



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



Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las flores de *Spartium
junceum*

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Erick Xavier Solis Mayorga

TUTORA: Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

Ambato-Ecuador

Marzo-2023

APROBRACION DEL TUTOR

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 13 de febrero 2023

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I: 1802726628

TUTORA

DECLARACION DE AUTENTICIDAD

Yo, Erick Xavier Solis Mayorga, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Erick Xavier Solis Mayorga

C.I: 1804877346

AUTOR

APROBACION DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, 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 consistencia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. Mario García

C.I. 1103605471

Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 1757181209

Ambato, 8 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, 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.



Erick Xavier Solis Mayorga

C.I: 1804877346

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional en mi camino universitario, por brindarme sus consejos de vida y darme la oportunidad de estudiar.

A mis abuelitos quienes me apoyaron con su cariño incondicional, especialmente a mi abuelita Carmen quien me ha cuidado desde el cielo.

A mi tutora Mg. Ruth Pérez por su asesoramiento, predisposición y ayuda.

A mis amigos quienes me han ayudado a convertirme en una mejor persona y estudiante, en donde vivimos momentos felices y difíciles. Especialmente a Patricio, José, Liss, Yayo, Washo, Cami, Mishu, Josa, Diego, Juanjo, Angela, Kerly, Mica y Tatiana quienes han estado en los momentos más difíciles y me brindaron todo su apoyo como una familia.

A toda mi familia, por sus consejos y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme, protegerme y siempre brindarme grandes bendiciones que me han permitido llegar a esta etapa de mi vida.

Así también, quiero expresar mis más profundos agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible terminar con este proyecto de investigación:

A mi familia que me apoyaron y motivaron para culminar este proyecto

A mi tutora, la Mg. Ruth Pérez por su asesoramiento, predisposición y ayuda.

A PhD. Orestes López quien me brindo su ayuda y sus conocimientos para poder lograr esta investigación.

A mis amigos que han sido un gran apoyo en todos los buenos y malos momentos vividos en la universidad.

A todos, muchas gracias.

INDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBRACION DEL TUTOR	ii
DECLARACION DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACION DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN.....	xiii
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Plantas medicinales	1
1.1.2 Taxonomía de la planta	2
1.1.3 Diferencia frente otras especies	2
1.1.4 Descripción botánica de la retama	3
1.1.5 Distribución y hábitat	3
1.1.6 Uso medicinal de la planta	3
1.1.7 Composición química.....	4
1.1.8 Metabolitos secundarios.....	4
1.1.8.1. Flavonoides	4

1.1.8.2.	Taninos.....	7
1.1.8.3.	Alcaloides.....	8
1.1.9	Metodologías para obtener los componentes	9
1.1.9.1.	Extracción	9
1.1.9.2.	Extracción por maceración.....	9
1.1.9.3.	Extracción por Soxhlet.....	10
1.1.10	Determinación de la actividad antioxidante	10
1.1.10.1.	Actividad antioxidante.....	10
1.1.10.2.	Método DPPH (2,2-difenil-1-picrililhidracilo)	12
1.1.11	Proceso de Inflamación	13
1.1.11.1.	Mecanismo antiinflamatorio por inhibición de desnaturalización	13
1.2	Objetivos	15
1.2.1	Objetivo General	15
1.2.2	Objetivos Específicos.....	15
CAPITULO II		16
METODOLOGIA		16
2.1	Materiales.....	16
2.1.1	Materiales de laboratorio.....	16
2.1.2	Reactivos	17
2.1.3	Equipos.....	18
2.2	Métodos.....	18

2.2.1	Hipótesis.....	19
2.2.2	Variables	19
2.2.3	Sección experimental	19
2.2.3.1	Recolección de muestra.....	19
2.2.3.2	Preparación de la muestra	19
2.2.3.3	Secado de la muestra.....	20
2.2.3.4	Molienda de la muestra	20
2.2.3.5	Extracción por solvente.....	20
2.2.3.5.1	Extracción por maceración.....	20
2.2.3.5.2	Extracción Soxhlet.....	20
2.2.3.5.3	Cálculo del porcentaje de rendimiento	21
2.2.3.6	Tamizaje fitoquímico	21
2.2.3.6.1	Ensayo de Dragendorff.....	21
2.2.3.6.2	Ensayo de la espuma	21
2.2.3.6.3	Ensayo de Shinoda	22
2.2.3.6.4	Ensayo de cloruro férrico	22
2.2.3.6.5	Ensayo de gelatina-sal	22
2.2.3.6.6	Ensayo de Borntrager	22
2.2.3.7	Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	22
2.2.3.8	Preparación del reactivo DPPH y Trolox.....	23
2.2.3.8.1	Preparación del extracto	23

2.2.3.8.2	Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH.....	24
2.2.3.9	Actividad antiinflamatoria	24
2.2.3.9.1	Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria	25
CAPITULO III.....		26
RESULTADOS Y DISCUSION.....		26
3.1	Análisis y discusión de los resultados.....	26
3.1.1	Rendimiento de los extractos	26
3.1.2	Determinación de metabolitos secundarios.....	27
3.1.3	Análisis de espectroscopia infrarroja (FTIR).....	29
3.1.4	Determinación de la actividad antioxidante	33
3.1.5	Actividad antiinflamatoria.....	34
3.2	Verificación de hipótesis.....	36
CAPITULO IV.....		37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		37
4.1	Conclusión.....	37
4.2	Recomendaciones.....	39
MATERIALES DE REFERENCIA		40
Referencias Bibliográficas		40
Anexos.....		49

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de laboratorio.....	16
Tabla 2. Reactivos de laboratorio.....	17
Tabla 3. Equipos de laboratorio	18
Tabla 4. Rendimiento de los extractos	26
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de las flores	28
Tabla 6. Capacidad antioxidante de los extractos de los extractos	33
Tabla 7. Porcentaje de inhibición antiinflamatoria que presenta los extractos	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica del flavonoide dibujada en el programa ChemSketch.....	6
Figura 2. Estructura DPPH antes y después de reaccionar con el antioxidante dibujada en el programa ChemSketch	12
Figura 3. Comparativa del rendimiento todas las extracción y concentraciones	26
Figura 4. Espectrofotometría infrarroja realizado en el extracto por maceración en etanol al 70% (A) y Soxhlet con etanol al 70% (B).....	30
Figura 5. Espectrofotometría infrarroja realizada en el extracto por maceración en etanol al 96% (A) y Soxhlet con etanol al 96% (B).....	31
Figura 6. Comparación grafica de la actividad antioxidante en las diferentes metodologías y concentraciones	33
Figura 7. Comparación grafica de la actividad antiinflamatoria en las diferentes metodologías y concentraciones	35

RESUMEN

En las zonas rurales de los países en vía de desarrollo utilizan la medicina tradicional como único tratamiento de enfermedades, ya que se les dificulta ir a un hospital o por el tema económico no poder comprar los medicamentos. En la medicina tradicional se ha encontrado un sinnúmero de beneficios como antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, etc. Por lo que la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las flores de *S. junceum*. Se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos por medio de la extracción Soxhlet y maceración con etanol al 96 por ciento y 70 por ciento, el extracto por Soxhlet con etanol al 70 por ciento tuvo el mayor rendimiento siendo de 14,01 por ciento con una desviación estándar 3,64. La determinación cualitativa de metabolitos secundarios se desarrolló mediante ensayos fitoquímicos y se identificaron metabolitos como: alcaloides, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides y quinonas en diferentes concentraciones; y para comprobar la presencia de estos se realizó adicionalmente una espectrofotometría infrarroja. La capacidad antioxidante se realizó con la técnica de DPPH, donde el extracto por Soxhlet con etanol al 70 por ciento obtuvo la mayor actividad antioxidante siendo de 76,72 por ciento con una desviación estándar 0,01. Finalmente, los extractos fueron evaluados en la actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la desnaturalización de la albumina de huevo, la mayor inhibición de 76,55 por ciento con una desviación estándar 0,05 correspondió a la extracción por Soxhlet con etanol al 96 por ciento.

Palabras clave: Actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, Soxhlet, maceración, metabolitos secundarios, *S. junceum*, flores, etanol, extracto.

ABSTRACT

In rural areas of developing countries, traditional medicine is used as the only treatment for illnesses, since it is difficult for them to go to a hospital or because they cannot afford to buy the medicines. Traditional medicine has been found to have an endless number of benefits such as antivirals, antioxidants, anti-inflammatory, anticancer, etc. Therefore, the present research aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity of *S. junceum* flowers. Hydroalcoholic extracts were obtained by Soxhlet extraction and maceration with 96 percent and 70 percent ethanol, the extract by Soxhlet with 70 percent ethanol had the highest yield of 14.01 percent with a standard deviation of 3.64. The qualitative determination of secondary metabolites was developed by phytochemical assays and metabolites such as alkaloids, saponins, phenols, tannins, flavonoids and quinones were identified in different concentrations; and to verify the presence of these, infrared spectrophotometry was also performed. The antioxidant capacity was performed with the DPPH technique, where the Soxhlet extract with 70 percent ethanol obtained the highest antioxidant activity of 76.72 percent with a standard deviation of 0.01. Finally, the extracts were evaluated in the anti-inflammatory activity by inhibition of egg albumin denaturation, the highest inhibition of 76.55 percent with a standard deviation 0.05 corresponded to the Soxhlet extraction with 96 percent ethanol.

Keys words: Antioxidant activity, anti-inflammatory activity, Soxhlet, maceration, secondary metabolites, *S. junceum*, flowers, ethanol, extract.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Plantas medicinales

La medicina tradicional también es valorada por su enfoque holístico en el tratamiento de las enfermedades, donde no solo se tratan los síntomas, sino también se busca abordar las causas subyacentes. En muchos casos, también se promueve un estilo de vida saludable para prevenir enfermedades y mejorar la calidad de vida. Sin embargo, también es importante tener en cuenta que la medicina tradicional a menudo no está regulada y sus prácticas pueden variar mucho. Además, la falta de investigación científica rigurosa sobre su eficacia y seguridad puede plantear preocupaciones. Por lo tanto, es importante que la medicina tradicional se integre con la medicina moderna y se respeten los estándares de calidad y seguridad necesarios para garantizar la salud y el bienestar de las personas **(Bussmann, 2018)**.

A pesar del creciente interés en la medicina herbaria y los estudios científicos que demuestran su eficacia, todavía existe una brecha entre la investigación y su aplicación práctica en la atención médica. Esto puede ser debido a una falta de conocimiento y capacitación en medicina herbaria entre los profesionales de la salud, así como a una falta de regulación y estándares en la producción y distribución de medicamentos de origen vegetal. Sin embargo, la tendencia está cambiando y cada vez más médicos y profesionales de la salud están incorporando la medicina herbaria en sus prácticas, y se están llevando a cabo más investigaciones para determinar la eficacia y seguridad de estos tratamientos. **(Jiménez et al., 2021)**.

En muchos países en vías de desarrollo, la medicina herbaria puede ser una opción más accesible y económica para las personas que tienen dificultades para acceder a los medicamentos farmacológicos. Además, las prácticas culturales y las tradiciones pueden influir en la elección de tratamientos a base de hierbas sobre medicamentos sintéticos. **(Yanchaguano & Francisco, 2019)**.

S. junceum es una alternativa en la medicina tradicional, ya que esta presenta propiedades curativas y además se lo puede utilizar en el sector industrial. Se lo utiliza en la medicina como unguento, tisana y embrocación en el que tiene efecto diurético, en caso de envenenamiento, para regular el corazón, etc. Y en el sector industrial para para elaboración de bebidas alcohólicas, además tiene varios usos esta planta varios sectores (Yıldırım et al., 2017).

1.1.2 Taxonomía de la planta

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Spartium*

Especie: *Spartium junceum*

Fuente: (Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias, 2003).

1.1.3 Diferencia frente otras especies

Según Rizza et al., (2021) *Spartium* es un género con una única especie siendo *S. junceum*. En la que puede confundirse con otras especies del género *Cytisus*, *Genista* y *Retama*, las siguientes características permitirá diferenciar entre estos cuatro géneros:

- *Spartium*: Cáliz con un solo labio que lleva 3-5 pequeños dienteitos apicales, abierto superiormente; legumbre linear, erguida.
- *Genista* y *Cytisus*: Cáliz bilabiado; labios con 2-3 dientes o lóbulos; legumbre diferente.

- *Retama*: Legumbre esferoidal u ovoide, más o menos globos o arriñonada; flores amarillas o blancas.

1.1.4 Descripción botánica de la retama

La retama de olor es un arbusto ramificado que puede medir hasta 3 m de alto con el tallo muy ramificado y se reproduce por semilla. Sus ramas son largas y algo curvadas, estriadas, verdes y pierden pronto sus hojas. Las hojas pueden medir hasta 3,5 cm de largo y son simples, alternas, fácilmente caedizas, lanceoladas o estrechamente elípticas, enteras, lampiñas por el haz y sedosa por el envés, tiene los márgenes enteros, y son de color verde-azuloso. Las flores aparecen en los racimos terminales y pueden medir de 2 cm o más de largo, son de color amarillo, muy olorosas. Los frutos son una legumbre comprimida de hasta 7 cm de largo, con los bordes grueso y paralelos, que contiene 10-18 semillas ovoides, de color café rojizo y con la superficie porosa (Kovačević et al., 2021).

1.1.5 Distribución y hábitat

Arbusto proveniente del Mediterráneo y en nuestro país crece desde los 2000 hasta los 2800 m de altura en las provincias de Azuay, Bolívar, Carchi, Imbabura, Loja, Pichincha y Tungurahua. Por lo general, crece en climas cálidos y templados por lo que es abundante en los valles y laderas de la región sierra prefiriendo vivir cerca de los cauces de agua, pero resiste la sequía. Por ser una especie nitrofila, puede aparecer en los terrenos alterados, zonas de cultivos abandonadas, cunetas de caminos y carreteras, matorrales, etc (Lara et al., 2019).

1.1.6 Uso medicinal de la planta

Las partes utilizadas de la remata para los usos medicinales son las hojas y las flores. Son un excelente remedio para combatir diversos y complicadas enfermedades, como el reumatismo, gota, purgante, ictericia, úlceras, paludismo, afecciones crónicas a los riñones, vejiga, afecciones de la piel, herpes, granos, etc. Generalmente se lo utiliza para tratar úlceras gástricas, algunos estudios han encontrado que no solo cura la úlcera, sino que también previene su formación, otro estudio de las flores señalo que tiene acción diurética (Nanni et al., 2018).

Las flores soasadas o en infusión se usan contra dolores reumáticos, en las cefalalgias de igual manera la tinta extraída se utiliza como antirreumático y en ictericia; las flores frescas en fricciones contra las pecas, el tratamiento de afecciones renales y de las vías urinarias (Noriega, 2018).

1.1.7 Composición química

Tiene la esparteína que es un principio activo y es un excelente tónico del corazón. La escoparina, sales de potasio que contiene las flores y semillas le confieren una acción diurética enérgica. En cuanto a la composición química la retama posee entre otros: alcaloides (citisina y esparteína principalmente, junto con genesteína e isoesparteína), glucósidos (escoparina), flavonoides (quercetina), ácidos (cafeico, linoleico, caprílico, palmítico), taninos y oxalatos (De la Cruz, 2015).

Contiene muchas sustancias activas como anagirina, ácido cafeico, ácido caprílico, crisina, citisina, genisterina, lupeol, ácido mirístico, ácido oleico, quercetina, sitosterol, ácido esteárico y esparteína, los cuales proporcionan buena actividad antiinflamatoria, antibacteriana, principalmente para problemas infecciosos de las vías respiratorias, urinarias y digestivas. Se puede utilizar para lavar heridas y como desinfectante. Los aceites esenciales extraídos permiten calmar los nervios y tiene efecto estimulante (Jaume & Mascaró, 2020).

En el extracto etéreo y acuoso se confirma presencia de metabolitos como: flavonoides, taninos, alcaloides, cumarinas y triterpenos en menor intensidad, los cuales presentan las coloraciones y precipitaciones específicas. El extracto acuoso de la flor de retama contiene los siguientes principios activos: flavonoides, alcaloides, taninos gálicos, compuestos fenólicos, azúcares reductores y principios amargos (Jaume & Mascaró, 2020).

1.1.8 Metabolitos secundarios

1.1.8.1 Flavonoides

Los flavonoides consisten principalmente de quince átomos de carbono en su estructura de núcleo fundamental C6-C3-C6 que consta de dos anillos de benceno etiquetados como anillos A y B conectados por un pirano heterocíclico llamado anillo

C. Y se clasifican dependiendo de sus estructuras químicas en chalconas, flavanonas, flavanonoles, flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavan-3-oles (catequinas) y antocianidinas, y los investigadores han aislado e identificado más de 1000 compuestos flavonoides (**Shamsudin et al., 2022**). Los flavonoides están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal constituyendo la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, chalconas, auroras), rojos y azul (antocianos) de flores y algunos frutos. Destacan las familias Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Umbellifereae, Lamiaceae, entre otras. Muchos flavonoides muestran actividad frente a la úlcera péptica, reduciendo el índice de ulceración y la intensidad del daño mucosa (**Ramírez, 2018**).

Son metabolitos secundarios que se encuentran en frutas, hierbas, tallos, cereales, nueces, vegetales, flores y semillas. Se los han utilizado como tintes naturales, en cosméticos y productos para el cuidado de la piel y agentes antiarrugas para la piel. Sin embargo, tienen varias aplicaciones en el campo de la medicina. Esos polifenoles se han utilizado como agentes antimicrobianos, antivirales, antiangiogénicos, antipalúdicos, antioxidantes, neuroprotectores, antitumorales y antiproliferativos (**Ullah et al., 2020**). Casi siempre son hidrosolubles y son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. Así ocurre con los flavonoides amarillos (chalconas, auroras, flavonoles amarillos), con las antocianinas rojos, azules o violetas. Por regla general los flavonoides *in vitro* son inhibidores enzimáticos: inhibición de la histidina descarboxilasa por el quercetol o la naringenina (**Corona et al., 2019**).

Se ha demostrado que los flavonoides pueden retirar oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentados en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (**Moura et al., 2020**). Así mismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. De hecho, las

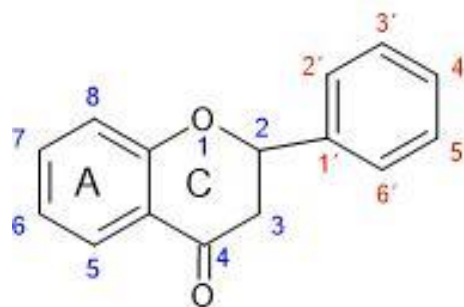
poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (**Ramírez, 2018**).

La estructura de los flavonoides juega un papel importante en la actividad antiinflamatoria. Tienen una estructura de anillo plano con insaturación en C2-C3, y las posiciones del grupo hidroxilo son cruciales para impartir la propiedad. El grupo hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo B es muy importante, sin el cual se pierde la actividad antiinflamatoria del compuesto (**Al-Khayri et al., 2022**). Para que una molécula de flavonoide ejerza actividades antiinflamatorias, debe existir la presencia de un doble enlace C2-C3 (anillo C) y grupos hidroxilo en las posiciones C3', C4' (anillo B), C5 y C7 (anillo A) son requisitos estructurales esenciales. Por otro lado, se ha demostrado que la sustitución en la ubicación C3 reduce la actividad antiinflamatoria de los flavonoides (**Shamsudin et al., 2022**).

La capacidad antioxidante de los flavonoides está asociada con la estructura molecular y, más precisamente, con la ubicación y el número total de los grupo -OH, los efectos de conjugación y resonancia, el entorno que modifica el sitio antioxidante favorecido termodinámicamente y el mecanismo antioxidante particular. para un compuesto (**Ullah et al., 2020**). El mecanismo de acción es que actúan como antioxidantes exógenos y los radicales los oxidan directamente para formar especies menos reactiva a través de cuatro mecanismos, por la inhibición de la actividad óxido nítrico sintasa, la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa, la modulación de las vías de los canales, o por la interacción con otros sistemas enzimáticos. Por lo general, los antioxidantes suplementados más utilizados son las vitaminas C y E, pero el potencial antioxidante de los flavonoides es más sólido que estos suplementos (**Cao et al., 2020**).

Figura 1

Estructura básica del flavonoide dibujada en el programa ChemSketch.



Nota: Tomado de (Sajid et al., 2021).

1.1.8.2. Taninos

Los taninos son metabolitos secundarios polifenólicos vegetales que fueron utilizado durante la Antigüedad Clásica para el tratamiento de pieles de animales para evitar su putrefacción. Debido a la interacción entre los taninos y el colágeno de las pieles, el colágeno se estabilizo y las pieles de los animales se curtieron y se transformaron en cuero. Esta capacidad de los taninos de combinarse con las macromoléculas explica que precipiten celulosa, pectinas y proteínas (Gonçalves et al., 2021).

Los taninos están dispersos en la dieta humana debido a su consumo frecuente de alimentos y bebidas de origen vegetal como, por ejemplo: uvas rojas, vino tinto, chocolate, te y cerveza. El consumo de pequeñas cantidades de taninos tiene un efecto positivo sobre el metabolismo de los lípidos y la regulación de las respuestas inmunitarias por lo que se les han asociado con varios beneficios para la salud como la prevención del cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las alergias, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los alimentos ricos en taninos tienen un valor nutricional más bajo debido a la capacidad de los taninos para flocular las proteínas, disminuyendo su digestibilidad (Soares et al., 2020).

Los taninos se clasifican en taninos condensados (proantocianidinas), taninos hidrolizables, florotaninos (principalmente presentes en las algas pardas) y taninos complejos. Los taninos condesados son polímeros de catequina, epicatequina, prodelfinidinas, profisetinidinas y prorobinetidinas. Los taninos hidrolizables, pueden ser hidrolizados por ácidos o bases débiles, siendo estos últimos mezclas de carbohidratos con ácido gálico y elágico (galotaninos y elagitaninos). Las proantocianidinas donan hidrógeno y electrones (acción antioxidante primaria), quelan

el hierro e inhiben la actividad de la ciclooxigenasa (acción antioxidante secundaria) **(Manassis et al., 2020)**.

Los taninos hidrolizables, los taninos condensados y los florotaninos son los principales grupos de taninos que se encuentran en diversas partes de las plantas superiores. Como productos naturales en las plantas, actúan como una barrera natural contra insectos, patógenos y animales, por su capacidad de reacción con las proteínas y sus propiedades antioxidantes **(Watrelet & Norton, 2020)**. Los taninos son conocidos como bactericidas porque reaccionan con las proteínas de manera irreversible, complejándose dentro de las membranas bacterianas, y así neutralizando su actividad. Como consecuencia, los productos farmacéuticos a base de taninos para curar infecciones intestinales se comercializan desde hace mucho tiempo obteniendo propiedades anticánceres eficaces. Los taninos también tienen muchas aplicaciones para otros usos farmacéuticos/médicos, pero todos ellos están destinados a un uso futuro más que al presente **(Pizzi, 2019)**.

La mayor parte de las propiedades biológicas de los taninos se debe al poder que poseen de formar complejos con macromoléculas, especialmente con proteínas. Por vía tópica, impermeabilizan las capas más externas de la piel y mucosas, protegiendo así las capas subyacentes; tiene también un efecto vasoconstrictor sobre pequeños vasos superficiales **(Rengifo, 2018)**. Al limitar la pérdida de fluidos e impedir las agresiones externas, favorecen la regeneración de los tejidos en caso de heridas superficiales o de quemaduras. Por vía interna, ejercen un cierto efecto antidiarreico por cualquier vía de administración. El efecto antiséptico, antibacteriano y antifúngico demostrado claramente por estas moléculas es interesante **(Ramos, 2018)**.

1.1.8.3. Alcaloides

Los alcaloides se encuentran principalmente en las plantas y están particularmente presentes en familias específicas de plantas y se han reconocido más de 3000 tipos distintos de alcaloides. Generalmente, representan un grupo muy diverso de compuestos que contiene estructuras cíclicas con al menos un átomo de nitrógeno básico incorporado dentro. Varios alcaloides, como camptotecina, vincristina, vinblastina, berberina, sanguinarina, evodiamine, piperine, matrine y tetrandrine, son bien conocidos como potentes agentes quimioterapéuticos **(Mondal et al., 2019)**.

Por su estructura, los alcaloides se pueden dividir en clases como indoles, quinolinas, isoquinolinas, pirrolidinas, piridinas, pirrolizidinas, tropanos y terpenoides y esteroides. Otro sistema de clasificación está conectado con una familia de especies de plantas como Leguminosae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Loganiaceae y Papaveraceae (**Kurek, 2019**).

Los alcaloides pueden reaccionar con ácidos y luego formar sales, al igual que los alcalinos inorgánicos. Estos átomos de nitrógeno pueden comportarse como una base en reacciones ácido-base (**Bhambhani et al., 2021**). Los alcaloides estimulan los organismos humanos, por ejemplo, el sistema nervioso central o actúan directamente sobre el cerebro humano. La nicotina es un alcaloide obtenido de la planta de tabaco y es un potente estimulante y el ingrediente principal del tabaco que se fuma en pipa, puros y cigarrillos. Además de tener un impacto negativo, los alcaloides de muchas especies de plantas diferentes tienen muchas otras aplicaciones como antiparasitario, antiplasmodial, actividad anticorrosiva, antioxidante, antibacteriana, anti-VIH e insecticida (**Daley & Cordell, 2021**).

1.1.9 Metodologías para obtener los componentes

1.1.9.1 Extracción

La extracción es una técnica muy utilizada en la industria química y farmacéutica para separar compuestos orgánicos de mezclas complejas. Es una forma eficaz de separar compuestos deseados de impurezas o de aislarlos de sus fuentes naturales. En cuanto a la extracción para compuestos polifenólicos se busca disminuir la cantidad de solventes orgánicos sin afectar el rendimiento y calidad de los fenoles (**Avello & Suwalsky, 2017**). Sin embargo, se deben tener en cuenta aspectos como la humedad de la muestra, la pureza del extracto, la técnica que se utiliza y el solvente para que el contenido de metabolitos en el extracto se vea favorecido al obtenerlos.

1.1.9.2 Extracción por maceración

Esta técnica es uno de los métodos de referencia para la determinación de compuesto polifenólicos. Esto por su simplicidad, configuración menos experimental, bajo costo y características amigables con el medio ambiente. Los factores más importantes de

esta técnica es la velocidad de agitación y el tiempo, la velocidad del agitador magnético puede conducir a la formación de un vórtice generando turbulencia cuando se varia la velocidad y con esto un posible aumento de la tasa de transferencia de masa; por lo que la velocidad debe mantenerse entre 180 y 240 rpm (**Sridhar et al., 2021**).

Esta técnica consiste en remojar el material sólido, que generalmente suele ser material vegetal, en un solvente hasta que este penetre y disuelva las porciones solubles. Este material vegetal debe estar fragmentado para aumentar el área de transferencia entre el soluto y el solvente (**Fernández, 2020**).

1.1.9.3. Extracción por Soxhlet

La extracción Soxhlet se considera el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado que conducen a la separación de componentes bioactivos de productos naturales y actualmente es el método de referencia cuando se comparan distintos métodos de extracción. Debido a su simplicidad de técnica se lo considera como un método de extracción habitual. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes con esta técnica. Utiliza grandes cantidades de muestras, largos tiempos de extracción grandes cantidades de uso de solvente y pérdida excesiva de energía térmica (**Sridhar et al., 2021**).

La extracción por Soxhlet es una técnica muy eficaz para la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas, especialmente cuando se requiere una alta eficiencia de extracción y la pérdida de la integridad de la muestra. Sin embargo, es una técnica que requiere un aparato especializado y un tiempo significativo para llevarse a cabo, por lo que no es la técnica de extracción más conveniente o económica para todas las situaciones. (**Duarte et al., 2020**).

1.1.10 Determinación de la actividad antioxidante

1.1.10.1. Actividad antioxidante

Durante las últimas décadas, el uso de antioxidantes ha aumentado considerablemente en la industria alimentaria. Por el papel que tienen los antioxidantes en neutralizar los radicales libres en las células biológicas, teniendo los radicales libres un impacto

negativo en los organismos vivos. Los antioxidantes están presentes en los alimentos o en el cuerpo humano en muy bajas concentraciones. Y se pueden producir de forma endógeno o ingerir de forma exógena a través de la dieta o los complementos alimenticios **(Kotha et al., 2022)**.

Los antioxidantes se pueden clasificar de varias maneras. En función de su actividad, se agrupan en dos categorías: enzimáticos (por ejemplo, catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSHPx), glutatión reductasa (GRD), etc) y no enzimáticos (por ejemplo, selenio, coenzima Q10, vitamina C, vitamina E, etc). Los antioxidantes enzimáticos funcionan a través de la descomposición y la eliminación de radicales libres, y los no enzimáticos operan interrumpiendo la reacción en cadena de los radicales libres **(Flieger et al., 2021)**.

El suministro de antioxidantes actúa neutralizando las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se producen en el sistema durante los procesos fisiológicos. Oxígeno singlete, superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito, hidroxilo y radicales peroxilo son ejemplos de ROS, y son ubicuos y potencialmente dañinos para valiosas biomoléculas. La producción excesiva e incontrolada de ROS se denomina estrés oxidativo, que podría provocar daños, como alteraciones en la función celular que están relacionadas con varias afecciones, como inflamación crónica, asma, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, senescencia y cáncer **(Mendonça et al., 2022)**.

Existen varios métodos para detectar la actividad antioxidante, las pruebas que se basan en la transferencia de un átomo de hidrógeno son la prueba de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC), la prueba de Capacidad Antioxidante de Radicales Hidroxilo (HORAC), la prueba de Parámetro Antioxidante de Captura de Radicales Peroxilo Totales (TRAP), y la prueba de capacidad total de eliminación de oxirradicales (TOSC). Las pruebas basadas en la transferencia de un electrón incluyen la prueba del poder antioxidante reductor cúprico (CUPRAC), la prueba del poder antioxidante reductor férrico (FRAP), la prueba de Folin-Ciocalteu. Las pruebas mixtas, que incluyen la transferencia de un átomo de hidrógeno y un electrón, incluyen la prueba del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y la prueba [2,2-di(4-terc -octilfenil)-1-picrilhidrazil] (DPPH). Todos estos ensayos se basan en

reacciones químicas y la evaluación de la cinética o la consecución del estado de equilibrio se basa en la espectrofotometría, suponiendo la aparición de colores característicos o la decoloración de las soluciones a analizar, que son procesos monitoreados por adsorción de longitud de onda específica (**Munteanu & Apetrei, 2021**).

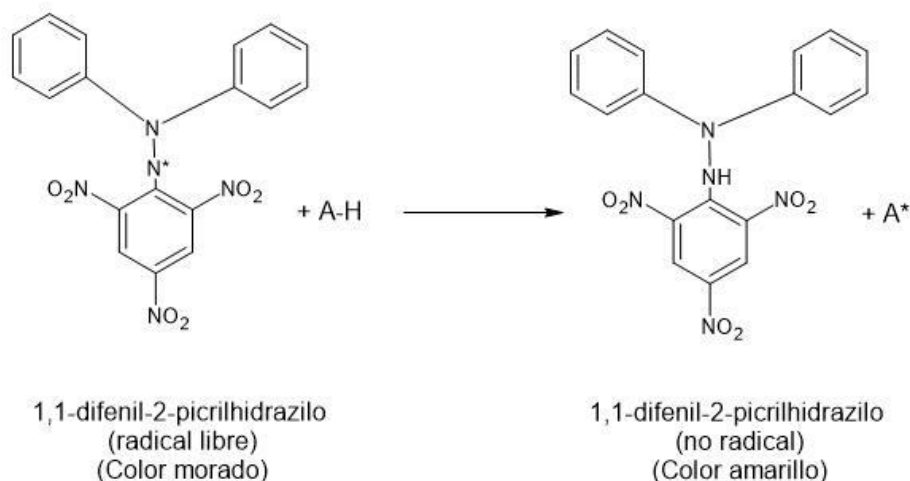
1.1.10.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrililhidracilo)

DPPH es un radical π , presente en forma de monómero en estado sólido, así como en solución. Se comprobó que, aunque la eliminación del grupo p-nitro solo tiene una ligera influencia, la eliminación del grupo encargado de proteger a los grupos o-nitro condujo a un aumento significativo de la reactividad. Además, el hecho de que ambos grupos fenilo estén retorcidos tiene un efecto adverso sobre la estabilidad de la conjugación. El radical es soluble en diferentes disolventes orgánicos, pero no en agua. Generalmente se disuelve en metanol, etanol o sus mezclas acuosas. En este caso final, el contenido de agua no debe exceder el 60% para que el radical sea más fácilmente soluble (**Munteanu & Apetrei, 2021**).

Es un método rápido, simple y ampliamente utilizado para evaluar el potencial antioxidante de un compuesto o extracto. Este ensayo se basa en la medición cuantitativa de la capacidad de eliminación de los antioxidantes frente a los radicales libres de 2,2-difenil-1-picrililhidracilo (DPPH) utilizando el espectrofotómetro. En la actualidad, no existen procedimientos experimentales estándar de DPPH, varios investigadores han utilizado protocolos muy diferentes basados en sus muestras tratadas que difieren en la concentración de DPPH, el tiempo de reacción y el solvente de reacción (**Frezzini et al., 2019**).

Figura 2

Estructura DPPH antes y después de reaccionar con el antioxidante dibujada en el programa ChemSketch.



Nota: Tomado de (Angeli et al., 2021).

1.1.11 Proceso de Inflamación

Es un proceso fisiológico del sistema inmune, que se presente ante un daño cuando a las células y tejidos, ya sea por una agresión física, química, infecciosa o autoinmune. Con el fin de alisar la zona afectada, contener la lesión, destruir al agente invasor e iniciar la reparación del tejido. En este proceso interviene tanto la inmunidad innata como la adquirida (Rivero & Dahl, 2020).

Los monocitos forman parte del sistema inmune inespecífico, cuya función es la eliminación de desechos celulares, el reconocimiento de los alejo al organismo, la defensa inespecífica del mismo, la reparación e inflamación de los tejidos y el enlace con el sistema sanguíneo y de esta a los tejidos, donde se diferenciarán en macrófagos intersticiales. Los macrófagos pueden activarse clásicamente liberando citoquinas proinflamatorias y radicales libres, participando funcionalmente en la reparación del tejido, el reconocimiento antigénico y la curación de heridas (Medina et al., 2020).

1.1.11.1. Mecanismo antiinflamatorio por inhibición de desnaturalización

Los fármacos antiinflamatorios utilizados en la actualidad se asocian con varios efectos secundarios, en lo que se puede presentar toxicidad gastrointestinal, riesgo cardiovascular, lesiones renales y hepatotoxicidad, así como hipertensión, muerte súbita cardiaca y otros trastornos menores. La mayor parte de fármacos están siendo reemplazadas debido a sus efectos secundarios a largo plazo. En la actualidad, el

diseño de compuestos antiinflamatorios tiene grandes limitaciones debido a los efectos secundarios indeseables, baja toxicidad y buena eficacia **(Bian et al., 2021)**.

El cuerpo humano tiene una respuesta inflamatoria que es autolimitada y su duración está regulada por varias moléculas con una doble actividad proinflamatoria y antiinflamatoria. Una de estas es el mediador antiinflamatorio TGF- β (factor de crecimiento transformante- β) que se secreta en respuesta a la fagocitosis de las células apoptóticas y contribuye a la resolución de la inflamación a través de un rápido aclaramiento de las células inflamatorias **(Cruz et al., 2022)**. En el caso que la respuesta inflamatoria se prolongue, puede pasar a ser una inflamación crónica, caracterizada por la presencia de linfocitos y macrófagos con morfología anormal que secretan continuamente factores de crecimiento y citocinas. La producción persistente de mediadores inflamatorios puede provocar daños en los tejidos y el ADN al generar un microambiente que promueve la proliferación celular y predispone al cáncer **(Zappavigna et al., 2020)**.

La desnaturalización de proteínas significa la pérdida de sus funciones biológicas y se debe a diversos factores; como el estrés, cambios bruscos de pH, contacto con disolventes orgánicos, calor, detergentes, fuerza iónica etc. Este fenómeno ocurre con frecuencia en el proceso inflamatorio de diversas enfermedades como la artritis reumatoide, la diabetes, el cáncer etc., por esta razón la determinación de la desnaturalización de las proteínas principalmente de la albúmina es una medida del potencial antiinflamatorio de los distintos compuestos presentes en extractos vegetales **(Joshi et al., 2021)**.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las flores de *S. junceum*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de las flores mediante el método de extracción por solvente.
- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios del extracto mediante pruebas de tamizaje fitoquímico.
- Analizar la capacidad antioxidante de las flores mediante la técnica de 2,2-difenil-1-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto por el método de inhibición de la desnaturalización de la proteína.

CAPITULO II
METODOLOGIA

2.1 Materiales

2.1.1 Materiales de laboratorio

Tabla 1

Materiales de laboratorio.

Insumo	Cantidad
Embudos	3
Frasco ámbar	12
Matraz Erlenmeyer (250 ml)	3
Micropipeta 10-100 ml	1
Mortero	1
Papel aluminio	1
Papel filtro	1
Pipeta (1 ml)	1
Puntas de micropipetas	30
Tubos Falcon (50 ml)	6

Varilla de agitación	1
Vaso de precipitación (250 ml)	3

2.1.2 Reactivos

Tabla 2

Reactivos de laboratorio

Insumo	Cantidad
Ácido clorhídrico concentrado (HCl)	10 ml
Agua destilada	1 L
Etanol 70%	2 L
Etano 96%	2 L
Cinta de magnesio metálico	2 mg
Cloroformo (CHCL ₃)	4 ml
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)	59 mg
Reactivo Gelatina-Sal	4 ml
Hidróxido de sodio al 5% de pureza (NaOH)	5 ml

Reactivo de Dragendorff	4 ml
Tricloruro férrico al 5% de pureza (FeCl ₃)	4 ml
Hipoclorito de sodio al 5% de pureza (marca comercial “Clorox”)	5 ml
Solución salina tamponada con fosfato (pH 6,4)	60 ml

2.1.3 Equipos

Tabla 3

Equipos de laboratorio

Insumo	Cantidad
Balanza analítica METTLER TOLEDO	1
Equipo Soxhlet KIMAX	1
Espectrómetro Fisher Scientific	1
Estufa Memmert GmbH + Co. KG	1
Rotavapor IKA HB100	1
Refrigerador	1

2.2 Métodos

2.2.1 Hipótesis

Hipótesis nula

Los extractos de las flores de *S. junceum* no presentan actividad antioxidante ni antiinflamatoria.

Hipótesis alternativa

Los extractos de las flores de *S. junceum* presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

2.2.2 Variables

Variables dependientes

- Actividad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria

Variables independientes

- Tipo de disolvente utilizado en la extracción
- Método de extracción de las flores

2.2.3 Sección experimental

Para llevar a cabo la investigación es necesario partir de la preparación de la muestra por lo que se aplicó la siguiente metodología.

2.2.3.1 Recolección de muestra

Se compro la planta *S. junceum* en el vivero "El Trébol" localizado en la ciudad de Ambato de la provincia de Tungurahua, y se procedió a retirar las flores. Se las colocó en una bolsa ziploc y se trasladó a los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Y se las almaceno en un lugar fresco y seco hasta su posterior uso.

2.2.3.2 Preparación de la muestra

Las muestras fueron desinfectadas y limpiadas con el fin de eliminar impurezas. Una vez recolectadas las muestras se desinfectaron con 20 mL de hipoclorito de sodio (5%) en 100 mL de agua destilada por 5 minutos y se enjuagó con abundante agua.

2.2.3.3 Secado de la muestra

En una bandeja metálica con un papel absorbente se colocó las muestras en una estufa a 60°C durante 3 a 4 días hasta que se encontraran completamente secas.

2.2.3.4 Molienda de la muestra

Después del secado, se utilizó un mortero para triturar las muestras secas hasta conseguir una especie de pulverizado. Las muestras se almacenaron en bolsas libres de aire (Zengin et al., 2019).

Para obtener el extracto de las flores se realizaron las siguientes metodologías.

2.2.3.5 Extracción por solvente

2.2.3.5.1 Extracción por maceración

Cuando la muestra se encontró seca y triturada, a través del uso de una balanza analítica se pesó aproximadamente 20 g de la muestra pulverizada. El extracto hidroalcohólico de la flor de *S. junceum* se llevó a cabo con 150 mL de etanol al 70% y 90% durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto se filtró a través del papel filtro y, por último, con un rotavapor se evaporó al vacío a 40°C y los extractos obtenidos se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis (Nanni et al., 2018).

2.2.3.5.2 Extracción Soxhlet

La muestra seca y triturada se pesó 10 g en una balanza analítica y se colocó en papel filtro para luego ubicarla en el interior del tubo extractor, previamente se montó un equipo de extracción Soxhlet. Posteriormente, se añadió 250 mL de etanol en el balón y se empezó a calentar, controlando que sea suficiente el flujo de agua en el condensador y, además se reguló la temperatura a fin de evitar una ebullición tosca del etanol. El proceso de calentamiento continuo durante el tiempo preciso para que

recircule lo suficiente y se reduzca visiblemente la coloración del solvente más el extracto. Por último, con un rotavapor se evapora al vacío a 40°C y se almacenaron a 4°C los extractos obtenidos hasta su posterior análisis (**Karaboyaci, 2019**).

2.2.3.5.3 Cálculo del porcentaje de rendimiento

Para determinar el rendimiento de las flores de *S. junceum* obtenidos por maceración y Soxhlet con etanol al 96% y 70%, se calculó con la Ecuación 1.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{X_1}{X_0} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de rendimiento.

X₁: Pesó del extracto después de la evaporación del solvente

X₀: Pesó seco del polvo vegetal antes de la extracción

Para identificar los metabolitos secundarios del extracto de las flores se realizó un tamizaje fitoquímico con las siguientes pruebas.

2.2.3.6 Tamizaje fitoquímico

Para el análisis cualitativo de metabolitos secundarios presentes en los extractos de las flores de *S. junceum* por maceración y Soxhlet con etanol al 96% y 70% se siguió la metodología de **Pujol et al., (2020)** y **Nanni et al., (2018)**, que se detalla a continuación:

2.2.3.6.1 Ensayo de Dragendorff

Se tomó 1 ml del extracto hidroalcohólico y se evaporó en baño de agua el solvente. Se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado y 3 gotas del reactivo de Dragendorff (solución de yoduro de bismuto y potasio). La aparición de un precipitado rojo resulta positiva la prueba para alcaloides.

2.2.3.6.2 Ensayo de la espuma

En un 1 ml del extracto hidroalcohólico se diluyó 5 veces su volumen en agua, se agitó fuertemente el tubo de ensayo aproximadamente por 10 minutos. La formación de espuma de 2 mm es positiva para la prueba de saponinas.

2.2.3.6.3 Ensayo de Shinoda

Se tomo 1ml del extracto hidroalcohólico y se añadió 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña porción de cinta de magnesio metálico. Se dejó en reposo por 5 minutos y se añadió 1 ml de alcohol amílico, un cambio de coloración amarillo, naranja, carmelita o rojo intenso resulta positiva para la prueba de flavonoides.

2.2.3.6.4 Ensayo de cloruro férrico

A 1 ml del extracto hidroalcohólico se añadió 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% y se homogenizó. Una coloración morada, azul o negra es considerada positiva para la prueba de fenoles.

2.2.3.6.5 Ensayo de gelatina-sal

A 1ml del extracto hidroalcohólico se le adiciono 1 ml del reactivo gelatina-sal (solución de gelatina al 1% y de cloruro de sodio al 10%) y una formación de precipitado es considerado positivo para la prueba de taninos.

2.2.3.6.6 Ensayo de Borntrager

Se evaporo 1 ml del extracto alcohólico en baño de agua y el residuo se volvió a disolver en 1 ml de cloroformo, luego se adiciono 1 ml de hidróxido de sodio al 5%. Posteriormente se agitó mezclando las fases, y se dejó reposando hasta su separación. Si existe una coloración rosada o roja de la fase acuosa es considerada como positiva para la prueba de quinonas.

2.2.3.7 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

Como prueba complementaria se realizó espectrometría infrarroja en los extractos para comprobar la presencia de los metabolitos secundarios. La FTIR indica la presencia de grupos funcionales mediante las vibraciones de enlaces moleculares, ya que el espectro infrarrojo de cada compuesto es único, es posible compáralo con espectros de

referencia o también mediante tablas (Nandiyanto et al., 2019). El espectro infrarrojo se obtuvo utilizando un espectrómetro PerkinElmer en el rango espectral de 4000-400 cm^{-1} mediante una representación gráfica de los valores de frecuencia (cm^{-1}) ante los valores de por ciento de transmitancia (%T).

Para analizar la actividad antioxidante del extracto de las flores se realizó la siguiente metodología.

2.2.3.8 Preparación del reactivo DPPH y Trolox

Se preparo una solución de DPPH de 150 μM , primero se disolvieron 59 mg de DPPH en 100 mL de una solución metanol-agua (80:20). Se almaceno en un frasco ámbar para cubrir la solución de la luz y se agitó alrededor de 30 a 40 minutos, y se mantuvo bajo refrigeración. Por otro lado, para la curva de calibración se tomó como referencia una solución madre de Trolox a 500 μM . Se pesó 12,5 mg de Trolox, el cual se disolvió en 100 mL de una solución metanol-agua (50:50) y se agitó. A partir de la solución madre del Trolox se prepararon diluciones a diferentes concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM . (Rammal et al., 2021).

2.2.3.8.1 Preparación del extracto

Se tomo 1 mL de cada extracto obtenido de las flores y se diluyó en 10 mL de etanol al 96% y 70% respectivamente a la concentración que se utilizó para su extracción. En una placa de 96 pocillos se añadió el blanco, control y los extractos preparados, los cuales se colocaron de la siguiente manera dependiendo de la concentración del solvente:

Para los extractos que se diluyeron en etanol al 96%:

Blanco: 180 μl del diluyente DPPH (metanol-agua, 80:20) + 20 μl etanol 96%.

Control: 180 μl de la solución DPPH + 20 μl etanol 96%.

Extracto por Soxhlet: 180 μl de la solución DPPH + 20 μl extracto obtenido por Soxhlet diluido.

Extracto por maceración: 180 µl de la solución DPPH + 20 µl extracto obtenido por maceración diluido.

Para los extractos que se diluyeron en etanol al 70%:

Blanco: 180 µl del diluyente DPPH (metanol-agua, 80:20) + 20 µl etanol 70%.

Control: 180 µl de la solución DPPH + 20 µl etanol 70%.

Extracto por Soxhlet: 180 µl de la solución DPPH + 20 µl extracto obtenido por Soxhlet diluido.

Extracto por maceración: 180 µl de la solución DPPH + 20 µl extracto obtenido por maceración diluido.

Una vez preparada la placa se cubrió con papel aluminio y se dejó reposar por 40 minutos a temperatura ambiente en un lugar donde le cubra de la luz. Seguidamente se encendió el espectrofotómetro y se programó a 517 nm la longitud de onda. Se realizó 5 réplicas (Rammal et al., 2021).

2.2.3.8.2 Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH

Se calculo el porcentaje de inhibición con la siguiente formula:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de DPPH.

A_m: absorbancia de la muestra

A_b: absorbancia del blanco

A_c: absorbancia del control

Para analizar la actividad antiinflamatoria del extracto de las flores se realizó la siguiente metodología.

2.2.3.9 Actividad antiinflamatoria

Para realizar la prueba de la actividad antiinflamatoria, se realizó una mezcla en un tubo de ensayo donde se colocó 0,2 ml de albúmina de huevo de gallina fresco, con 2,8 ml solución salina tamponada con fosfato (pH 6,4) y 2 ml de cada extracto obtenido o diclofenaco como control a una concentración de 200 µg/ml. Se utilizó 2 mL de agua destilada como blanco. Todas las mezclas fueron incubadas a 37 ± 2 °C durante 15 minutos. Luego se calentaron en baño de agua a 70 °C durante 10 minutos. Después se dejó enfriar, y se midió la turbidez en un espectrofotómetro a 660 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado (Cisneros, 2021).

2.2.3.9.1 Determinación del porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria

Se calculo el porcentaje de inhibición con la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{A_c - A_m}{A_c} \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de la actividad antiinflamatoria.

A_c: absorbancia del patrón de referencia

A_m: absorbancia de cada solución diluida del extracto vegetal

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Rendimiento de los extractos

La obtención de los extractos de las flores de *S. junceum* se llevó a cabo mediante una extracción con disolvente utilizando etanol a una concentración de 96% y 70%, y se calculó el rendimiento con la Ecuación 1. Cuyos resultados Tabla 4. El rendimiento de una extracción depende en su mayoría de la polaridad del disolvente, de la composición química de los componentes a extraer, el tamaño molecular y de factores como la temperatura, tamaño de partícula, tiempo de contacto con el disolvente, relación solvente/masa y la concentración del disolvente (Soto & Rosales, 2016).

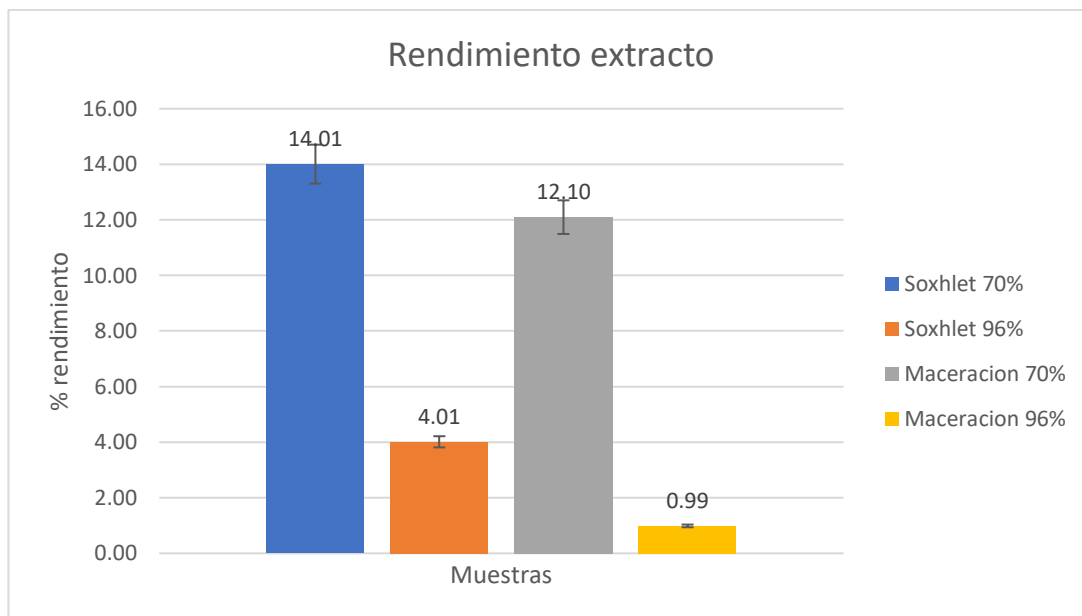
Tabla 4

Rendimiento de los extractos.

Extracción	Solvente	Rendimiento (%)
Soxhlet	Etanol 96%	4,01 ± 1,53
	Etanol 70%	14,01 ± 3,64
Maceración	Etanol 96%	0,99 ± 1,06
	Etanol 70%	12,10 ± 1,79

Figura 3

Comparativa del rendimiento todas las extracción y concentraciones.



Mediante un análisis de varianza con la prueba de Tukey con una confianza del 95%, el cual nos indicó que existe una diferencia significativa en la concentración de etanol siendo al 70%. Como se puede observar en la Figura 3 la mejor metodología y concentración de etanol fue por Soxhlet al 70%, seguidamente de la metodología de extracción por maceración a la misma concentración, siendo el rendimiento más bajo en comparación de todos.

El etanol tiene una gran ventaja en comparación a los otros disolventes orgánicos polares como el metanol, el acetato de etilo, la acetona, etc; siendo relativamente seguro para el consumo humano y especialmente este solvente se usa ampliamente para extraer fitoquímicos y compuesto bioactivos del material vegetal (**Salas et al., 2022**). Existe diferencia en el solvente a las concentraciones usadas en el estudio, siendo el etanol al 70% una mezcla de etanol y agua por lo que es más polar en comparación con el etanol al 96%, esto explicaría los rendimientos en la Figura 3 (**Lobos, 2018**).

3.1.2 Determinación de metabolitos secundarios

El tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de las flores de *S. junceum*, se muestra en la Tabla 5, la presencia de alcaloides, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides y quinonas en diferentes concentraciones. Los compuestos fenólicos

pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro que producen cuando se le agrega el cloruro férrico al 5% (Meléndez et al., 2020), con la reacción de Shinoda el cambio de color de amarillo a roja indica la presencia de flavonoides, en la identificación de quinonas indican que una coloración rojiza al realizar la prueba de Borntrager es considerado positivo (Meléndez et al., 2020). Para el ensayo de la espuma es considerado como positivo si apareció una espuma de 2 mm de espesor como mínimo y si persiste por más de 2 minutos, el ensayo de Dragendorff será positivo si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++), para el ensayo gelatina sal será positivo si se forma un precipitado (Nanni et al., 2018). Según Pujol et al., (2020) también obtuvieron los metabolitos identificados en el tamizaje y además estos realizaron otras pruebas en que obtuvieron cardenólido, lactonas, resina y catequinas.

Tabla 5

Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de las flores

Ensayo	Metabolito	Extracción por disolvente			
		Soxhlet (etanol 96 %)	Soxhlet (etanol 70%)	Maceración (etanol 96%)	Maceración (etanol 70%)
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++	+++	+++
Espuma	Saponinas	++	+++	++	+++
Shinoda	Flavonoides	+++	+++	-	+++
Cloruro férrico	Fenoles	+	+	+	+

Gelatina-sal	Taninos	+++	+++	+++	+++
Borntrager	Quinonas	-	++	-	+++

Nota: El signo (+++) significa presencia abundante del metabolito, (++) presencia mediana del metabolito y (+) presencia mínima del metabolito (Ayala, 2018).

En el caso del extracto obtenido por Soxhlet con etanol al 96% presento una gran abundancia de alcaloides, flavonoides y taninos, una mediana presencia de saponinas, una baja concentración de fenoles y ninguna presencia de quinonas. Casi el mismo caso ocurre con el extracto obtenido por maceración con etanol al 96%, en la que se diferencia en la prueba de Shinoda por no tener presencia de flavonoides.

Por otro lado, los extractos con etanol al 70% tuvieron las mismas concentraciones de metabolitos; en la que tienen una abundante concentración de alcaloides, saponinas, flavonoides y taninos, mientras que se obtuvo una mediana concentración de fenoles. En lo que se diferencia los extractos fue en la concentración de quinonas, siendo el extracto por maceración el más abundante y mientras que por Soxhlet tuvo una poca concentración de estos.

De acuerdo con **del Pilar et al., (2021)** estos extractos vegetales son una mezcla amplia de metabolitos secundarios, que en gran medida posee carbohidratos, cetonas, alcoholes, aldehídos, proteínas, etc. Mismos que, son los responsables de las magníficas propiedades biológicas de aquellas plantas medicinales y aromáticas. El tamizaje fitoquímico se basa en la identificación de estos metabolitos secundarios que están presentes en los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural, a través de reacciones y análisis químicos descritos (**Montoya et al., 2022**).

3.1.3 Análisis de espectroscopia infrarroja (FTIR)

El extracto de las flores por maceración con etanol al 70% presento las bandas que se muestran en la Figura 4A. Se observo que la banda de 3341 cm⁻¹ corresponde a vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo de los fenoles (ocurre en pares en

3400 cm^{-1} y en 3300 cm^{-1}). Se encontró una banda de 1633 que corresponde al grupo carbonilo característico de las flavonas, es decir, de la luteolina. Una banda de 1407 corresponde al estiramiento del anillo C=C (ocurre en pares en 1638 cm^{-1} y en 1400 cm^{-1}). Y la banda de 1044 cm^{-1} probablemente está relacionada con alcoholes primarios y secundarios y con el grupo éster estirable C-O (**Juradin et al., 2019**).

En la Figura 4B del extracto por Soxhlet con etanol al 70%. Se encontró una banda de 3342 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo de los fenoles. Y, por último, la banda de 1633 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo característico de las flavonas, es decir, de la luteolina (**Bedreddine et al., 2019**).

El extracto por maceración con etanol al 96% correspondiente a la Figura 5A, se encontró una banda de 3334 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo de los fenoles. La banda de 2973 cm^{-1} , 2891 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} podría deberse al etanol. La banda 1646 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo característico de las flavonas, es decir, de la luteolina. La banda de 1085 posiblemente podría estar relacionada con la vibración de estiramiento de (C-O-C). La banda de 1044 cm^{-1} probablemente está relacionada con alcoholes primarios y secundarios y con el grupo éster estirable C-O. Y la banda de 879 estaría relacionada con la vibración de deformación CH fuera del plano de los grupos funcionales principalmente de carbohidratos (**Kovačević et al., 2021**).

El extracto por maceración con etanol al 96% en la Figura 5B. Se observó una banda de 3336 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo de los fenoles. La banda de 2973 cm^{-1} , 2885 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} podría deberse al etanol. La banda de 1086 posiblemente podría estar relacionada con la vibración de estiramiento de (C-O-C). La banda de 1044 cm^{-1} probablemente está relacionada con alcoholes primarios y secundarios y con el grupo éster estirable C-O. Y la banda de 879 estaría relacionada con la vibración de deformación CH fuera del plano de los grupos funcionales principalmente de carbohidratos (**Margariti, 2019**).

Figura 4.

Espectrofotometría infrarroja realizado en el extracto por maceración en etanol al 70% (A) y Soxhlet con etanol al 70% (B).

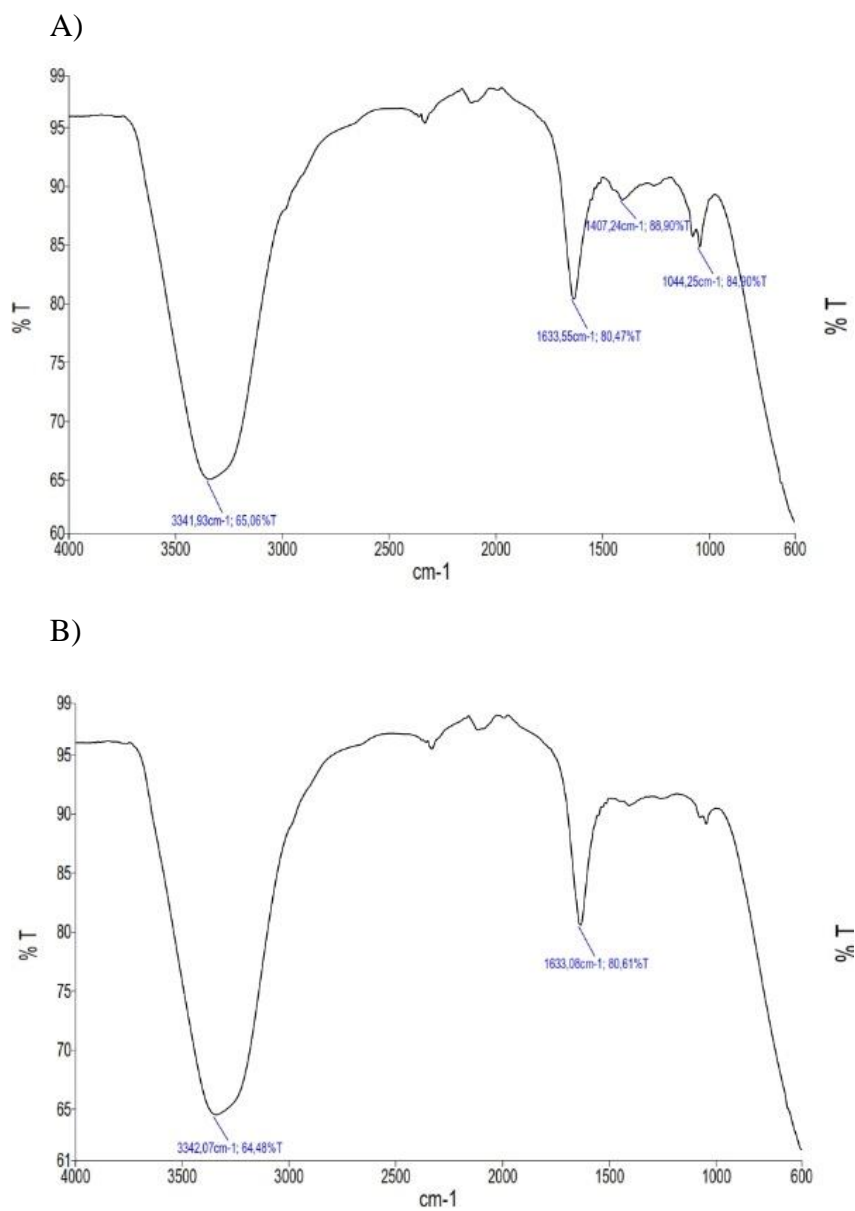
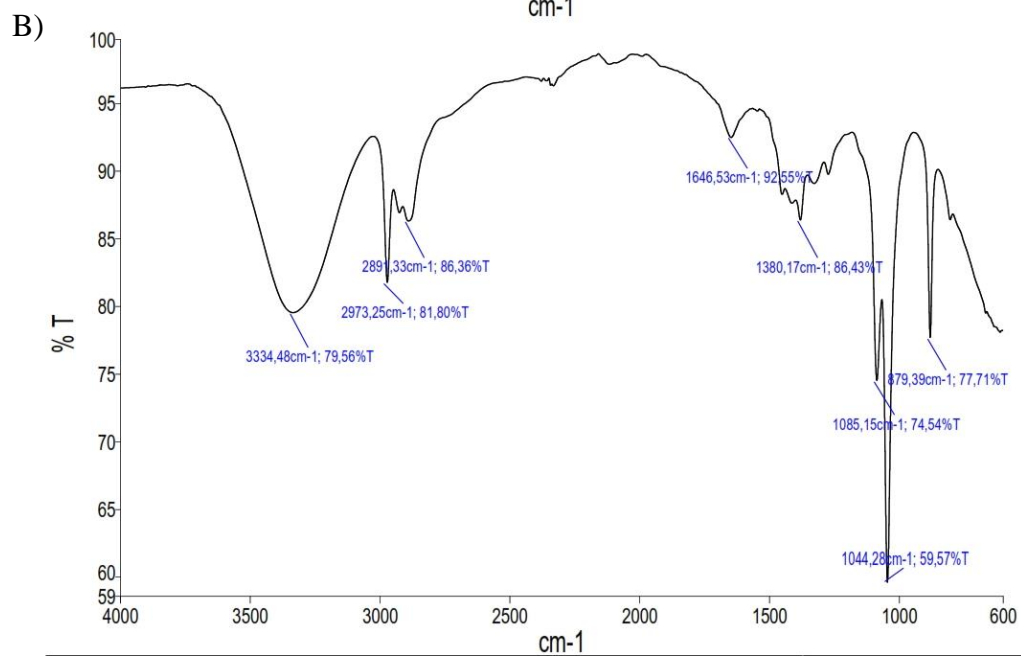
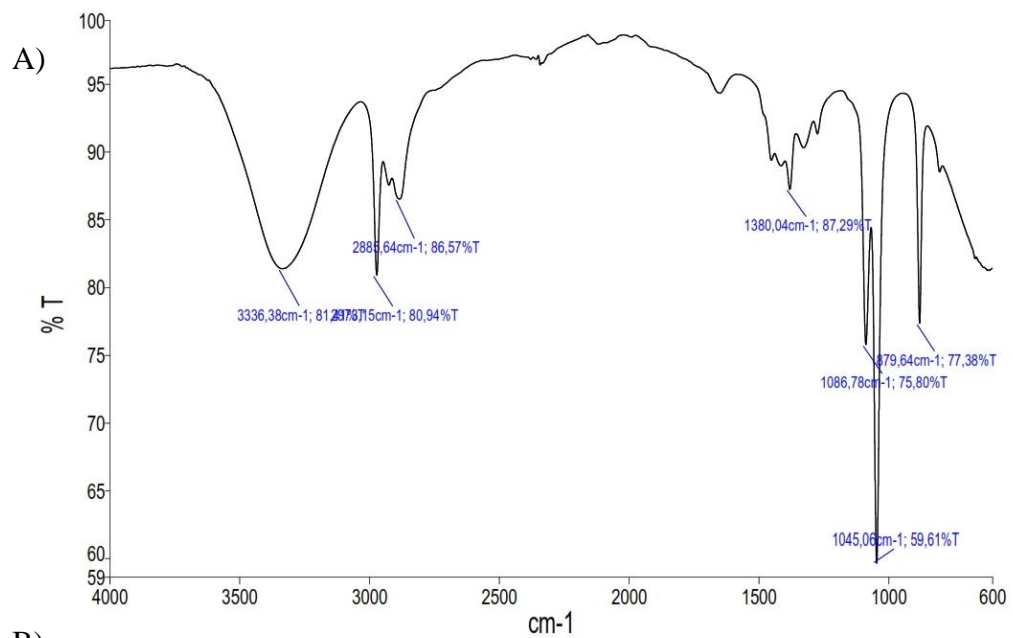


Figura 5.

Espectrofotometría infrarroja realizada en el extracto por maceración en etanol al 96% (A) y Soxhlet con etanol al 96% (B).



3.1.4 Determinación de la actividad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de la especie *S. junceum* se llevó a cabo por la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En la Tabla 6, se ilustró el porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras que fueron calculadas con la Ecuación 2. Se evidenció que el resultado de la actividad antioxidante del extracto obtenido por Soxhlet con etanol al 70% posee mayor capacidad antioxidante en comparación de los demás extractos.

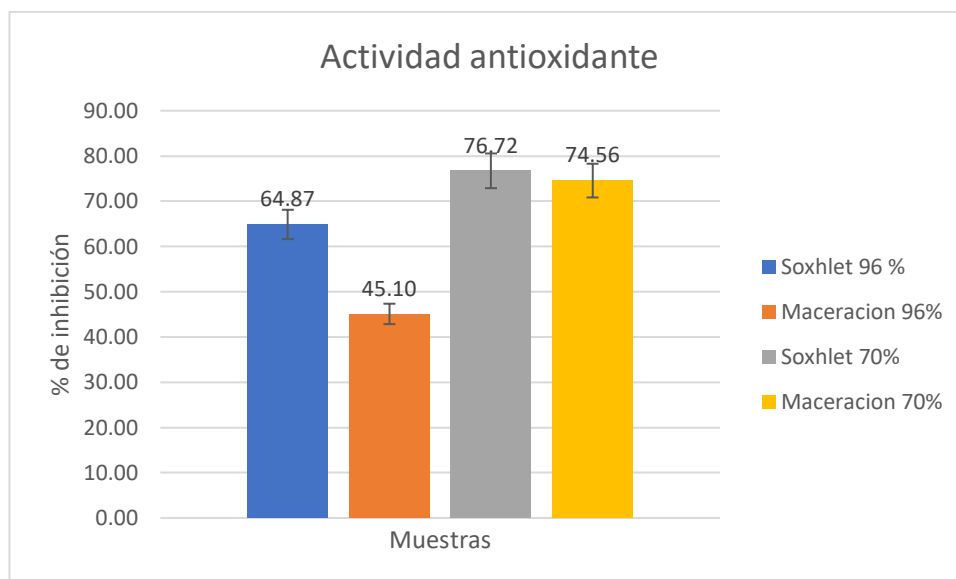
Tabla 6

Capacidad antioxidante de los extractos de los extractos

Extracción	Solvente	% de Inhibición	μ mol Equivalente Trolox/L
Soxhlet	Etanol 96%	64,87 ± 0,05	362,49 ± 0,04
	Etanol 70%	76,72 ± 0,01	429,92 ± 0,05
Maceración	Etanol 96%	45,10 ± 0,06	160,32 ± 0,06
	Etanol 70%	74,56 ± 0,01	417,61 ± 0,02

Figura 6

Comparación grafica de la actividad antioxidante en las diferentes metodologías y concentraciones



Un análisis de varianza con la prueba de Tukey al 95% de confianza se obtuvo una diferencia significativa en el método de extracción y en la concentración del solvente. A una menor concentración del solvente tiene una mayor actividad antioxidante, por lo que el ensayo DPPPH es más favorable para reaccionar con compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Por lo que el etanol a una concentración de 96% es menos eficiente para extraer compuestos fenólicos de bajo peso molecular con alta capacidad antioxidante en comparación al etanol al 70% (Aida, 2011) y (Yuniarti et al., 2020).

3.1.5 Actividad antiinflamatoria

Mediante la Ecuación 3 se obtuvo los valores expresados en la Tabla 7, se muestra el porcentaje de inhibición de los concentrados proteicos sobre la desnaturalización de las proteínas de la albúmina de huevo frente al diclofenaco, el estándar empleado para la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

El máximo porcentaje de inhibición de la desnaturalización alcanzado fue por Soxhlet con etanol al 96% con $76,55\% \pm 0,05$ y el de menor rendimiento el de maceración con etanol al 70% con $40,79\% \pm 0,04$. Se realizó un análisis de varianza con la prueba de Tukey con el 95% de confianza donde se obtuvo una diferencia significativa en el método de extracción y en la concentración del solvente.

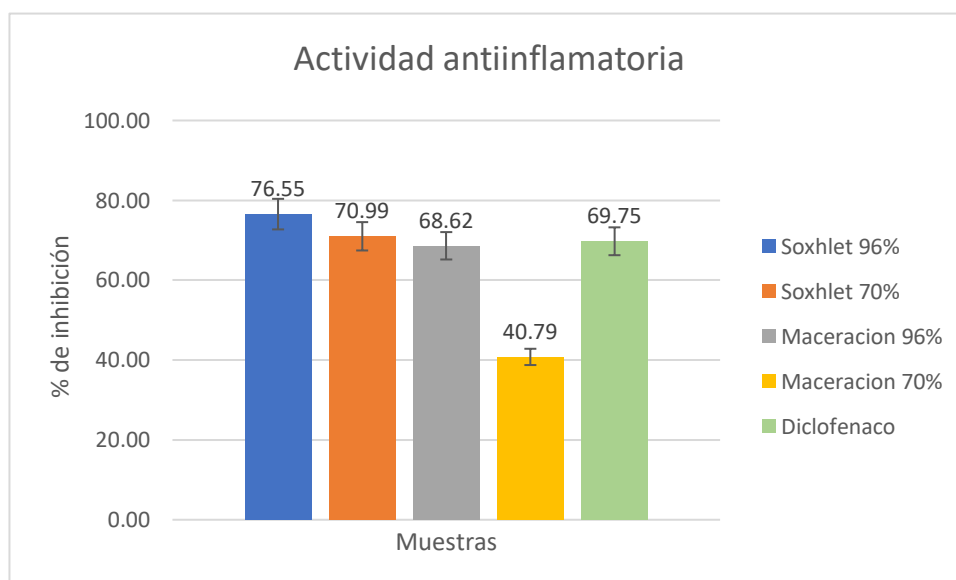
Tabla 7

Porcentaje de inhibición antiinflamatoria que presenta los extractos

Extracción	Solvente	% de inhibición
Soxhlet	Etanol 96%	76,55 ± 0,05
	Etanol 70%	70,99 ± 0,07
Maceración	Etanol 96%	68,62 ± 0,03
	Etanol 70%	40,79 ± 0,04
Diclofenaco		69,75 ± 0,05

Figura 7

Comparación grafica de la actividad antiinflamatoria en las diferentes metodologías y concentraciones



La desnaturalización de las proteínas es una causa bien documentada de la inflamación y artritis reumatoide. Por lo que, con esta investigación se evaluó la capacidad de los extractos de *S. junceum* para reducir la desnaturalización térmica de la proteína

albúmina, que vendría a ser un factor que contribuye a su actividad antiinflamatoria (Cisneros, 2021).

Se utilizó el diclofenaco de sodio, ya que es un potente fármaco no esteroideo (AINE) que posee actividades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas la cual se utiliza para tratar enfermedades degenerativas, y como la mayoría de este tipo de fármacos, posee la capacidad intrínseca de estabilizar o prevenir la desnaturalización de la albúmina tratada térmicamente a un pH fisiológico de 6,2–6,5 (Bariguan et al., 2020). Se utilizó una concentración de 200 µg/ml porque muestra una inhibición de 66,786% ± 2,95, superando todos los extractos excepto el extracto por maceración al 70% (Alsahli et al., 2021).

El mecanismo de desnaturalización está involucrado en la alteración de la fuerza electrostática de los enlaces de hidrógeno, hidrófobos y disulfuro (Menghini et al., 2018). Y varios compuestos como: fenoles, flavonoides, glucósidos, carotenoides, terpenoides y esteroides exhiben una capacidad mediadora que reduce el impacto de estos procesos desnaturalizantes; por lo que, los extractos, al presentar una notable cantidad de estos compuestos, exhibe una considerable actividad antiinflamatoria. Este fue el caso del extracto por Soxhlet con etanol al 96% por tener varios compuestos que se puede observar en el infrarrojo de la Figura 5 B por lo que exhibió el mayor rendimiento (Truong et al., 2019).

3.2 Verificación de hipótesis

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que los extractos obtenidos de las flores *S. junceum* presentaron actividad antioxidante y antiinflamatoria.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusión

- Se obtuvo extractos de las flores de *S. junceum* mediante la metodología de extracción por Soxhlet y maceración utilizando etanol al 96% y 70%. El mejor rendimiento fue el extracto por Soxhlet con etanol al 70% y el más bajo fue el extracto por maceración con etanol al 96% siendo de $14,01\% \pm 3,64$ y $0,99\% \pm 1,06$ respectivamente.
- Se determinó cualitativamente los metabolitos secundarios de los extractos mediante pruebas de tamizaje fitoquímico. En que se identificaron alcaloides, saponinas, flavonoides, fenoles, taninos y quinona, siendo el extracto por Soxhlet con etanol al 70% el que tuvo la presencia y mayor concentración de los metabolitos. Adicionalmente, se realizó espectrometría infrarroja para verificar la presencia de los metabolitos que se identificaron en el tamizaje fitoquímico.
- Se analizó la capacidad antioxidante de los extractos de las flores mediante la técnica de DPPH. El extracto por Soxhlet con etanol al 70% obtuvo la mayor actividad antioxidante siendo de $76,72\% \pm 0,01$ y el extracto por maceración con etanol al 96% fue $45,10\% \pm 0,06$ siendo el más bajo en comparación de todos.

- Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos por el método de inhibición de la desnaturalización de la proteína de la albumina del huevo de gallina fresco. El mejor extracto fue por Soxhlet con etanol al 96% con un rendimiento del $76,55\% \pm 0,05$ y el más bajo de fue $40,79\% \pm 0,04$ siendo el extracto por maceración al 70%.
- Los compuestos producidos por *S. junceum* mostraron actividad antioxidante y antiinflamatoria, lo que verifica su uso medicinal. Además, se podrá llevar a cabo este estudio *in vivo*, ya que esta planta es rica en flavonoides y se han descrito estudios en la que se utiliza para combatir a las úlceras, lo que podría aportar a una alternativa en el campo de la medicina a futuro.

4.2 Recomendaciones

- Utilizar otro solvente polar para la extracción que sea diferente al etanol para comparar la eficiencia que tiene en los extractos de las flores y en las pruebas realizadas.
- Cuantificar por espectrofotometría los metabolitos presentes en los extractos especialmente en los flavonoides, ya que son fundamentales para el estudio por su característica antioxidante y antiinflamatoria.
- Aumentar el tiempo de extracción en la metodología por maceración que sea mayor a 48 horas, ya que a mayor tiempo que pase el extracto vegetal con el solvente mayor será los metabolitos obtenidos.
- Aumentar diferentes concentraciones de diclofenaco y de los extractos en la actividad antiinflamatoria.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Aida, W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), condensed tannin content (CTC), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical-scavenging capacity, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging capacity. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427–1435.
- Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. v., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. En *Molecules* (Vol. 27, Número 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Alsahli, M., Almatroodi, S., Almatroudi, A., Khan, A., Anwar, S., Almutary, A., Alrumaihi, F., & Rahmani, A. H. (2021). 6-Gingerol, a Major Ingredient of Ginger Attenuates Diethylnitrosamine -Induced Liver Injury in Rats through the Modulation of Oxidative Stress and Anti-Inflammatory Activity. *Mediators of Inflammation*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6661937>
- Angeli, L., Imperiale, S., Ding, Y., Scampicchio, M., & Morozova, K. (2021). A novel stoichio-kinetic model for the dpph• assay: The importance of the side reaction and application to complex mixtures. *Antioxidants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071019>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2017). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494, 161–172. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>
- Ayala, E. (2018). Efecto genotóxico in vitro de plantas medicinales antibacterianas *Spartium junceum* “retama”, *Caesalpinia spinosa* (Malina) *Kuntze* “tara” y

Euca/iptus globulus Labill “eucalipto”. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA*, 127.

Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias. (2003). *Biota - Spartium junceum L.*
<https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/F00590>

Bariguián, F., Fayet, M., & Hagen, M. (2020). Topical diclofenac, an efficacious treatment for osteoarthritis: A narrative review. *Rheumatology and Therapy*, 7(2), 217–236. <https://doi.org/10.1007/S40744-020-00196-6/TABLES/3>

Bedreddine, M., Nekkaa, S., & Guessoum, M. (2019). Poly (lactic acid)/(*Spartium junceum*)fibers biocomposites: effects of the fibers content and surface treatments on the microstructure and thermomechanical properties. *Composite Interfaces*, 26(12), 1101–1121. <https://doi.org/10.1080/09276440.2019.1591577>

Bhambhani, S., Kondhare, K. R., & Giri, A. P. (2021). Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. En *Molecules* (Vol. 26, Número 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26113374>

Bian, M., Ma, Q., Wu, Y., Du, H., & Guo, G. (2021). Small molecule compounds with good anti-inflammatory activity reported in the literature from 01/2009 to 05/2021: a review. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 2139–2159. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1984903>

Bussmann, R. W. (2018). *PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES Y LA AMAZONIA-La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú Medicinal plants and their ecology in Northern Peru and Southern Ecuador View project Ethnobotany and livelihoods in Madagascar and Eastern Africa View project.*
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3485.0962>

Cao, X., Yang, L., Xue, Q., Yao, F., Sun, J., Yang, F., & Liu, Y. (2020). Antioxidant evaluation-guided chemical profiling and structure-activity analysis of leaf extracts from five trees in *Broussonetia* and *Morus* (Moraceae). *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61709-5>

- Cisneros, J. (2021). *Técnicas de evaluación de la actividad antiinflamatoria “in vitro” y su aplicabilidad a plantas medicinales*. Universidad de Cuenca.
- Corona, L., Hernández, D., & Meza, O. (2019). Análisis de parámetros fisicoquímicos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en piel, pulpa y fruto entero de cinco cultivares de manzana (*Malus domestica*) cosechadas en México//Analysis of physicochemical parameters, phenolic compounds and antiox. *Biotecnia*, 22(1), 166–174. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i1.1193>
- Cruz, S., Queiroz, J., Medeiros, A., França, A., Piuvezam, G., Lima, B., Passos, T., & Araújo, A. (2022). Anti-inflammatory agents as modulators of the inflammation in adipose tissue: A systematic review. *PLoS ONE*, 17(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273942>
- Daley, S., & Cordell, G. (2021). Alkaloids in contemporary drug discovery to meet global disease needs. *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26133800>
- De la Cruz, E. (2015). Efecto antiulceroso y antisecreto del extracto hidroalcoholico de las flores del (*Spartium junceum*) “retama”. *Universidad Nacional de San Martín*, 1–125.
- Duarte, A., Jiménez, J., Pinedai, J., González, C., & García, M. (2020). Extraction of bioactive substances from *pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) by dynamic maceration. *Acta Biologica Colombiana*, 25(1), 61–74. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Fernández, S. (2020). Extraction methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments comparison using. *Centro azúcar*, 47(1), 14–24.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15). <https://doi.org/10.3390/ma14154135>

- Frezzini, M. A., Castellani, F., Francesco, N., Ristorini, M., & Canepari, S. (2019). Application of DPPH assay for assessment of particulate matter reducing properties. *Atmosphere*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/ATMOS10120816>
- Gonçalves, F. G., Chaves, I., Vargas, M., Brito, A., da Silva, É., López, Y., & de Oliveira, R. (2021). Tannin extraction from heat-treated pinus spp bark - Application as an adhesive. *Madera y Bosques*, *27*(1), 1–9. <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2712041>
- Jaume, G., & Mascaró, B. (2020). Biología reproductiva de (*Spartium junceum*) una leguminosa naturalitzada a l'illa de mallorca amb potencial invasor. *TREBALL FI DE GRAU*.
- Jiménez, A., Mora, K., Rosete, S., & Cabrera, C. (2021). Utilización de plantas medicinales en cuatro localidades de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Siembra*, *8*(2 SE-Artículo original), e3223. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.3223>
- Joshi, D., Jat, D., & Patil, B. (2021). In vitro protein denaturation and membrane stabilizing anti-arthritic activity of aqueous extracts of bark of *Ficus benghalensis* L. against methotrexate. *The Pharma Innovation*, *10*(4), 689–692. <https://doi.org/10.22271/tpi.2021.v10.i4j.6038>
- Juradin, S., Boko, I., Netinger, I., Jozić, D., & Mrakovčić, S. (2019). Influence of harvesting time and maceration method of Spanish Broom (*Spartium junceum*) fibers on mechanical properties of reinforced cement mortar. *Construction and Building Materials*, *225*, 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.07.207>
- Karaboyaci, Ö. (2019). Chemical Composition of (*Spartium Junceum*) flowers direct extraction with polar and apolar solvents. *International Conferences on Science and Technology Engineering Science and Technology*, 471–476.
- Kotha, R., Tareq, F., Yildiz, E., & Luthria, D. (2022). Oxidative stress and antioxidants—a critical review on in vitro antioxidant assays. *Antioxidants*, *11*(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>

- Kovačević, Z., Sutlović, A., Matin, A., & Bischof, S. (2021b). Natural dyeing of cellulose and protein fibers with the flower extract of (*Spartium junceum*) Plant. *Materials*, *14*(15). <https://doi.org/10.3390/ma14154091>
- Kurek, J. (2019). Introductory chapter: Alkaloids - their importance in nature and for human life. En J. Kurek (Ed.), *Alkaloids*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85400>
- Lara, F., Calleja, J., & Garilleti, R. (2019). *Metodologías para el seguimiento del estado de conservación de los tipos de hábitat. SELECCIÓN Y DESCRIPCIÓN DE VARIABLES QUE PERMITAN DIAGNOSTICAR EL ESTADO DE CONSERVACIÓN DEL PARÁMETRO 'ESTRUCTURA Y FUNCIÓN' DE LOS DIFERENTES TIPOS DE HÁBITAT DE BOSQUE.*
- Lobos, R. (2018). *Optimización de los parámetros de extracción discontinua sólido-líquido de los antioxidantes de las hojas de Anona (Annona x atemoya Mabb.)*. Universidad Nacional Amazónica De Madre De Dios.
- Manassis, G., Kalogianni, A., Lazou, T., Moschovas, M., Bossis, I., & Gelasakis, A. (2020). Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. *MDPI*, *9*(12), 1–30. <https://doi.org/10.3390/antiox9121215>
- Margariti, C. (2019). The application of FTIR microspectroscopy in a non-invasive and non-destructive way to the study and conservation of mineralised excavated textiles. *Heritage Science*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s40494-019-0304-8>
- Medina, U., Millán, M., Arana, V. E., & Segura, M. R. (2020). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of chaya extracts (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). *Nutricion Hospitalaria*, *37*(1), 46–55. <https://doi.org/10.20960/nh.02752>
- Meléndez, L., Cabrera, B., Soto, I., Castro, A., & Ramírez, J. (2020). Natural antioxidants and their reducing power against silver ions: Alternative in the recovery of metals. *Ciba Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, *10*(20). <https://doi.org/https://doi.org/10.23913/ciba.v9i17.95>

- Mendonça, J., Guimarães, R., Zorretto, V., Fernandes, C., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K., Hiane, P., Melo, E., Vilela, M., & Nascimento, V. (2022). Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules*, 27(11). <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
- Menghini, L., Massarelli, P., Bruni, G., & Pagiotti, R. (2018). Anti-inflammatory and analgesic effects of (*Spartium junceum*) flower extracts: A preliminary study. *Journal of Medicinal Food*, 9(3), 386–390. <https://doi.org/10.1089/JMF.2006.9.386>
- Mondal, A., Gandhi, A., Fimognari, C., Atanasov, A., & Bishayee, A. (2019). Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *European Journal of Pharmacology*, 858. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172472>
- Montoya, S., Castillo, B., Cajas, M., & Garcia, F. (2022). Actividad antioxidante, fenoles totales y tamizaje fitoquímico de Dragón Fruit roja y amarilla. *RECIAMU*, 408–417. <https://www.reciamuc.com/index.php/RECIAMUC/article/view/919/1339>
- Moura, M., Araújo, V., & Sousa, J. (2020). Análise farmacocinética, toxicológica e farmacodinâmica in silico do flavonoide quercetina isolado das sementes de Bixa orellana l. *Research, Society and Development*, 9(3), e170932242. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i3.2242>
- Munteanu, I., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97–118. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>
- Nanni, V., Canuti, L., Gismondi, A., & Canini, A. (2018c). Hydroalcoholic extract of (*Spartium junceum*). flowers inhibits growth and melanogenesis in B16-F10 cells

- by inducing senescence. *Phytomedicine*, 46, 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.008>
- Noriega, P. (2018). La flora medicinal de los parques del distrito metropolitano de Quito. En *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Pilar, M., Gamarra, O., & Romel, F. (2021). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de seis plantas medicinales usadas en Amazonas. En *Medicina naturalista* (Vol. 15).
- Pizzi, A. (2019). Tannins: Prospectives and actual industrial applications. *Biomolecules*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biom9080344>
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020b). Phytochemical screening of extracts obtained from the (*Sapindus saponaria*) plant that grows in Cuba. *Bionatura*, 5(3).
<https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.7>
- Ramírez, C. (2018). Uso de flavonoides como ingrediente activo en alimentos funcionales. *Agro Productividad*, 11(11).
<https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1296>
- Rammal, H., Zahreddine, H., & Hijazi, A. (2021). Chemical composition and antioxidant capacity of (*Spartium junceum*) grown in Lebanon. *Journal of Medical Research and Health Sciences*, 4(11), 1588–1591.
- Ramos, D. (2018). *Metabolismo hepático de derivados de taninos y su bioactividad en inflamación*. Universidad Central del Ecuador.
- Rengifo, D. (2018). eEstudio fitoquímico cualitativo preliminar y cuantificación de flavonoides y taninos del extracto etanólico de hojas de (*Desmodium vargasianum*) Schubert. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(2), 175–182. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v84i2.139>
- Rivero, D., & Dahl, W. (2020). Dieta e inflamación crónica. *EDIS*, 2020(5).
<https://doi.org/10.32473/edis-fs405-2020>

- Rizza, S., Rossi, M., Spallino, R., Tedeschi, R., Marzachì, C., Catara, V., & Tessitori, M. (2021). Ecology-based analysis of a recent association between (*Spartium junceum*) and 16SrV phytoplasma. *Plant Pathology*, 70(2), 305–317. <https://doi.org/10.1111/ppa.13300>
- Sajid, M., Channakesavula, C., Stone, S., & Kaur, P. (2021). Synthetic biology towards improved flavonoid pharmacokinetics. *Biomolecules* (Vol. 11, Número 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom11050754>
- Salas, L., Moncayo, M., Borroel, V., Guzmán, T., & Ramírez, M. (2022). Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos solventes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 28, 113–123. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V13I28.3267>
- Shamsudin, N., Ahmed, Q., Mahmood, S., Shah, S., Sarian, M., Khattak, M., Khatib, A., Sabere, A., Yusoff, Y., & Latip, J. (2022). Flavonoids as antidiabetic and anti-inflammatory agents: A review on structural activity relationship-based studies and meta-analysis. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232012605>
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. *Molecules*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112590>
- Soto, M., & Rosales, 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 sideroxylla*). *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P., Kapoor, A., Vo, D., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 19, Número 4, pp. 3409–3443). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8>

- Truong, D., Nguyen, H., Thuy, N., Ta, A., Bui, A., Do, H., & Nguyen, H. (2019). *Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and In Vitro Anti-Inflammatory Activities of Severinia buxifolia*. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B., Emwas, A., & Jaremko, M. (2020). Important flavonoids and their role as a therapeutic agent. En *Molecules* (Vol. 25, Número 22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>
- WatreLOT, A., & Norton, E. (2020). Chemistry and reactivity of tannins in vitis spp.: A review. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092110>
- Yanchaguano, J., & Francisco, J. (2019). Medicina convencional frente a medicina tradicional: preferencias de uso en una comunidad rural del Ecuador
Conventional medicine versus traditional medicine : preferences for use in a rural community in Ecuador. *Conecta Libertad*, 1(1), 44–54.
- Yıldırım, N., Pulatkan, M., & Turna, İ. (2017). Effects of different medium on seed germination of (*Spartium junceum*) with medicinal and aromatic importance. *International Journal of Secondary Metabolite*, 376–383. <https://doi.org/10.21448/ijsm.374627>
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R., & Nizam, M. (2020). Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method. *Journal of Physics: Conference Series*, 1462(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1462/1/012026>
- Zappavigna, S., Cossu, A., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G., Nicoletti, G., Filosa, R., & Caraglia, M. (2020). Anti-inflammatory drugs as anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms21072605>
- Zengin, G., Mahomoodally, M., Picot, C., Cakmak, Y., Uysal, S., & Aktumsek, A. (2019). In vitro tyrosinase inhibitory and antioxidant potential of (*Consolida*

orientalis), (*Onosma isauricum*) and (*Spartium junceum*) from Turkey. *South African Journal of Botany*, 120, 119–123.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.010>

Anexos

ANEXO A. Extracción

Figura A1

Preparación del material vegetal.



Figura A2

Secado y pulverizado de las muestras.



Figura A3

Extracción por maceración con etanol al 70% (izquierda) y 96% (derecha) de las muestras vegetales.



Figura A4

Pesaje y armado de los cartuchos del material vegetal para el tubo extractor Soxhlet.



Figura A5

Extracción por Soxhlet del material vegetal con etanol al 70% (izquierda) y 96% (derecha).



Figura A6

Rota evaporación de los extractos obtenidos por maceración y Soxhlet.

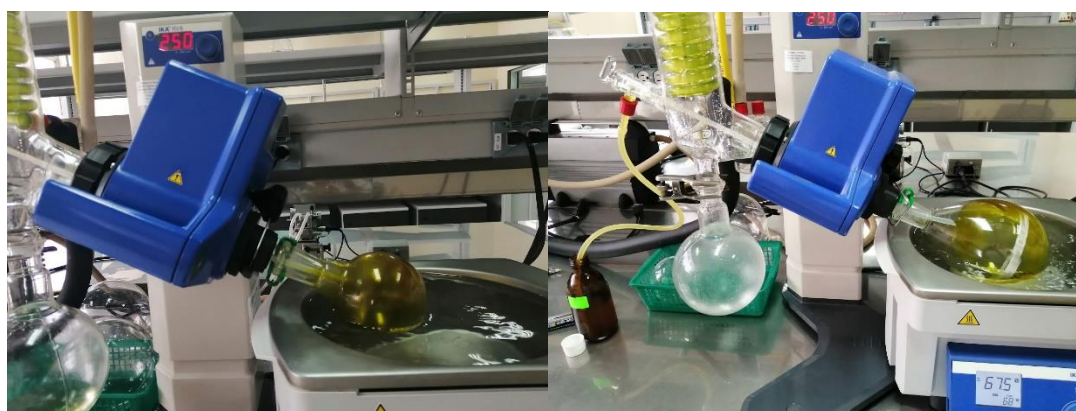
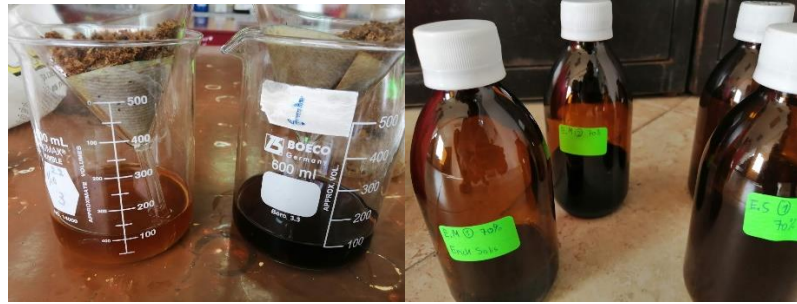


Figura A7

*Resultado de la extracción con disolvente de las flores de *S. junceum*.*



Análisis de varianza y prueba de Tukey del rendimiento

Análisis de la varianza

Variable	N	R2	R2 AJ	Cv
Rendimiento	12	0,93	0,90	24,54

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F. V	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	363,99	3	121,33	33,41	0,0001	
Método	18,25	1	18,25	5,01	0,0556	
Concentración	334,12	1	334,12	91,72	<0,0001	
Replica	11,62	1	11,62	3,19	0,1120	1,21
Error	29,14	8	3,64			
Total	393,13	11				

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 2,54101

Error: 3,6426 g.l: 8

Método	Medias	n	E. E	
Maceración	6,54	6	0,78	A
Soxhlet	9,01	6	0,78	A

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 2,54101

Error: 3,6426 g.l: 8

Concentración	Medias	n	E. E	
96%	2,50	6	0,78	A
70%	13,05	6	0,78	B

ANEXO B. Tamizaje fitoquímico

Figura B1

Ensayo de Dragendorff en el extracto por maceración con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B2

Ensayo de Dragendorff en el extracto por maceración con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B3

Ensayo de Dragendorff en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).

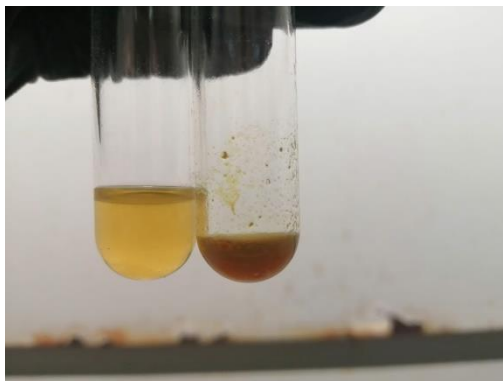


Figura B4

Ensayo de Dragendorff en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).

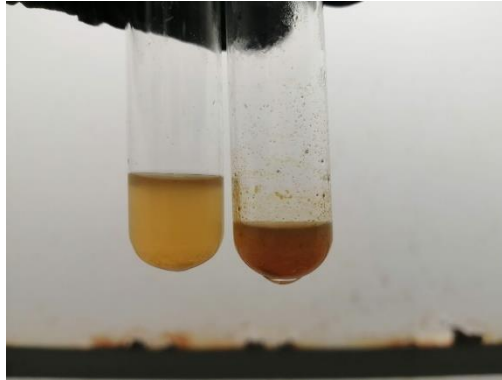


Figura B5

Ensayo de espuma en el extracto por maceración con etanol al 70% (izquierda) y su control (derecha).

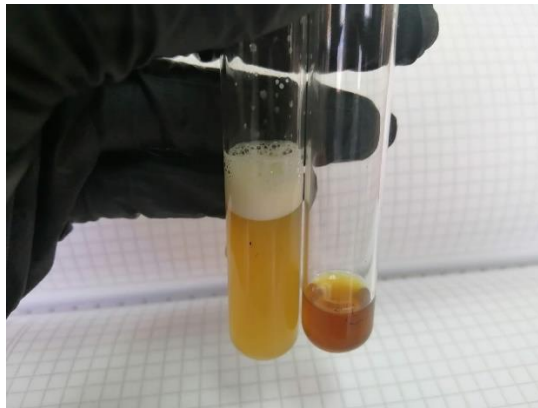


Figura B6

Ensayo de espuma en el extracto por maceración con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).

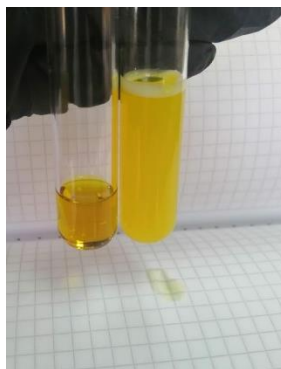


Figura B7

Ensayo de espuma en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B8

Ensayo de espuma en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B9

Ensayo gelatina sal en el extracto por maceración con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).

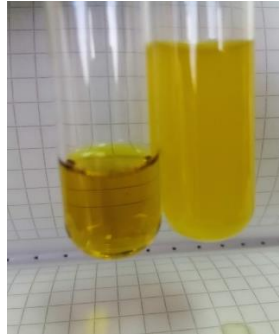


Figura B10

Ensayo gelatina sal en el extracto por maceración con etanol al 70%.



Figura B11

Ensayo gelatina sal en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).

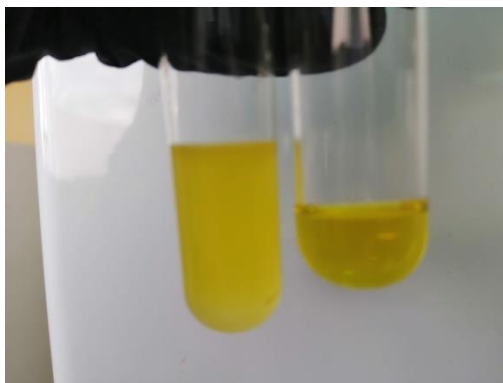


Figura B12

Ensayo gelatina sal en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B13

Ensayo clouro ferrico en el extracto por maceracion con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B14

Ensayo clouro ferrico en el extracto por maceracion con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B15

Ensayo clouro ferrico en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B16

Ensayo clouro ferrico en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (izquierda) y su control (derecha).

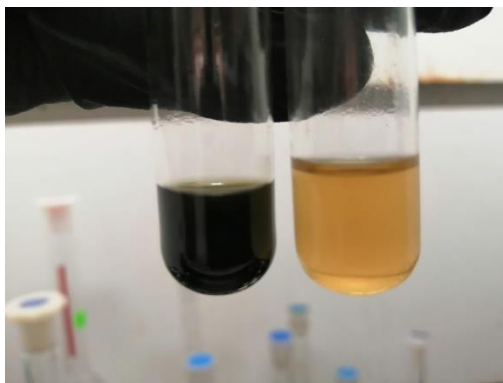


Figura B17

Ensayo de shinoda en el extracto por maceracion con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B18

Ensayo de shinoda en el extracto por maceracion con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B19

Ensayo de shinoda en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (izquierda) y su control (derecha).

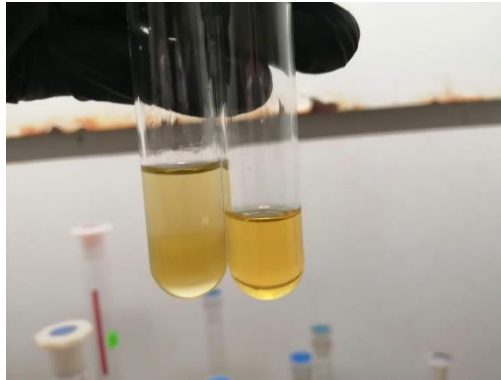


Figura B20

Ensayo de shinoda en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (izquierda) y su control (derecha).



Figura B21

Ensayo de Borntrager en el extracto por maceracion con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B22

Ensayo de Bortrager en el extracto por maceracion con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).



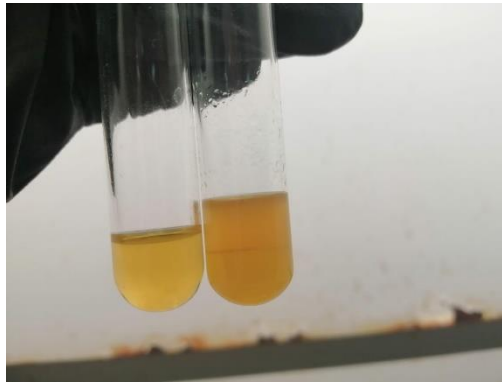
Figura B23

Ensayo de Bortrager en el extracto por Soxhlet con etanol al 70% (derecha) y su control (izquierda).



Figura B24

Ensayo de Borntrager en el extracto por Soxhlet con etanol al 96% (derecha) y su control (izquierda).



ANEXO C. Actividad antioxidante

Figura C1

Preparación de la concentración de los extractos.



Figura C2

Preparación de la placa de 96 pocillos de los extractos con etanol al 70%.



Figura C3

Medición de la placa de 96 pocillos de los extractos con etanol al 70%.

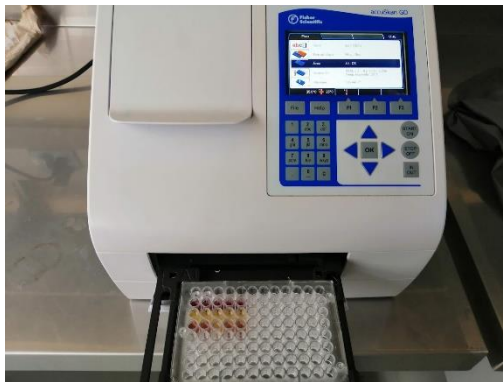


Figura C4

Preparación de la placa de 96 pocillos de los extractos con etanol al 96%.



Figura C5

Medición de la placa de 96 pocillos de los extractos con etanol al 96%.

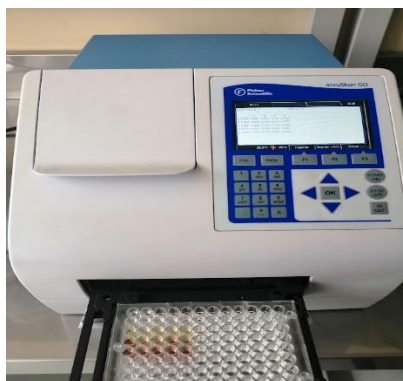


Tabla C1. Datos de absorbancias del extracto de las flores en etanol al 96%.

Concentración	Replicas					Promedio	Desviación
	1	2	3	4	5		
Blanco	0,046	0,048	0,049	0,050	0,052	0,049	0,002
Control	0,628	0,626	0,737	0,667	0,758	0,683	0,061
Soxhlet	0,215	0,225	0,315	0,304	0,300	0,272	0,048
Maceración	0,741	0,361	0,355	0,581	0,448	0,497	0,164

Tabla C2. Datos de absorbancias del extracto de las flores en etanol al 70%.

Concentración	Replicas	Promedio	Desviación
---------------	----------	----------	------------

	1	2	3	4	5		
Blanco	0,046	0,050	0,057	0,055	0,063	0,0542	0,007
Control	0,582	0,524	0,497	0,552	0,612	0,5534	0,046
Soxhlet	0,176	0,173	0,176	0,163	0,164	0,1704	0,006
Maceración	0,177	0,185	0,176	0,176	0,192	0,1812	0,007

Tabla C3. Datos de absorbancias del Trolox.

Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Replicas				Promedio	Desviación
	1	2	3	4		
50	0,575	0,574	0,576	0,579	0,576	0,002
100	0,512	0,494	0,532	0,522	0,515	0,016
200	0,482	0,422	0,427	0,426	0,439	0,029
300	0,260	0,331	0,356	0,357	0,326	0,046
400	0,207	0,233	0,189	0,235	0,216	0,022
500	0,097	0,093	0,092	0,096	0,095	0,002

Blanco	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,000
Control	0,640	0,604	0,653	0,663	0,640	0,026

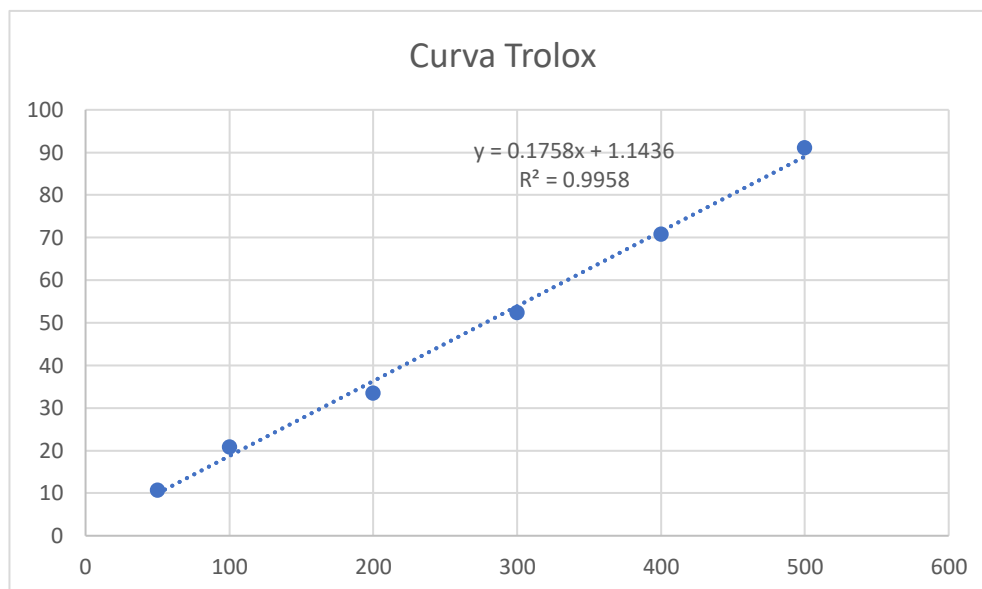


Figura C6. Curva de calibración del Trolox en % de inhibición de DPPH.

Análisis de varianza y prueba de Tukey de la actividad antioxidante

Análisis de la varianza

Variable	N	R2	R2	AJ	Cv
%Inhibición	20	0,80	0,77		9,44

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F. V	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
------	----	----	----	---	---------	------

Modelo	2606,85	2	1303,43	33,66	<0,0001
Método	769,79	1	769,79	19,88	0,0003
Concentración	1837,06	1	1837,06	47,44	<0,0001
Error	658,34	17	38,73		
Total	3265,19	19			

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 5,87163

Error: 38,7257 g.l: 17

Método	Medias	n	E. E	
Maceración	59,54	10	1,97	A
Soxhlet	72,10	10	1,97	B

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 6,09748

Error: 38,7257 g.l: 17

Concentración	Medias	n	E. E	
96%	56,31	10	1,97	A
70%	75,48	10	1,97	B

ANEXO D. Actividad antiinflamatoria

Figura D1

Pesaje del diclofenaco.



Figura D2

Ensayo de desnaturalización de la albúmina.

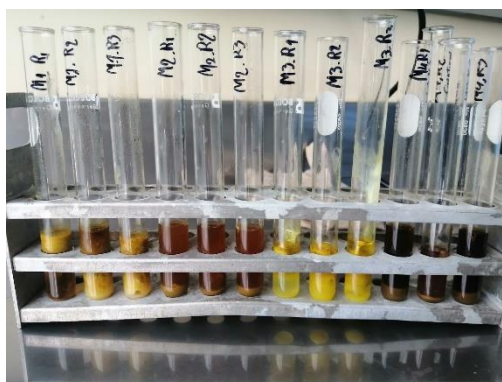


Figura D3

Medición de la turbidez de las mezclas.



Análisis de varianza y prueba de Tukey de la actividad antiinflamatoria

Análisis de la varianza

Variable	N	R2	R2	AJ	Cv
%Inhibición	20	0,87	0,82		5,41

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F. V	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo	582,95	2	291,48	15,38	0,0012	
Método	323,68	1	323,68	17,08	0,0026	
Concentración	259,27	1	259,27	13,68	0,0049	
Error	170,59	9	18,95			
Total	753,53	11				

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 5,68609

Error: 18,9541 g.l: 9

Método	Medias	n	E. E	
Maceración	75,31	6	1,78	A
Soxhlet	85,70	6	1,78	B

Prueba de Tukey: Alfa=0,05 DMS= 6,09748

Error: 41,7620 g.l: 17

Concentración	Medias	n	E. E	
96%	75,86	6	1,78	A
70%	85,15	6	1,78	B

ANEXO E. Autorización del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica



PRONUNCIAMIENTO FAVORABLE No. MAATE-ARSFC-2023-2944

Sr. **SOLIS MAYORGA ERICK XAVIER**,

Una vez que la propuesta para Autorización de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica Sin Fines Comerciales para Investigación Científica, ha sido analizada, el Ministerio del Ambiente y Agua en uso de las atribuciones que le confiere el Acuerdo Interministerial SENESCYT-MAE N°001 aprueba el Proyecto **Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las flores de Spartium junceum**, al haber cumplido con los parámetros técnicos, administrativos y legales, establecidas en la ley.

Por lo dispuesto, se solicita realizar el pago correspondiente en:

BANECUADOR
RUC MAATE: 1768192860001
CUENTA CTE. No. 3001480604 / SUB-LÍNEA: 190499
TIPOS DE SERVICIOS: Servicios de Áreas Protegidas y Vida Silvestre

En base a lo dispuesto en el Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.

Atentamente,

LAGLA CHIMBA BYRON ADRIAN

DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica
Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía
Código postal: 170525 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593-2 398 7600
www.ambiente.gob.ec



ANEXO F. Factura electrónica de la compra de la planta *S. junceum* (retama)

R.U.C. : 1804916441001

FACTURA

No. 001-002-00000036

NÚMERO DE AUTORIZACIÓN

0401202301180491644100120010020000000361234567817

LIZANO LALALEO GIOVANNA MICHELLE

Dirección Matriz: PJE SANCHEZ SN Y VIRGEN DEL SOL

Dirección Sucursal: PJE SANCHEZ SN Y VIRGEN DEL SOL

OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD: NO

CONTRIBUYENTE RÉGIMEN RIMPE

AMBIENTE: PRODUCCION

EMISIÓN: NORMAL

CLAVE DE ACCESO



0401202301180491644100120010020000000361234567817

Razón Social / Nombres y Apellidos: ERICK XAVIER SOLIS MAYORGA

RUC / CI: 1804877346

Fecha Emisión: 04/01/2023

Guía Remisión:

Dirección: INGAHURCO VENEZUELA Y BOLIVIA

Cod. Principal	Cod. Auxiliar	Cant	Descripción	Precio Unitario	Descuento	Precio Total
Cla		4.00	Retama	1	0.00	4.00
SUBTOTAL 12%						0.00
SUBTOTAL 0%						4.00
SUBTOTAL No objeto de IVA						0.00
SUBTOTAL SIN IMPUESTO						4.00
DESCUENTO						0.00
ICE						0.00
IVA 12%						0.00
PROPINA						0.00
Gastos Transporte Otros						0.00
Valor Total USD \$						4.00

Forma de pago	Valor	Plazo	Tiempo
OTROS CON UTILIZACION DEL SISTEMA FINANCIERO	4.00	0	anios

Información Adicional	
Email Cliente:	ericksolis17@hotmail.com
Telef. Cliente:	0979293950