



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema: Caracterización de extractos obtenidos a partir de Tarqui *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, planta nativa del cerro Teligote

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este trabajo de Titulación forma parte del Proyecto: “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usadas en el Ecuador-España llevado a cabo en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos” HCU 0206-CU-P-2018

AUTORA: Jenifer Gabriela Castillo Villamarín

TUTOR: PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador

Febrero – 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

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

Ambato, 14 de agosto 2020

.....

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

C.I: 180413557-0

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jenifer Gabriela Castillo Villamarín, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



.....

Jenifer Gabriela Castillo Villamarín

C.I: 050380317-3

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

.....

PhD. Ingeniera Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I: 1804148086

Presidente del Tribunal

.....

Dr. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

C.I: 1802738102

.....

Mg. Verónica Jeannette Carrera Cevallos

C.I: 1716192271

Ambato, 26 de enero de 2021

DERECHOS DE AUTOR

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

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



.....
Jenifer Gabriela Castillo Villamarín

C.I: 050380317-3

AUTOR

DEDICATORIA

“Cuanto más avances, tantos más lazos encontrarán tus pies. El sendero que a la meta conduce está iluminado por una luz única, la luz del arrojo, que arde en el corazón. Cuanto más osa uno, tanto más obtendrá. Cuanto más teme, tanto más palidecerá aquella luz, la única que puede guiarle.” **Helena Blavatsky**

A mis padres Patricio Castillo y Gladys Villamarín porque gracias a ustedes puedo cristalizar un escalón más en mi vida profesional, a Araceli, a mis hermanos Evelin, Cristian, Angélica, quienes son las piezas fundamentales de mi rompecabezas, a mis queridos padrinos Miguel Freire e Inés Valencia, a mi abuelita Florcita y bisabuela Ignacia, a Graciela Granja, Fernanda Castillo, Alexandra Peñaherrera, a mis pequeños Oscar Alonso y Emilia y a toda mi familia, amigos que me han acompañado en este camino.

Con todo mi corazón a todas y cada una de las personas que se han subido y han formado parte de este mi tren de la vida,

¡Gracias por confiar en mí!”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, porque hoy tengo la dicha de compartir este logro con todas y cada una las personas que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente en este sueño que hoy se cristaliza, agradezco cada palabra de aliento recibida, cada consejo el cual me ha ayudado a crecer como persona, y seguir aprendiendo cada día ya que las caídas te hacen más fuerte pero siempre es más llevadero contar con cada uno de ustedes. Hoy es tanta la alegría de poder culminar, sin lugar a duda me faltarían palabras para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este no perfecto y difícil camino, pero sin dudarlo un gratificante trabajo, Sin embargo, merecen reconocimiento especial mis padres Gladys y Patricio que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible, a Araceli por su guía, a mis hermanos Evelin, Cristian y Angélica por ser ese impulso y mi motor principal, un especial agradecimiento a mi mami Florcita e Ignacia, quienes ha sido mi ejemplo de trabajo y amor infinito, a mi tía Chelita quien con sus palabras me ha dado el impulso necesario en los momentos difíciles, a Fernanda y Alexandra que son mi inspiración y que a pesar de la distancia me han apoyado desde niña las amo, a mis tías Albita, Adrianita, Florcita, Carolita por siempre estar con un abrazo sincero, a mis queridos padrinos por abrirme las puertas de su hogar y enseñarme la lección de vida más grande , siempre están en mi mente y corazón, a mis primos y primas, por ser mi ejemplo e inspiración de superación. Gracias por hacer de este camino el más acogedor y lleno de amor que todos supieron darme en el momento exacto.

A mis amigas Isabel, Allem, Belén, Ximena, Angie, a mis niñas, CT, por brindarme una amistad sincera y saber que siempre que las necesite puedo contar con su apoyo, a mi grupo de investigación “Polifenoles”, a Kary con quien he compartido experiencias que recordaré toda la vida.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, y todos y cada uno de los docentes que el transcurso de mi

formación profesional, han formado parte de esta semillita de sabiduría. Al proyecto de investigación: “Estudio del perfil de polifenoles y encapsulación de los extractos de hierbas medicinales usados en el Ecuador: Proyecto de Investigación asociado al Proyecto de Canje de Deuda Ecuador – España” por permitirme ser parte de este trabajo de investigación. Al proyecto de Canje de Deuda Ecuador-España, quienes financiaron parte de los reactivos, también agradezco a los ingenieros Mario y Mónica quienes me permitieron el uso del Laboratorio de Análisis Instrumental, y por su predisposición a ayudarme, en cuyas instalaciones realicé mi experimentación. Un especial agradecimiento a mi tutora la Dra. Dayana Morales, por acogerme desde el principio en este proyecto y enseñarme que lo más importante en la vida no son los títulos que uno puede llegar a tener, sino el de ser un buen ser humano, gracias por su apoyo, su paciencia, por compartir sus conocimientos siempre esperando que mejoremos, por ser esa mano amiga, deja una huella imborrable gracias infinitas. Al Dr. Walter Simbaña y al Ing. Fernando Álvarez, por creer en mí, a la Dra, Cecilia Carpio, Dr. Milton Ramos, Ing. Liliana Acurio, Ing. Araceli Pilamala, Dra. Jacqueline Ortiz, Dra. Mayra Paredes, Dr. Rubén Vilcacundo, Ing, Diego Salazar, Dr. Freddy del Pozo, Dr. Manolo Córdova, Ing. Geovanny Vega, Ing. Dolores Robalino por sus invaluable enseñanzas.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo caracterizar los extractos obtenidos a partir de TARQUI *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, planta nativa del cerro Teligote, para la optimización del proceso de extracción se consideraron tres factores: disolvente (etanol, metanol, a una concentración de: 25, 50 y 75 por ciento y puro) y agua; temperatura (30, 40, 50, y 60 grados centígrados) y tiempo (5,10 y 20 min), se estandarizó el método de extracción para polifenoles, etanol al 50 por ciento, 50 grados centígrados y 5min, mientras que para flavonoides fue etanol al 75 por ciento, 50 grados centígrados y 20min. Al comparar los distintos solventes para la extracción de polifenoles, se obtuvo el mayor porcentaje de desgaste vegetal el cual fue de 98,91 por ciento para flavonoides y 97,74 por ciento para polifenoles y así obtener el extracto más concentrado con la mínima degradación de sus compuestos durante el proceso de obtención. La concentración de polifenoles en los extractos de tarqui se determinó por el método Folin Ciocalteu, y para la concentración de flavonoides totales se empleó el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. La separación e identificación de los polifenoles y flavonoides presentes en el extracto, se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con dos estándares de referencia (catequina y ácido gálico) y cromatografía de capa fina (TLC).

Palabras clave: Extractos vegetales, Plantas medicinales, Polifenoles, Flavonoides, *Myrsine andina*.

ABSTRAC

The objective of this research work was to characterize the extracts obtained from TARQUI *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, a native plant of Cerro Teligote, for the optimization of the extraction process, three factors were considered: solvent (ethanol, methanol, at a concentration of: 25, 50 and 75 percent and pure) and water; temperature (30, 40, 50, and 60 degrees centigrade) and time (5.10 and 20 min), the extraction method was standardized for polyphenons, 50 percent ethanol, 50 degrees centigrade and 5 min, while for flavonoids it was 75 percent ethanol, 50 degrees centigrade and 20min. When comparing the different solvents for the extraction of polyphenols, the highest percentage of plant wear was obtained which was 98.91 percent for flavonoids and 97.74 percent for polyphenols and thus obtain the most concentrated extract with the minimum degradation of its compounds during the production process. The concentration of polyphenols in the tarqui extracts was determined by the Folin Ciocalteu method, and the ultraviolet-visible spectrophotometry method was used for the concentration of total flavonoids. The separation and identification of the polyphenols and flavonoids present in the extract, high performance liquid chromatography (HPLC) with two standards was used.

Keywords: tarqui *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, characterization, optimization, polyphenols, flavonoids.

1. CAPITULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de Investigación

Geográficamente Ecuador es un país pequeño. No obstante, está caracterizado por su singular topografía, su diversidad de zonas climáticas, y una prolífica población de especies vegetales y animales. Ecuador posee la mayor diversidad vegetal y animal del mundo. Su riqueza biológica se refleja en toda una gama de organismos, a saber: el 10% de las especies de plantas vasculares del mundo se encuentran en un área que apenas representa el 2% de la superficie total de la Tierra. Sus diversos ecosistemas han interactuado de múltiples formas a lo largo de la historia geológica (**Empresario, 2009**)

La práctica de la medicina herbaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación. De las plantas se usa sus extractos en diversas formas de preparación, para mejorar el estado de salud (**White & Foster, 2004**); dando lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (**Pascual et al., 2014**).

Por sus usos tradicionales en la medicina se ha visto la necesidad de realizar investigaciones en plantas que contribuyan con la descripción de los principios activos y otros compuestos fitoquímicos, aportando beneficios para la humanidad, ya que han demostrado tener un resultado importante combatiendo la inflamación y el dolor de algunas enfermedades, lo que se debe fundamentalmente a componentes activos como los polifenoles y flavonoides, responsables de estos efectos que ejercen acción sobre el organismo humano. De allí, el estudio del tarqui una planta del cerro Teligote, el cuál es considerado como el único vestigio que todavía conserva un remanente de bosque andino y que se encuentra ubicado en el cantón San Pedro de Pelileo, provincia del Tungurahua (**Terranova, 2001**).

El objetivo del presente estudio fue la optimización del método de extracción para obtener la mayor cantidad de metabolitos secundarios y la caracterización de estos compuestos mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas; lo cual servirá como fundamento para una posterior aplicación en el diseño y fabricación de preparaciones farmacológicas.

En cuanto al impacto económico será positivo para las poblaciones que habitan en las cercanías del cerro Teligote que podrían dedicarse a la comercialización de tarqui y para las personas que lo consuman al conocer sus propiedades medicinales.

1.1.1. Uso de plantas como medicina natural

En el Ecuador el uso de plantas medicinales está inmerso en la cotidianidad de sus habitantes debido principalmente a que el conocimiento médico ancestral es inmenso **(Pérez, 1999)**. Se reportan 3118 especies pertenecientes a 206 familias de plantas usadas con fines medicinales en el país. Estas son utilizadas para aliviar manifestaciones de enfermedades que pueden o no ser diagnosticadas por el enfermo o el tratante. Los productos del metabolismo secundario de las plantas son los principios activos que proporcionan beneficios de prevención o curación con efecto fisiológico en el organismo **(Gallegos, 2016)**.

La incorporación y utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades son prácticas comunes en la medicina tradicional. En la actualidad es evidente que el interés de compuestos activos de origen vegetal va en aumento, porque ofrecen en algunos casos ventajas en relación a los medicamentos clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios **(Gómez Estrada et al., 2011)**.

1.1.2. Características de la especie Tarqui

El cerro Teligote es el único vestigio del bosque andino en el cantón Pelileo, siendo un bosque primario que alberga a la flora y fauna nativas del lugar. Tarqui es la especie que se investigó por lo que es importante identificar la clasificación taxonómica de la misma, la cual se encuentra especificada en el catálogo de **Hassler M., (2019)** y corresponde a:

Nombre científico: *Myrsine andina (Mez) Pipoly*

Nombre común:	Tarqui, “samal”
Sinónimo:	<i>Rapanea andina Mez</i>
Reino:	Plantae
Filo:	Traqueofita
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Myrsinoideae
Orden:	Ericales
Familia:	Primuláceas
Género:	<i>Myrsine</i>
Especie:	<i>andina (Mez) Pipoly</i>

Hábito: Árbol de 8 a 12 m de altura y 15 a 20 cm de diámetro de altura de pecho (DAP). Tronco cilíndrico o frecuentemente retorcido, ramificación alterna, copa densa irregular, ramificación alterna que inicia desde cerca del suelo, corteza externa lisa de color gris.

Distribución y ecología: Especie nativa de amplia distribución en la región andina del Ecuador; crece entre 2000 y 4000 m de altitud. Es frecuente en el subpáramo y en los márgenes de ríos y quebradas. Varias especies de aves silvestres consumen sus frutos y posiblemente son agentes dispersores (**Oliver, 2013**).

1.1.3. Características morfológicas de Tarqui

Hojas: Simples alternas, lámina de forma elíptica obovada de 3 a 3,5 cm de largo por 1,4 a 1,8 cm de ancho, margen entero, ápice redondeado y base atenuada, a veces ligeramente involuto; haz verde oscuro brillante, envés glabro con puntuaciones glandulares.

Flores: Reunidas en pequeños fascículos axilares de 0,3 a 0,5 cm de largo. Flores unisexuales, sésiles de 0,5 cm de diámetro; cáliz compuesto por 5 sépalos, glandulares unidos en la base; corola con 5 pétalos imbricados de color verde cremoso; androceo conformado por 5 estambres insertos en un tubo corolino, anteras grandes con dehiscencia longitudinal. Ovario súpero unilocular, estigma sésil.

Fruto: Pequeña drupa punteado-glandular seca, esférica (0,3-0,4 mm de diámetro) provista de una sola semilla (Oliver, 2013).



Figura 1. Fotografía de *Myrsine andina* (Mez)
Pipoly
Reproducida de: herbario.uazuay.edu.ec

1.1.4. Usos tradicionales de Tarqui.

En medicina tradicional campesina sus hojas cocinadas sirven para preparar baños calientes que se aplican a mujeres cinco días después del parto (**CESA, 1993**). En Saraguro lo emplean para combatir granos y salpullidos, mediante la preparación de cataplasmas o emplastos (**Elleman, 1990**). Antiguamente su madera era empleada para la construcción de pequeñas viviendas, pero en la actualidad se la usa solamente para leña y postes (**Oliver, 2013**).

1.1.5. Composición Química

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples. Los metabolitos secundarios presentan propiedades biológicas, y muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como saborizantes, colorantes, fragancias, insecticidas, drogas medicinales y adictivas, y cosméticos (**Ávalos & Elena, 2009**). Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Actualmente en plantas medicinales, se han realizado estudios sobre el contenido de polifenoles puesto que se asocia con propiedades farmacológicas (sedativas, antiespasmódicas o antibacteriales) (**Gaona, 2014**).

Los flavonoides son sustancias, producto del metabolismo secundario de las plantas, que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cáscaras de las frutas. Estos compuestos juegan un papel importante en la salud, y el proceso de defensa de las plantas (**Alan Crozier, Michael N. Clifford, 2006**). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros

metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Peñarrieta., et al, 2014).

1.1.6. Estructura de los compuestos fenólicos

El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Paladino & Zuritz, 2008).

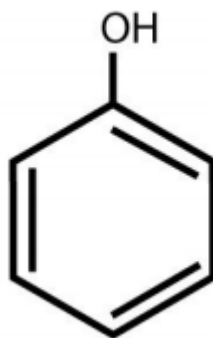


Figura 2. Estructura de un fenol
Reproducida Paladino,

1.1.7. Flavonoides

Se han identificado alrededor de 4000 compuestos flavonoides entre ellos están los derivados hidroxilados (aquellos que tienen en su estructura un grupo hidroxilo), metoxilados (tienen en su estructura un grupo metoxilo), y glicosilados (tienen en su estructura un glúcido). A estos compuestos se les atribuye la propiedad de ser antioxidantes y la capacidad de capturar radicales (Paladino & Zuritz, 2008).

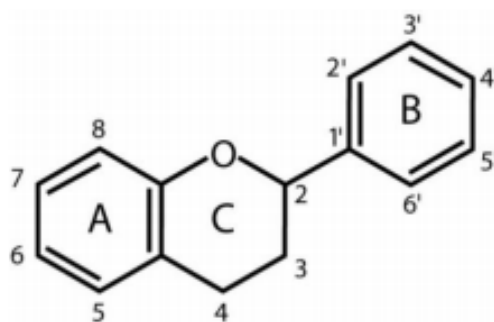


Figura 3. Estructura de un fenol
Reproducida Paladino,

1.1.8. Técnicas de Caracterización

Al buscar principios activos en plantas, se destacan las diferentes técnicas de caracterización, las cuales permiten detectar e identificar los compuestos bioactivos de tarqui. La cromatografía es un método de separación basado en el grado de partición de un analito entre una fase móvil y una fase estacionaria lo que permite separar los componentes de una mezcla. Dentro de los métodos cromatográficos hay una gran variedad, pero para este estudio nos enfocaremos en dos (HPLC y TLC) que se diferencian entre sí principalmente por el tipo de fase estacionaria (**Calderón & Calderón, 2000**). La cromatografía en capa fina (TLC) utiliza como fase estacionaria un adsorbente sólido colocado sobre un soporte plano (placa de sílica) y como fase móvil, un solvente orgánico o una mezcla de ellos. Se utiliza principalmente para separar y purificar compuestos orgánicos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cualitativa y cuantitativa importante, generalmente utilizada para la estimación de muestras farmacéuticas y biológicas. Es la técnica cromatográfica más versátil, segura, confiable y rápida para el control de calidad de los componentes del medicamento (**Hashim, 2018**).

1.2.Objetivos:

1.2.1. Objetivo general

- Caracterizar los extractos obtenidos a partir de tarqui *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, planta nativa del cerro Teligote.

1.2.2. Objetivos específicos

- Optimizar una metodología para la extracción de flavonoides y polifenoles a partir de hojas de Tarqui.
- Cuantificar el contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos de Tarqui.
- Caracterizar los mejores extractos mediante cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alto rendimiento.

1.3.Hipótesis:

1.3.1. Hipótesis nula

Las estandarizaciones de procesos no influyen en la concentración final de metabolitos secundarios.

1.3.2. Hipótesis alternativa

Las estandarizaciones de procesos influyen en la concentración de metabolitos secundarios.

1.4.Señalamiento de las variables

1.4.1. Variable independiente

- Disolvente:
- Temperatura
- Tiempo de extracción:

1.4.2. Variable dependiente

- Compuestos polifenólicos y flavonoides
- Cantidad de compuestos polifenólicos y flavonoides

2. CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material orgánico

Planta: *Myrsine andina* (Mez) Pipoly (hojas y ramas).

2.1.2. Material de laboratorio

Papel aluminio, vasos de precipitación de 50 ml (PYREX), probetas graduadas de vidrio de 50-30 y 10 ml (Boro), agitador magnético, varilla de agitación, tubos eppendorf 2ml, micropipetas de 50, 100 y 1000 µl, balones de aforo 5,50 y 100ml, celdas de vidrio para espectrofotómetro, guantes quirúrgicos, mascarillas, toallas de papel, placas de cromatografía camag 10x10cm sílica gel 60F 254 (TLC y HPTLC), columna HPTLC eclipse XDB-C18 4,6 x 250nm 5µm (agilent technologies), viales de 10ml, espátula, filtros 0,45µm, puntas para micropipetas de 50, 100 y 1000 µl.

2.2. Equipos

Estufa de secado (Binder), balanza analítica (Mettler Toledo XS 4002S), balanza de humedad (5Q-5/10), plancha de calentamiento con agitador magnético (Super Nouva Multiplace, Thermo Scientific), refrigeradora, rotoevaporador (IKA RU8, USA), balón rotoevaporador (IKA RU8, USA, centrifuga (Hettich Zentrifugen, Germany), baño de ultrasonido (BRANSON), Equipo HPLC, vortex (VWR), liofilizador (LABCONCO), cromatografía de líquidos (Agilent Technologies), cromatografía de capa fina (CAMAG), espectroscopia de absorción atómica (P&G), ultracongelador (Binder).

2.3. Reactivos

Etanol 96 %, metanol 96%, agua destilada, diclofenaco de sodio, estándar de ácido gálico (Sigma- Aldrich G7384), catequina hidrato grado HPLC, Follin & Ciucaltea's Phenol Reagent (MP, Biomediate), alcohol etílico (Sharlau, 99,8%), bicarbonato de sodio (Na₂CO₃) (Sodium Bicarbonate, Merck, USA), ácido fórmico (analar, 90%), nitrito de sodio (NaNO₂), cloruro de aluminio (ALCL₃), hidróxido de sodio (NaOH), sílica gel 60 F_254, columna C18, agua miliQ, etanol absoluto, metanol (applichem, 99,8%), metanol grado HPLC (merk.99%) butil hidroxi tolueno (BHT).

2.4.Métodos

2.4.1. Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas y ramas de Tarqui en el cerro Teligote ubicado al suroeste del cantón San Pedro de Pelileo, provincia de Tungurahua, Ecuador el 6 de septiembre de 2018, cabe recalcar que la identificación de la planta se la realizó con el botánico Walter Simbaña, el lugar forma parte del último cinturón verde del sector.

El material vegetal (hojas) se lavó con agua para eliminar las impurezas, y luego se coló en una estufa (Gander MTN) a una temperatura de 40 °C, para ayudar a secar de forma rápida. Con la ayuda de un mortero, se trituran las hojas secas hasta conseguir un tamaño de partícula uniforme que luego se almacenó en fundas ziploc, en un lugar seco.

2.4.2. Determinación de humedad del material vegetal

En una balanza de humedad previamente calibrada, se colocaron 3 g de hojas de Tarqui, una vez transcurrido el tiempo necesario, el equipo reveló el valor de la humedad de la muestra el cual fue de 66,94%

2.4.3. Obtención de los extractos vegetales

Para la optimización del proceso de extracción se considerarán tres factores: disolvente (etanol y metanol, a una concentración de: 25%, 50% ,75% y puro) y agua; temperatura (30, 40, 50, y 60°C) y tiempo (5,10 y 20 min)

Para la obtención de los extractos se utilizó una relación 1:10 empleando 0,1 g del material vegetal molido con 1 ml del disolvente. La mezcla se colocó en tubos eppendorf y se llevó a un baño de ultrasonido a la temperatura y tiempo correspondientes según las condiciones mencionadas anteriormente, se centrifugó a 14900 rpm /10min/10°C. Se extrajo el sobrenadante y se evaporó el disolvente orgánico en una estufa. El remanente se llevó a volumen constante. A partir de este extracto se realizó la cuantificación de polifenoles y flavonoides.

En la fase experimental se encontraron las mejores condiciones de extracción, las cuales permitieron extrapolar la cantidad de muestra a 3g, realizando 5 extracciones

sucesivas, los extractos que se obtuvieron fueron llevados al rotavapor a 40 °C, posteriormente fueron llevados a congelación a -80°C, para luego ser liofilizados para los análisis respectivos.

2.4.4. Cuantificación de polifenoles totales (Método de Folin Ciocalteu)

Se realizó siguiendo la metodología propuesta por **Vasco, Ruales, & Kamal, (2008)** con ciertas modificaciones. En un balón de aforo de 5ml se colocaron 100µl del extracto vegetal líquido y 100 µl del reactivo Folin–Ciocalteu, se dejó reaccionar por 3 minutos y luego se agregaron 2 ml de solución de carbonato de sodio (75 g/l). Se completó el volumen de cada balón hasta el aforo (5ml) con agua destilada, se dejó reposar a temperatura ambiente. Para la medición de las absorbancias se empleó un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (EAG). Se utilizó una curva de calibración a partir de un stock de ácido gálico con diferentes concentraciones que van en un rango de 50 a 300 ppm. La determinación se realizó por triplicado.

2.4.5. Análisis cuantitativo de la concentración de flavonoides totales

Para el análisis cuantitativo de la concentración de flavonoides totales se empleó el método de espectrofotometría ultravioleta-visible propuesto por **Dewanto,et al., (2002)** con ciertas modificaciones. Para el tratamiento se tomaron 250 µl de muestra líquida en un balón de 5 ml, se añadió 1,25ml de agua, más 75 µl de nitrito de sodio (NaNO₂) al 5%, se dejó actuar por 6min, se añadió 150 µl de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 10%, y se dejó actuar por 5min. Se añadieron 0.5ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1M. El volumen de cada balón se completó hasta el aforo (5ml) con agua destilada, y la absorbancia del complejo formado se midió a 500 y 510 nm.

2.4.6. Caracterización de los extractos

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

2.4.6.1. Cromatografía de capa fina (TLC):

Se llevaron a cabo en platos de cromatografía de capa fina previamente cubiertos con sílica gel 60 F₂₅₄, según la metodología propuesta por **Knežević et al., (2011)** con las respectivas modificaciones. Para ello, alícuotas de 12 µl de los extractos obtenidos con las mejores condiciones del proceso, se inyectaron sobre los platos y se revelaron con la fase móvil de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (15:40:4) respectivamente. Los platos se secaron con una corriente de aire por 10 minutos y se realizó la detección bajo luz ultravioleta a 254, 366 nm, o con luz blanca.

2.4.6.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):

Se llevaron a cabo en condiciones de gradiente; utilizando agua y metanol como fase móvil y una columna C18 como fase estacionaria, según la metodología descrita por **Guillarme et al., (2010)**, **Saéñz et al., (2009)** **Parets et al., (2016)** con ciertas modificaciones.

La identificación de los picos se los comparó con los tiempos de retención de los estándares ácido gálico y catequina. La cuantificación de los principales componentes identificados se calculó a partir de las curvas de calibrado correspondientes. Tomando en cuenta que se trabajó a distintas longitudes de onda 214, 254, 280, 320, 360 y 366 nm.

3. CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Optimización del Proceso de extracción

Las técnicas clásicas de extracción de solventes a partir de material vegetal se basan en la correcta elección del solvente y condiciones como la temperatura y agitación **Vinatoru et al., (1997)**, se demostró que la extracción por solventes de compuestos orgánicos en materiales vegetales es eficiente utilizando el ultrasonido **(Mason,1999)**.

Para la obtención de un extracto, es importante identificar la hierba deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles, en esta investigación se utilizaron hojas de Tarqui. Adicionalmente, la determinación de una técnica precisa de cosecha y métodos de preservación de la planta fueron de crucial importancia ya que el mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto **(Vinatoru, 2001)**.

3.2.Factor disolvente

La extracción por solventes se basa principalmente en la selección de solventes, temperatura o agitación, con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa. Se separan los compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles, usualmente agua y un solvente orgánico en la industria, este proceso se realiza continuamente bombeando una corriente orgánica y otra acuosa dentro de una mezcladora, donde se mezclan ambos componentes y se permite el incremento iónico hasta que se logra el equilibrio. La introducción de un transductor ultrasónico dentro de la unidad de extracción , puede incrementar considerablemente la eficiencia del método , debido a que por lo general se utilizan solventes fríos **(Azuola R., 2007)**

Para seleccionar el tipo de solvente se empleó 1g de la muestra y una relación volumen de disolvente de 1ml evitando la saturación del disolvente, se evaluaron diferentes

concentraciones de metanol, etanol (25%,50%,75%, puro) y agua. Todos los estudios se realizaron por triplicado y se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos en hojas de Tarqui, durante la optimización del factor disolvente.

Disolventes	Concentración del disolvente (%)	Concentración de Polifenoles en mg de Ácido Gálico/g de hoja seca *	Concentración de Flavonoides en mg de Catequina /g de hoja seca *
Agua	100	16,35 ± 0,14 ^a	4,46 ± 0,05 ⁱ
Metanol	99,8	22,97 ± 0,14 ^b	5,89 ± 0,09 ^j
	75	43,59 ± 0,21 ^c	6,52 ± 0,19 ^k
	50	8,17 ± 0,11 ^d	6,17 ± 0,04 ^t
	25	19,01 ± 0,16 ^e	5,96 ± 0,04 ^j
Etanol	99,8	9,23 ± 0,05 ^{d,f}	4,65 ± 0,13 ^m
	75	10,84 ± 0,34 ^f	7,60 ± 0,03 ⁿ
	50	56,47 ± 1,87 ^g	6,20 ± 0,04 ^t
	25	30,04 ± 3,90 ^h	6,89 ± 0,05 ^p

*Promedio de tres réplicas y desviación estándar a 760nm y 510 nm para la determinación de polifenoles y flavonoides respectivamente.

a,b,c,d,e,f,g,h Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de polifenoles con respecto a la variación de disolventes.

i,j,k,t,m,n,p Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de flavonoides con respecto a la variación de disolventes.

A los resultados obtenidos de concentración de polifenoles en mg de ácido gálico/g de hoja seca y concentración de flavonoides en mg de catequina /g de hoja seca, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las variables con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, como se muestran en la tabla 1, prueba de múltiples rangos, diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel 95% de confianza, existiendo buena correlación entre los valores obtenidos en cuanto al comportamiento se obtuvo mayor concentración para polifenoles al trabajar con una concentración del 50% de etanol 56,47 mg de ácido gálico/g de hoja seca , y para flavonoides trabajando al 75% de etanol 7,60 mg de catequina/g de hoja seca , se encontraron en la literatura resultados similares al arrojado en el presente estudio

(Victorio, 2009). Generalmente grandes cantidades de disolvente pueden disolver constituyentes más eficientemente, conduciendo a un aumento del rendimiento de extracción (Li, Hui y Chen, Bo y Yao, 2005), por el contrario, pequeñas relaciones de disolvente material vegetal pueden propiciar bajos rendimientos de extracción debido a que se alcanza el equilibrio (Valachovic et al., 2001) y al no existir una diferencia de concentración del metabolito en la fase líquida y dentro de la matriz vegetal finaliza el proceso de transferencia de masa. Por consiguiente, la elección de volúmenes apropiados de disolventes es una tarea muy importante.

3.3. Factor temperatura

El efecto de la temperatura en la extracción de polifenoles y flavonoides es fundamental ya que su estandarización evita la desnaturalización de los compuestos presentes en la planta tarqui, las temperaturas de experimentación fueron: 30, 40, 50 y 60 °C, logrando establecer una temperatura óptima de 50°C tanto para la extracción de polifenoles como flavonoides como se muestra en la tabla 2, según (Azuola R., 2007) debido al aumento en el número de las burbujas de cavitación formadas al subir la temperatura.

Tabla 2. Concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos en hojas de Tarqui, durante la optimización del factor temperatura.

		Concentración de Polifenoles en mg de Ácido Gálico/g de hoja seca *	Concentración de Flavonoides en mg de Catequina /g de hoja seca *
Concentración de Disolvente		Etanol 50%	Etanol 75%
Temperatura °C	30	35,62 ± 0,21 ^a	7,38 ± 0,03 ^e
	40	41,33 ± 0,14 ^b	7,61 ± 0,05 ^f
	50	46,03 ± 0,21 ^c	7,87 ± 0,05 ^g
	60	47,32 ± 0,21 ^d	7,39 ± 0,10 ^e

*Promedio de tres réplicas y desviación estándar a 760nm y 510 nm para la determinación de polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{a,b,c,d} Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de polifenoles con respecto a la variación de temperatura.

^{e,f,g} Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de flavonoides con respecto a la variación de temperatura.

La tabla 2 muestra que el compuesto activo se extrajo a diferentes temperaturas con el disolvente anteriormente seleccionado mostrando los efectos de la temperatura de extracción en la concentración de polifenoles 46,03 mg de ácido gálico/g de hoja seca y flavonoides 7,87 mg de catequina/g de hoja seca, la temperatura óptima de extracción fue de 50° C, probándose su eficiencia tanto para polifenoles como para flavonoides. Sin embargo, tanto el contenido de polifenoles como flavonoides disminuye a medida que la temperatura de extracción sobrepasa los 60°C, en la degradación térmica los compuestos químicos sufren cambios significativos en su estructura (pérdida de uno o más átomos de la estructura fundamental) debido a la acción de altas temperaturas resultando en una pérdida de las propiedades del compuesto (Costa J, 1993).

3.4.Factor tiempo

En el estudio de la influencia del tiempo de extracción se utilizó el baño de ultrasonido a diferentes tiempos de exposición (5,10,20min) de 1 g de material vegetal, una relación volumen de disolvente/ material vegetal de 1 ml/g y, se empleó como disolvente etanol al 50 %, para polifenoles y etanol al 75% para flavonoides todos los estudios se realizaron por triplicado. Los resultados se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos en hojas de Tarqui, durante la optimización del factor tiempo.

	Temperatura °C	Tiempo (min)	Concentración
Concentración de Polifenoles en mg de Ácido Gálico/g de hoja seca *	50	5	37,10 ± 0,08^a
		10	37,01 ± 0,14 ^a
		20	35,71 ± 0,21 ^c
	60	5	37,42 ± 0,14 ^d
		10	37,42 ± 0,23 ^d
		20	35,30 ± 0,21 ^g
Concentración de Flavonoides en mg de Catequina /g de hoja seca *	50	5	7,38 ± 0,08 ^h
		10	7,60 ± 0,05 ^h
		20	9,04 ± 0,03^k

*Promedio de tres réplicas y desviación estándar a 760nm y 510 nm para la determinación de polifenoles y flavonoides respectivamente.

^{a,c,d,g} Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de polifenoles con respecto a la variación de tiempo.

^{h,k} Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de flavonoides con respecto a la variación de tiempo.

La relación positiva entre el factor tiempo y la variable respuesta concentración señala un incremento en la cantidad de flavonoides totales extraídos a mayores tiempos de extracción, lo cual se explica teniéndose en cuenta que la difusión es un fenómeno que depende del tiempo por lo que entre mayor tiempo transcurra, mayor penetración del solvente en el tejido del material vegetal se obtendrá **(Yolmeh et al., 2014)**.

La maximización de la cantidad de FT extraídos redundaría en el mayor aprovechamiento del material vegetal disponible, según **Viuda et al., (2012)**, el uso apropiado del tiempo del proceso y de la cantidad de solvente utilizado resulta de importancia si se pone en consideración las actividades antimicrobiana y antioxidante del compuesto a extraer .

Bajo las condiciones del presente estudio es posible obtener extractos de hojas de Tarqui con el mayor contenido de flavonoides totales ($37,42 \pm 0,14$ mg GA/g de hoja seca), cuando se trabaja durante un tiempo de extracción de 20 minutos; para polifenoles no se determinaron diferencias significativas entre 5 y 10 min , por lo cual el óptimo fue de 5min ($7,38 \pm 0,08$ mg QT /g de hoja seca) **(Tatiana et al., 2016)**.

3.5.Factor desgaste del material vegetal.

Para la maximización de la cantidad de flavonoides y polifenoles totales, se extrajeron 5 veces consecutivas mostrando un efecto estadísticamente significativo hasta 4 ciclos de extracción aprovechando al máximo el material disponible, los datos se observan en la tabla 4, la gráfica 1 y 2 muestran el porcentaje de recuperación para flavonoides (98,91%) y para polifenoles (97,74%), respectivamente.

Tabla 4. Concentración de polifenoles y flavonoides obtenidos en hojas de Tarqui, durante la optimización desgaste vegetal.

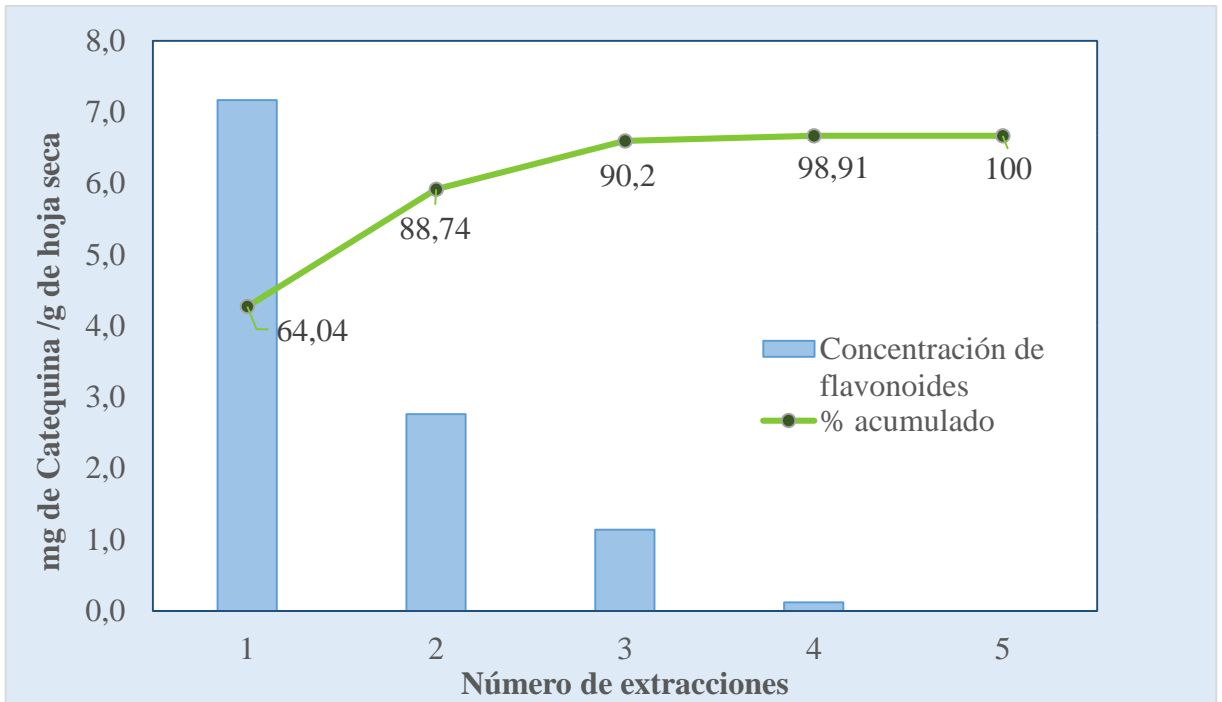
	Temperatura °C	Número de extracciones	Concentración
Concentración de Polifenoles en mg de Ácido Gálico/g de hoja seca *	50	1	15,56 ± 0,09 ^a
		2	8,62 ± 0,71 ^b
		3	1,86 ± 0,15 ^c
		4	0,60 ± 0,22 ^d
		5	0,00 ± 0,00 ^d
	60	1	13,04 ± 0,09 ^e
		2	6,41 ± 0,07 ^f
		3	1,52 ± 0,07 ^g
		4	0,03 ± 0,11 ^h
		5	0,00 ± 0,00 ^h
Concentración de Flavonoides en mg de Catequina /g de hoja seca *	50	1	7,17 ± 0,07 ^j
		2	2,76 ± 0,05 ^k
		3	1,14 ± 0,13 ^m
		4	0,12 ± 0,05 ^m
		5	< LOD

*Promedio de tres réplicas y desviación estándar a 760nm y 510 nm para la determinación de polifenoles y flavonoides respectivamente.

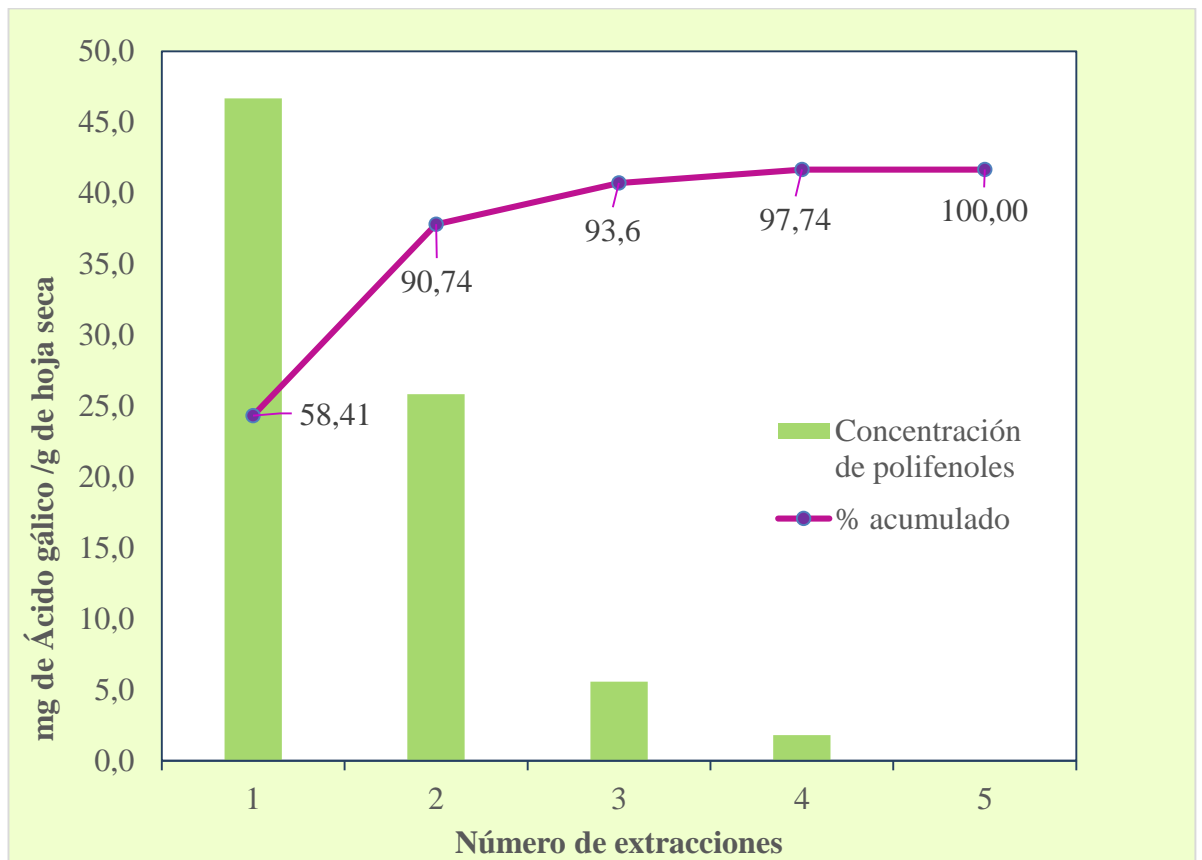
a,b,c,d,e,f,g,h Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de polifenoles con respecto al desgaste del material vegetal .

j,k,m Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95,0% de confianza entre concentraciones de flavonoides con al desgaste del material vegetal.

Se determinaron las mejores condiciones que favorecen el proceso de extracción a una temperatura de 50 °C, un tiempo de ultrasonido de 5 min para polifenoles y 20 minutos para flavonoides y una relación concentración del disolvente/ material vegetal 50:50 y 75:25 de etanol mencionados anteriormente.(**Annona, 2016**)



Gráfica 1. Desgaste del material vegetal en la optimización del proceso de extracción de flavonoides; expresado en número de extracciones vs concentración de flavonoides.



Gráfica 2. Desgaste del material vegetal en la optimización del proceso de extracción de polifenoles; expresado en número de extracciones vs concentración de polifenoles.

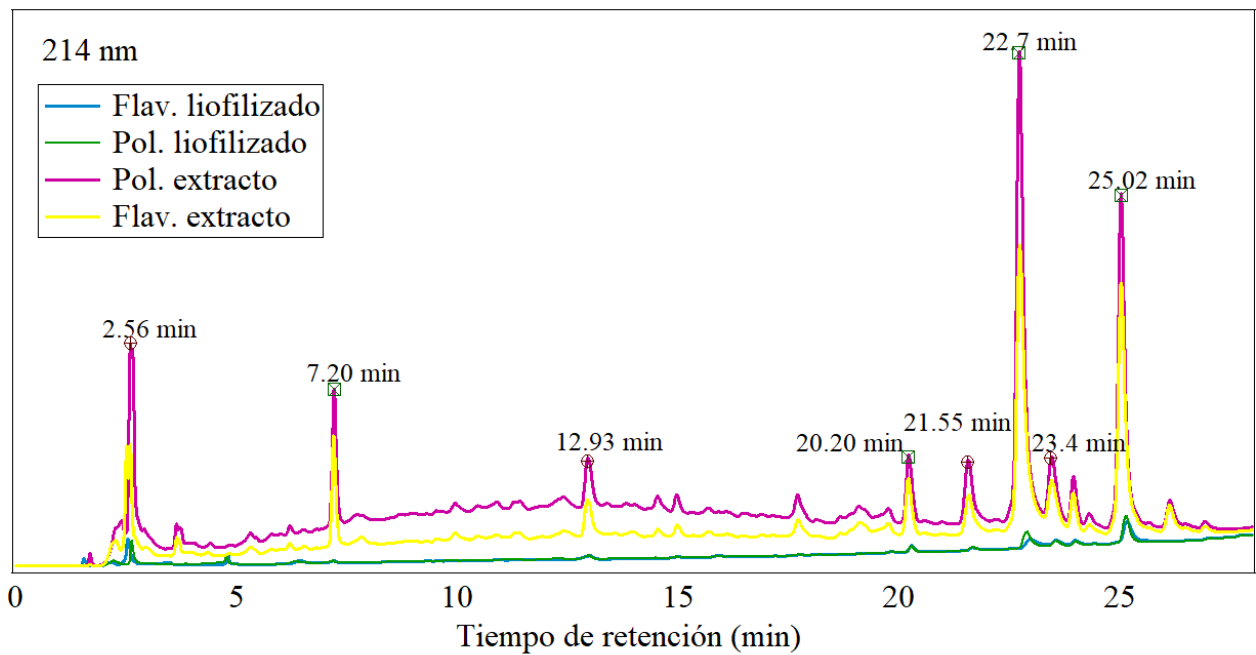
Las gráficas 1 y 2 muestran el número de extracciones necesarias para obtener la mayor cantidad de extracto vegetal, trabajando con cuatro extracciones tanto para polifenoles como para flavonoides, logrando extraer 98,91% y 97,74% respectivamente.

3.6. Caracterización

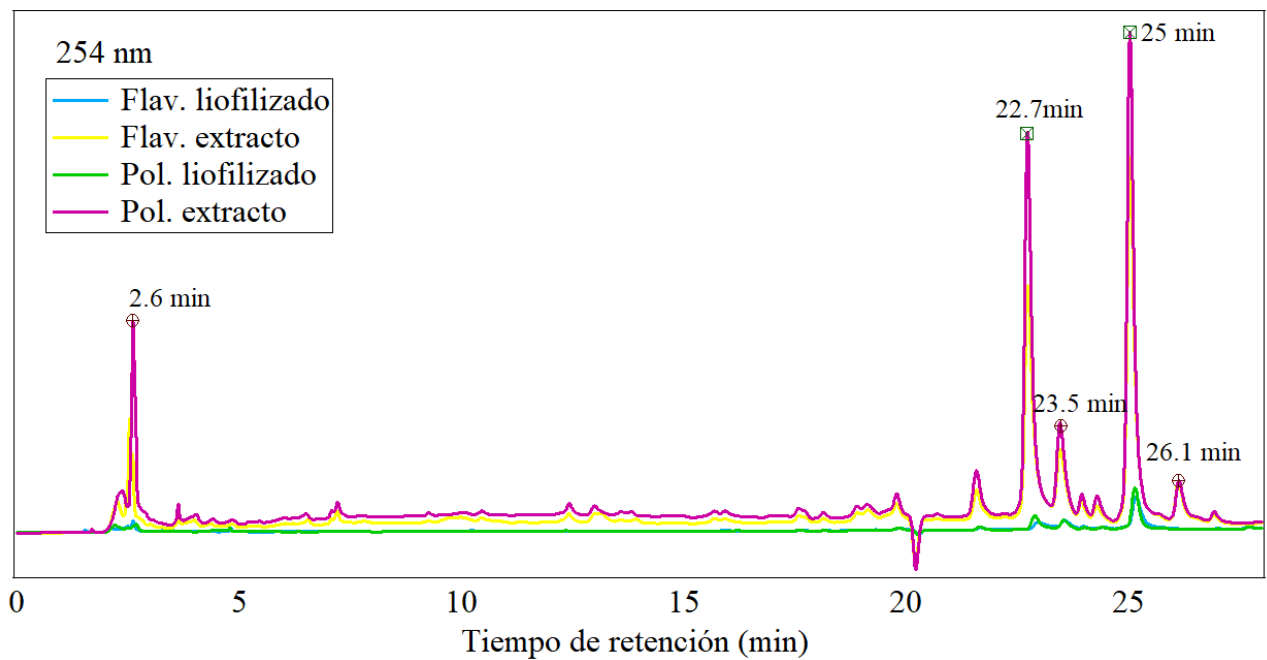
Los flavonoides se caracterizan por la solubilidad frente a solventes polares, su carácter fenólico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro electromagnético (Romero, Carlos R, Jorge, Nelly L, & Gómez, 2006). Existen varias técnicas para la identificación de flavonoides y polifenoles, para este estudio se emplearon la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de capa fina (TLC). La etapa del aislamiento y purificación es importante en la separación e identificación de los flavonoides y polifenoles presentes en el extracto de tarqui.

3.6.1. HPLC

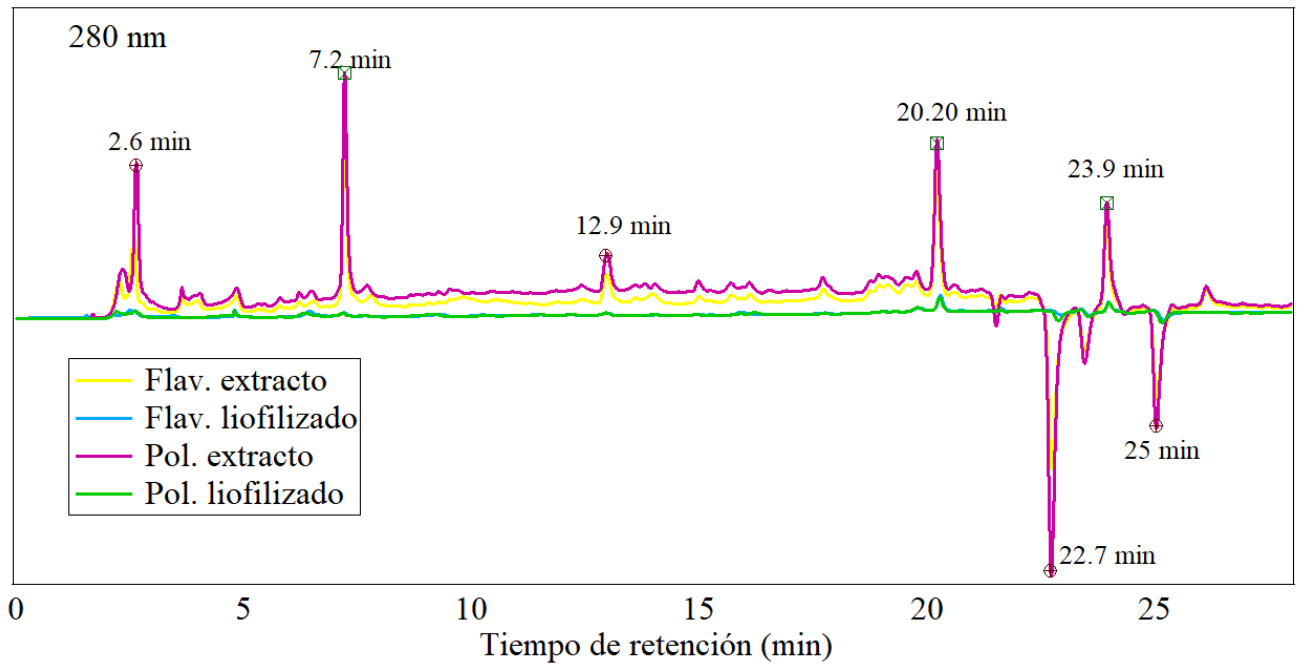
Para una mejor caracterización de los extractos de tarqui se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en la cual se pesaron 0,3mg de muestra liofilizada/ml, previamente filtrados por membrana de 0,22 μ m, con un volumen de inyección de 20 μ l a 130,5 bares y un flujo de 0,8ml/min, a diferentes longitudes de onda (254, 214, 366, 320, 280 y 360 nm), se obtuvieron un total de 6 cromatogramas los mismos se pueden visualizar en las gráficas (4,5,6,7,8,9). Al comparar los tiempos de retención de los estándares (ácido gálico y catequina), en los cuales no fueron identificados. Sin embargo, se observó la separación de varios compuestos con similitud entre los espectros uv de los picos obtenidos para los extractos y el material de referencia, demostrando que estos se obtienen con elevada pureza, lo cual evidencia que no existe co-elución de metabolitos ni productos de degradación en el tiempo de retención, por lo que nos encontramos ante un método selectivo, existiendo una mayor concentración de los compuestos en el extracto etanólico, lo que sugiere que este es más eficiente al lograr un mayor rendimiento de los compuestos presentes en tarqui.



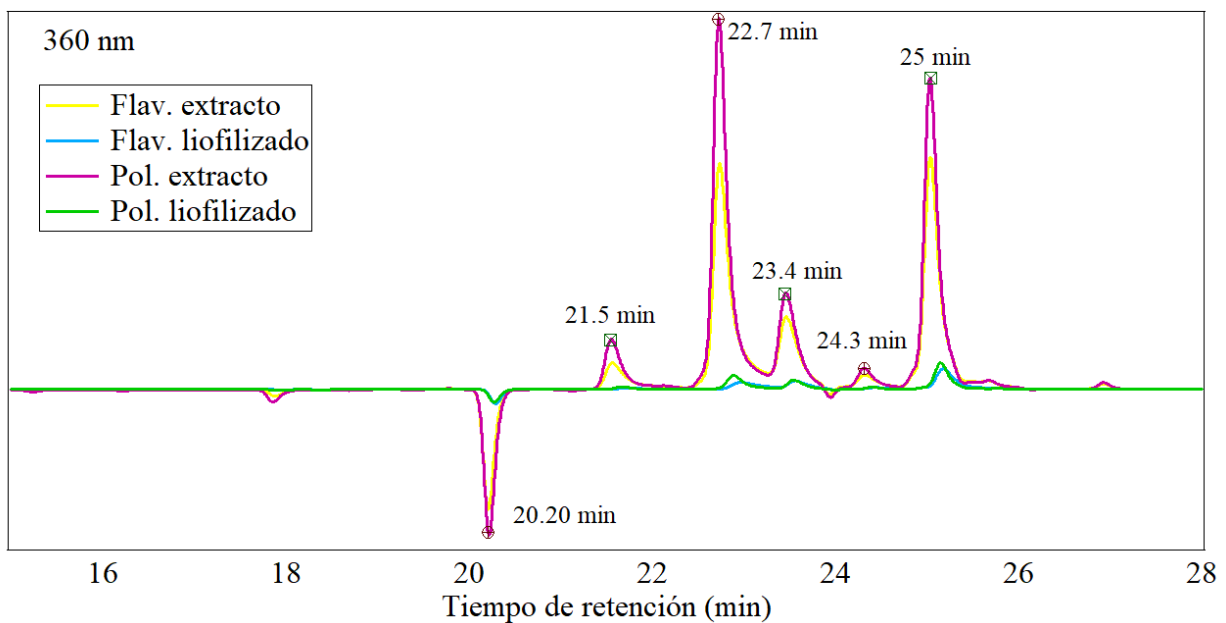
Gráfica 4. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 214nm.



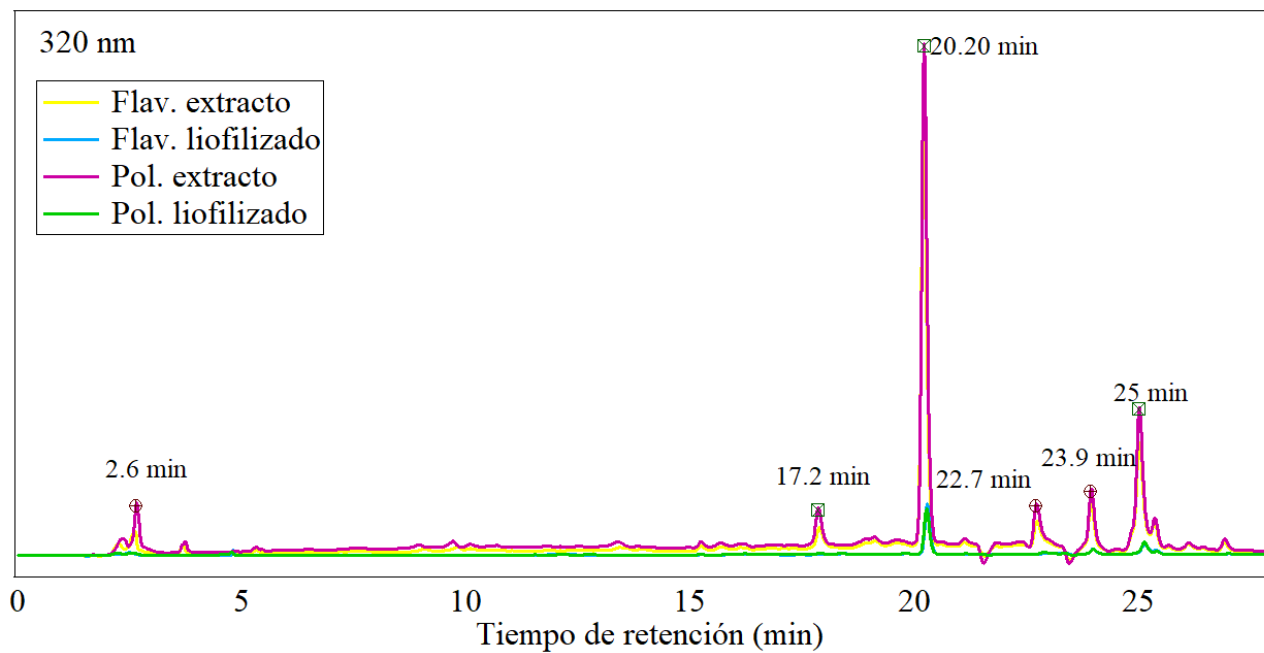
Gráfica 5. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 254nm.



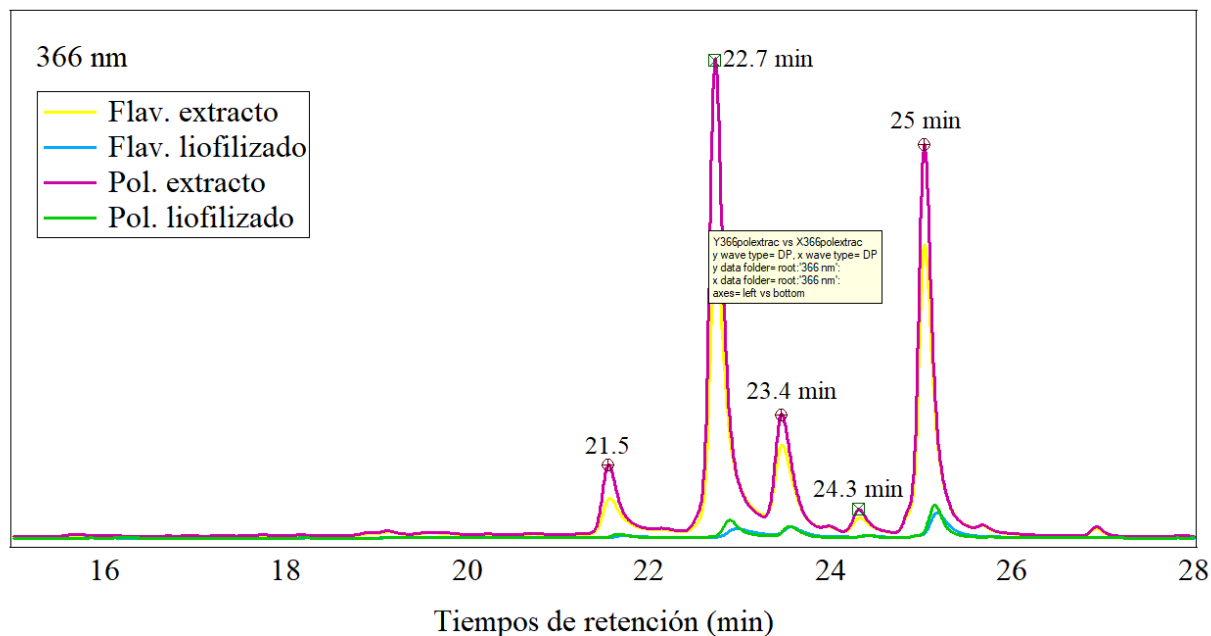
Gráfica 6. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 280nm.



Gráfica 7. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 320nm.



Gráfica 8. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 360nm.



Gráfica 9. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 366nm.

3.6.2. TLC

Las placas cromatográficas se realizaron a partir de condiciones estandarizadas, con pruebas anteriores se demostró que, a una relación de tolueno, acetato de etilo, ácido fórmico (32:40:4) respectivamente se consigue una mayor separación de los compuestos. Se inyectaron 12µl del extracto y 2µl de los patrones ácido gálico y catequina. Los flavonoides se caracterizan por la presencia de un doble enlace en C2 y de un grupo hidroxilo en C3 en el heterociclo. Se conocen 450 tipos de agliconas y 900 tipos glucósidos aproximadamente (Iwashina T., 2000) en la figuras 4 se corrió a una longitud de onda de 254nm , figura 5 a 366nm , figura 6 con luz blanca , lo que permitió una mejor identificación de los compuestos separados.

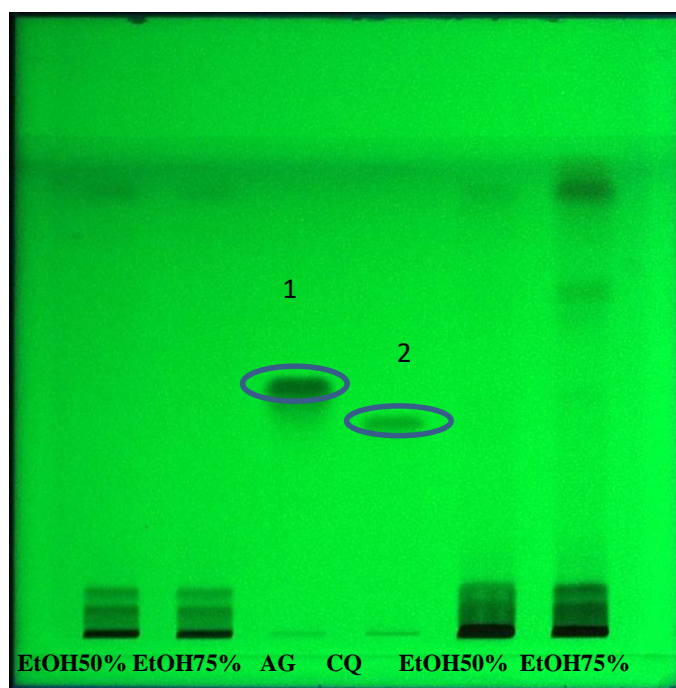


Figura 4. Placa cromatográfica a una longitud de onda de 254nm con patrones de ácido gálico (AG), Catequina (CQ) y extractos de etanol al 50% y etanol al 75%.

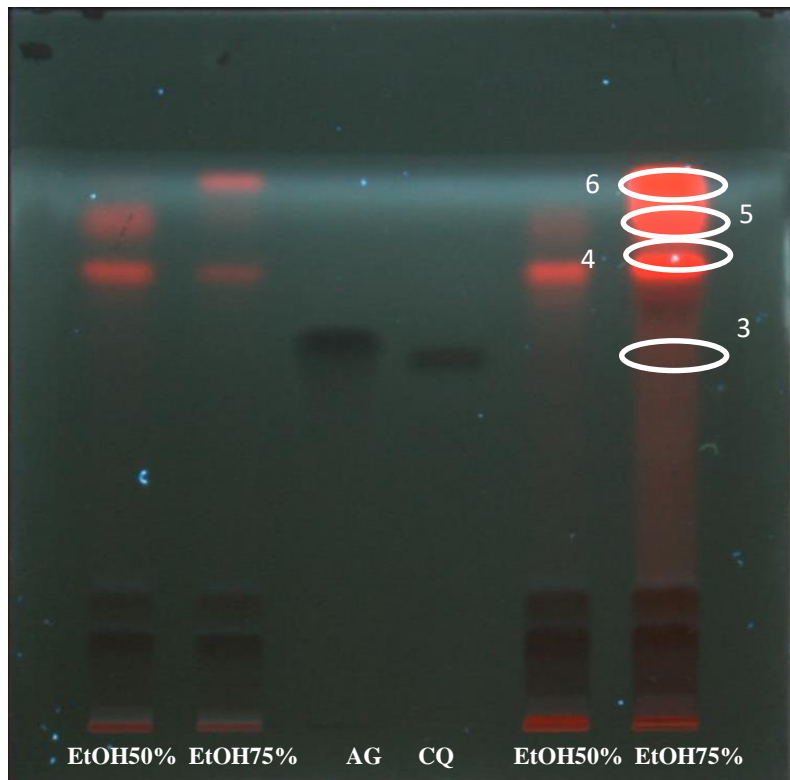


Figura 5. Placa cromatografía a una longitud de onda de 366nm con patrones de ácido gálico (AG), Catequina (CQ) y extractos de etanol al 50% y etanol al 75%.

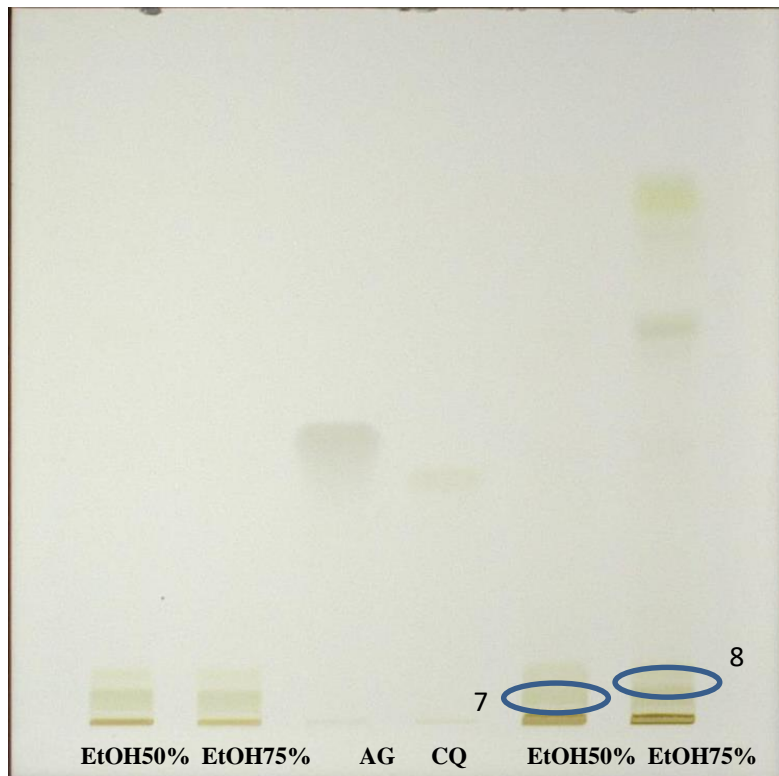


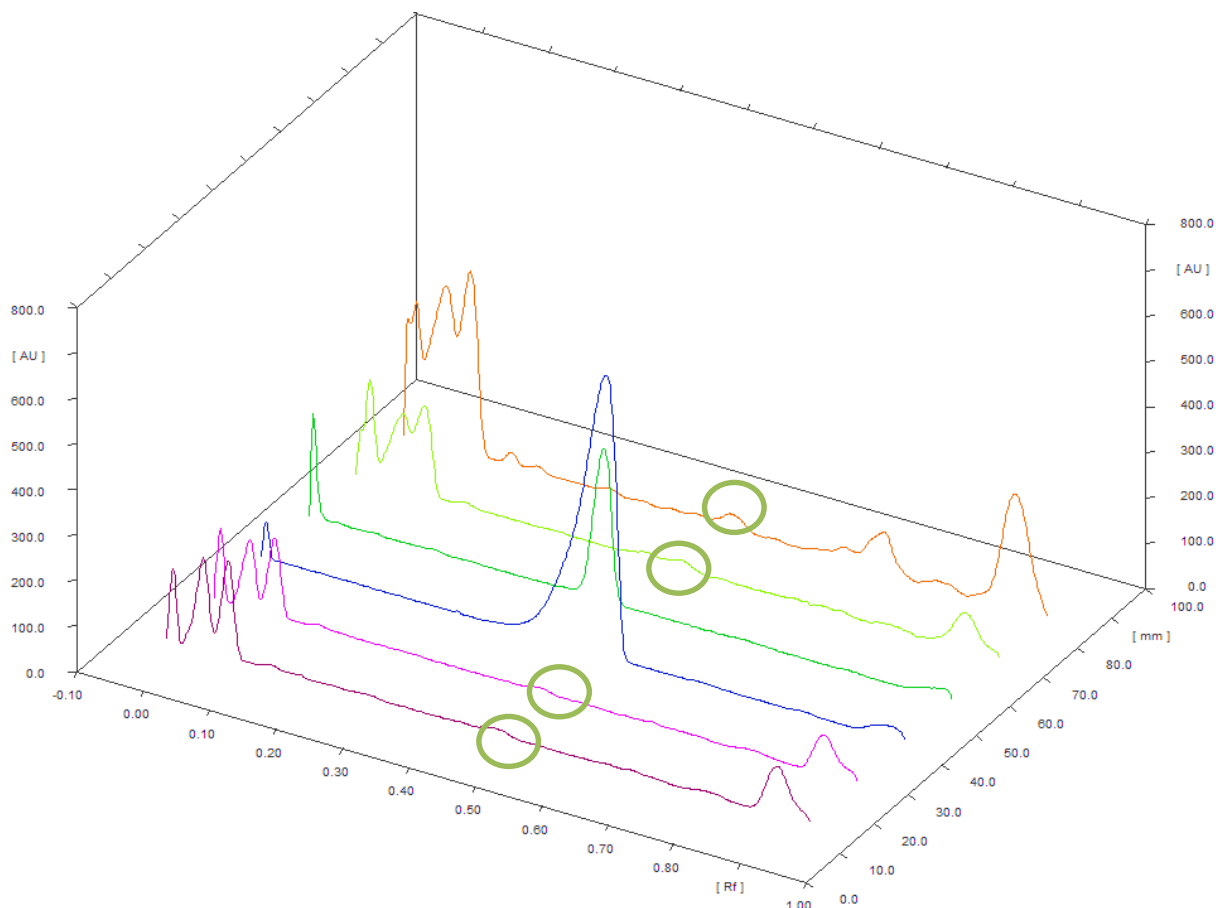
Figura 6. Placa cromatográfica con luz blanca con patrones de ácido gálico (AG), Catequina (CQ) y extractos de etanol al 50% y etanol al 75%.

Tabla 5. Factor de retención para las bandas reveladas en TLC

Banda	Identificación	X_s (cm)	X_m(cm)	R_f
1	AG	7,42	4,12	0,56
2	CQ	7,42	3,53	0,48
3	-	7,42	3,54	0,48
4	-	7,42	6,33	0,85
5	-	7,42	6,79	0,92
6	-	7,42	7,32	0,98
7	-	7,42	0,65	0,09
8	-	7,42	1,1	0,15

Fuente: Laboratorio de Análisis Instrumental de Canje de Deuda

En las placas de TLC, se obtuvieron 8 bandas, las cuales arrojan información cualitativa de los compuestos, puesto que la solubilidad depende de la forma en que se encuentra y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en etanol, metanol y n-butanol, mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas altamente metoxilados son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (COSTA O. JORGE, 1993). Razón por la cual un aumento de cualquiera de los dos radicales, producirá un cambio visible al rojo, mientras que la metilación y glucosilación producen un cambio visible al azul. Las bandas 3,4 ,5 y 6 son de color rojo, además que la intensidad de color de las bandas es un indicativo de concentración de compuestos, como se visualizan en las bandas 7 y 8, en la tabla 5 se muestran los factores de retención para las bandas reveladas en TLC a continuación en la gráfica 9 de espectro tridimensional indica los R_f de los extractos de tarqui en comparación con los patrones catequina y ácido gálico corridos en el equipo de TLC, se puede visualizar que existe catequina en el extracto de tarqui aunque a una intensidad menor, pero no se presencia la existencia de ácido gálico.



Gráfica 9. Espectro tridimensional, el cual muestra los Rf de los extractos y patrones corridos en el equipo de TLC

3.7.Verificación de hipótesis

Al realizar la experimentación y en base a los resultados obtenidos se demuestra que existe diferencias significativas en la estandarización de la concentración tanto de polifenoles como de flavonoides por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

3.7.1. Factor disolvente, temperatura, tiempo

Realizando el análisis estadístico por el método de rangos dígitos como resultado que existe diferencias significativas en el tipo de disolvente y concentración del disolvente tiempo y temperatura utilizado para la extracción de tarqui.

4. CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.Conclusiones

Se optimizó satisfactoriamente el proceso de extracción para la cuantificación de flavonoides y polifenoles en hojas de tarqui a través de la elección del mejor solvente, temperatura y tiempo, tratando de obtener el mayor rendimiento del material vegetal. Es así que para polifenoles las mejores condiciones de extracción fueron etanol al 50%, 50°C y 5min, mientras que para flavonoides fueron etanol al 75%, 50°C y 20min.

Se cuantificó el contenido de polifenoles y flavonoides utilizando únicamente los mejores tratamientos del proceso de optimización obteniendo un contenido de flavonoides totales de ($37,42 \pm 0,14$ mg GA/g de hoja seca), y para polifenoles de ($7,38 \pm 0,08$ mg QT /g de hoja seca); con un porcentaje de recuperación del 98,91% y de 97,74 % respectivamente.

Se caracterizaron los extractos de tarqui por cromatografía en capa fina (TLC), con una relación de tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico de 32:40:4, y un volumen de inyección para el extracto de 12 μ l y los patrones de 2 μ l en donde se logró la separación de ocho bandas a 354,366 nm y luz blanca, los estándares AG y CQ presentaron una polaridad intermedia, con un Rf de 0,56 y 0,48 respectivamente.

Se caracterizaron los extractos de tarqui por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con un volumen de inyección de 20 μ l, a diferentes longitudes de onda (254, 214, 366, 329 ,280 y 360 nm) y usando AG y CQ como estándares de referencia, los cuales no fueron identificados en los extractos bajo las condiciones de análisis. Sin embargo, se observó la separación de varios compuestos que muestran perfiles cromatográficos similares a las diferentes longitudes de onda ensayadas. La composición de flavonoides y polifenoles depende en gran medida de la especie vegetal, su etapa de desarrollo, el tipo de tejido, la localización subcelular y las influencias ecológicas clave de origen biótico y abiótico.

4.2.Recomendaciones

En la determinación de polifenoles y flavonoides es recomendable utilizar soluciones recién preparadas ya que este reactivo es fotosensible, de lo contrario afectaría en los resultados obtenidos.

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

Se recomienda continuar con la investigación de TARQUI *Myrsine andina* (Mez) Pipoly, no solo en las hojas sino también en las raíces, flores y tronco, con la finalidad de identificar metabolitos secundarios de interés en el campo de la medicina y de los alimentos.

5. CAPITULO IV.- MATERIALES DE REFERENCIA

- Alan Crozier, Michael N. Clifford, H. A. (2006). *Metabolitos secundarios de plantas: ocurrencia, estructura y papel en la dieta humana* (B. Publishing (ed.)). <http://eprints.gla.ac.uk/84846/>
- Annona, L. (2016). *Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de Annona muricata L . Optimization of variables for extraction of flavonoids from. 21(3), 298–308.*
- Ávalos, A., & Elena, G. (2009). *Metabolismo secundario de plantas. 2(3), 119–145.*
- Azuola R., V. P. (2007). *Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). 1, 11.*
- Calderón, P., & Calderón, R. P. (2000). *NACIÓN DE VITAMINA A EN ALIMENTOS INFANTILES INSTANTÁNEOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC).*
- Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA). (1993). *Especies forestales nativas de los Andes Ecuatorianos, resultados preliminares de algunas experiencias.*
- COSTA O. JORGE, L. D. U. O. (1993). “Los flavonoides como compuestos biológicamente activo.” *Volumen 7, 73–86.*
- Dewanto, V., Xianzhong, W., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(10), 3010–3014.* <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Dianelis Pascual , Esperanza Pérez, Ivette Morales, C., & Eugenia. (2014). *Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. 18(10), 1467–1474.*
- Elleman, L. (1990). *El uso de la madera del Bosque Montano por los Saraguros.* (Abya-yala.).

- Empresario, N. (2009). *La biodiversidad de Ecuador*. <https://www.e-travelware.com/ztravel/ecuador.htm>
- Gallegos, M. (2016). *Las plantas medicinales : principal alternativa para el cuidado de la salud , en la población rural de Babahoyo ,. 77(4).*
- Gaona, C. (2014). *Redalyc.USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS PARA REDUCIR LA METANOGÉNESIS RUMINAL.*
- Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, 10(3)*, 182–217.
- Guillarme, D., Casetta, C., Bicchi, C., & Veuthey, J. L. (2010). High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A, 1217(44)*, 6882–6890.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.060>
- Hashim, H. (2018). *chromatography and HPLC principles. January.*
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33635.25126>
- Hassler M. (2019). *Plantas del mundo: listas de verificación sinonímicas de las plantas vasculares del mundo (versión Nov 2018).*
<https://www.gbif.org/es/species/152361041>
- Iwashina T. (2000). *La estructura y distribución de los flavonoides en plantas.* 113,287-99.
- Li, Hui y Chen, Bo y Yao, S. (2005). Aplicación de la técnica ultrasónica para extraer ácido clorogénico de *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ecografía Por Ultrasonidos, 12*, 295–300.
- Mason, Timothy J and Mason, T. J. (1999). *Sonochemistry*. Oxford University Press New York.
- Oliver, J. (2013). *ÁRBOLES Y ARBUSTOS DE LOS RÍOS DE CUENCA AZUAY - ECUADOR*. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue

9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Paladino, C., & Zuritz, C. A. (2008). *FENÓLICOS CONTENIDOS EN LAS SEMILLAS DE LA VID (Vitis vinifera l.)*.

Parets, L., Alechaga, É., Núñez, O., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., & Puignou, L. (2016). Ultrahigh pressure liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry for the determination of polyphenolic profiles in the characterization and classification of cranberry-based pharmaceutical preparations and natural ext. *Analytical Methods*, 8(22), 4363–4378. <https://doi.org/10.1039/c6ay00929h>

Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68–81.

Pérez, A. (1999). “*Hierbas Buenas*”, (Editorial & A. Magna (eds.)).

Romero, Carlos R, Jorge, Nelly L, & Gómez, M. E. (2006). (2006). *Caracterización de la Especie Ilex Paraguariensis mediante Análisis por Cromatografía Gaseosa de sus Componentes Volátiles*. 17, 3–6. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642006000200002&nrm=iso

Saénz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114(2), 616–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.095>

Tatiana, C., Rincón, S., Luz, I. G., Gómez, C., & Zapata, I. J. E. (2016). *Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de Bixa orellana L. (achiote)* Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from leaves of *Bixa orellana L. (achiote)*. 21(2), 133–144.

Terranova. (2001). Enciclopedia agropecuaria Terranova. In *Terranova* (2a ed).

Valachovic, P., Pechova, A., & Mason, T. J. (2001). *Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction*. 8, 6–12.

- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, *111*(4), 816–823. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.054>
- Victorio, CP y Kuster, RM y Lage, C. (2009). Detección de flavonoides en *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. hojas usando cromatografía líquida de alto rendimiento. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 147–153.
- Vinatoru, M y Toma, Maricela y Radu, Otilia y Filip, PI y Lazurca, D y Mason, T. (1997). El uso de ultrasonido para la extracción de principios bioactivos de materiales vegetales. *Ultrasonografía Sonoquímica*, *4*, 135–139.
- Vinatoru, M. (2001). Una visión general de la extracción asistida por ultrasonidos de los principios bioactivos de las hierbas. *Ultrasonografía Sonoquímica*, *8*, 303–313.
- Viuda-martos, M., Ciro-gómez, G. L., Ruiz-navajas, Y., Zapata-montoya, J. E., Sendra, E., Pérez-álvarez, J. A., & Fernández-lópez, J. (2012). *IN VITRO ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM ANNATTO (BIXA ORELLANA L .) LEAVES AND SEEDS*. 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x>
- Vladimir-Kneževic, S., Blažekovic, 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>
- White, L. B. (Linda B., & Foster, S. (2004). *El recetario herbario : las mejores alternativas naturales a los medicamentos*. Rodale.
- Yolmeh, M., Najafi, M. B. H., & Farhoosh, R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *FOOD CHEMISTRY*, *155*, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.059>

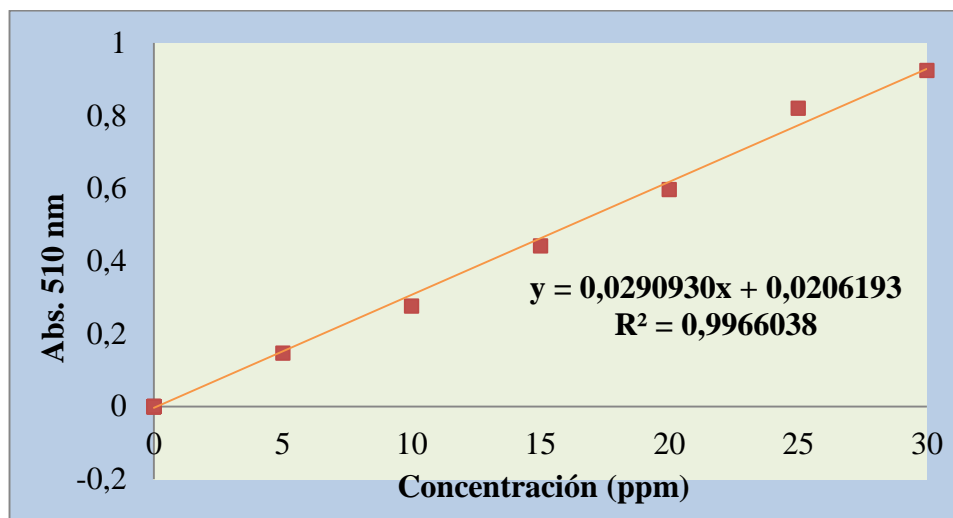
ANEXOS

Anexos

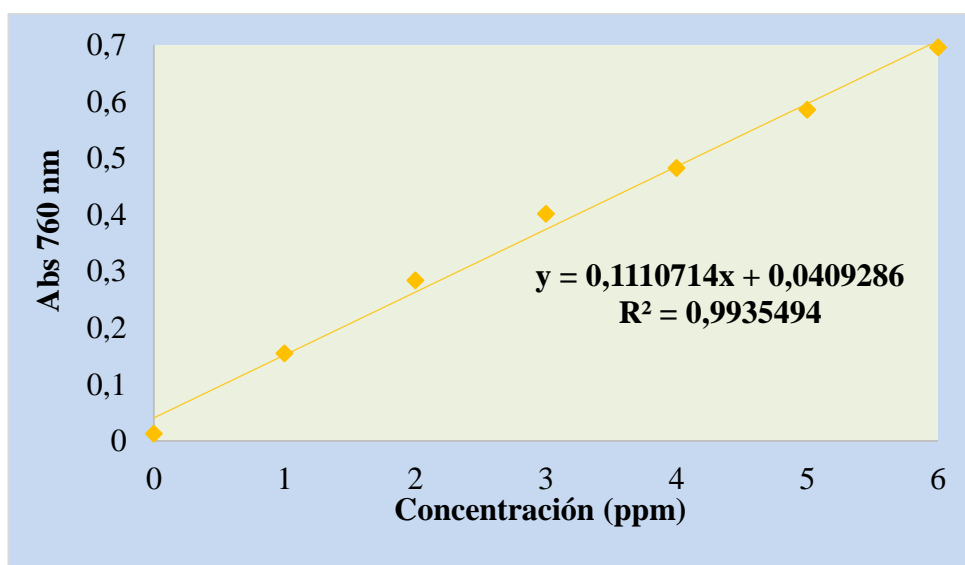


Curva de calibrado

Gráfica I. Curva de calibración de catequina para la determinación de flavonoides



Gráfica II. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de polifenoles



Factor disolvente

Tabla I. Datos obtenidos a partir de la extracción de flavonoides a distintos disolventes

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio concentración	Desviación estándar
Agua								
0,1000	5	250	5	1	0,148	4,515	4,46	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,146	4,452		
0,1000	5	250	5	1	0,145	4,420		
Etanol 75%								
0,1000	5	250	5	1	0,245	7,566	7,60	0,03
0,1000	5	250	5	1	0,247	7,629		
0,1000	5	250	5	1	0,246	7,597		
Etanol 50%								
0,1000	5	250	5	1	0,201	6,182	6,20	0,04
0,1000	5	250	5	1	0,203	6,245		
0,1000	5	250	5	1	0,201	6,182		
Etanol 25%								
0,1000	5	250	5	1	0,224	6,905	6,89	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,222	6,842		
0,1000	5	250	5	1	0,225	6,937		
Etanol puro								
0,1000	5	250	5	1	0,156	4,766	4,65	0,13
0,1000	5	250	5	1	0,153	4,672		
0,1000	5	250	5	1	0,148	4,515		
Metanol 25%								
0,1000	5	250	5	1	0,193	5,921	5,96	0,04
0,1000	5	250	5	1	0,195	5,992		
0,1000	5	250	5	1	0,194	5,957		
Metanol 50%								
0,1000	5	250	5	1	0,201	6,203	6,17	0,04
0,1000	5	250	5	1	0,200	6,168		
0,1000	5	250	5	1	0,199	6,133		
Metanol 75%								
0,1000	5	250	5	1	0,204	6,308	6,52	0,19
0,1000	5	250	5	1	0,212	6,590		
0,1000	5	250	5	1	0,214	6,660		
Metanol puro								
0,1000	5	250	5	1	0,195	5,992	5,89	0,09
0,1000	5	250	5	1	0,190	5,816		
0,1000	5	250	5	1	0,191	5,851		

Tabla II. ANOVA para concentración de flavonoides por disolvente

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	23,6319	8	2,95399	385,55	0,0000
Intra grupos	0,137912	18	0,00766178		
Total (Corr.)	23,7699	26			

Tabla III. Pruebas de múltiples rangos para concentración de flavonoides por disolvente

Disolvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Agua	3	4,46233	X
Etanol 98.8%	3	4,651	X
Metanol 99.8%	3	5,88633	X
Metanol 25%	3	5,95667	X
Metanol 50%	3	6,168	X
Etanol 50%	3	6,203	X
Metanol 75%	3	6,51933	X
Etanol 25%	3	6,89467	X
Etanol 75%	3	7,59733	X

Tabla IV. Datos obtenidos a partir de la extracción de polifenoles a distintos disolventes

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio	Desviación estándar
Agua								
0,1000	5	50	5	1,5	0,281	16,211	16,35	0,14
0,1000	5	50	5	1,5	0,283	16,346		
0,1000	5	50	5	1,5	0,285	16,481		
Etanol 75%								
0,1000	5	50	5	1	0,287	11,077	10,84	0,34
0,1000	5	50	5	1	0,273	10,447		
0,1000	5	50	5	1	0,285	10,987		
Etanol 50%								
0,1000	5	50	5	6	0,242	54,309	56,47	1,87

0,1000	5	50	5	6	0,254	57,550		
0,1000	5	50	5	6	0,254	57,550		
Etanol 25%								
0,1000	5	50	5	3	0,230	25,534	30,04	3,90
0,1000	5	50	5	3	0,280	32,286		
0,1000	5	50	5	3	0,280	32,286		
Etanol puro								
0,1000	5	50	5	1	0,247	9,277	9,23	0,05
0,1000	5	50	5	1	0,246	9,232		
0,1000	5	50	5	1	0,245	9,186		
Metanol 25%								
0,1000	5	50	5	3	0,181	18,916	19,01	0,16
0,1000	5	50	5	3	0,183	19,186		
0,1000	5	50	5	3	0,181	18,916		
Metanol 50%								
0,1000	5	50	5	1	0,220	8,061	8,17	0,11
0,1000	5	50	5	1	0,222	8,151		
0,1000	5	50	5	1	0,225	8,286		
Metanol 75%								
0,1000	5	50	5	3	0,364	43,630	43,59	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,365	43,765		
0,1000	5	50	5	3	0,362	43,360		
Metanol puro								
0,1000	5	50	5	3	0,211	22,968	22,97	0,14
0,1000	5	50	5	3	0,210	22,833		
0,1000	5	50	5	3	0,212	23,103		

Tabla V. ANOVA para concentración de polifenoles por disolvente

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6602,71	8	825,339	392,35	0,0000
Intra grupos	37,8643	18	2,10357		
Total (Corr.)	6640,57	26			

Tabla VI. Pruebas de múltiples rangos para concentración de polifenoles por disolvente

Disolvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Metanol 50%	3	8,166	X
Etanol 98.8%	3	9,23167	XX
Etanol 75%	3	10,837	X
Agua	3	16,346	X
Metanol 25%	3	19,006	X
Metanol 99.8%	3	22,968	X
Etanol 25%	3	30,0353	X
Metanol 75%	3	43,585	X
Etanol 50%	3	56,4697	X

Factor Temperatura

Tabla VII. Datos obtenidos a partir de la extracción de flavonoides a distintas temperaturas

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio Abs 510nm	Desviación estándar
Etanol (75%) Temperatura 30								
0,1000	5	250	5	1	0,240	7,408	7,38	0,03
0,1000	5	250	5	1	0,238	7,346		
0,1000	5	250	5	1	0,239	7,377		
Etanol (75%) Temperatura 40								
0,1000	5	250	5	1	0,245	7,566	7,61	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,246	7,597		
0,1000	5	250	5	1	0,248	7,660		
Etanol (75%) Temperatura 50								
0,1000	5	250	5	1	0,255	7,880	7,87	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,256	7,912		
0,1000	5	250	5	1	0,253	7,817		
Etanol (75%) Temperatura 60								
0,1000	5	250	5	1	0,236	7,283	7,39	0,10
0,1000	5	250	5	1	0,240	7,408		
0,1000	5	250	5	1	0,242	7,471		

Tabla VIII. ANOVA para concentración de flavonoides a diferentes temperaturas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,484403	3	0,161468	43,79	0,0000
Intra grupos	0,029496	8	0,003687		
Total (Corr.)	0,513899	11			

Tabla IX. Pruebas de múltiples rangos para concentración de flavonoides a diferentes temperaturas

TEMPERATURA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
30°C	3	7,377	X
60°C	3	7,38733	X
40°C	3	7,60767	X
50°C	3	7,86967	X

Tabla X. Datos obtenidos a partir de la extracción de polifenoles a diferentes temperaturas

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio	Desviación estándar
Etanol (50%) Temperatura 30								
0,1000	5	50	5	3	0,306	35,797	35,62	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,303	35,392		
0,1000	5	50	5	3	0,305	35,662		
Etanol (50%) Temperatura 40								
0,1000	5	50	5	3	0,347	41,334	41,33	0,14
0,1000	5	50	5	3	0,348	41,469		
0,1000	5	50	5	3	0,346	41,199		
Etanol (50%) Temperatura 50								
0,1000	5	50	5	3	0,382	46,061	46,02	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,380	45,791		
0,1000	5	50	5	3	0,383	46,196		
Etanol (50%) Temperatura 60								
0,1000	5	50	5	3	0,391	47,277	47,32	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,390	47,141		
0,1000	5	50	5	3	0,393	47,547		

Tabla XI. ANOVA para concentración de polifenoles por diferentes temperaturas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	252,975	3	84,3251	2310,59	0,0000
Intra grupos	0,291961	8	0,0364951		
Total (Corr.)	253,267	11			

Tabla XII. Pruebas de múltiples rangos para concentración de polifenoles por diferentes temperaturas

TEMPERATURA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
30°C	3	35,617	X
40°C	3	41,334	X
50°C	3	46,016	X
60°C	3	47,3217	X

Factor Tiempo

Tabla XIII. Datos obtenidos a partir de la extracción de flavonoides a diferentes tiempos

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Promedio Abs 510nm	Desviación estándar
Etanol 75% a 50°C x 5 min								
0,1000	5	250	5	1	0,241	7,440	7,377	0,08
0,1000	5	250	5	1	0,240	7,408		
0,1000	5	250	5	1	0,236	7,283		
Etanol 75% a 50°C x 10 min								
0,1000	5	250	5	1	0,245	7,566	7,597	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,245	7,566		

0,1000	5	250	5	1	0,248	7,660		
Etanol 75% a 50°C x 20 min								
0,1000	5	250	5	1	0,293	9,075	9,044	0,03
0,1000	5	250	5	1	0,292	9,044		
0,1000	5	250	5	1	0,291	9,013		

Tabla XIV. ANOVA para concentración de flavonoides por diferentes tiempos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,92028	2	2,46014	684,05	0,0000
Intra grupos	0,0215787	6	0,00359644		
Total (Corr.)	4,94186	8			

Tabla XV. Pruebas de múltiples rangos para concentración de flavonoides por diferentes temperaturas

Tiempos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5 min	3	7,377	X
10 min	3	7,59733	X
20 min	3	9,044	X

Tabla XVI. Datos obtenidos a partir de la extracción de polifenoles a diferentes tiempos.

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota (ul)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio	Desviación estándar
Etanol 50% a 50°C x 5 min								
0,1000	5	50	5	3	0,315	37,013	37,10	0,08
0,1000	5	50	5	3	0,316	37,148		
0,1000	5	50	5	3	0,316	37,148		
Etanol 50% a 50°C x 10 min								
0,1000	5	50	5	3	0,315	37,013	37,01	0,14
0,1000	5	50	5	3	0,314	36,878		
0,1000	5	50	5	3	0,316	37,148		
Etanol 50% a 50°C x 20 min								
0,1000	5	50	5	3	0,307	35,932	35,71	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,304	35,527		

0,1000	5	50	5	3	0,305	35,662		
Etanol 50% a 60°C x 5 min								
0,1000	5	50	5	3	0,318	37,418	37,42	0,14
0,1000	5	50	5	3	0,319	37,553		
0,1000	5	50	5	3	0,317	37,283		
Etanol 50% a 60°C x 10 min								
0,1000	5	50	5	3	0,317	37,283	37,42	0,23
0,1000	5	50	5	3	0,320	37,688		
0,1000	5	50	5	3	0,317	37,283		
Etanol 50% a 60°C x 20 min								
0,1000	5	50	5	3	0,304	35,527	35,30	0,21
0,1000	5	50	5	3	0,302	35,257		
0,1000	5	50	5	3	0,301	35,122		

Tabla XVII. ANOVA para concentración de polifenoles por diferentes tiempos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,66255	2	1,83128	82,21	0,0000
Intra grupos	0,13365	6	0,022275		
Total (Corr.)	3,7962	8			

Tabla XVIII. Pruebas de múltiples rangos para concentración de polifenoles por diferentes tiempos

Tiempos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
20 min	3	35,707	X
10 min	3	37,013	X
5 min	3	37,103	X

Factor desgaste del material vegetal

Tabla XIX. Datos obtenidos a partir de la extracción de flavonoides por desgaste del material vegetal.

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 510nm	Conc. 510 nm (mg/g muestra)	Abs 510nm	Desviación estándar
Etanol 75% a 50°C x 20min. Extracción 1								
0,1000	5	250	5	1	0,230	7,094	7,167	0,07
0,1000	5	250	5	1	0,233	7,188		
0,1000	5	250	5	1	0,234	7,220		
Etanol 75% a 50°C x 20min. Extracción 2								
0,1000	5	250	5	1	0,094	2,816	2,764	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,091	2,722		
0,1000	5	250	5	1	0,092	2,753		
Etanol 75% a 50°C x 20min. Extracción 3								
0,1000	5	250	5	1	0,044	1,244	1,139	0,13
0,1000	5	250	5	1	0,042	1,181		
0,1000	5	250	5	1	0,036	0,992		
Etanol 75% a 50°C x 20min. Extracción 4								
0,1000	5	250	5	1	0,007	0,080	0,122	0,05
0,1000	5	250	5	1	0,008	0,111		
0,1000	5	250	5	1	0,010	0,174		
Etanol 75% a 50°C x 20min. Extracción 5								
0,1000	5	250	5	1	0,002	-0,078	-0,078	0,03
0,1000	5	250	5	1	0,001	-0,109		
0,1000	5	250	5	1	0,003	-0,046		

Tabla XX. ANOVA para concentración de flavonoides por desgaste del material vegetal

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	105,81	4	26,4525	5071,99	0,0000
Intra grupos	0,052154	10	0,0052154		
Total (Corr.)	105,862	14			

Tabla XXI. Pruebas de múltiples rangos para concentración de flavonoides por desgaste del material vegetal

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0	X
4	3	0,121667	X
3	3	1,139	X
2	3	2,76367	X
1	3	7,16733	X

Tabla XXII. Datos obtenidos a partir de la extracción de polifenoles por desgaste del material vegetal.

Peso (g)	Aforo inicial (ml)	Alícuota muestra (µl)	Aforo final (ml)	F.D.	Abs 760 nm	Conc. 760 nm (mg/g muestra)	Promedio conc. a 760 nm	Desviación estándar	Coefficiente de variación
0,1000	5	50	5	3	0,385	46,466	46,69	0,28	0,006
0,1000	5	50	5	3	0,389	47,006			
0,1000	5	50	5	3	0,386	46,601			
0,1000	5	50	5	3	0,220	24,183	25,85	2,12	0,082
0,1000	5	50	5	3	0,227	25,129			
0,1000	5	50	5	3	0,250	28,235			
0,1000	5	50	5	3	0,080	5,277	5,59	0,434	0,078
0,1000	5	50	5	3	0,081	5,412			
0,1000	5	50	5	3	0,086	6,087			
<u>Etanol 50% a 50°C x 5 min. Extracción 4</u>									
0,1000	5	50	5	3	0,051	1,360	1,81	0,666	0,368
0,1000	5	50	5	3	0,052	1,495			
0,1000	5	50	5	3	0,060	2,576			
<u>Etanol 50% a 50°C x 5 min. Extracción 5</u>									
0,1000	5	50	5	3	0,013	-3,772	-2,83	0,886	-0,313
0,1000	5	50	5	3	0,021	-2,691			
0,1000	5	50	5	3	0,026	-2,016			
<u>Etanol 50% a 60°C x 5 min. Extracción 1</u>									
0,1000	5	50	5	3	0,330	39,039	39,13	0,281	0,007
0,1000	5	50	5	3	0,333	39,444			
0,1000	5	50	5	3	0,329	38,904			
<u>Etanol 50% a 60°C x 5 min. Extracción 2</u>									
0,1000	5	50	5	3	0,182	19,051	19,23	0,206	0,011
0,1000	5	50	5	3	0,185	19,457			
0,1000	5	50	5	3	0,183	19,186			
<u>Etanol 50% a 60°C x 5 min. Extracción 3</u>									
0,1000	5	50	5	3	0,073	4,331	4,56	0,206	0,045

0,1000	5	50	5	3	0,076	4,736			
0,1000	5	50	5	3	0,075	4,601			
Etanol 50% a 60°C x 5 min. Extracción 4									
0,1000	5	50	5	3	0,039	-0,260	0,10	0,340	3,410
0,1000	5	50	5	3	0,042	0,145			
0,1000	5	50	5	3	0,044	0,415			
Etanol 50% a 60°C x 5 min. Extracción 5									
0,1000	5	50	5	3	0,009	-4,312	-4,36	0,206	-0,047
0,1000	5	50	5	3	0,007	-4,582			
0,1000	5	50	5	3	0,010	-4,177			

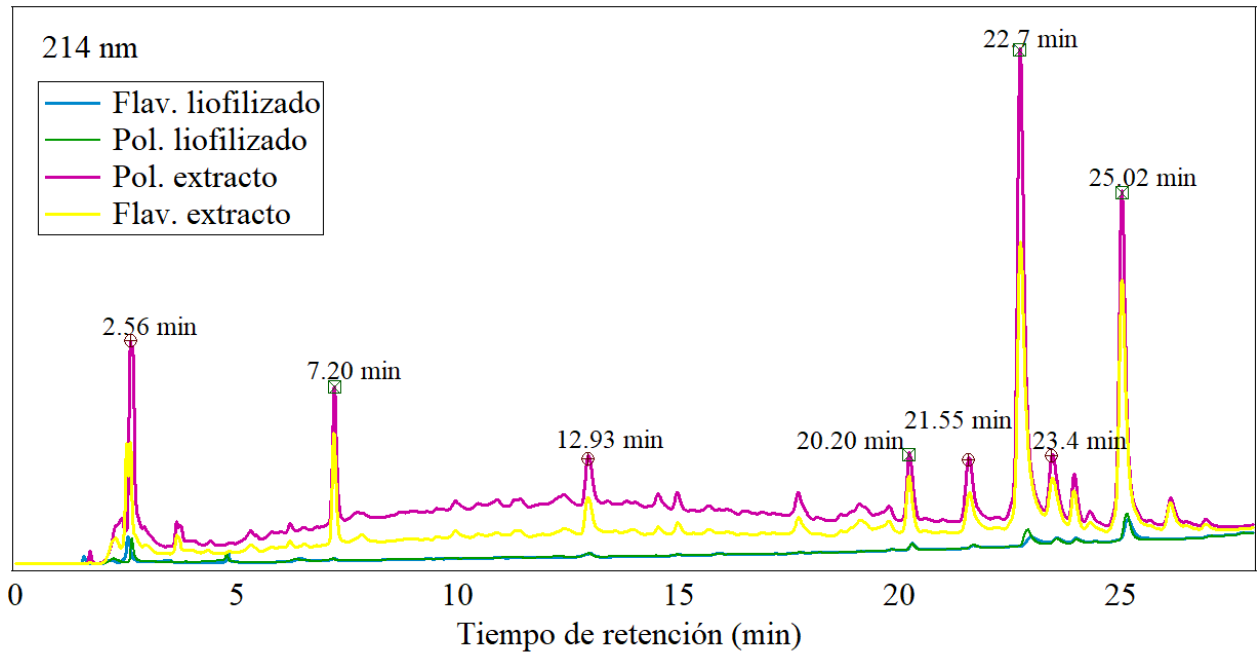
Tabla XXIII. ANOVA para concentración de polifenoles por desgaste del material vegetal.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4813,84	4	1203,46	1156,06	0,0000
Intra grupos	10,41	10	1,041		
Total (Corr.)	4824,25	14			

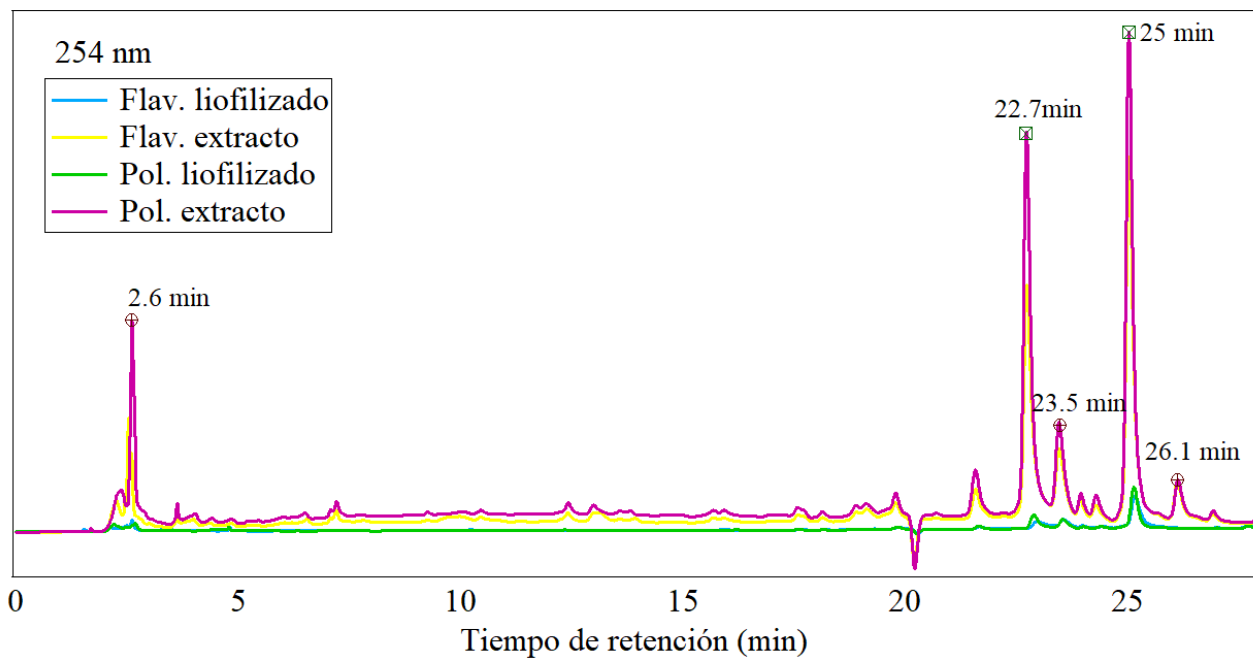
Tabla XXIV. Pruebas de múltiples rangos para concentración de polifenoles por desgaste del material vegetal

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0	X
4	3	1,81033	X
3	3	5,592	X
2	3	25,849	X
1	3	46,691	X

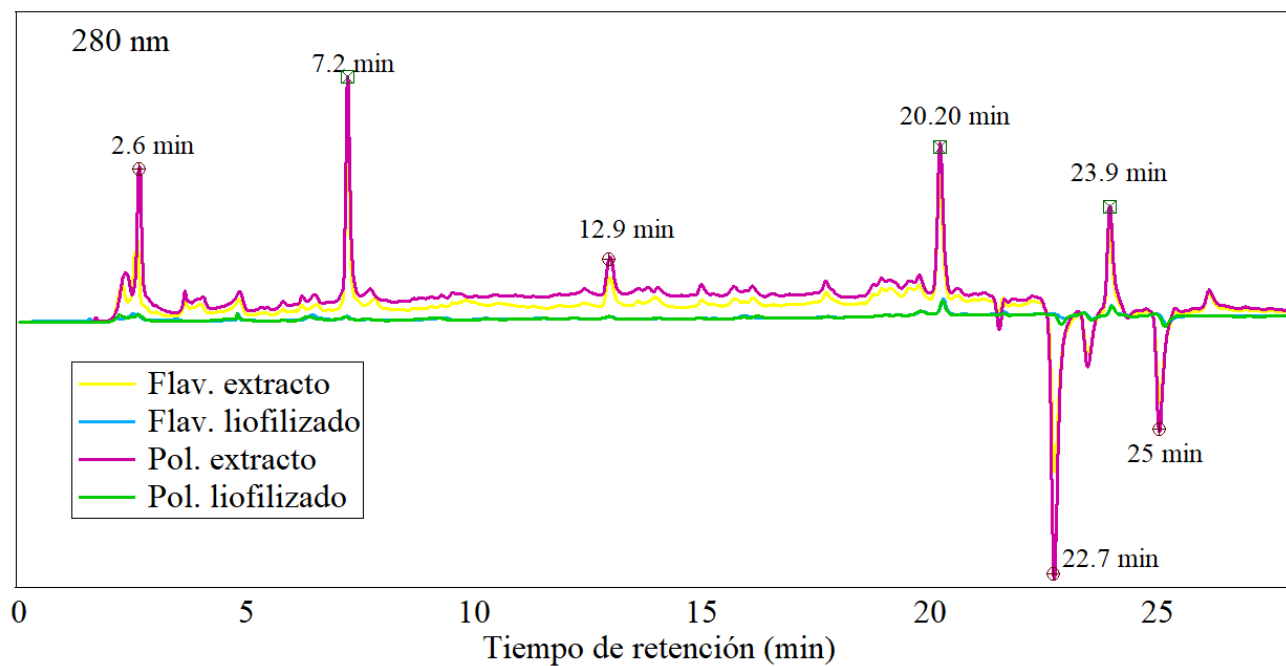
Perfil Cromatográfico



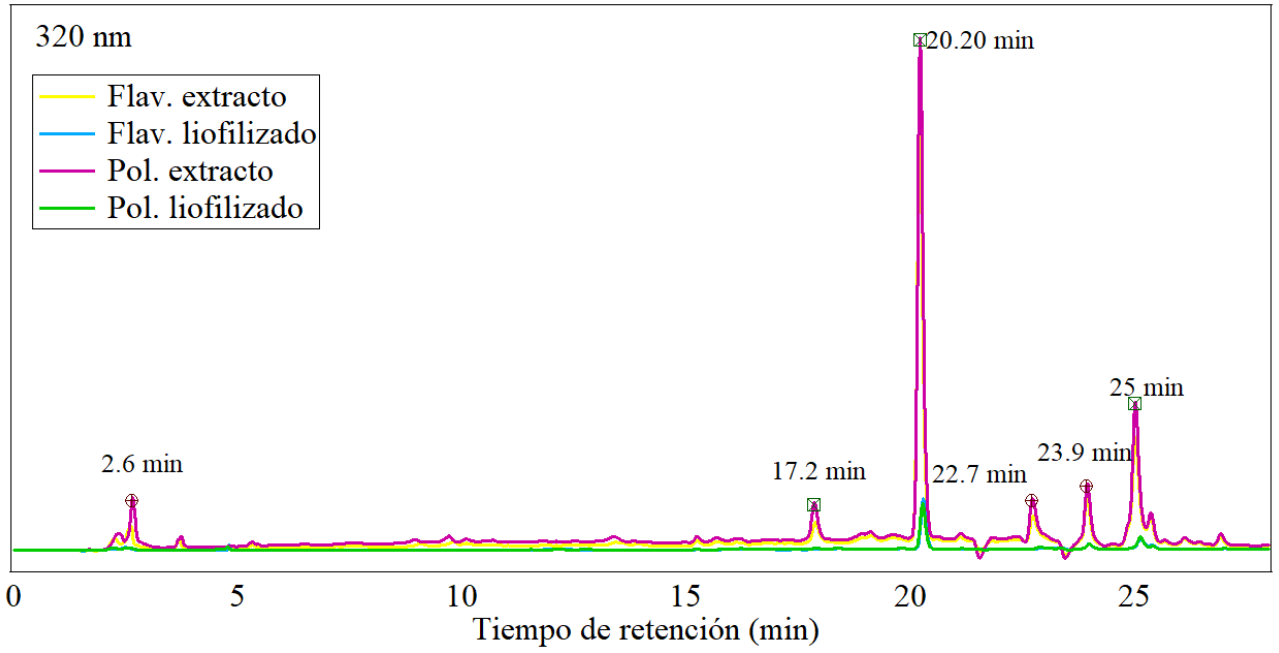
Gráfica 10. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 214nm.



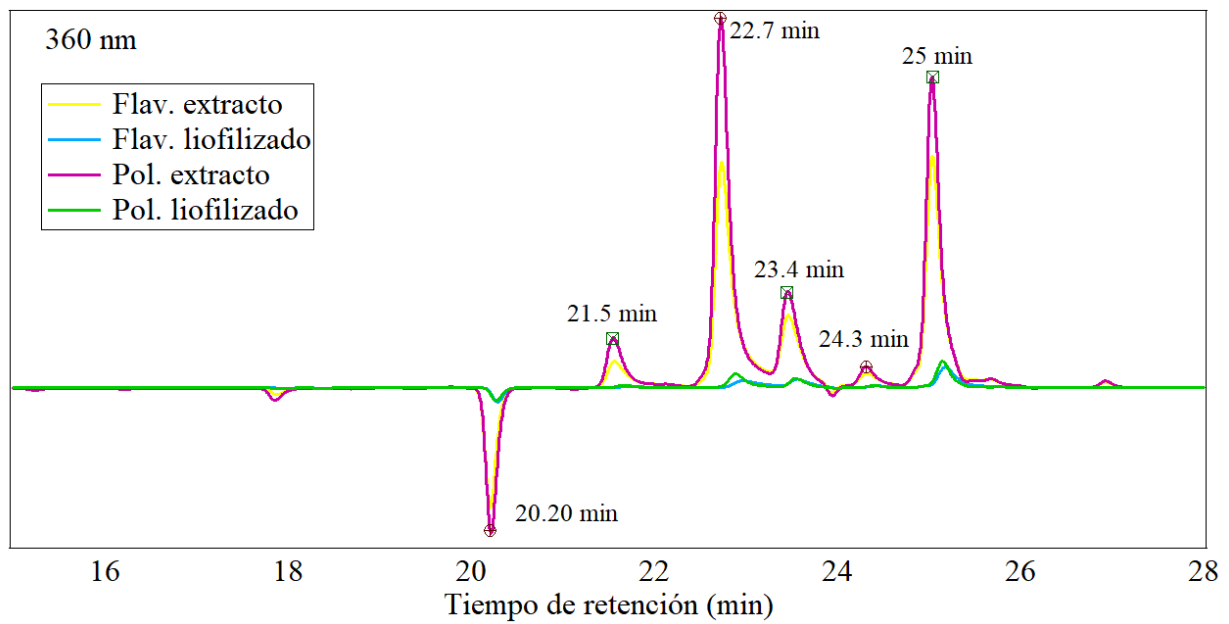
Gráfica 11. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 254nm.



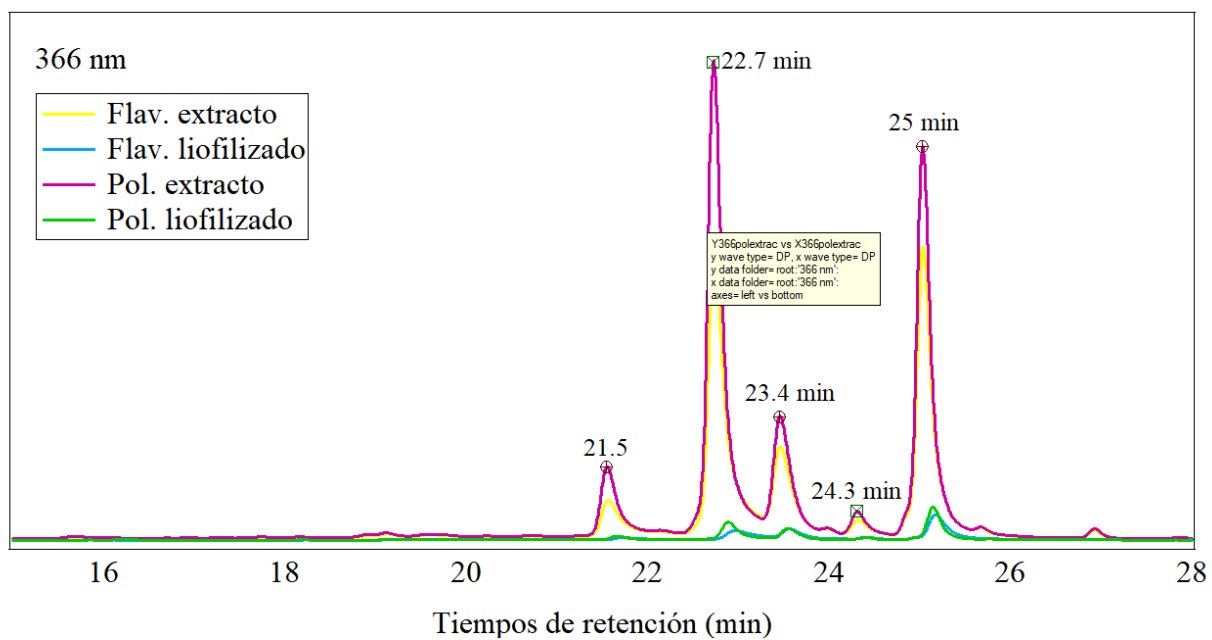
Gráfica 12. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 280nm.



Gráfica 13. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 320nm.



Gráfica 14. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 360nm.



Gráfica 15. Perfil cromatográfico de los extractos de Tarqui a una longitud de onda de 366nm.

Evidencias Fotográficas





Imagen 2. Tratamiento de las hojas de tarqui (disminución del tamaño de partícula)



Imagen 3. Muestras de los extractos, cuantificación de flavonoides y polifenoles



Imagen 4. Rotavapor, evaporación del solvente