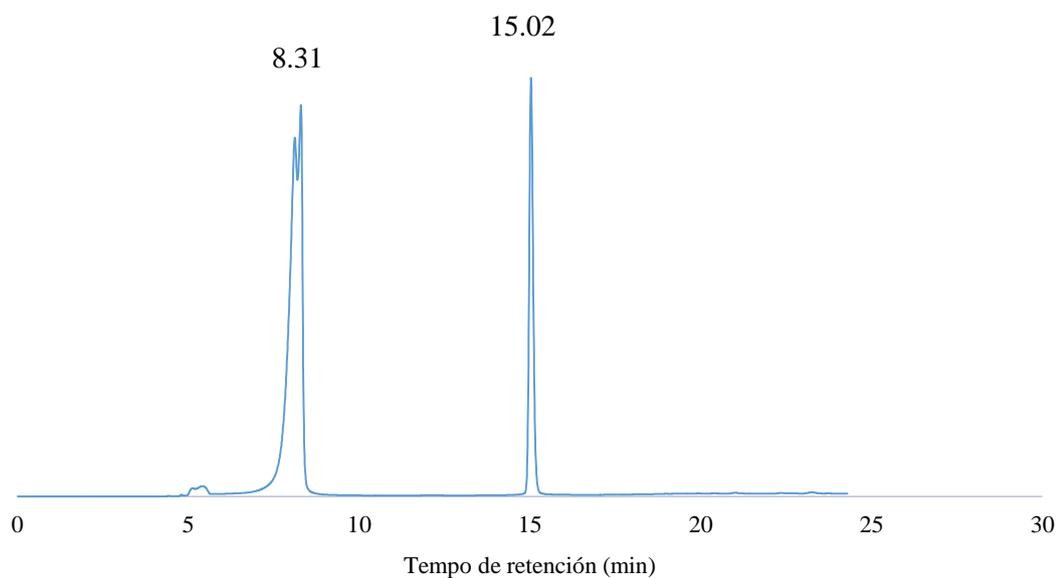


Figura 13. Curva de calibración para ácido gálico y catequina

5.2.5. Datos actividad antiinflamatoria

5.2.5.1. Desnaturalización de proteínas

Tabla 33. Datos de desnaturalización de proteínas para polifenoles

Muestra	Concentración del extracto en el tubo	ml de solución de extracto	Réplica	ml de solución de albúmina 1mM en buffer pH 6,4	Abs. a 660 nm	Promedio control	
Control	0 ug/ml	0	1	2	1,236	1,285	
			2		1,233		
			3		1,331		
			4		1,339		
						% de protección	Promedio del % de Protección
Arquitectura etanol 50% polifenoles	100 ug/ml	2	1 2 3	2	0,825 0,826 0,844	35,8 35,7 34,3	35,3
Arquitectura etanol 50% polifenoles	200 ug/ml	2	1 2 3	2	0,814 0,821 0,82	36,6 36,1 36,2	36,3
Arquitectura etanol 50% polifenoles	500 ug/ml	2	1 2 3	2	0,864 0,868 0,857	32,7 32,4 33,3	32,8
Arquitectura etanol 50% polifenoles	1000 ug/ml	2	2 3 4	2	0,977 0,967 0,976	24,0 24,7 24,0	24,2

Tabla 34. Datos de desnaturalización de proteínas para flavonoides

Muestra	Concentración del extracto en el tubo	ml de solución de extracto	Réplica	ml de solución de albúmina 1mM en buffer pH 6,4	Abs. a 660 nm	Promedio control	
Control	0 ug/ml	0	1	2	1,425	1,359	
			2		1,313		
			3		1,358		
			4		1,339		
							% de protección
Arquitectura etanol 50% flavonoides	100 ug/ml	2	1	2	1,054	22,4	22,0
			2	1,058	22,1		
			3	1,066	21,5		
Arquitectura etanol 50% flavonoides	200 ug/ml	2	1	2	1,034	23,9	24,0
			2	1,024	24,6		
			3	1,039	23,5		
Arquitectura etanol 50% flavonoides	500 ug/ml	2	1	2	0,969	28,7	28,7
			2	0,977	28,1		
			3	0,960	29,3		
Arquitectura etanol 50% flavonoides	1000 ug/ml	2	2	2	1,037	23,7	23,3
			3	1,046	23,0		
			4	1,045	23,1		

Tabla 35. Dato de desnaturalización de proteínas para estándar diclofenaco

Muestra	Concentración de diclofenaco en el tubo	Réplica	ml de solución de albúmina 1mM en buffer pH 6,4	Abs. a 660 nm	% Protección	Promedio
Control	0 ug/ml	1		1,536		1,47
		2	2	1,427		
		3		1,444		
Diclofenaco	25 ug/ml	1		1,074	26,89	22,85
		2	2	1,193	18,79	
		3		1,133	22,87	
Diclofenaco	50 ug/ml	1		1,049	28,59	31,31
		2	2	1,009	31,31	
		3		0,969	34,04	
Diclofenaco	75 ug/ml	1		0,909	38,12	37,51
		2	2	0,927	36,90	
		3		0,918	37,51	
Diclofenaco	100 ug/ml	1		1,066	27,43	26,80
		2	2	1,091	25,73	
		3		1,069	27,23	
Diclofenaco	200 ug/ml	1		0,953	35,13	37,60
		2	2	0,906	38,33	
		3		0,891	39,35	
Diclofenaco	500 ug/ml	1		0,728	50,44	51,69
		2	2	0,712	51,53	
		3		0,689	53,10	
Diclofenaco	1000 ug/ml	1		0,583	60,31	61,40
		2	2	0,516	64,87	
		3		0,602	59,02	

5.2.5.2. Estabilización de glóbulos rojos

Tabla 36. Datos de método in vitro HRBC

	Abs 560 nm			%Protección			Promedio
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Control	0,838	0,86	0,738				
DF 25	0,045	0,031	0,024	96,47	97,57	98,12	97,38
DF 50	0,027	0,039	0,025	97,88	96,94	98,04	97,62
DF 75	0,03	0,026	0,038	97,64	97,96	97,02	97,54
DF 100	0,067	0,07	0,064	94,74	94,50	94,98	94,74
DF200	0,086	0,09	0,082	93,25	92,93	93,56	93,25
500	0,09	0,118	0,083	92,93	90,74	93,48	92,38
1000	0,079	0,107	0,118	93,80	91,60	90,74	92,04
ARQ. poli 25	0,068	0,065	0,067	94,66	94,90	94,74	94,77
ARQ. poli 50	0,069	0,072	0,049	94,58	94,35	96,15	95,03
ARQ. poli 75	0,058	0,059	0,063	95,45	95,37	95,05	95,29
ARQ. poli 100	0,054	0,07	0,049	95,76	94,50	96,15	95,47
ARQ. poli 200	0,019	0,026	0,03	98,51	97,96	97,64	98,04
ARQ. poli 500	0,051	0,05	0,07	96,00	96,07	94,50	95,52
ARQ. poli 1000	0,061	0,063	0,117	95,21	95,05	90,81	93,69
ARQ. flavo 25	0,03	0,025	0,022	96,31	96,92	97,29	96,84
ARQ. flavo 50	0,025	0,02	0,022	96,92	97,54	97,29	97,25
ARQ. flavo 75	0,022	0,020	0,024	97,29	97,54	97,04	97,29
ARQ. flavo 100	0,028	0,020	0,018	96,55	97,54	97,78	97,29
ARQ. flavo 200	0,022	0,023	0,021	97,29	97,17	97,41	97,29
ARQ. flavo 500	0,025	0,026	0,024	96,92	96,80	97,04	96,92
ARQ. flavo 1000	0,066	0,058	0,068	91,87	92,86	91,63	92,12

5.2.6. Datos actividad antioxidante

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

Tabla 37. Réplicas para actividad antioxidante

	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
CONTROL (Aceite Oxidado)	0,970	0,918	0,973	1,096	1,164	1,024
Aceite sin oxidar	0,109	0,101	0,123	0,129	0,124	0,117

Muestras	R1	R2	R3	Promedio
Arq. Poli-100	57,464	55,810	56,582	56,62
Arq. Poli-200	69,151	68,269	67,828	68,42
Arq. Poli-500	85,579	86,571	87,233	86,46
Arq. Poli-1000	47,762	49,305	48,754	48,61
Arq. flavo-100	61,874	60,110	61,433	61,14
Arq. flavo-200	64,851	64,079	62,977	63,97
Arq. flavo-500	83,705	84,807	84,035	84,18
Arq. flavo-1000	69,041	63,418	65,182	65,88
BHT-100	83,37	83,48	82,93	83,26
BHT-200	85,47	84,70	84,48	84,88
BHT-500	90,32	92,41	90,76	91,17
BHT-1000	94,95	94,18	95,61	94,91

5.3. Fotografías

Recolección y procesamiento de Arquitecta



Figura 14. Llegada al cerro Teligote



Figura 15. Ascenso al pájonal del cerro Teligote para la obtención de Arquitecta con el guía Juanito.



Figura 16. Tratamiento de la muestra Architecta

Extracción y desgaste del material vegetal



Figura 17. Extractos con las condiciones óptimas para polifenoles (a) y flavonoides (b)

a

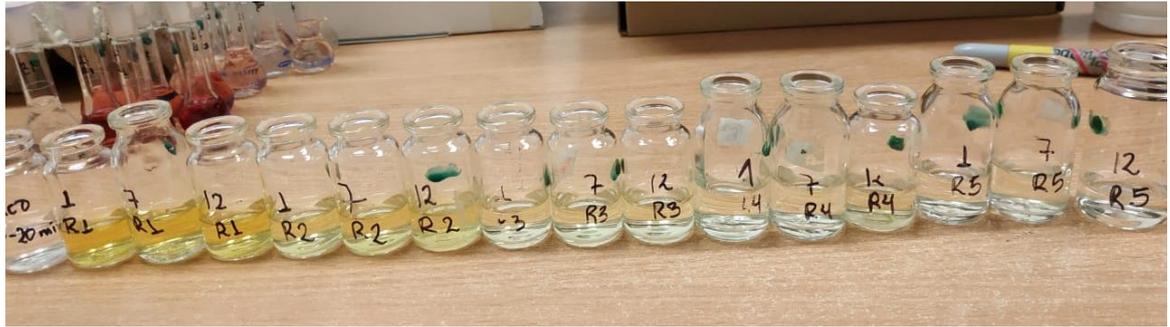


Figura 18. Desgaste del material vegetal, del extracto (a) y con las pruebas para flavonoides (b) y polifenoles (c)

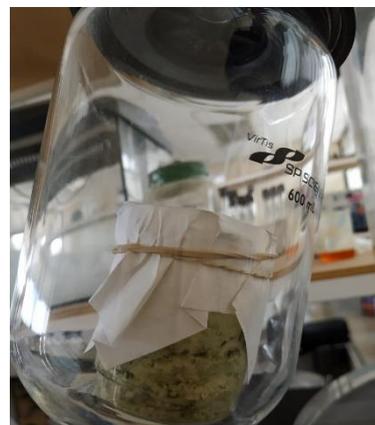


Figura 19. Proceso de liofilización de Arquitecta



Figura 20. Desnaturalización de proteína.



Figura 21. Muestra de sangre para prueba de estabilización de glóbulos rojos

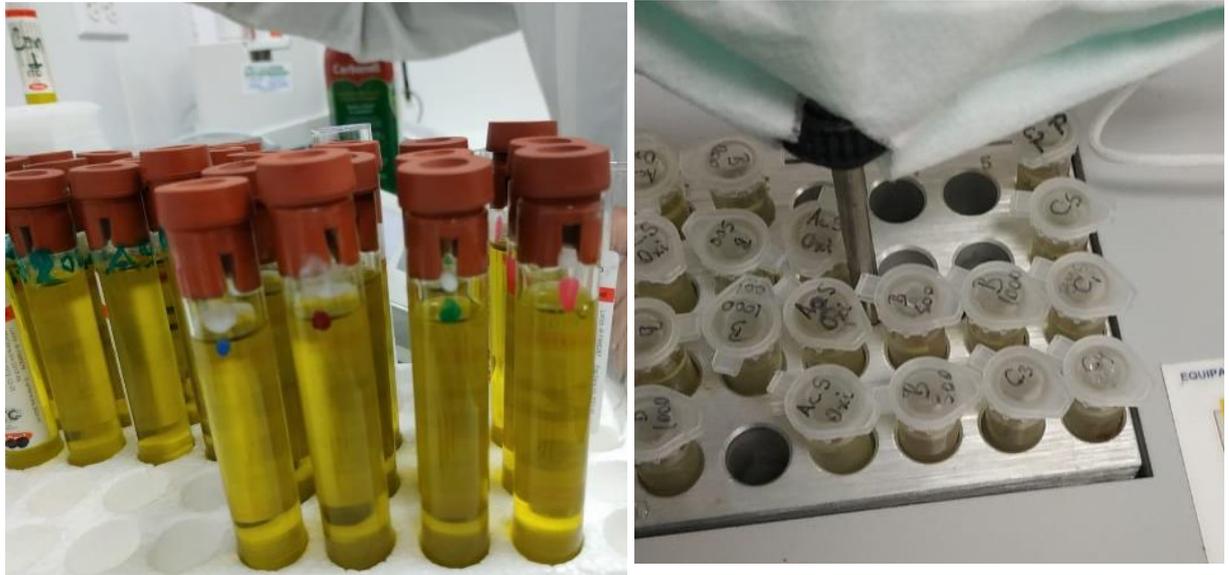


Figura 22. Actividad antioxidante tubos con aceite y muestras en termo bloque