



**“Análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial antioxidante”**

Giler Velez, Katherine Ninoshca y Sosa Pinargote, Ana Karen

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

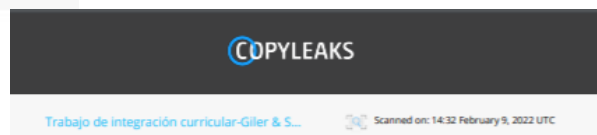
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Naranjo Gaybor, Sandra Judith, PhD.

07 de febrero del 2022

## Reporte de verificación de contenido



Identical Words	90
Words with Minor Changes	41
Paraphrased Words	227
Omitted Words	3529

### Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text in your submitted document.

1 <a href="http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2828.pdf">http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2828.pdf</a>	0%	<b>IDENTICAL</b>
Resumen: Dano oxidativo radicales libres y antioxidantes   ... <a href="https://fitead.com/doc/libro-oxidativo-radicales-libres-y-antioxidantes-1">https://fitead.com/doc/libro-oxidativo-radicales-libres-y-antioxidantes-1</a>	0%	Identical matches are one to one exact wording in the text.
111293 <a href="http://ingbiblia.vareduc.edu.ar/fulltext/file/111293.pdf">http://ingbiblia.vareduc.edu.ar/fulltext/file/111293.pdf</a>	0%	<b>MINOR CHANGES</b>
Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes <a href="http://scielo.sit.cu/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S0138-655720020000...">http://scielo.sit.cu/scielo.php?script=sci_arttext&amp;pid=S0138-655720020000...</a>	0%	Nearly identical with different form, ie "flow" becomes "flowly".
1 <a href="https://revistas.ucom.es/index.php/RCCV/article/download/RCCV09091200...">https://revistas.ucom.es/index.php/RCCV/article/download/RCCV09091200...</a>	0%	<b>PARAPHRASED</b>
v16n1a15.pdf <a href="http://www.scielo.org.co/pdf/v16n1/v16n1a15.pdf">http://www.scielo.org.co/pdf/v16n1/v16n1a15.pdf</a>	0%	Close meaning but different words used to convey the same message.
abre_fichero.pdf?sequence=1&isAllowed=y <a href="https://revis.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10296/2352/abre_fichero.pdf...">https://revis.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10296/2352/abre_fichero.pdf...</a>	0%	
Alcaloides Estructura y clasificación Ruta biosintética Purif... <a href="https://www.dcccity.com/es/alcaloides-estructura-y-clasificacion-ruta-bios...">https://www.dcccity.com/es/alcaloides-estructura-y-clasificacion-ruta-bios...</a>	0%	

Ensure about your report?

The results have been found after comparing your submitted text to online sources, open databases and the CopyLeaks internal database. For any questions about the report contact us on [support@copyleaks.com](mailto:support@copyleaks.com)  
[Learn more about different kinds of plagiarism here](#)

Firma:

.....

**Naranjo Gaybor, Sandra Judith PhD.**

C. C 1709384422

**DIRECTORA**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial antioxidante**” fue realizado por las señoritas **Giler Velez Katherine Ninoshca** y **Sosa Pinargote Ana Karen** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 7 de febrero de 2022**

Firma:

.....

**Naranjo Gaybor, Sandra Judith PhD.**

C. C 1709384422



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **Giler Velez Katherine Ninoshca** y **Sosa Pinargote Ana Karen**, con cédulas de ciudadanía n° 1718390485 y 2300400393, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial antioxidante**" es de mi/nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 7 de febrero de 2022

Firma

**Giler Velez Katherine Ninoshca**

C.C.: 1718390485

Firma

**Sosa Pinargote Ana Karen**

C.C.: 2300400393



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Nosotras, **Giler Velez Katherine Ninoshca** y **Sosa Pinargote Ana Karen**, con cédula/cédulas de ciudadanía n°1718390485 y 2300400393, autorizo/autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial antioxidante"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 7 de febrero de 2022**

Firma

**Giler Velez Katherine Ninoshca**

C.C.: 1718390485

Firma

**Sosa Pinargote Ana Karen**

C.C.: 2300400393

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi madre por su paciencia, cariño, sacrificio y habilidad para manejar situaciones difíciles, por ser mi principal ayuda y apoyo en los momentos adversos, por sus enseñanzas y creer en mí dándome la oportunidad de culminar mis estudios.

A mi padre por su arduo trabajo y ser un apoyo incondicional en cada objetivo que me propongo impulsándome a alcanzar mis objetivos.

A mi hermana por su apoyo y ayuda cada vez que lo necesite.

Katherine

Este trabajo se lo dedico a mi madre quien fue pilar fundamental en mi formación académica, por darme la fuerza para seguir, a mi padre por el apoyo económico y a mi abuelita que me incentivaba a no decaer para ser mejor cada día.

A mis hermanos Alejandro y Ashley, quienes han sido parte de mi motivación para no rendirme y ser un ejemplo para ellos.

Karen

## Agradecimientos

A Dios por brindarme fuerza, sabiduría y conocimiento y por permitirme culminar esta etapa de mi vida académica con salud y rodeada de bendiciones.

A mis padres por brindarme todos los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo y la confianza puesta en mí.

A Kevin por creer en mí, apoyarme incondicionalmente y ayudar a que este proceso sea más ameno, por alentarme a perseguir mis sueños y brindarme su paciencia, empatía y cariño aún en los momentos adversos.

A la Dra. Sandra Naranjo por compartir sus conocimientos, brindarme su ayuda y velar por el proyecto para lograr alcanzar con éxito el trabajo, al Dr. Santiago Ulloa por atender mis dudas y ayudar a disiparlas con paciencia. Al grupo de investigación de Productos Naturales y Frutas de Colombia en especial a Leonardo Castellanos PhD, a Mateo y Sara por su ayuda incondicional.

A mi compañera y amiga Nicole por darle un toque de alegría a cada momento compartido y ser un apoyo incondicional, a mis amigos Italo, Andrés, Kevin C., Margarita, Lissette y Brandon, a mi compañera de lucha Karen por no rendirse y compartir momentos de alegría, y a cada persona que tuvo un impacto positivo en mi vida.

A mis tías, Rosibel, Mónica, Zoila, Martha, Mariana G, a mis tíos Ramón y Mariana por preocuparse por mí, ofrecerme su apoyo y cariño en cada momento de mi vida y al resto de mi familia por creer en mi potencial y apoyarme en este proceso.

Katherine



Agradezco a Dios y a mis padres por ser una guía para mi vida y darme la fuerza para seguir adelante y no rendirme. Quiero recalcar el apoyo incondicional que me dio mi madre Narcisa Sosa y su esposo Máximo Olivo esta etapa de mi vida.

A Italo Torres por darme ánimo y cariño en los momentos más difíciles, impulsarme a seguir adelante, explicarme cosas que no comprendía y por alegrar mis días

A mi compañera de lucha Katherine por ser un soporte y una guía para el desarrollo adecuado de este trabajo, además de compartir momentos de alegría.

A la Dra. Sandra Naranjo por compartir sus conocimientos y ser una guía en el desarrollo adecuado de este trabajo, al Dr. Fernando Hurtado por el apoyo y resolver las dudas surgidas durante el proyecto de integración curricular y al grupo de investigación de Productos Naturales y Frutas de Colombia de la Universidad Nacional de Colombia.

A mi mejor amiga Shirleidy por apoyarme, darme consejos e impulsarme a seguir adelante, a mis amigas Jessica C. y Katherine R. quienes con su compañía hicieron más agradable esta etapa de mi vida. Agradezco a mis compañeros de universidad Andrés, Boris, Kevin, Ivonne, Brandon, Jhonny, Harrison y Jorge C por su apoyo en la carrera y los buenos momentos vividos.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional para que termine mis estudios universitarios

Karen

## Índice De Contenidos

Carátula.....	1
Reporte de Verificación de Contenido.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	8
Índice de Contenidos .....	10
Lista de Figuras.....	14
Lista de Tablas.....	15
Lista De Abreviaturas .....	16
Resumen .....	18
Abstract.....	19
Capítulo I: Introducción .....	20
1.1    Objetivos.....	21
1.1.1    Objetivo General.....	21
1.1.2    Objetivos Específicos.....	21
Capítulo II: Marco Teórico.....	22
2.1    Generalidades de <i>Neurolaena lobata</i> .....	22
2.1.1    Información Taxonómica .....	22
2.1.2    Familia Asteraceae .....	22
2.1.3    Género <i>Neurolaena</i> R. Br .....	23
2.1.4    Usos.....	24
2.1.5    Composición Química .....	24

2.1.6	Propiedades biológicas .....	25
2.2	Radicales libres.....	25
2.2.1	Estrés Oxidativo .....	27
2.2.2	Efecto Nocivo de los Radicales Libres .....	27
2.2.3	Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) .....	28
2.3	Antioxidantes .....	28
2.3.1	Clasificación.....	28
2.3.1.1	Antioxidantes De Origen Natural.....	30
2.3.1.2	Antioxidantes Exógenos.....	30
2.3.1.2.1	Vitaminas. ....	31
2.3.1.2.2	Compuestos Fenólicos. ....	31
2.3.1.2.3	Flavonoides. ....	32
2.3.1.2.4	Taninos.....	32
2.3.1.3	Antioxidantes Endógenos. ....	32
2.3.1.3.1	Antioxidantes Enzimáticos. ....	33
2.3.1.3.2	Antioxidantes No Enzimáticos. ....	33
2.3.1.4	Antioxidantes De Origen Sintético .....	33
2.4	Actividad Antioxidante.....	34
2.4.1	Antioxidantes Primarios.....	34
2.4.2	Antioxidantes Secundarios.....	35
2.4.3	Antioxidantes Terciarios .....	35
2.5	Aplicaciones .....	35
2.6	Técnicas de Análisis de Muestras .....	36
2.6.1	Cromatografía en Capa Fina.....	36
2.6.2	Cromatografía Líquida de Alta Presión .....	37

2.6.2.1	HPLC-DPPH.....	38
2.6.3	Resonancia Magnética Nuclear.....	38
	Capítulo III: Metodología .....	40
3.1	Material Vegetal.....	40
3.2	Diseño de la Investigación .....	40
3.3	Materiales y Reactivos .....	40
3.4	Comprobación Taxonómica e Identificación Botánica .....	43
3.5	Preparación de la Muestra.....	43
3.6	Caracterización de la Materia Prima.....	43
3.6.1	Cenizas Totales.....	43
3.7	Extracción.....	44
3.7.1	Decocción.....	44
3.7.2	Extracción líquido-líquido de la fase de acetato de etilo.....	44
3.7.3	Maceración .....	44
3.7.4	Extracción líquido-líquido de la fase de acetato de etilo.....	45
3.8	Rendimiento.....	45
3.9	Análisis Fitoquímico .....	45
3.9.1	Saponinas .....	46
3.9.2	Taninos.....	46
3.9.3	Fenoles .....	46
3.9.4	Cumarinas .....	47
3.9.5	Quinonas .....	47
3.9.6	Triterpenos.....	47
3.9.7	Flavonoides .....	47
3.9.8	Alcaloides .....	48

Cuantificación de Polifenoles.....	48
3.9.9    Curva de calibración.....	48
3.9.10   Cuantificación .....	49
3.10   Análisis cromatográfico.....	50
3.10.1   Cromatografía de Capa Fina (TLC).....	50
3.11   Determinación de Actividad Biológica .....	51
3.11.1   Actividad Antioxidante.....	51
3.11.2   Actividad Antibacteriana.....	51
3.11.3   Actividad Antifúngica .....	52
3.12   Resonancia Magnética Nuclear.....	53
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	54
4.1    Descripción Botánica de <i>Neurolaena lobata</i> .....	54
4.2    Cenizas .....	56
4.3    Rendimiento.....	57
4.4    Tamizaje .....	58
4.5    Cromatografía de Capa Fina.....	60
4.6    Cuantificación de Polifenoles.....	63
4.7    Actividad Biológica .....	65
4.7.1    Actividad Antioxidante.....	65
4.7.2    Actividad antimicrobiana .....	68
4.8    Resonancia Magnética Nuclear.....	70
Capítulo V: Conclusiones.....	74
Capítulo VI: Recomendaciones .....	75
Capítulo VII: Bibliografía .....	76

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de un átomo estable y un radical libre.....	26
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los antioxidantes .....	29
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo de la obtención de los extractos y las fracciones.....	42
<b>Figura 4.</b> Curva de calibración del ácido gálico.....	49
<b>Figura 5.</b> Hoja de <i>Neurolaena lobata</i> .....	54
<b>Figura 6.</b> Dibujo lineal de <i>Neurolaena lobata</i> .....	55
<b>Figura 7.</b> Flores de <i>Neurolaena lobata</i> .....	56
<b>Figura 8.</b> Cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo D02 y M02 .....	62
<b>Figura 9.</b> Polifenoles totales .....	64
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de la disminución del radical DPPH en el control.....	65
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de la disminución del radical DPPH en el extracto de maceración (M0).....	66
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de la disminución del radical DPPH en la fracción de acetato de etilo (M02) .....	67
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de la disminución del radical DPPH en la fracción de acetato de etilo (D02) .....	68
<b>Figura 14.</b> Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de <i>Neuroalena lobata</i> sobre <i>E. coli</i> .....	68
<b>Figura 15.</b> Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de <i>Neuroalena lobata</i> sobre <i>Aspergillus spp.</i> .....	69
<b>Figura 16.</b> RMN del extracto de maceración y de la fracción de acetato de etilo.....	71
<b>Figura 17.</b> RMN de la fracción de acetato de etilo (D02) .....	71
<b>Figura 18.</b> RMN en el extracto de maceración (M0) superpuesto con una lactona sesquiterpénica .....	72

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica.....	22
<b>Tabla 2.</b> Materiales, equipos y reactivos utilizados en estudio.....	40
<b>Tabla 3.</b> Significación considerada para reportar los resultados del tamizaje fitoquímico.....	46
<b>Tabla 4.</b> Valores empleados para la curva de calibración .....	48
<b>Tabla 5.</b> Contenido total de cenizas en las hojas.....	56
<b>Tabla 6.</b> Rendimiento de cada extracción.....	57
<b>Tabla 7.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico .....	58
<b>Tabla 8.</b> Número de bandas obtenidas en cada solución .....	60
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la cromatografía de capa fina hexano-acetato de etilo (2:1) .....	61
<b>Tabla 10.</b> Cuantificación de polifenoles .....	63

**Lista De Abreviaturas**

<b>μm</b>	Micrómetro
<b>μL</b>	Microlitros
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BHA</b>	Hidroxianisol butilado
<b>BHT</b>	Hidroxitolueno butilado
<b>cm</b>	Centímetros
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
<b>g</b>	Gramos
<b>GHS</b>	Glutación
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta presión
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litros
<b>LOO</b>	Peroxilo lipídico
<b>Mbar</b>	Milibar
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mg/mL</b>	Miligramos por mililitro
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>O<sub>2</sub></b>	Superóxido
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RL</b>	Radicales libres



<b>ROO</b>	Peroxilo
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNS</b>	Especies de nitrógeno reactivo
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>TBHQ</b>	Hidroquinona tercbutilada
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta

## Resumen

La aplicación de extractos vegetales para el tratamiento de diferentes afecciones es una práctica extendida en todo el territorio nacional, determinada por el tipo de flora de la región. El uso de *Neurolaena lobata* planta conocida popularmente como “Tres puntas” ha aumentado en los últimos meses dado que se le atribuyen propiedades antivirales y terapéuticas. Las infecciones víricas aumentan el estrés oxidativo afectando el equilibrio redox de las células, razón por la que ha surgido interés en la obtención de compuestos antioxidantes, los cuales se encargan de mantener el equilibrio en las células al retrasar o inhibir su oxidación y se ha evidenciado que las plantas son una fuente potencial de este tipo de compuestos, asociando esta actividad con la presencia de compuestos fenólicos. Estudios anteriores de *Neurolaena lobata* indican la posible presencia de metabolitos con potencial antioxidante, es por ello que el objetivo de este trabajo fue desarrollar el análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial actividad antioxidante mediante la extracción, el tamizaje fitoquímico, la separación de los compuestos y la evaluación de su actividad antioxidante mediante la técnica HPLC-DPPH, determinándose la presencia de compuestos captadores de radicales libres, flavonoides, sesquiterpenos, fenoles y taninos en los extractos de la planta observando que al emplear maceración se obtiene una concentración mayor de polifenoles, concluyendo así que *Neurolaena lobata* posee actividad antioxidante y sus extractos pudieran tener diferentes usos en la industria alimenticia, la nanobiotecnológica y la farmacéutica.

Palabras clave:

- **NEUROLAENA LOBATA**
- **ANTIOXIDANTES**
- **RADICALES LIBRES**
- **HPLC-DPPH**

### Abstract

The plant extracts application for the treatment of different conditions is a widespread practice throughout the national territory determined by the type of flora in the region. The use of *Neurolaena lobata*, a plant popularly known as “Tres puntas”, has increased in recent months since antiviral and therapeutic properties are attributed to it. Viral infections increase oxidative stress by affecting the redox balance of cells, cause for interest has arisen in obtaining antioxidant compounds, which are responsible for maintaining the balance in cells by delaying or inhibiting their oxidation and it has been shown plants are a potential source of this type of compounds, associating this activity with the presence of phenolic compounds. Previous studies of *Neurolaena lobata* indicate the possible presence of compounds with antioxidant potential, therefore the objective of our work was develop the phytochemical analysis of *Neurolaena lobata* in order to determine its potential antioxidant activity, through extraction, phytochemical screening, separation of the compounds and the evaluation of their antioxidant activity apply HPLC-DPPH technique, determining the presence of free radical scavenging compounds, flavonoids, sesquiterpenes, phenols and tannins in the plant extracts, observing that by using maceration a higher concentration is obtained of polyphenols, concluding that *Neurolaena lobata* has an antioxidant activity and its extracts be able to uses in different issues as in the food, nanobiotechnology and pharmaceutical industries.

Key words:

- **NEUROLAENA LOBATA**
- **ANTIOXIDANTS**
- **FREE RADICALS**
- **HPLC-DPPH**

## Capítulo I: Introducción

Se puede definir como antioxidante a cualquier sustancia que elimine directamente las especies reactivas de oxígeno (ROS), actúe indirectamente para regular el alza de las defensas antioxidantes o inhiba la producción de ROS (Sotler *et al.*, 2019). La importancia de los antioxidantes se basa en que para mantener la homeostasis redox, los radicales libres que se encuentran en exceso producto del metabolismo deben ser neutralizados por antioxidantes enzimáticos o antioxidantes no enzimáticos, sin embargo el cuerpo humano los produce en poca cantidad por lo que el resto deben ser suministrados en la dieta, a nivel químico se sintetizan antioxidantes como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) usados para prolongar la vida útil de los alimentos, sin embargo se han asociado a la formación de subproductos peligrosos por lo que se ha empezado una búsqueda de antioxidantes naturales, los cuales se encuentran principalmente en plantas como vegetales comestibles, hierbas y especias que se caracterizan por su alto contenido en compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas entre otros (Flieger *et al.*, 2021).

Los antioxidantes se utilizan en diferentes áreas, pero ha surgido un especial interés en la industria alimenticia, en la nanobiotecnológica y en la farmacéutica (Caleja *et al.*, 2015). Los antioxidantes se pueden clasificar en función de su origen: sintéticos o naturales; modo de acción: enzimáticos o no enzimáticos, dentro del grupo de los no enzimáticos se encuentran las vitaminas, carotenoides, minerales y compuestos fenólicos (Sotler *et al.*, 2019).

*Neurolaena lobata* L. conocida popularmente como “tres puntas” es una planta medicinal perteneciente a la familia *Asteraceae* que se utiliza en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí donde se le atribuyen propiedades medicinales como diurético, hipoglucemiante, hipotensivo, agente antimicrobiano y tónico por lo que se administra para tratar dolores estomacales y fiebre (Lima & Morales, 2014). Recientemente

se le han atribuido propiedades terapéuticas frente a infecciones provocadas por el virus SARS-CoV-2, lo que ha provocado un aumento de su ingesta por parte de la población Santodomingueña.

En estudios anteriores se ha reportado que se han aislado diferentes compuestos a partir de las hojas de tres puntas como polifenoles en extractos de diclorometano y acetato de etilo, en la decocción de las hojas se reportan neuroleninas y furanoheliangólidos (sesquiterpeno), lactonas como neurolina A y neurolina B, lobatina A y lobatina B (Paredes *et al.*, 2019). Además, se le atribuyen propiedades antioxidantes según el estudio de Nayak, *et al.*, (2014) al encontrar la presencia de taninos y flavonoides, sin embargo, no todos los compuestos flavonoides tienen actividad antioxidante es por ello que el objetivo de este estudio fue desarrollar el análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial actividad antioxidante.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Desarrollar el análisis fitoquímico de *Neurolaena lobata* con la finalidad de determinar su potencial actividad antioxidante.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Recolectar y describir características morfológicas de la especie vegetal de interés para la confirmación.
- Obtener extractos y fracciones de *Neurolaena lobata*, utilizando extracción líquido-líquido.
- Identificar algunas especies químicas en base a ensayos químicos y cromatografía en capa fina.
- Determinar la actividad antioxidante y realizar enfrentamientos *in vitro* para evaluar su actividad antimicrobiana.

## Capítulo II: Marco Teórico

### 2.1 Generalidades de *Neurolaena lobata*

#### 2.1.1 Información Taxonómica

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica*

<b>Taxón</b>	<b>Nombre</b>
Reino	Plantae
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Neurolaena R. Br
Especie	Neurolaea lobata

*Nota:* Adaptada de Trópicos (n.d). *Neurolaena lobata*. Copyright 2022

Nombres Populares: Tres puntas, tres dedos, hiera amarga, gavilana, garrapatilla, yaxta, mano de tigre, balsilla, capitana, contragavilana, mano de lagarto, amargón, yerba del cáncer y salvia cimarrona (Pruski & Ernest, 2018)

#### 2.1.2 Familia Asteraceae

Las Asteráceas son la familia con más plantas vasculares, aproximadamente con 25037 especies, representado el 8% de toda la flora mundial (Panero & Funk, 2008). Se encuentran en hábitats forestales, pastizales de gran altitud, incluso se puede encontrar en espacios verdes urbanos, algunas crecen en áreas húmedas, templadas y subtropicales (Rolnik & Olan, 2021).

Las Asteráceas se distinguen por ser arbustos, hierbas, árboles o enredaderas, con laticíferos o conductos de resina presentes en algunos taxones (Simpson, 2010). La mayoría de las hojas están cubiertas con un indumento y pelos de todas las longitudes y colores, estas son exestipuladas, simples o compuestas, espirales u opuestas (Rolnik & Olas, 2021; Simpson, 2010). La inflorescencia consta de uno o más capítulos dispuestos en varias inflorescencias secundarias, cada capítulo consta de un receptáculo compuesto plano a cónico que lleva de una a muchas flores y subtendido por una o más series de brácteas (Simpson, 2010).

Uno de los compuestos más importantes que se ha podido identificar en la familia *Asteraceae* son las lactonas sesquiterpénicas, cuya estructura básica se basa en un esqueleto de 15 átomos de carbono formado alrededor de tres unidades de isopreno (Sülsen & Martino, 2018); las lactonas sesquiterpénicas se caracterizan por tener un sabor amargo y ser incoloras (Rolnik & Olas, 2021). Los extractos de la familia *Asteraceae* han demostrado capacidad para captación de radicales libres (Rolnik & Olas, 2021).

### **2.1.3 Género *Neurolaena* R. Br**

El género *Neurolaena* encuentra en áreas tropicales del sur de México, Guatemala y otros estados de América Central, a excepción de la especie *Neurolaena lobata* la cual tiene una distribución tropical bastante amplia que va desde el Sur de México y muchas de las islas de las Indias Occidentales hasta la Guayana Holandesa y hacia el sur hasta de Perú, las demás especies tiene una distribución limitada (Passreiter *et al.*, 1999).

Las especies de *Neurolaena* son mesofíticas, frondosas, anuales robustas o perennes robustas, pueden distinguirse por su involucre de 3-5 seriados, cabezas homógamas y receptáculo escamoso, en su mayoría son plantas bastante majestuosas con corimbos de flores de color amarillo dorado o amarillo verdoso, contiene sesquiterpenos denominados neuroleninas (Bueno *et al.*, 2021, Passreiter *et al.*, 1999)

#### **2.1.4 Usos**

Las hojas de la planta han sido utilizadas en infusiones en la medicina tradicional para combatir dolores de diferentes orígenes, enfermedades parasitarias, fiebre, malaria, úlceras, en el tratamiento de trastornos inflamatorios, diabetes y diferentes tipos de cáncer (García-González *et al.*, 2007; Girón *et al.*, 1991; Vasas *et al.*, 2021).

De los tallos y las hojas se hacen extractos acuosos los cuales son administrados de forma oral para tratar la malaria (Gupta *et al.*, 2005). Puede usarse en el cuidado de heridas debido a su capacidad para detener el sangrado, además de inhibir el crecimiento bacteriano y ayuda a la cicatrización rápida (Nayak *et al.*, 2014).

Algunas investigaciones han demostrado que el extracto tiene actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antinociceptivo, antiulcerogénicas y antiprotozoaria (Berger *et al.*, 2001; De Las Heras *et al.*, 1998; Gracioso *et al.*, 2000; Gracioso *et al.*, 1998; Walshe-Roussel *et al.*, 2013).

#### **2.1.5 Composición Química**

El tallo y las hojas contienen un principio amargo constituido por sesquiterpenlactonas derivados del timol (Gupta *et al.*, 2005), además se han podido aislar once flavonoides de extractos de diclorometano, acetato de etilo y agua, de las hojas de la planta, incluidos cinco derivados de quercetagenina, cuatro derivados del kaempferol y dos derivados de luteolina.

Las hojas contienen lactonas como neurolina A y neurolina B, lobatina A y lobatina B, neurolina CF, lobatina C, 8 $\beta$ -isovalerianiloxi-9 $\alpha$ -hidroxi-caly-culatolide y 8 $\beta$ -isovalerianiloxi-9 $\alpha$ -acetoxi-caly-culatolide (Paredes *et al.*, 2019).



### **2.1.6 Propiedades biológicas**

Algunas investigaciones han demostrado que el extracto crudo de las hojas de *N. lobata* tienen actividad antiinflamatoria (De Las Heras *et al.*, 1998), debido a que el extracto se administró y hubo una reducción de la producción de factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) estimulada por lipopolisacárido en monocitos THP-1 en un 72% en relación con el control del vehículo estimulado.

El extracto hidroalcohólico de *N. lobata* y, en particular sus fracciones divididas, tienen propiedades analgésicas, ya que inhibieron significativamente la constricción abdominal inducida por ácido acético en ratones (Gracioso *et al.*, 1998).

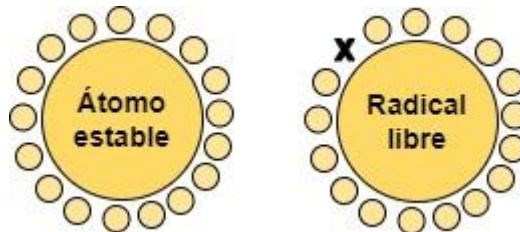
El extracto etanólico de *N. lobata* inhibió significativamente el crecimiento del parásito de *Trypanosoma cruzi* y *Trichomonas vaginalis* demostrando así ser antiprotozoaria (Berger *et al.*, 2001). Las fracciones de hexano (48%), cloroformo (70%) y acuosa (52%), del extracto hidroalcohólico de *N. lobata* ayuda a reducir las lesiones gástricas, debido a que hay un aumento en los mecanismos defensivos de la mucosa como la producción de moco y las síntesis de prostaglandinas (Gracioso *et al.*, 2000).

## **2.2 Radicales libres**

Los radicales libres (RL) son cualquier especie capaz de existir de forma independiente, contienen uno o más electrones desapareados en su capa externa, lo que le da una configuración inestable cinéticamente (Halliwell & Gutteridge, 2015); son muy reactivos, tienen vida media corta, razón por la que actúan cerca al sitio en que se forman (Halliwell & Gutteridge, 2015). Al ser inestables genera energía que es liberada por medio de las reacciones con moléculas cercanas como proteínas, carbohidratos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y lípidos (Aguilar *et al.*, 2018; Pham-Huy *et al.*, 2008).

**Figura 1**

Estructura de un átomo estable y un radical libre



*Nota:* Adaptado de “Antioxidantes e inhibición de radicales libres: lipoperoxidación y carbonilación” (p. 62), por O. A. Aguilar-Paredes *et al.*, 2018, Mexican Journal of Biotechnology, 3(1):60-72.

Los radicales libres a pesar de tener diferencias químicas, comparten mecanismos de acción similares a nivel molecular que pueden provocar enfermedades (Fregoso *et al.*, 2016). Los radicales libres del oxígeno presentan funciones en el organismo las cuales son favorecer las síntesis de prostaglandinas y la síntesis de colágeno, además participan en la fagocitosis, así mismo ayudan a disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, activan las enzimas de la membrana celular, ayudan en la quimiotaxis y modifican la biomembrana (Halliwell & Gutteridge, 2015).

Cuando hay el aumento de la concentración de los radicales libres hay la aparición de un desequilibrio entre la velocidad de generación y la inhibición por el sistema antioxidante endógeno, lo que origina un estrés oxidativo el cual está asociado a diferentes enfermedades como las cataratas, envejecimiento, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Aguilar *et al.*, 2018; Poljsak *et al.*, 2013). Los radicales libres también se generan por fuentes externas como la exposición de rayos X, el ozono, la contaminación del aire, el tabaquismo y por productos químicos industriales (Flieger *et al.*, 2021; Poljsak *et al.*, 2013).

Los radicales libre incluyen a especies químicas como el radical hidroxilo (OH), superóxido (O<sub>2</sub>), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), peroxilo (ROO) y peroxilo lipídico (LOO) (Pham-Huy *et al.*, 2008).

### **2.2.1 Estrés Oxidativo**

Es una alteración del equilibrio al aumentar el contenido intracelular de radicales libres, haciendo que las defensas antioxidantes de las células sean incapaces de inhibir el daño (Halliwell & Gutteridge, 2015). El daño que causa el estrés oxidativo se denomina a menudo daño oxidativo, el incremento del daño oxidativo puede aumentar un estrés oxidativo y también ocasiona fallas en los sistemas de reparación y remplazo (Halliwell & Gutteridge, 2015). Una clase de estrés oxidativo oxida a los aminoácidos produciendo modificaciones en la formación de los grupos carbonilo, modifica su estructura, actividad y función (Aguilar *et al.*, 2018).

### **2.2.2 Efecto Nocivo de los Radicales Libres**

Los radicales libres pueden acumularse en el cuerpo con la edad, dando inicio al proceso de envejecimiento, además están asociados a diversas enfermedades como el Alzheimer, la distrofia muscular, la enfermedad de Parkinson y la aterosclerosis (Flieger *et al.*, 2021; Singh & Jialal, 2006). El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre en diversas macromoléculas:

- **Lípidos:** se genera la peroxidación lipídica y afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados.
- **Proteínas:** se oxidan ciertos aminoácidos, hay formación de grupos carbonilo y existe entrecruzamientos de las cadenas peptídicas.
- **ADN:** Generan errores en la transcripción y traducción del (ARN) ácido ribonucleico, ocurren mutaciones y carcinogénesis.

### **2.2.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)**

Los ROS son necesarios para la regulación de la expresión génica, la apoptosis, la proliferación, los procesos de fosforilación de las proteínas o la concentración de calcio en la célula, eliminación de microorganismo, y la activación de proteínas que controlan la división celular (Flieger *et al.*, 2021), se generan a partir de fuentes endógenas y exógenas.

## **2.3 Antioxidantes**

Se puede definir el término antioxidante desde diferentes enfoques, para Halliwell & Gutteridge (2015) “un antioxidante es cualquier sustancia capaz de retrasar, prevenir o eliminar el daño oxidativo causado en una molécula diana”. Mientras que otros autores definen como antioxidante a cualquier sustancia que es capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno o actuar de una forma directa para regular su alza o inhibir su producción (Lobo *et al.*, 2010). Un antioxidante actúa estabilizando los radicales libres mediante la donación de un electrón, suelen ser de bajo peso molecular y algunos pocos se producen de forma natural por el metabolismo celular como el glutatión, el ubiquinol y al ácido úrico (Shi *et al.*, 1999).

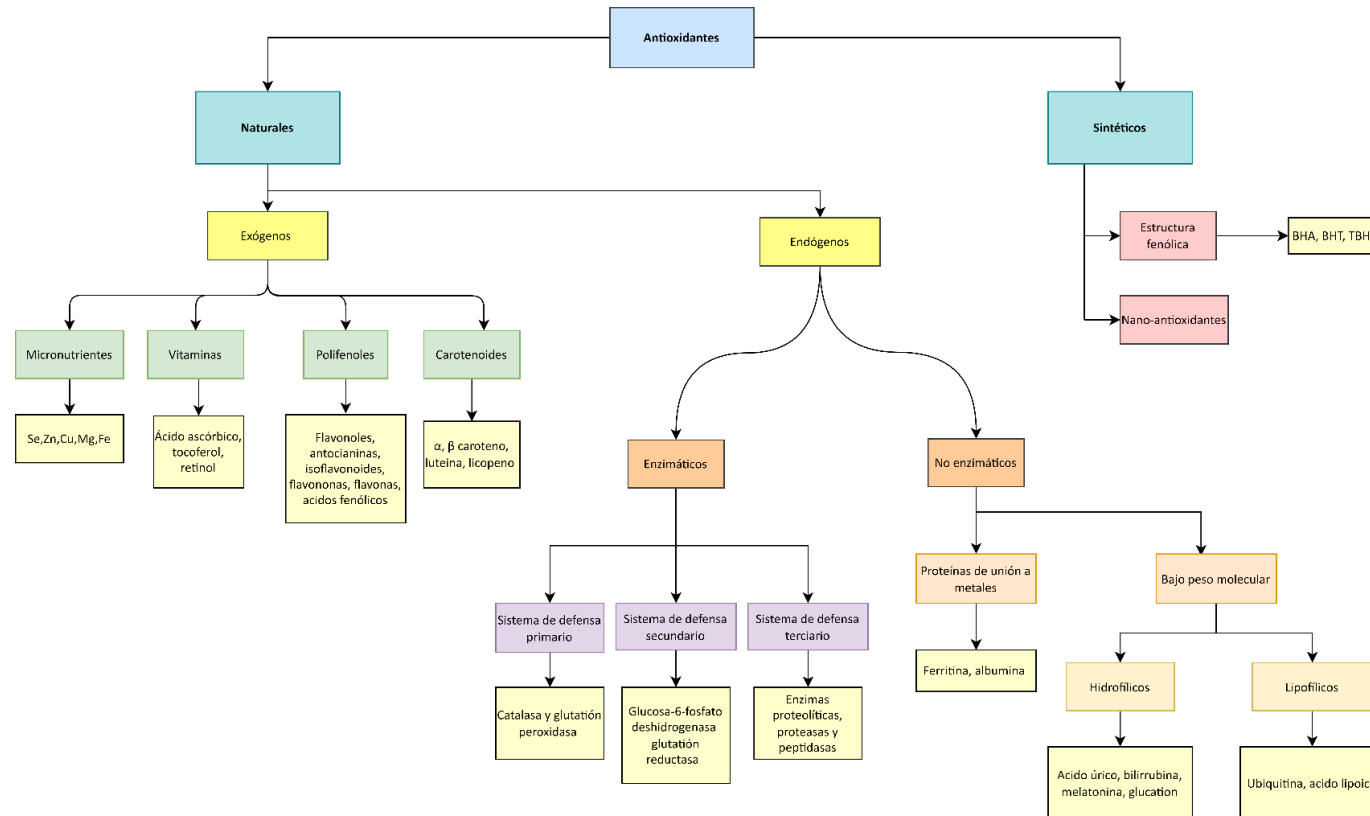
Las sustancias antioxidantes fueron conocidas por su papel en procesos industriales como la prevención de que las grasas insaturadas se tornen rancias, prevención de corrosión de metales y polimerización de combustibles, pero el evento que marcó una diferencia en el estudio de los antioxidantes fue la identificación de las vitaminas E, A y C lo que llevó a la identificación de los agentes antioxidantes como agentes reductores que prevenían las reacciones oxidativas (Flieger *et al.*, 2021).

### **2.3.1 Clasificación**

Los antioxidantes se pueden dividir según su origen, natural o sintético, su lugar de acción, exógenos o endógenos, su modo de acción, enzimáticos o no enzimáticos y según su efecto final (Flieger *et al.*, 2021).

Figura 2

## Clasificación de los antioxidantes



*Nota.* Adaptado de “Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles Materials” por Flieger, J. *et al.*, 2021, *Materials*, 14(15).

**2.3.1.1 Antioxidantes De Origen Natural.** Se encuentran principalmente en plantas; frutas, vegetales, hierbas y especias. Las plantas poseen una gran variedad de moléculas que pueden actuar como antioxidantes entre ellas las vitaminas, compuestos fenólicos, carotenoides, terpenoides y flavonoides (Flieger *et al.*, 2021). Los antioxidantes naturales son de gran importancia para la salud y la prevención de enfermedades como trastornos neurodegenerativos, envejecimiento, trastorno reumático entre otros. El cuerpo produce de forma natural antioxidantes que se encargan de prevenir el estrés oxidativo como el glutatión, la ubiquinona y el ácido úrico, pero se producen en cantidades insuficientes por lo tanto deben ser suministrados a través de la dieta favoreciendo el consumo de vitaminas A y E, flavonas, carotenos y productos naturales a partir de plantas (Doughari, 2012).

Otra fuente potencial de antioxidantes naturales son los microorganismos; hongos, bacterias, protozoos, levaduras y microalgas que producen una gran variedad de compuestos antioxidantes como carotenoides, polifenoles, vitaminas entre otros (Chandra *et al.*, 2020). Se consideran como fuente potencial dado que en comparación con las plantas se pueden cultivar de forma más rápida y en condiciones controladas, uno de los compuestos más prometedores es el micotiol aislado a partir de actinomicetos que ha sido eficaz para descomponer peróxido de hidrógeno, arseniato entre otros (Rani *et al.*, 2021).

**2.3.1.2 Antioxidantes Exógenos.** Los antioxidantes exógenos son los que no se producen de forma natural en el metabolismo e ingresan al cuerpo principalmente a través de la dieta y juegan un papel importante en el equilibrio entre la oxidación y la antioxidación de los sistemas vivos (Bouayed & Bohn, 2010). Los principales antioxidantes exógenos son los ácidos fenólicos, flavonoles, isoflavonas, flavonas y las vitaminas: C que se pueden encontrar en los cítricos, la vitamina E que se encuentra en frutos secos y aceites vegetales, el betacaroteno en zanahorias y calabazas, o mediante la ingestión de suplementos que

contengan antioxidantes o cofactores como cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio (Romero *et al.*, 2013).

2.3.1.2.1 **Vitaminas.** Son micronutrientes orgánicos de estructura molecular diversa y necesarios para el ser humano en pequeñas cantidades, son suministradas por la dieta de forma general, la vitamina E engloba a un grupo de tocoferoles y tocotrienoles y es conocida por ser un potente antioxidante lipofílico que se encuentra en las membranas celulares actuando como agente protector de moléculas lipídicas, su estructura se compone de dos partes principales: un anillo aromático denominado cromano con un grupo hidroxilo y una cadena lateral poliprenoide (Romero *et al.*, 2013).

La vitamina E se considera un importante antioxidante dado que evita que los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular sufran peroxidación celular y además inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad, actúa reduciendo los radicales al transferirles un átomo de hidrogeno a partir de su anillo cromano dando como resultado un radical estabilizado, además neutraliza peróxidos y oxida el singlete de oxígeno, actúa de forma sinérgica con el selenio, la vitamina E funciona como protección frente a enfermedades cardiovasculares además de reducir problemas circulatorios y aumentar la resistencia y fuerza muscular (Moussa *et al.*, 2019).

2.3.1.2.2 **Compuestos Fenólicos.** Son metabolitos secundarios que se encuentran principalmente en las plantas se dividen en dos grupos; ácidos fenólicos y polifenoles, incluyen a los flavonoides y taninos, su importancia radica en que actúan como agentes quelantes de metales y captore de especies reactivas de oxígeno especialmente sobre el radical peroxilo y el radical hidroxilo, el ácido gálico precursor de los taninos es el compuesto que presenta mayor actividad antioxidante (Sotler *et al.*, 2019).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está dada por el número y la posición de los grupos hidroxilo y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos

debido a que su capacidad para estabilizar radicales libres, está dada por su estructura compuesta por grupos hidroxilo, los dobles enlaces del anillo bencénico y el doble enlace del grupo funcional oxo (Minatel et al., 2017).

**2.3.1.2.3 Flavonoides.** Son compuestos aromáticos que se encuentran en las plantas sobre todo en las hojas, frutos y flores tienen como esqueleto el difenilpropano, son de bajo peso molecular, son solubles en agua, alcohol y disolventes orgánicos polares, incluyen a los flavonoles, antocianinas, isoflavonoides, flavononas y flavonas, siendo la quercetina el compuesto más abundante y prometedor dado que actúa previniendo el estrés y muerte celular al eliminar las especies reactivas de oxígeno, quelando iones metálicos y estabilizando el singlete de oxígeno (Procházková et al., 2011).

Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antitumorales y antiinflamatorias, su actividad antioxidante está dada por las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre los diferentes grupos de su estructura química, además se ha observado que estimulan la acción de otros antioxidantes como la de la catalasa, protegen especialmente queratinocitos, ganglios linfáticos, tejido nervioso y endotelio (Romero et al., 2013).

**2.3.1.2.4 Taninos.** Los taninos son compuestos fenólicos que son solubles en agua y su peso molecular varía entre 500 a 3000 uma, tienen propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antimutagénicas y antioxidantes pudiendo actuar como antioxidantes primarios es decir donando electrones, o secundarios capturando radicales de oxígeno libres, además funcionan como agentes quelantes de iones metálicos y retrasan la oxidación interviniendo en la reacción de Fenton (Amarowicz, 2007).

**2.3.1.3 Antioxidantes Endógenos.** Incluyen al conjunto de moléculas antioxidantes de actividad enzimática o no enzimática que se localizan en el citoplasma y orgánulos celulares, los de actividad enzimática son liposolubles y se encuentran mayoritariamente en



las membranas celulares mientras que los no enzimáticos son solubles en agua y se localizan en el citoplasma (Moussa *et al.*, 2019).

**2.3.1.3.1 Antioxidantes Enzimáticos.** Se encargan de convertir productos metabolitos oxidados en peróxido de hidrógeno y luego agua, utilizan como cofactores el hierro, zinc, cobre y manganeso, algunos actúan como sistema de defensa primaria como el superóxido dismutasa (SOD) que es una enzima desintoxicante del radical superóxido, la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) que están involucradas en la desintoxicación de los peróxidos, tiorredoxina reductasa que está involucrada de prevención de la oxidación de proteínas, mientras que el glutatión reductasa que se encarga de la regeneración del glutatión y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que se encarga de la regeneración de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) se consideran sistemas de defensa secundarios (Bouayed & Bohn, 2010).

**2.3.1.3.2 Antioxidantes No Enzimáticos.** Juegan un papel importante en el metabolismo celular y en la cadena respiratoria, actúan como interceptores de especies reactivas de oxígeno, se encargan de terminar las reacciones en cadena y son de bajo peso molecular, los antioxidantes no enzimáticos son el glutatión (GSH), ácido úrico, ácido lipoico, NADPH, coenzima Q, albúmina y bilirrubina (Bouayed & Bohn, 2010).

**2.3.1.4 Antioxidantes De Origen Sintético.** Los antioxidantes de origen sintético son bioequivalentes a sus formas naturales como la vitamina C y el ácido L-ascórbico que es de síntesis química, los más empleados son el BHA (hidroxianisol butilado), BHT (hidroxitolueno butilado) y la TBHQ (hidroquinona tercbutilada) todos de estructura fenólica, se emplean en la industria alimentaria para prevenir la oxidación de alimentos principalmente para prevenir

el deterioro oxidativo de los lípidos y prolongar la vida útil de los alimentos (Carocho & Ferreira, 2013).

## **2.4 Actividad Antioxidante**

El término antioxidante se emplea de forma general para agrupar diferentes sustancias que pueden ser fenoles, tioles o aminas, los antioxidantes pueden ser de carácter hidrofílicos y lipofílicos de forma que cada compuesto antioxidante posee su propio perfil bioquímico, el mecanismo de acción de cada compuesto está determinado por la presencia de grupos funcionales como hidroxilos o aminas, el número y la posición en que se encuentren teniendo mayor actividad los que se encuentran en la posición orto y una menor actividad los que se encuentran en posición meta (Flieger *et al.*, 2021).

Los antioxidantes pueden actuar de diferentes maneras, donando electrones, captando radicales o donando hidrógenos, mejorando la defensa antioxidante endógena, reparando el daño celular resultante de la oxidación, descomponiendo el peróxido de hidrógeno, actuando como inhibidores de enzimas prooxidantes, como agentes estabilizantes de los hidroperóxidos y como agentes quelantes de metales (Sotler *et al.*, 2019). Sin embargo, son conocidos principalmente por su acción de eliminación de radicales libres de oxígeno al volverlos radicales estables donando electrones lo que previene que los radicales libres dañen biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN (Mansour & Dhouha, 2021). En función a su mecanismo de acción los antioxidantes se pueden considerar de actividad primaria, secundaria o terciaria en función de su acción frente agentes oxidantes (Sotler *et al.*, 2019).

### **2.4.1 Antioxidantes Primarios**

Son antioxidantes que intervienen en las reacciones de oxidación de forma activa eliminando ROS/RNS, por lo que se consideran como un mecanismo de ruptura además inhiben la formación de ROS al suprimir el inicio de la cadena oxidativa (Selman *et al.*, 2006). Pueden eliminar radicales de tipo hidrofílicos o lipofílicos, la vitamina C, el ácido úrico,

bilirrubina, la albúmina y los tioles eliminan radicales de origen hidrofílico mientras que la vitamina E y el ubiquinol eliminan los radicales de naturaleza lipofílica (Niki, 1993).

#### **2.4.2 Antioxidantes Secundarios**

Actúan inhibiendo la formación de radicales libres mediante la reducción del peróxido de hidrogeno y de los hidroperóxidos, eliminan productores de especies reactivas de oxígeno, actúan de forma indirecta en la quelación de iones metálicos de transición, tienen acción antiinflamatoria, inhiben el NADPH oxidasa y se encargan de la regulación de vías de transducción de señales sensibles a reacciones de oxidorreducción (Bast & Haenen, 2013). Pueden tener actividad indirecta como la activación de factores de transcripción que conducen a la expresión de enzimas antioxidantes endógenas (Reuland *et al.*, 2013),

#### **2.4.3 Antioxidantes Terciarios**

Los antioxidantes terciarios son considerados reparadores o de novo, son el conjunto de enzimas que se encuentran en el citosol y mitocondrias que se encargan de reconocer, degradar y eliminar proteínas oxigenadas previniendo su acumulación, por ejemplo, enzimas proteolíticas, proteasas y peptidasas, además reparan moléculas dañadas como ADN (Niki, 1993).

### **2.5 Aplicaciones**

El uso de antioxidantes en la industria alimenticia es una práctica extendida y se han utilizado principalmente para alargar la vida útil de los alimentos, retardar la oxidación, inhibir el crecimiento microbiano y conservar el sabor, se añaden principalmente a los alimentos ricos en grasas insaturadas además ha recibido gran interés por parte de la industria de los alimentos funcionales donde actúan como aditivos que incrementan la calidad de los alimentos (Loizzo & Tundis, 2019).

La industria farmacéutica también se ha interesado en el uso de antioxidantes dado que el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno está ligado a diferentes

patologías que abarcan desde cáncer hasta trastornos neurodegenerativos por lo tanto sugieren el uso de antioxidantes como la catalasa, el licopeno, la coenzima Q10, la quercetina entre otros, como agentes terapéuticos y profilácticos, además proponen sistemas de administración de fármacos de forma localizada, esta idea ha surgido de que la mayor ingesta de antioxidantes se produce a través de los alimentos pero su disponibilidad se ve afectada por un gran número de factores como la escasa solubilidad, la permeabilidad ineficaz, el efecto del primer paso y la degradación, por lo que han desarrollado liposomas, micropartículas y nanopartículas para mejorar la eficiencia de la administración de antioxidantes (Ratnam *et al.*, 2006).

Han recibido especial interés en el área de nanotecnología donde se plantea su uso como potencial reductor para sustituir reactivos tóxicos que se utilizan en la síntesis química para reducir cationes metálicos, lo que ha dado paso a la nanobiotecnología que plantea que al sustituir sustancias químicas por extractos naturales con potencial antioxidante se podría aumentar las aplicaciones de las nanopartículas en el área biomédica (Flieger *et al.*, 2021). Este tipo de síntesis denominada verde no se ha limitado al área biomédica y se plantean aplicaciones para la producción de biomateriales, en la industria en la fabricación de iones de litio, en los bioprocesos con la remediación ambiental y la conservación de alimentos, mejora de resonancia magnética, elaboración de pigmentos y terapia génica (Henriksen *et al.*, 2017).

## **2.6 Técnicas de Análisis de Muestras**

### **2.6.1 Cromatografía en Capa Fina**

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica empleada para separar e identificar componentes de una mezcla y determinar la pureza de un compuesto de forma rápida y sencilla (Bele & Khale, 2010). Se compone de una fase móvil que puede ser un solvente puro o una mezcla de varios y una fase estacionaria; la fase estacionaria suele ser una placa de

aluminio recubierta con una capa de un material absorbente comúnmente sílica gel, la muestra se coloca en un extremo de la placa cromatográfica y la placa se coloca en una cubeta que contiene la fase móvil; la fase móvil desplaza la muestra por capilaridad separando los compuestos en base a su afinidad por la fase estacionaria de forma que los compuestos con mayor afinidad por la fase móvil se desplazarán más arriba en la placa que los que presenten mayor afinidad por la fase estacionaria, la TLC se basa en el principio de la adsorción donde las sustancias serán retenidas sobre una superficie sólida por efecto de fuerzas fisicoquímicas (Cardona, 2010; Bele & Khale, 2010).

La elección de la fase móvil y de la fase estacionaria dependerá del tipo de compuesto que se quiera separar y su polaridad. El valor del factor retención ( $R_f$ ) se utiliza para determinar el comportamiento de un compuesto en TLC, representa la relación entre la velocidad de movimiento de un compuesto y la velocidad de la fase móvil, el  $R_f$  puede tomar valores desde 0 a 1 y puede emplearse para identificar compuestos si las condiciones de la TLC son las mismas que la TLC de referencia caso contrario no podría emplearse debido a que el  $R_f$  depende de la naturaleza del adsorbente, la fase móvil, la temperatura, el espesor de la capa, el tanque de revelado, la masa de la muestra y la técnica cromatográfica empleada a menos que (Néstor *et al.*, 2019).

### **2.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Presión**

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía líquida de alta resolución es una variación de la cromatografía líquida que se utiliza para separar y analizar analitos en una mezcla con una alta resolución y sensibilidad (Gika *et al.*, 2016). Se compone de una fase móvil y una estacionaria; la fase estacionaria puede ser sólida o líquida acoplada a un soporte sólido, la muestra se inyecta y la fase móvil que puede tener diferentes combinaciones de solventes se encarga de movilizarla sobre la fase estacionaria, de forma que los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria se desplazarán a una velocidad

inferior que aquellos que presenten menor afinidad, las diferentes fases que se separen dependerán de las interacciones de la absorción superficial, el intercambio iónico, la solubilidad y los efectos estéricos entre la muestra y las dos fases (Ismail & Nielsen, 2010).

Se lleva a cabo en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento equipado con un reservorio, una bomba, un inyector, una columna, un detector y un registrador, la fase móvil se coloca en el reservorio, la bomba succiona la fase móvil para que fluya por todo el sistema, en el inyector se coloca la muestra, el horno se encarga de mantener la temperatura constante dentro del equipo, en la columna se coloca la fase estacionaria, el detector se coloca al final de la columna y es el responsable de captar las variaciones en los efluentes de la columna y convertirlos en señales eléctricas que son registradas, los detectores pueden ser universales y selectivos, los selectivos pueden ser de fluorescencia y medir una propiedad ya sea física o química de los componentes de la mezcla de forma que solo los que la posean serán detectados (Suarez & Morales, 2018).

**2.6.2.1 HPLC-DPPH.** El método de HPLC en línea es un método rápido para la detección de compuestos captadores de radicales, permite separar mezclas complejas y evaluar la capacidad de captar radicales de sus componentes de forma simultánea, presenta como ventaja frente a otros métodos de evaluación de la actividad antioxidante que permite identificar directamente las moléculas que capturan los radicales, se basa en la reacción de los analitos separados por HPLC con una solución metanólica de un radical libre y la decoloración inducida por el antioxidante al capturar el radical que se detecta a una absorbancia de 515 nm (Koleva *et al* , 2000).

### **2.6.3 Resonancia magnética nuclear**

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una poderosa herramienta para la identificación de estados químicos en la materia, cuando comenzó su auge se encontró aplicaciones en las industrias de biomedicina, alimentos y petróleo; algunas de las primeras

investigaciones fueron la composición del petróleo y fracciones de petróleo (Dunn *et al.*, 2002). La RMN es una técnica utilizada para dilucidar información estructural y aislar los metabolitos dentro de sistemas complejos (Dunn *et al.*, 2002).

La RMN es un método que permite la detección simultánea de diversos grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, terpenoides, etc.) además de abundantes metabolitos primarios; se ha usado para identificar y caracterizar la composición de varios tipos de plantas, alimentos y tejido (Kim *et al.*, 2010; Pramai *et al.*, 2018). Un espectro de RMN refleja los niveles molares de los metabolitos presentes en una planta; es una técnica útil para la elucidación de estructuras, al usar varias mediciones de RMN bidimensionales, muchas señales pueden identificarse sin la necesidad de un mayor fraccionamiento del extracto (Kim *et al.*, 2010).

## Capítulo III: Metodología

### 3.1 Material Vegetal

Se utilizaron hojas frescas de *Neurolaena lobata* L. “tres puntas” recolectadas en La Concordia-Santo Domingo de los Tsáchilas-Ecuador; con Latitud (DMS) S 40° 45' 36" y Longitud (DMS) E 73° 59' 3.4". Se escogieron hojas grandes y verdes que se encontraran en buen estado, aproximadamente se recolectaron 4 kg de hojas frescas. Las hojas frescas fueron lavadas para eliminar los residuos (Cornell Nutrient Analysis Laboratory, 2021).

### 3.2 Diseño de la Investigación

Se empleó un estudio observacional de tipo descriptivo.

### 3.3 Materiales y Reactivos

**Tabla 2**

*Materiales, equipos y reactivos utilizados en estudio*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Vasos de precipitación	Rotavapor	Cloroformo
Crisol	Estufa	Metanol
Embudo de separación	Cámara de flujo laminar	Acetato de etilo
Tubos de ensayo	Agitador	Cloruro férrico al 1%
Tubos con tapa rosca	Balanza analítica	Ácido sulfúrico
Cajas Petri	Autoclave	Hidróxido de sodio al 20%
Asa Driblasky	Mufla	Hidróxido de potasio al 10%
Pipeta de 10 mL	Desecador	Ácido clorhídrico 1N
Micropipeta	Refrigeradora	Acetato de sodio



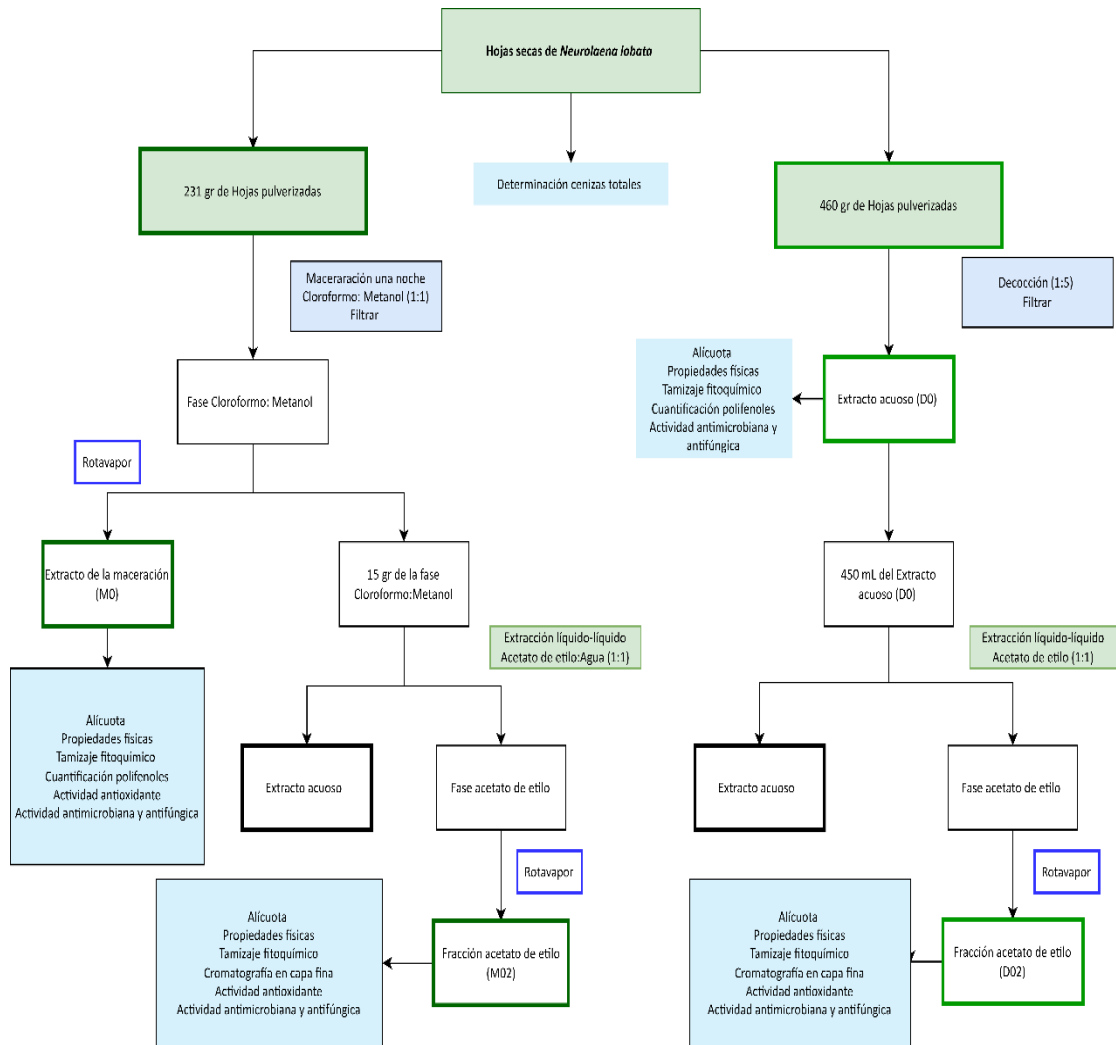
---

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Gradillas de plástico	Espectrofotómetro UV-VIS	Cloruro férrico 5%
Parafilm	Baño María	Hidróxido de sodio al 10%
Mechero de alcohol	Transiluminador	Reactivo de Wagner
Probeta de 100 mL	Centrifuga	Carbonato de Sodio
Pinzas	Homogeneizador	Agar Papa Dextrosa
Balón de aforo		Agar Nutriente
Placas de silicagel		Medio LB
Papel filtro		Ampicilina
Embudos de decantación		Agua salina
Erlenmeyer		Reactivo Folin- Ciocalteu
		Ácido gálico
		Cloruro de sodio

---

Figura 3

Diagrama de flujo de la obtención de los extractos y las fracciones



### 3.4 Comprobación Taxonómica e Identificación Botánica

Se tomaron muestras completas de la planta conocida como Tres puntas y se llevaron a la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", donde el Dr. Fernando Hurtado, docente en botánica y Doctor en biología, certifico que la especie se trata de *Neurolaena lobata*.

### 3.5 Preparación de la Muestra

Las hojas limpias se secaron durante una semana al ambiente con una temperatura promedio de 23.3 °C, posterior a eso se llevaron a los laboratorios de Ciencias Químicas de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", Sede Santo Domingo- Ecuador. donde se colocaron en una estufa a 35°C por 2 horas. Una vez que estuvieron secas totalmente se procedió a moler las hojas en uno molino común.

### 3.6 Caracterización de la Materia Prima

#### 3.6.1 Cenizas Totales

Para la determinación de cenizas totales se empleó el método de la USP30-NF25/561 con modificaciones, se colocó un crisol en una estufa a 108°C durante 2 horas, una vez culminado el tiempo se trasladó a un desecador hasta que se enfrió, luego se pesaron 2 g de la muestra pulverizada y tamizada en el crisol, se colocó en una mufla a 500°C durante 4 horas, una vez incineradas las muestras se enfrió el crisol dentro de un desecador y se pesó, la muestra se reintrodujo en la mufla durante 30 minutos a 500°C y se repitió el proceso hasta que se obtuvo un peso constante (USP 30, 2007).

El ensayo de cenizas totales se realizó por triplicado, los valores se promediaron y el resultado se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{M_f - M_c}{M_o - M_c} \times 100$$

Donde:

%C= Porcentaje de cenizas totales

$M_c$ =masa de crisol vacío (gr)

$M_o$ =Masa de crisol más la muestra (gr)

$M_f$ =Masa del crisol con la ceniza (gr)

100=Factor matemático

### **3.7 Extracción**

Se emplearon dos métodos de extracción: decocción y maceración.

#### **3.7.1 Decocción**

Se tomaron 460 g de muestra molida y se añadió 2300 mL de agua; se llevó a cocción y una vez que comenzó a burbujear el agua se dejó por 15 minutos, pasado ese tiempo se procedió a filtrar la muestra primero con papel de filtrar café y luego con papel filtro con un rango de retención de 20 a 25  $\mu\text{m}$  obteniéndose un extracto acuoso (D0).

#### **3.7.2 Extracción líquido-líquido de la fase de acetato de etilo**

Se tomó 450 mL del extracto acuoso y se realizó la extracción líquido-líquido con acetato de etilo, empleando un embudo de separación, se dejó decantar hasta observar una separación y se recuperaron dos fases; la fase acuosa (D01) y la fase de acetato de etilo, este proceso se repitió por tres veces.

La fase de acetato de etilo se llevó a rotavapor para concentrar el extracto a una temperatura de 40°C, presión 240 mbar se fue disminuyendo la presión hasta que se observó la formación de una pasta y se llevó al extractor para eliminar en su totalidad el solvente, obteniendo un peso de 1.2 g de la fracción de acetato de etilo (D02).

#### **3.7.3 Maceración**

Se tomó 231 g de hojas secas previamente molidas, luego se colocó 950 mL de una solución de cloroformo y metanol en relación 1:1 hasta cubrir por completo la muestra y se dejó macerar por una noche. Una vez macerado se filtró la muestra en papel filtro con un rango de retención de 20 a 25  $\mu\text{m}$ , a continuación, el extracto se concentró en un rotavapor a

una temperatura de 40°C y una presión de 474 mbar primero y luego a una presión de 337 mbar, esta se continuó modificando hasta que se observó la formación de la pasta y se llevó al extractor para eliminar en su totalidad los solventes obteniendo 2.5 g del extracto de maceración (M0).

#### **3.7.4 Extracción líquido-líquido de la fase de acetato de etilo**

Se tomó 1.5 g del extracto de maceración y se realizó una extracción líquido-líquido con agua y acetato de etilo empleando un embudo de separación y se dejó se dé la separación entre los dos líquidos inmiscibles, se recuperaron dos fases, fase acuosa (M01) y la fase de acetato de etilo, este proceso se repitió por tres veces.

La fase de acetato de etilo se llevó al rotavapor a una temperatura de 40°C a una presión de 240 mbar, se fue modificando la presión hasta que se observó la formación de una pasta y se llevó al extractor para eliminar los residuos del solvente, obteniendo 0.8 g de la fracción de acetato de etilo (M02).

### **3.8 Rendimiento**

Se determinó el rendimiento de cada fracción al dividir la cantidad de muestra luego de ser concentrada en el rotavapor por la cantidad de producto que había en solución.

### **3.9 Análisis Fitoquímico**

Se disolvió una alícuota de cada extracto en 10mL de agua destilada y se realizó el tamizaje fitoquímico cualitativo en los extractos de maceración (M0) y acuoso (D0), para identificar la presencia de saponinas, taninos, fenoles, cumarinas, quinonas, triterpenos, flavonoides y alcaloides; aquellos que resultaron positivos se ensayaron con las fracciones de acetato de etilo (M02) y (D02), el estudio se ejecutó por duplicado. Los resultados se reportaron en base a la Tabla 3 (Cerpa, 2007).

**Tabla 3**

*Significación considerada para reportar los resultados del tamizaje fitoquímico*

<b>Especificación</b>	<b>Significado</b>	<b>Comentarios</b>
-	Negativo	Sin cambio de coloración
±	Escasa presencia	Cambio mínimo de coloración
+	Presencia	Cambio leve de coloración
++	Presencia estable	Cambio de coloración
+++	Presencia constante	Cambio de coloración notable
++++	Presencia abundante	Cambio de coloración prolongado

### **3.9.1 Saponinas**

Prueba de Saponificación espumeante

Se colocó un mL de la disolución del extracto más 5 mL de agua en un tubo de ensayo con tapa, luego se agito durante 10 minutos y se evaluó la presencia de la espuma de altura entre 4 mm hasta 20 mm por más de 2 minutos (Nayak *et al.*, 2014).

### **3.9.2 Taninos**

Ensayo con FeCl<sub>3</sub> al 1%

A un mL de la disolución del extracto se le adiciono 2 mL de cloruro férrico al 1% en un tubo de ensayo, se evaluó el desarrollo de una tonalidad marrón rojiza a negra azulada (Nayak *et al.*, 2014).

### **3.9.3 Fenoles**

Ensayo con FeCl<sub>3</sub> al 5%

A un mL de la disolución del extracto en un tubo de ensayo se le adicionaron 3 gotas de acetato de sodio en un tubo más 0.5 mL de solución de cloruro férrico al 5% en solución salina, se evaluó la aparición de una tonalidad azul intensa (Pant *et al.*, 2017).

### **3.9.4 Cumarinas**

Ensayo de KOH al 10%

En un tubo de ensayo se colocó un mL de la disolución del extracto más 3 gotas de KOH al 10% y se evaluó la aparición de una coloración amarillenta, luego se adiciono 0.5 mL de HCl al 1N para desvanecer la coloración (López, 2017).

### **3.9.5 Quinonas**

Prueba de Borntrage

Se colocó un mL de la disolución del extracto en un tubo de ensayo y luego se llevó a baño maría durante 10 minutos a una temperatura de 55°C, una vez finalizado el tiempo se adiciono 1 mL de KOH al 10% luego se agito el tubo y se goteo cloroformo, se evaluó la aparición de una tonalidad rojiza (López, 2017).

### **3.9.6 Triterpenos**

Prueba de Salkowski

A un mL de la disolución del extracto en un tubo se le adicionaron 10 mL de cloroformo y se calentó durante 30 minutos a 55°C en un baño María, una vez culminado el tiempo se adiciono 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se evaluó la presencia de una coloración marrón rojiza (Nayak *et al.*, 2014).

### **3.9.7 Flavonoides**

Prueba de reactivo alcalino

A un mL de la disolución del extracto en un tubo de ensayo se le goteo NaOH al 10% y se evaluó la presencia de una coloración amarilla intensa luego para desvanecer el amarillo se goteo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (Pant *et al.*, 2017).

Reacción con NaOH 20%

A un mL de la disolución del extracto en un tubo de ensayo se le añadieron 5 gotas de NaOH al 20% y se evaluó el cambio de tonalidad (Colina, 2016).

### 3.9.8 Alcaloides

Reactivo de Wagner

En un tubo de ensayo se añadió un mL de la disolución del extracto y se disolvió en 2 mL de HCl al 10%, luego se añadieron 3 gotas del reactivo de Wagner, se evaluó la presencia de un precipitado (López, 2017).

### 3.10 Cuantificación de Polifenoles

La cuantificación de polifenoles se llevó a cabo en los laboratorios de nutrición y calidad del INIAP- Santa Catalina según el protocolo de Slinkard & Singleton (1967).

#### 3.10.1 Curva de calibración

A partir de una solución de ácido gálico de 200 ppm se preparó la siguiente curva de calibración:

**Tabla 4**

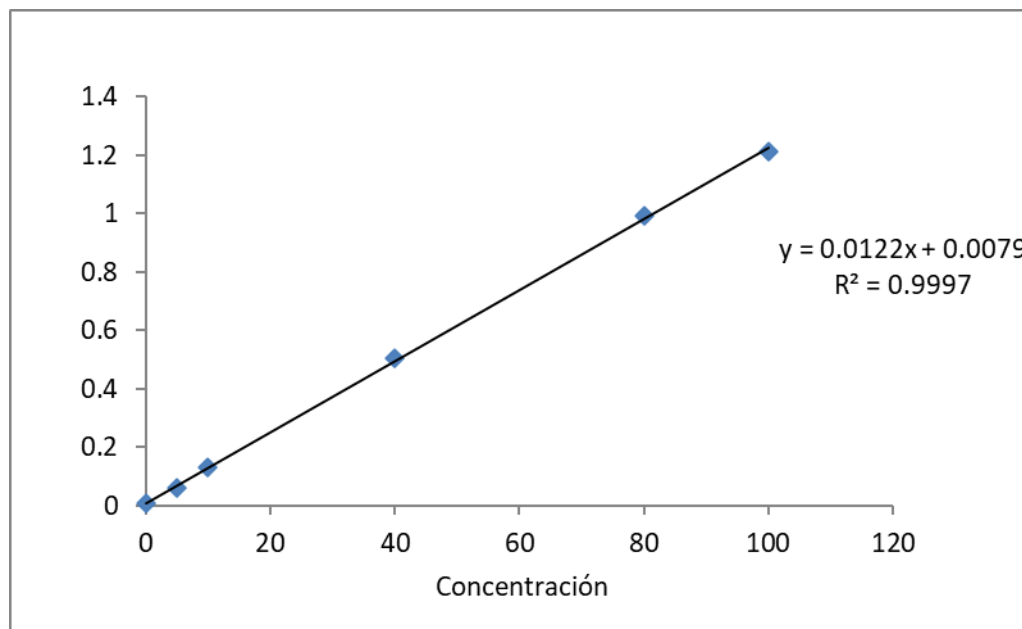
*Valores empleados para la curva de calibración*

Concentración mg/mL	mL de Ácido gálico	mL de agua destilada	Absorbancia
0	0	10	0.052
5	0.25	9.75	0.066
10	0.5	9.5	0.169
40	2	8	0.378
80	4	6	0.734
100	5	5	0.902



**Figura 4**

*Curva de calibración del ácido gálico*



### **3.10.2 Cuantificación**

Se realizó la cuantificación de polifenoles en el extracto acuoso (D0) y en el extracto de maceración (M0); la cuantificación se realizó por duplicado.

Se tomó 0.1 g de la muestra y en cada tubo con muestra se adiciono un mL de buffer de extracción (Metanol 70%, H<sub>2</sub>O 30% y A.F 0.1%) y se colocaron en el homogenizador MP Fast Prep por 60 segundos a PM 24x2 & 6,5 M/S, una vez culminado el tiempo se colocó en la centrifuga Sigma a 9°C, PM 29x2 & 6,5 M/S por 13 minutos y se volvieron a centrifugar por 15 minutos, de los tubos se tomó el sobrenadante, se colocó en balones de aforo de 5 mL y se repitió el proceso 4 veces más. Los balones de aforo se colocaron en oscuridad hasta su uso y una vez culminadas las extracciones se aforaron con buffer de extracción.

Se tomó un mL de la muestra del extracto acuoso (D0) y de la extracción de la maceración (M0) y se les añadió 6 mL de agua destilada más un mL del reactivo de Folin-

Ciocalteu y se dejó reaccionar por 3 minutos, a continuación se añadió 2 mL de carbonato de sodio al 20% y se trasladaron los tubos a un baño María a 40°C durante 2 minutos, una vez culminado se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de (760 nm) y se verificó que la lectura estuviera dentro de la curva de calibración, en el caso del extracto acuoso no estaba en rango por lo tanto se tuvo que diluir hasta que entro en la curva de calibración. El contenido de polifenoles se expresó en mg de ácido gálico (GAE) /100 g de muestra y se calculó mediante la ecuación:

$$mg. Ac. gálico/g de muestra = \frac{LR \left( \frac{mg}{L} \right) * Vt (L) * FD}{Pm (g)}$$

**Donde:**

LR= Lectura de regresión

Vt= Volumen total

Pm= Peso de la muestra

FD= Factor de la dilución

### **3.11 Análisis cromatográfico**

#### **3.11.1 Cromatografía de Capa Fina (TLC)**

La cromatografía de capa fina se realizó con las fracciones de acetato D02 y M02, se tomó una pequeña cantidad de muestra y se disolvió en un mL de metanol; como fase estacionaria se emplearon placas de silicagel 60 F<sub>254</sub> Macherey-Nagel de 8 cm marcadas a lápiz a un centímetro del borde inferior para utilizarse como guía para colocarse la muestra y a un centímetro del borde superior para determinar el límite de la corrida cromatográfica, como fase móvil se empleó hexano, acetato de etilo y diferentes soluciones de hexano-acetato de etilo (4:1), (2:1), (1:2) y (1:4) con un volumen final de 2 mL. Se colocaron 2 µL de cada muestra a una distancia de 1.5 cm entre ellas sobre la placa, el proceso de sembrado se repitió tres veces y se colocó la placa en el solvente dentro de una cubeta cromatográfica con tapa.

Se dejó que el solvente migrará hasta la marca superior y a continuación se retiraron las placas del solvente y se dejaron secar, para la detección no se aplicó ningún tratamiento químico, las placas se observaron en un transiluminador de luz UV de onda media (312 nm) y se contabilizaron el número de bandas en cada placa para determinar en qué solución hubo mayor separación.

En la placa que se observó mayor separación se determinó la coloración de cada banda y el valor de Rf de las bandas; para determinar el valor de Rf de las bandas se tomó la distancia desde el punto donde se sembró la muestra hasta su nueva posición y la distancia entre el punto de siembra de la muestra hasta el frente del disolvente (Martinez *et al.*, 2003). Se determinó el Rf de cada banda según la ecuación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

### **3.12 Determinación de Actividad Biológica**

#### **3.12.1 Actividad Antioxidante**

La actividad antioxidante se determinó mediante el uso de HPLC-DPPH en los Laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia, para ello se enviaron alícuotas en tubos de Eppendorf de la fracción de maceración (M0) y las fracciones de acetato de etilo (D02) y (M02).

Se llevo a cabo en una columna RP-C18e (LiChroCART; 5  $\mu$ m, 4.6x250 mm) y las condiciones de operación fueron: para el analito volumen de inyección:40  $\mu$ L; Flujo:0,6 mL/min; Analito: 2 mg/mL; Detección DAD 200-600 nm y para el DPPH, flujo DPPH:0.4 mL/min (5 g/L) y detección:515 nm.

#### **3.12.2 Actividad Antibacteriana**

Preparación de los extractos

Se tomó una alícuota del extracto y se disolvió en 3 mL de agua, luego se tomó un mL de esa solución y se añadió 9 mL de agua para obtener una solución al 10 %. Se tomó 0.5 y un mL de la solución al 10% a las cuales se les añadió 4.5 y 4 mL de agua para obtener soluciones al 1 y 2 % respectivamente. El procedimiento se realizó para el extracto acuoso (D0), extracto de maceración (M0), fracción de maceración de acetato de etilo (M02) y fracción de decocción de acetato de etilo (D02).

#### Preparación del medio

Se preparó Agar Nutriente (TM MEDIA), siguiendo las indicaciones del fabricante para 100 mL, se realizó una mezcla homogénea y se llevó a la autoclave; se dispuso en cajas Petri previamente esterilizadas.

#### Preparación del inóculo

Se obtuvo *Escherichia coli* comercial (BL21) la cual se cultivó en caldo Luria Bertani (LB) en el que se mantuvo por 4 días en agitación.

#### Método de difusión en discos

Se realizó la siembra de *E. coli* por extensión con el uso de un asa Driblasky. Los discos se impregnaron con las soluciones de los extractos aproximadamente con 0,10 µL y se colocaron en el medio, de la misma manera para el control positivo (Ampicilina) y control negativo (agua salina 0.9), se llevó a la incubadora por 24 horas

### **3.12.3 Actividad Antifúngica**

#### Preparación del medio

Se usó medio de Agar de Dextrosa y Papa (PDA), siguiendo las indicaciones del fabricante para 100 mL, se realizó una mezcla homogénea y se llevó a la autoclave; una vez autoclavado el medio se le agregó ampicilina y se dispuso en cajas Petri.

#### Preparación del inóculo

Fue donado por Jhony Maldonado quien lo obtuvo a partir de suelo para su tema de tesis "Caracterización de hongos entomopatógenos con potencial para el control biológico de estrés biótico en plantas"

Método de pozo en Agar

Se realizaron pozos de 7 mm de diámetro sobre la superficie del agar y en cada uno de ellos se depositó 0,20  $\mu$ L de los extractos a evaluar, además del control positivo (Metanol) y negativo (agua salina), se dejó reposar por 30 minutos; se tomó con un sacabocados el hongo y se colocó en medio de la caja Petri a continuación se incubó por un tiempo de 96 horas.

### **3.13 Resonancia Magnética Nuclear**

La resonancia magnética nuclear se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia donde se tomaron los espectros  $^1\text{H}$  RMN de las mezclas para identificar en macro los componentes de los extractos obtenidos. Se utilizó el Bruker AVANCE 400, a 400 MHz para H1.

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

### 4.1 Descripción Botánica de *Neurolaena lobata*

Arbusto mediano erecto, anual o perenne, de 1-4 metros de altura, tallo pubescente, terete y acanalado. Hojas de peciolo corto a subsésiles, acuminadas en cada extremo, trilobadas, de color verde oscuro, hirsutas y peludas en el lado superior, presenta márgenes dentados, textura rugosa, generalmente de 1 a 3 lóbulos, pinnadamente nervadas y fuertemente reticulada como se observa en la Figura 4. Olor suave y sabor amargo.

#### Figura 5

*Hoja de Neurolaena lobata*



Figura 6

*Dibujo lineal de Neurolaena lobata*



*Nota:* Adaptada de *Neurolaea lobata*, Flora of Panamá, Trópicos. CC BY-NC-SA 3.0

Como podemos ver la figura 6 las flores de *Neurolaena lobata* se caracterizan por ser tubulares, campanuladas, oblongas, brácteas involucrales imbricadas en series 3-4, corolas amarillas, cabezas discoideas, de aproximadamente 20 flores, dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo, cabezas numerosas, cimas pedunculadas terminales o laterales que van desde las axilas de las hojas superiores; receptáculo con numerosas páleas delgadas largas como las brácteas involucrales internas.

**Figura 7***Flores de Neurolaena lobata***4.2 Cenizas****Tabla 5***Contenido total de cenizas en las hojas*

<b>Peso muestra</b>	<b>Peso crisol vacío</b>	<b>Peso crisol+muestra</b>	<b>Peso crisol+cenizas</b>	<b>% Cenizas totales</b>	<b>DE</b>
2.003	38.832	40.835	38.958	6.290	
2.004	38.743	40.747	38.870	6.337	
2.003	38.787	40.79	38.905	5.891	
				<b>6.172</b>	<b>±0.24</b>

Para regular la calidad de los extractos vegetales se emplean diferentes técnicas químicas para caracterizar la materia prima, entre ellas la determinación de cenizas totales ha sido una de las más empleadas, se basa en la calcinación o ignición de la materia orgánica por lo que el valor de cenizas totales expresa de forma general el contenido de materia inorgánica y minerales en la muestra seca (Vasantrao, 2012). Un valor alto de cenizas totales refleja un



manejo poco adecuado del material vegetal y la presencia de impurezas, en esta investigación se obtuvo un valor de cenizas totales de 6.2%  $\pm$ 0.24 el cual está dentro de los límites establecidos por la (Organización Mundial de la Salud, 1998) (<10%) y la Farmacopea Americana (<12%) (USP 30, 2007), por lo tanto, este valor nos indicó que el material vegetal cumplía con este parámetro de calidad y podía ser utilizado para el proceso de extracción.

### 4.3 Rendimiento

**Tabla 6**

*Rendimiento de cada extracción*

Método	Muestra obtenida	% Rendimiento
Decocción	1.27 L	NR
Maceración	25 g	10.9
Fraccionamiento maceración	1.2 g	8
Fraccionamiento decocción	0.8 g	4.4

*Nota:* No se realizó (NR)

Para la obtención exitosa de compuestos bioactivos, la preparación de la muestra y el proceso de extracción son claves, la extracción consiste en la separación de los metabolitos secundarios de una muestra vegetal mediante el uso de solventes, se pueden utilizar diferentes tipos de métodos y solventes en función del tipo de planta, órgano, polaridad, naturaleza química del compuesto, tiempo de recuperación y estabilidad al calor (Abubakar & Haque, 2020).

En este estudio se utilizó maceración y decocción para la obtención de los extractos debido a que son los métodos más empleados para el consumo humano. Como resultado se obtuvieron 25 g extracto con un rendimiento del 10,9 % por el método de maceración y 1.27 L por el método de decocción donde no fue posible determinar el rendimiento de extracción

dado que para concentrar la muestra se requería aplicar temperaturas altas que podrían degradar los metabolitos secundarios.

Debido a que en las extracciones se obtuvo una mezcla de una amplia gama de compuestos, se fraccionaron mediante extracción líquido-líquido para separar los componentes en base en la polaridad, obteniéndose 1.2 g del fraccionamiento del extracto de maceración con un rendimiento del 8 % y 0.8 del fraccionamiento del extracto de decocción con un rendimiento del 4.4 %, esta diferencia se debe a los solventes utilizados dado que para la maceración se empleó un sistema cloroformo-metanol y para la decocción solamente agua, de forma que al combinar un solvente no polar con un polar se lograron extraer compuestos de diferente polaridad; en la decocción se extraen principalmente polares, de forma que al realizar el fraccionamiento con un no polar disminuyó la cantidad de compuestos extraídos por decocción en comparación con el método de maceración (Sasidharan *et al.*, 2011).

#### 4.4 Tamizaje

**Tabla 7**

*Resultados del tamizaje fitoquímico*

<b>Metabolito</b>	<b>Extracto de la maceración (M0)</b>	<b>Acetato de etilo (M02)</b>	<b>Extracto acuoso (D0)</b>	<b>Acetato de etilo (D02)</b>
Saponinas	-	NR	-	NR
Taninos	++++	+	+++	++
Cumarinas	-	NR	-	NR
Flavonoides	++++	+++	++	++
Flavonoides*	++++	++	++++	+++
Quinona	++	+	+++	+++
Alcaloides	+	-	-	NR
Fenoles	++++	+++	++	++
Triterpenos	-	NR	-	NR

*Nota:* Flavonoides: Prueba de reactivo alcalino y Flavonoides \*: Reacción con NaOH 20%. NR:

No se realizó

El tamizaje fitoquímico permite identificar la presencia de metabolitos primarios y secundarios en un extracto, es un método cualitativo que se basa en reacciones colorimétricas, descritas en la literatura y de fácil reproducción, el tamizaje fitoquímico es una herramienta que permite realizar un análisis preliminar de la composición de los extractos de forma que es posible descartar las fracciones que no tienen potencial actividad antioxidante (Abubakar & Haque, 2020).

Se determinó un resultado negativo para la presencia de saponinas y cumarinas resultado que coincide con lo obtenido por Morales & Lima (2014). Se obtuvo presencia de alcaloides solamente en el extracto de la maceración resultado que coincide con lo reportado por Nayak *et al.*, (2014). Los alcaloides son de naturaleza básica y su solubilidad dependerá del pH, de forma generalizada son poco solubles en agua y para su extracción se utilizan solventes no polares como el cloroformo (Acosta, 2008). Es por ello que no se obtuvieron alcaloides en la fracción acuosa, pero si en la de maceración; resultado que se corrobora en el estudio de Córdova *et al.*, (2009) donde al emplear un solvente polar no obtuvieron presencia de alcaloides en el extracto de *N. lobata*.

No se registró presencia de triterpenos en el extracto de maceración, reporte que coincide con lo obtenido por Nayak *et al.*, (2014), ni en el acuoso dado que los terpenoides se caracterizan por ser hidrofóbicos (Perveen & Al-Taweel, 2018).

Se registró un resultado positivo de quinonas, taninos, fenoles y flavonoides en todas las muestras, siendo el extracto de la maceración la muestra donde hubo mayor presencia de flavonoides, taninos y fenoles; mientras que en el extracto acuoso hubo mayor presencia de quinonas. Resultado que coincide por lo obtenido por Lima & Morales, (2014) donde el extracto etanólico de *N. lobata* fue positivo ante la presencia de (flavonoides) quercetina, rutina, ácido clorogénico y antraquinonas.

Los compuestos fenólicos; flavonoides y taninos funcionan como agentes quelantes de metales y captadores de especies reactivas de oxígeno (Sotler *et al.*, 2019). De forma que los dos extractos analizados (M0); (D0) y sus fracciones (M02) y (D02) indican un posible potencial antioxidante.

#### 4.5 Cromatografía de Capa Fina

La cromatografía de capa fina se realizó con las fracciones de acetato de etilo (D02) y (M02); se determinó que al emplear la solución hexano-acetato de etilo (2:1) ocurría una mayor separación de los compuestos al observarse 11 bandas en la (D02) y 8 bandas en la (M02) mientras que con las otras proporciones se obtenía menor cantidad de bandas Tabla 8, esto se debe a que los componentes de la muestra presentan polaridad media (Altemimi *et al.*, 2017).

**Tabla 8**

*Número de bandas obtenidas en cada solución*

Muestra	Solución Hexano-Acetato de Etilo	Número De Bandas
D02	1:0	0
D02	4:1	3
D02	2:1	11
D02	1:2	6
D02	1:4	5
D02	0:1	4
M02	1:0	1
M02	4:1	5
M02	2:1	8
M02	1:2	4
M02	1:4	3
M02	0:1	3

*Nota:* D02: Fracción de acetato de etilo decocción, M02: Fracción de acetato de etilo maceración

**Tabla 9**

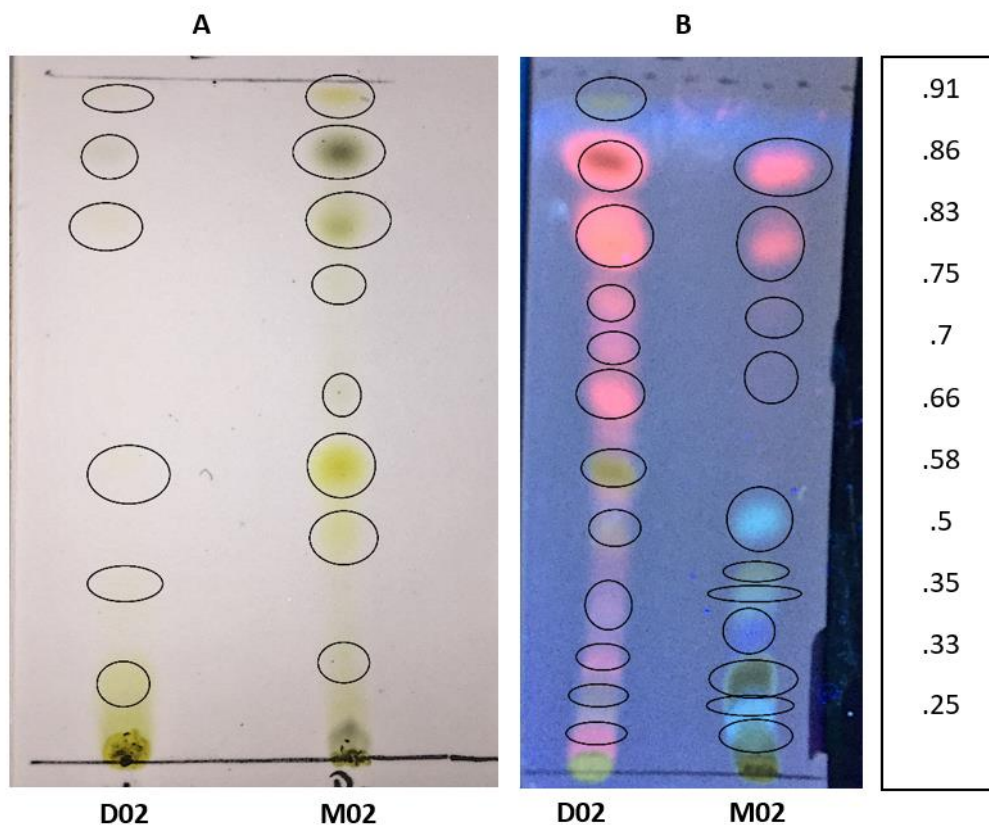
*Resultados de la cromatografía de capa fina hexano-acetato de etilo (2:1)*

<b>Muestra</b>	<b>Rf</b>	<b>Coloración UV (312 nm)</b>
D02	.91	Amarilla
D02	.86	Naranja
D02	.83	Naranja
D02	.75	Naranja
D02	.7	Naranja
D02	.66	Verde
D02	.58	Naranja
D02	.5	Amarillo
D02	.35	Naranja
D02	.33	Naranja
D02	.25	Verde
M02	.86	Naranja
M02	.83	Naranja
M02	.66	Celeste
M02	.5	Verde
M02	.41	Celeste
M02	.35	Azul
M02	.33	Verde
M02	.25	Azul

*Nota:* D02: Fracción de acetato de etilo decocción, M02: Fracción de acetato de etilo maceración

**Figura 8.**

*Cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo D02 y M02*



*Nota.* A Luz visible. B Luz UV 312 nm. Fase estacionaria: sílicagel Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (2:1)

Al determinar los valores de Rf de cada banda y emplear UV para su detección se observó compuestos de fluorescencia amarilla, naranja y verde en la muestra (D02) con diferentes polaridades; mientras que en la (M02) hubo presencia de compuestos de fluorescencia naranja de baja polaridad y compuestos de fluorescencia azul y verde de mayor polaridad.

Ciertos metabolitos fluorescen a una longitud de onda adecuada sin embargo no existen reportes del color de la fluorescencia de los diferentes metabolitos en UV a una longitud de onda media; sin embargo la coloración naranja ha sido característica de los

flavonoides pudiendo variar y ser amarilla o azul dependiendo de la estructura del flavonoide, los flavonoles arrojan tonalidades naranja-amarillo, las flavonas naranja, mientras que los fenoles suelen tener tonalidad azul; las antraquinonas amarilla y los taninos coloración rojiza (Wagner & Bladt, 1996).

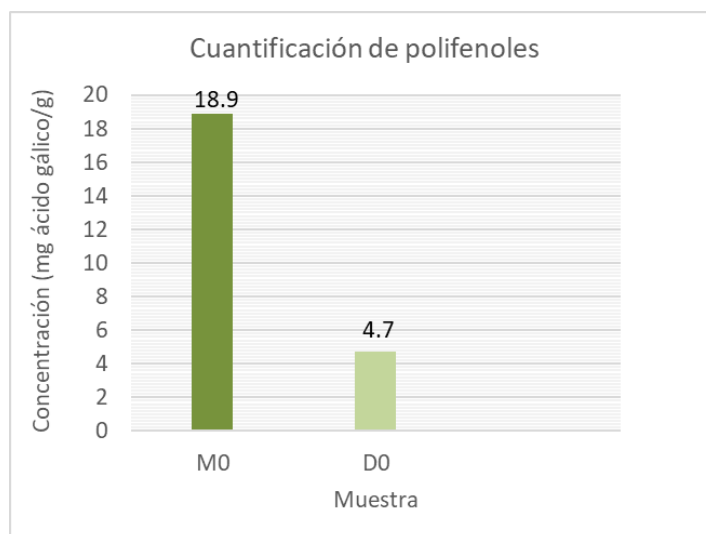
De forma que en base a los resultados obtenidos en el tamizaje y las coloraciones observadas se podría asumir que existe presencia de flavonoides de tipo flavonas y flavonoles, antraquinonas y taninos en la fracción de acetato de etilo (D02); mientras que en la fracción de acetato de etilo (M02) se asume la presencia de flavonoides, flavonas y taninos lo que concuerda con lo obtenido por Lima & Morales (2014).

#### 4.6 Cuantificación de Polifenoles

**Tabla 10**

*Cuantificación de polifenoles*

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>(mg GAE/g)</b>	
Extracto de la	0.473	18.93	
maceración	0.471	18.87	18.90
(M0)	0.472	18.91	
	0.548	4.42	
Extracto acuoso	0.614	4.96	4.69
(D0)	0.581	4.69	

**Figura 9***Polifenoles totales*

*Nota:* M0: Extracto maceración, D0: Extracto acuoso

El método del reactivo de Folin-Coicalteu para la cuantificación de polifenoles, se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino desde compuestos fenólicos para formar un cromóforo azul el cual está constituido por fosfomolibdeno o fosfotúngstico, donde la máxima absorción depende de la concentración de los compuestos fenólicos, generalmente se usa el ácido gálico como compuesto estándar de referencia (Singleton *et al.*, 1999). El extracto acuoso presentó una concentración de 4.69 mg GAE/g y el extracto de maceración 18,9 mg/g, la concentración de polifenoles en el extracto acuoso es bastante inferior a la obtenida en el extracto de maceración, esto se debe a que la recuperación final de los este tipos de compuestos se puede ver afectada por el pH y la temperatura, dado que varios tipos de polifenoles se degradan al ser sometidos a temperaturas elevadas y los compuestos fenólicos más abundantes, flavonoides y taninos son más solubles en metanol (Colina, 2016; Padmashree *et al.*, 2014).



La presencia de polifenoles en ambos extractos indica la presencia de compuestos que han demostrado actividad antioxidante por la presencia del fenol (Hatami *et al.*, 2014). Lo que consolida los resultados obtenidos del tamizaje y en la cromatografía en capa fina.

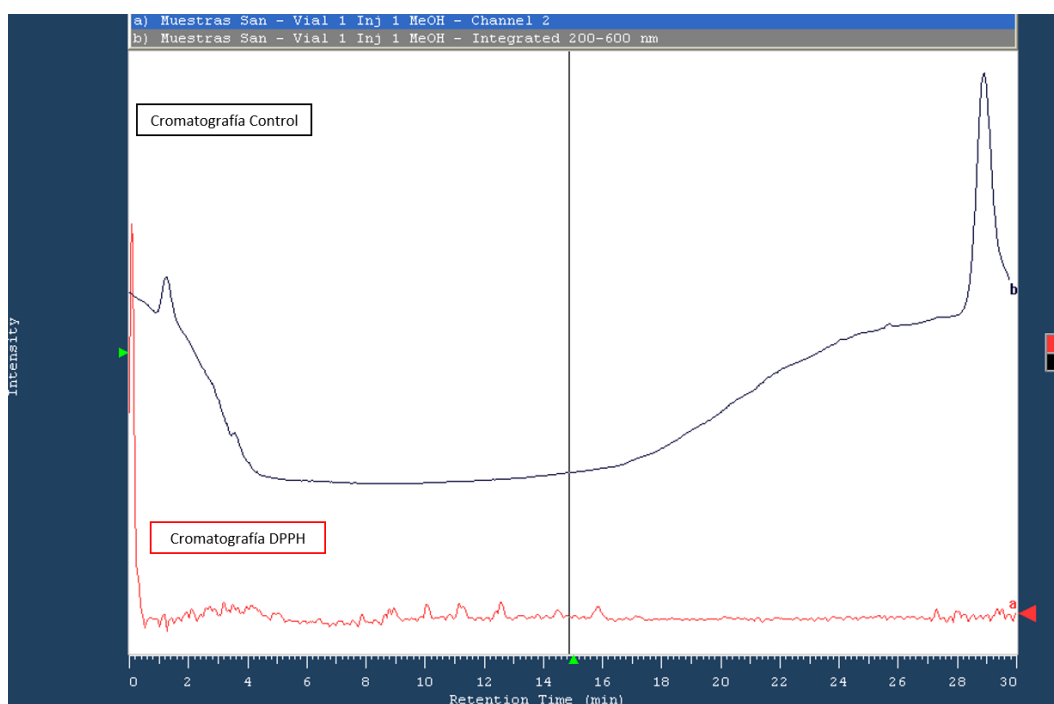
## 4.7 Actividad Biológica

### 4.7.1 Actividad Antioxidante

El análisis HPLC-DPPH reveló la presencia de captadores de radicales libres en la fracción de maceración (M0) y en las fracciones de acetato de etilo (M02) y (D02) como se observa en las Figuras 11, 12 y 13.

**Figura 10.**

*Cromatograma de la disminución del radical DPPH en el control.*

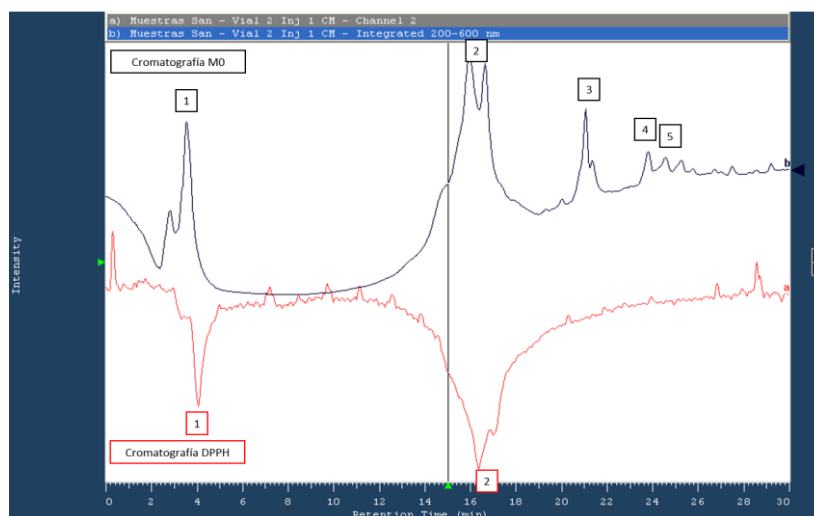


*Nota:* Cromatografía control: Picos correspondientes a la separación del blanco.

Cromatografía DPPH: Cromatografía del DPPH normal sin ser reducido.

**Figura 11**

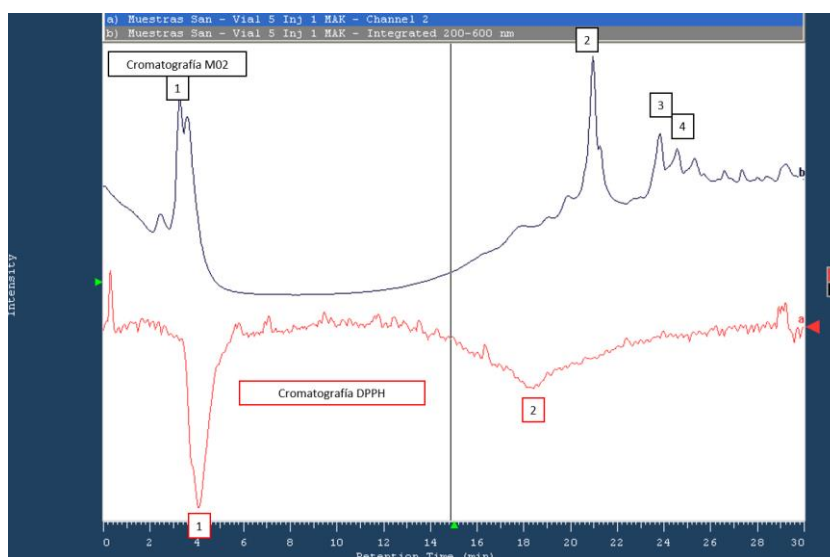
*Cromatograma de la disminución del radical DPPH en el extracto de maceración (M0)*



*Nota:* Cromatografía M0: Picos correspondientes a la separación de los analitos presentes en la muestra del extracto de la maceración. Cromatografía DPPH: Picos correspondientes a la reducción del DPPH.

**Figura 12**

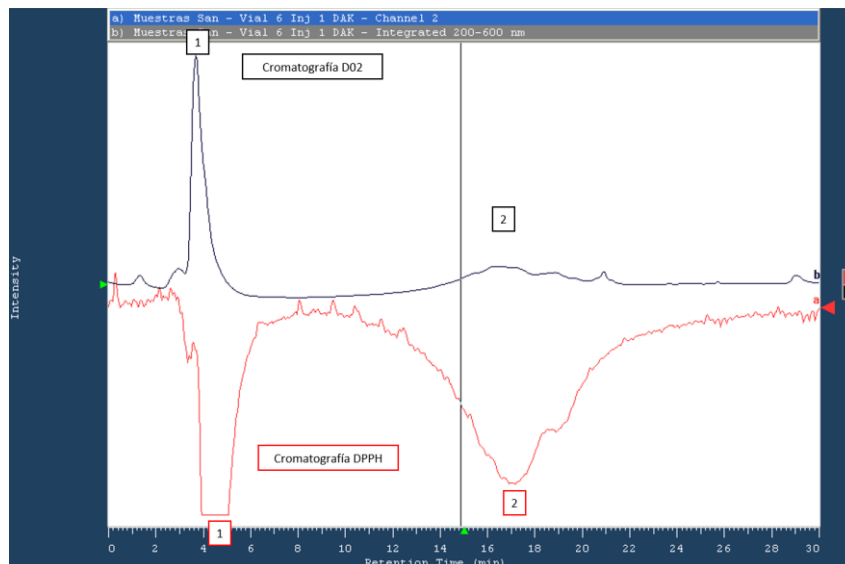
*Cromatograma de la disminución del radical DPPH en la fracción de acetato de etilo (M02)*



*Nota:* Cromatografía M02: Picos correspondientes a la separación de los analitos presentes en la muestra de la fracción de acetato de etilo de la maceración. Cromatografía DPPH: Picos correspondientes a la reducción del DPPH.

Figura 13

*Cromatograma de la disminución del radical DPPH en la fracción de acetato de etilo (D02)*



*Nota:* Cromatografía D02: Picos correspondientes a la separación de los analitos presentes en la fracción de acetato de etilo de decocción. Cromatografía DPPH: Picos correspondientes a la reducción del DPPH.

El radical DPPH ha sido ampliamente empleado en ensayos de actividad antioxidante por ser un radical libre estable y se caracteriza por la deslocalización de su electrón sobrante lo que le confiere una tonalidad morada intensa y una fuerte banda de absorción a los 515 nm, cuando un compuesto antioxidante actúa sobre el DPPH le dona un electrón lo que disminuye su tonalidad intensa y también su absorbancia (Kedare *et al.*, 2011).

Los picos positivos que se observan en el cromatograma corresponden a cada compuesto separado en la columna en función de su afinidad por la fase móvil presentando mayor tiempo de retención los compuestos menos polares, los picos negativos corresponden a la reducción del radical DPPH por parte de compuestos con actividad antioxidante dando como resultado una absorbancia negativa en la lectura a 515 nm, de forma que cada coincidencia representa la presencia de un compuestos con actividad antioxidante; se observa

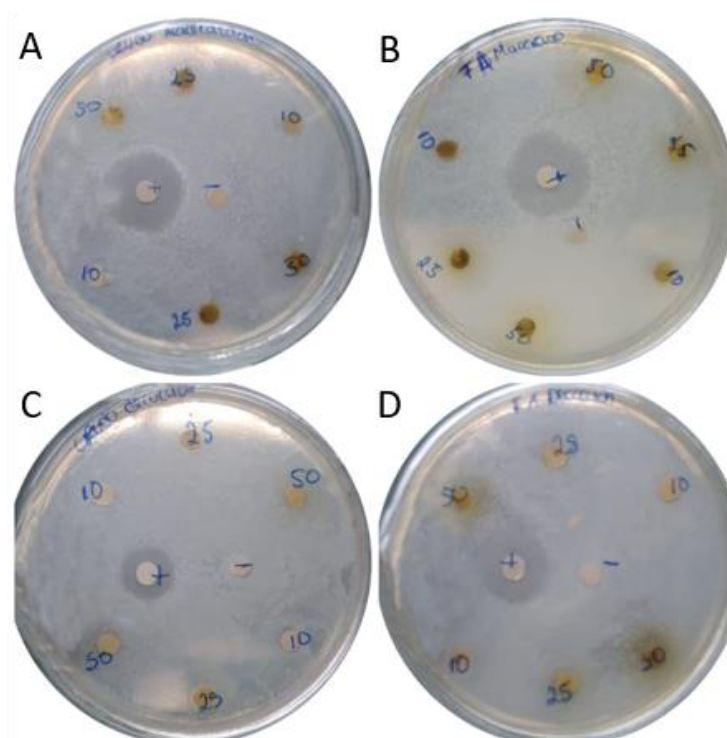
que en los tiempos de retención 4 y 17 minutos hay dos compuestos que presentan actividad reductora y son comunes en los tres cromatogramas. Un antioxidante puede actuar capturando radicales, neutralizándolos o evitando su producción, al observar la presencia de compuestos reductores de DPPH en los cromatogramas se determina que las tres fracciones tienen actividad antioxidante.

#### 4.7.2 Actividad antimicrobiana

No se observó un efecto inhibitorio de los extractos y fracciones probadas sobre el crecimiento de *E. coli* y *Aspergillus spp* como se observa en las Figuras 14 y 15.

#### Figura 14

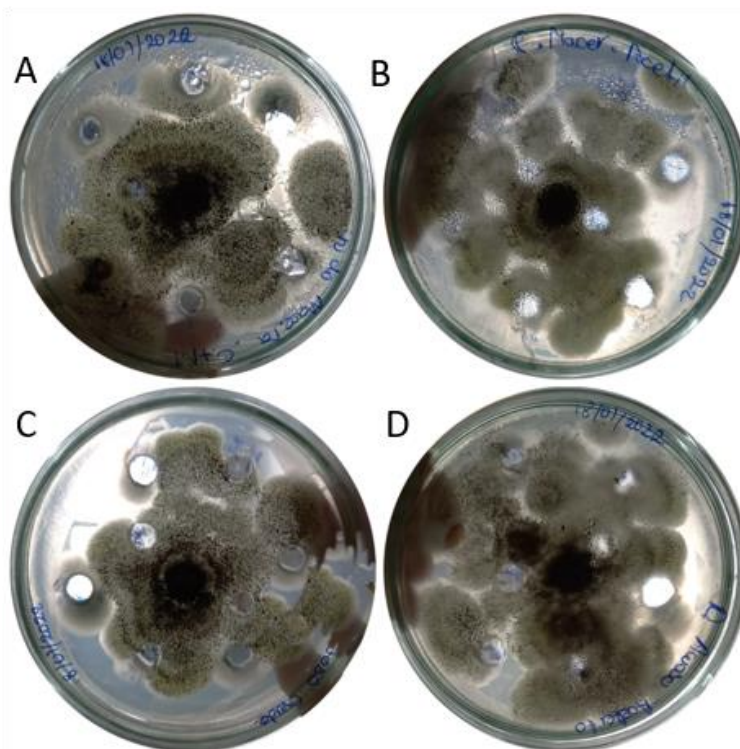
Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de *Neuroleena lobata* sobre *E. coli*



Nota: **A:** Extracto de maceración (M0), **B:** Fracción de acetato de etilo maceración (M02), **C:** Extracto acuoso (D0) y **D:** Fracción de acetato de etilo decocción (D02).

**Figura 15**

*Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de Neuroleena lobata sobre Aspergillus spp.*



*Nota: A: Extracto de maceración (M0), B: Fracción de acetato de etilo maceración (M02), C: Extracto acuoso (D0) y D: Fracción de acetato de etilo decocción (D02).*

La actividad biológica de una especie vegetal se ve determinada por la composición y cantidad de metabolitos secundarios; ninguno de los extractos y fracciones probadas en diferentes concentraciones inhibió el crecimiento de *E. coli*, como se observa en la Figura 14, por lo tanto, no tuvieron un efecto antibacteriano, resultado que se corrobora en una investigación realizada por Chariandy *et al.*, (1999) donde observaron que *N. lobata* tiene un mayor poder antimicrobiano frente a otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Nayak *et al.*, (2014) obtuvo un resultado contrario al de este estudio, donde demostró que el extracto crudo de *N. lobata* obtenido mediante maceración con etanol si tuvo un efecto antimicrobiano frente a *E. coli*. Mientras que Perera (2017) observó que, en hojas más jóvenes, hay un mayor número de compuestos

secundarios debido a que funcionan como método de defensa al carecer de dureza y grosor. La diferencia obtenida en nuestra investigación puede deberse a que los compuestos que se aislaron no tenían esta actividad biológica

En *N. lobata*; los metabolitos secundarios a los que se les ha atribuido propiedades antimicrobianas son las lactonas sesquiterpénicas, la diferencia de resultados se explica por el tipo de solventes empleados y que en este estudio no se recolectaron hojas jóvenes, en consecuencia, la concentración de este tipo de metabolito en los extractos posiblemente es baja como para ejercer una acción antibacteriana (Passreiter *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2011).

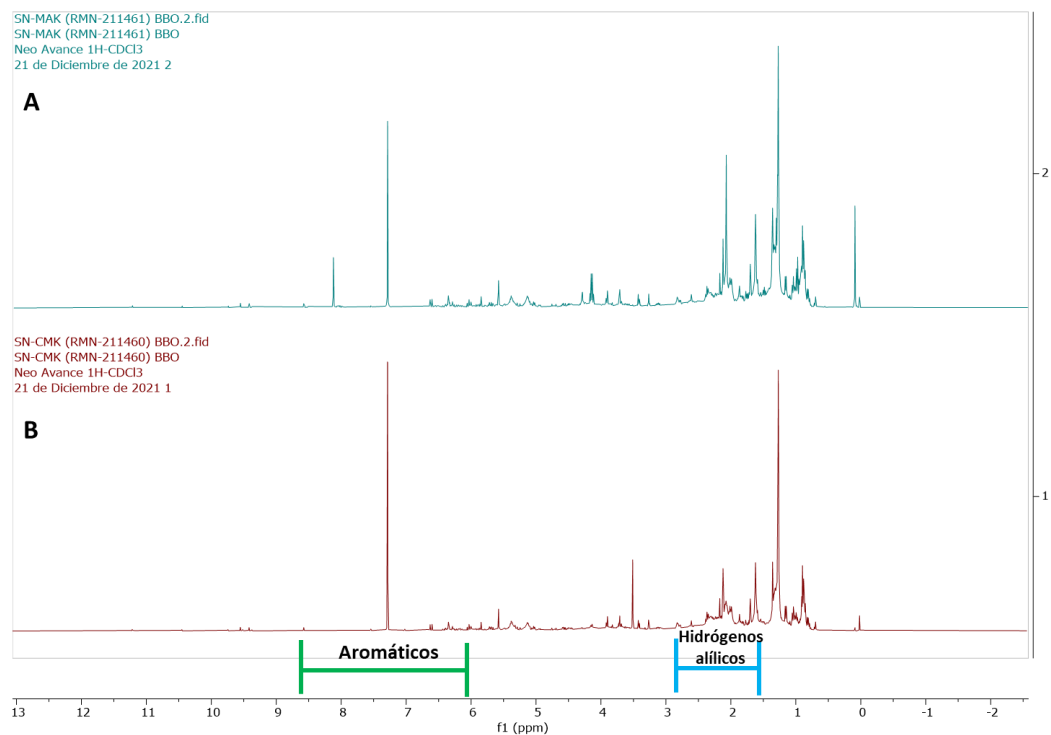
No hubo un efecto antifúngico sobre *Aspergillus spp* por parte de los extractos y fracciones de *N. lobata* como se observa en la Figura 15, este resultado se corrobora con el estudio realizado por Lentz *et al.*, (1998), donde observó que *N. lobata* no tiene un efecto antifúngico frente a algunos hongos incluido *Aspergillus spp*. A pesar de que los extractos no tuvieron efecto antimicrobiano, hay investigaciones donde han determinado el potencial antioxidante que presentan los extractos de *N.lobata* atribuida a la presencia de flavonoides, los cuales reducen la expresión de la nucleocápside e inhiben la expresión de enzimas responsables de la replicación (Flieger *et al*, 2021), además que la infección por el virus promueve el estrés oxidativo lo que ha llevado a una búsqueda de antioxidantes como suplemento en el tratamiento de los síntomas, sin embargo, cabe recalcar que la acción de los flavonoides puede verse afectada por la degradación en el estómago y que algunos compuestos de bajo peso molecular pierden su actividad en las células (Diniz *et al.*, 2020).

#### **4.8 Resonancia Magnética Nuclear**

El análisis de RMN reveló la presencia de hidrógenos alílicos, bencílicos, alquinos terminales, olefínicos, del grupo hidroxilo unidos a sistemas aromáticos y de carbonos unidos a oxígenos de tipo éter como se observa en las Figuras 16 y 17.

**Figura 16**

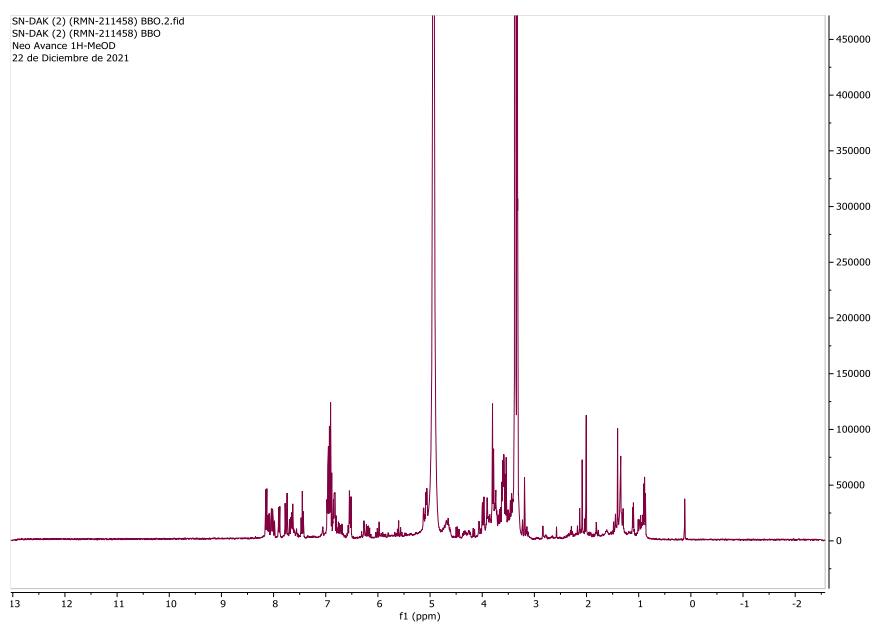
RMN en el extracto de maceración (M0) y fracción de acetato de etilo (M02)



Nota: A (fracción de acetato de etilo) y B (extracto de maceración)

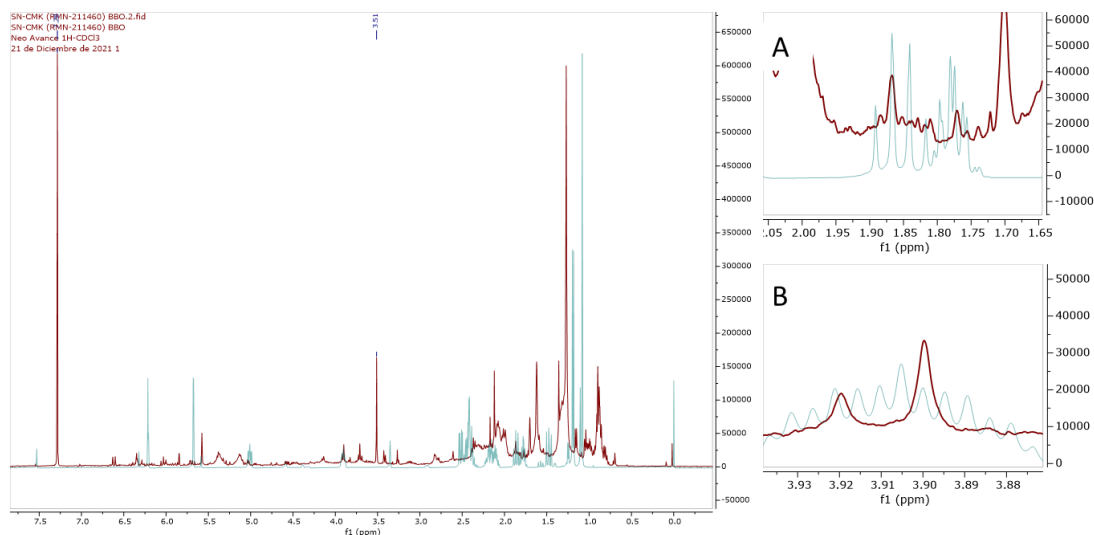
**Figura 17**

RMN en la fracción de acetato de etilo (D02)



**Figura 18**

*RMN en el extracto de maceración (MO) superpuesto con una lactona sesquiterpenica (bmse001215)*



**Nota:** A: picos similares en el rango de 1.70 – 1.90 ppm y B: picos similares en el rango 3.89 – 3.93 ppm

En una revisión general de los espectros se observa que no hay presencia de hidrógenos de aldehídos y de ácidos carboxílicos en D<sub>2</sub>O como se observa en la Figura 17, los cuales se encuentran en un rango de 9,5-10 y 11 ppm respectivamente, hasta el momento no se han reportado metabolitos secundarios de *N. lobata* en este rango corroborado así los resultados obtenidos.

La presencia de hidrógenos unidos a sistemas aromáticos ubicados en la posición 6.5 y 8 ppm, indica posiblemente la presencia de flavonoides (Kerr *et al.*, 1981). Así mismo se reporta la presencia del hidrógeno alílico, el cual esta relacionado con la presencia de lactonas sesquiterpénicas (García, 2003). Para la identificación de lactonas sesquiterpénicas se utilizó la lactona sequiterpénica 326 (bmse001215) obtenido de la base de datos Biological Magnetic Resonance Data Bank, la cual se compara con el espectro de la muestra MO (figura 18), observando similitud en los desplazamientos 1.70 – 1.90 ppm y 3.89 – 3.93 ppm; este



resultado puede ser debido a que algunas señales parecen estar solapadas con las señales de otros metabolitos; además, las lactonas sesquiterpénicas sufren reacciones de hidrólisis lo que podría afectar la estructura molecular (Saucedo Hernández *et al.*, 2009). En múltiples investigaciones de análisis de RMN de *N. lobata* se han reportado variedad de sesquiterpenos (Lajter *et al.*, 2014; Vasas *et al.*, 2021; Walshe-Roussel *et al.*, 2013).

## Capítulo V: Conclusiones

Se determinó que *Neurolaena lobata* tiene actividad antioxidante de tipo primaria al comprobarse la presencia de compuestos reductores de radicales mediante la técnica HPLC-DPPH. Se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, flavonas, flavonoles, sesquiterpenos, taninos y quinonas en los extractos mediante el tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina.

Los compuestos fenólicos presentes en *N. lobata* son de polaridad media al observarse su presencia en el extracto de maceración y en el de decocción, pero son más solubles en compuestos polares.

El estudio permitió aplicar por primera vez la técnica HPLC-DPPH sobre extractos de *Neurolaena lobata*, especie vegetal que adquirió gran popularidad al atribuirle propiedades antivirales y terapéuticas frente a la infección causada por el SARS-CoV-2, los resultados obtenidos podrían apoyar esta teoría por la presencia de flavonoides antioxidantes, sin embargo, la acción de los flavonoides se ve afectada por un gran número de factores como la degradación.

Los extractos y fracciones de *Neurolaena lobata* obtenidos, no presentan acción antimicrobiana frente a *E. coli* y *Aspergillus*, posiblemente a causa de las condiciones del extracto o la baja concentración de los compuestos responsables de esta actividad.

Los resultados comprueban la idea de que las plantas son una fuente potencial de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimenticia, la nanobiotecnológica y la farmacéutica.

## Capítulo VI: Recomendaciones

Se recomienda emplear métodos que no requieran temperaturas elevadas para la extracción de compuestos fenólicos y seleccionar solventes que no sean de difícil recuperación para disminuir el costo y tiempo de extracción.

Determinar las condiciones que aumentan el rendimiento de la extracción y unificar los pesos utilizados en las alícuotas para disminuir la variación de resultados en los polifenoles totales.

Purificar los analitos que presentan actividad captadora de radicales y determinar su estructura química para realizar estudios sobre la toxicidad y biodisponibilidad para la determinación de su uso más adecuado.

Realizar estudios sobre la resonancia magnética nuclear de los flavonoides presentes en los extractos de *Neurolaena lobata* para actualizar la información disponible.

## Capítulo VII: Bibliografía

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1–10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Acosta, G., J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Universidad de Antioquia.
- Aguilar, O. A., Castillo, C., Díaz, R., Nieto, A., & Méndez, D. (2018). Antioxidants and inhibition of free radicals: lipoperoxidation and carbonylation. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 60–72. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.60>
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from *Plant Extracts*. *Plants* (Basel, Switzerland), 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Amarowicz, R. (2007). Tannins: the new natural antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(6), 549–551. <https://doi.org/10.1002/EJLT.200700145>
- Bast, A., & Haenen, G. R. (2013). Ten misconceptions about antioxidants. *Trends in pharmacological sciences*, 34(8), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.05.010>
- Bele, A., & Khale, A. (2010). An overview on thin layer chromatography. *International journal of Pharmaceutical sciences and research*, 6, 256–257. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2\(2\).256-67](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.2(2).256-67)
- Berger, I., Passreiter, C. M., Cáceres, A., & Kubelka, W. (2001). Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research*, 15(4), 327–330. <https://doi.org/10.1002/PTR.782>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants--Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at

high doses. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 3(4), 228–237.  
<https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>

Bueno, V.R., Gostel, M.R., & Heiden, G. (2021). An overview of Neurolaeneae. *Embrapa Clima Temperado-Artigo Em Periódico Indexado (ALICE)*, 37–66. [https://doi.org/10.1007/978-1-4842-4483-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4842-4483-8_2)

Caleja C., Barros L., Antonio A.L., Ćirić A., Barreira J.C., Sokovic M., Oliveira M.B.P., Santos-Buelga C., Ferreira I.C. (2015). Development of a functional dairy food: Exploring bioactive and preservation effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) *J. Funct. Foods*. 2015; 16:114–124. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.033>.

Cardona, A. (2010). *Separación por cromatografía en capa fina y cuantificación por densitometría UV de cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol); -[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidindiamina y 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol) bencensulfonamida en tabletas y suspensión*. [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala].

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

Chandra, P., Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2020). Antioxidant compounds from microbial sources: A review. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 129, 108849. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108849>

Chariandy, C. M., Seaforth, C. E., Phelps, R. H., Pollard, G. V., & Khambay, B. P. S. (1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal

- properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 265–270.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00130-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00130-5)
- Chau, C. (2018). Actividad inhibitoria de alfa-amilasa y presencia de flavonoides en extractos de Neuroloena lobata. Retrieved from <http://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/3422>
- Colina, A. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas “Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].* [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/10/916203/analisis-fitoquimico-determinacion-cualitativa-y-cuantitativa-d\\_7TSqx4x.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/10/916203/analisis-fitoquimico-determinacion-cualitativa-y-cuantitativa-d_7TSqx4x.pdf)
- Córdova, D. J., Dardón, R. M., González, J. E., y Menéndez, M. C. (2009). *Determinación y cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutracéuticos.* [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala].
- De Las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., & Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 161–166.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00029-4)
- Diniz, L., Bezerra Filho, C., Fielding, B. C., & de Sousa, D. P. (2020). Natural Antioxidants: A Review of Studies on Human and Animal Coronavirus. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 3173281. <https://doi.org/10.1155/2020/3173281>
- Doughari, J. H. (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.* <https://doi.org/10.5772/26052>

- Dunn, K.-J., Bergan, D. J., & Latorraca, G. A. (2002). Nuclear magnetic resonance petrophysical and logging applications. *In Elsevier Science Ltd (Vol. 32)*. [https://doi.org/10.1016/S0950-1401\(13\)70001-6](https://doi.org/10.1016/S0950-1401(13)70001-6)
- 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>
- Fregoso A, A. T., Hernández N, C. B., & Mendoza P, J. A. (2016). Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. A Master Regulator of Oxidative Stress - *The Transcription Factor Nrf2*. <https://doi.org/10.5772/65715>
- García, E. (2003). Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de *Acosmiun panamense*, *Jatropha curcas* y *Tithona diversifolia*.
- García-González, M., Escalante, C., Díaz, C., & Costa, R. (2007). Antipyretic effect of the aqueous extract obtained from leaves of *Neurolaena lobata* (Asteraceae) on a pyretic model induced by brewer's yeast. *Revista Médica de La Universidad de Costa Rica*, 1(1), 20–27. <https://doi.org/10.15517/RMU.V1i1.7870>
- Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., & Theodoridis, G. (2016). Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Food and Health*, 93–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00159-8>
- Girón, L. M., Freire, V., Alonzo, A., & Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(2–3), 173–187. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90035-C](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90035-C)
- Gracioso, J. S., Hiruma-Lima, C. A., & Souza Brito, A. R. (2000). Antiulcerogenic effect of a hydroalcoholic extract and its organic fractions of *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. *Phytomedicine*, 7(4), 283–289. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80045-8](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80045-8)

- Gracioso, J. S., Paulot, M. Q., Lima, C. A. H., Alba, D., Souza Brito, R. M., & Souza Brito, A. R. M. (1998). Antinociceptive Effect in Mice of a Hydroalcoholic Extract of *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. and its Organic Fractions. In *J. Pharm, Pharmacol* (Vol. 50). Retrieved from <https://academic.oup.com/jpp/article/50/12/1425/6152817>
- Gupta, M. P., Santana, A. I., y Espinosa, A. (2005). Plantas medicinales de Panama. *Rev Farmacol*, 45, 115–145.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=3DIKcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=bplAcXzukV&sig=p77t75WQM1ajgGDi95i58\\_vQigU&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=3DIKcGAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=bplAcXzukV&sig=p77t75WQM1ajgGDi95i58_vQigU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Hatami, T., Emami, S. A., Miraghaee, S. S., & Mojarrab, M. (2014). Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Different Extracts and Fractions from the Aerial Parts of *Artemisia biennis* Willd. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(2), 551. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2014.1518>
- Henriksen, M., Carregal, S., & Liz, M. (2017). Current Challenges toward In Vitro Cellular Validation of Inorganic Nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, 28(1), 212–221. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00514>
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2010). Basic Principles of Chromatography. In *Food Analysis* (Vol. 27, Issue 1). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_27)
- Kedare SB., & Singh RP. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Kerr, K. M., Mabry, T. J., & Yoser, S. (1981). 6-Hydroxy- and 6-methoxyflavonoids from *Neurolaena lobata* and *N. macrocephala*. *Phytochemistry*, 20(4), 791–794. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85176-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85176-X)



- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536–549. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>
- Koleva, I. I., Niederländer, H. A., & van Been, T. A. (2000). An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Analytical chemistry*, 72(10), 2323–2328. <https://doi.org/10.1021/ac9912451>
- Lajter, I., Vasas, A., Béni, Z., Forgo, P., Binder, M., Bochkov, V., Zupkó, I., Krupitza, G., Frisch, R., Kopp, B., & Hohmann, J. (2014). Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. *Journal of natural products*, 77(3), 576–582. <https://doi.org/10.1021/np400834c>
- Lentz, D. L., Clark, A. M., Hufford, C. D., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C. M., Cordero, J., Ibrahim, O., & Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63(3), 253–263. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00100-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00100-7)
- Lima, W., y Morales, R. (2014). *Caracterización farmacobotánica de Byrsonima crassifolia y Neurolaena lobata*. [Tesis de pregrado, Universidad De San Carlos De Guatemala]. Repositorio Institucional
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Loizzo, M. R., & Tundis, R. (2019). Plant Antioxidant for Application in Food and Nutraceutical Industries. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 453. <https://doi.org/10.3390/antiox8100453>
- López, L. N. (2017). *Identificación y caracterización de los metabolitos secundarios específicos de Piper carpubya, con acción anti fúngica*. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. IASA I. Campus El Prado]. Repositorio institucional

- Mansour, S., & Saidana, D. (2021). Vitamin E: Natural Antioxidant in the Mediterranean Diet. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.99705>
- Martinez, A., Ospina, F., Valencia, G., Jimenez, N., & Mesa, M. (2003). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Alonzo Gomez Gomez, H., Chen, C.-Y. O., Pace, G., & Lima, P. (2017). Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. <https://doi.org/10.5772/66368>
- Montero, M. (1996). Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. Revisión. *Anales de La Facultad de Medicina*, ISSN 1025-5583, ISSN-e 1609-9419, Vol. 57, N°. 4, 1996, Págs. 278-281, 57(4), 278–281. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6292953&info=resumen&idioma=ENG>
- Moussa, Z., Judeh, Z. M. A., & Ahmed, S. A. (2019). Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. *Free Radical Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.87778>
- Nayak, B. S., Ramlogan, S., Chalapathi Rao, A., & Maharaj, S. (2014). *Neurolaena lobata* L. promotes wound healing in Sprague Dawley rats. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 4(2), 106–110. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.136791>
- Néstor, I., Ledesma, R., y Corzo, I. A. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica cromatografía* (1st ed., Vol. 44). Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Niki E. (1993) Antioxidant Defenses In Eukariotic Cells: An Overview. In: Poli G., Albano E., Dianzani M.U. (eds) Free Radicals: from Basic Science to Medicine. Molecular and Cell Biology Updates. *Birkhäuser Basel*. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9116-5\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9116-5_31)

- Ocaña Caisa, M. A. (2016). Extracción, purificación e identificación de metabolitos secundarios de la planta escama de pescado (*Drymaria ovata*). *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 91. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/5039>
- Organización mundial de la salud. (1998). Quality control methods for medicinal plant material. <https://www.who.int/>
- Padmashree, A., Sharma, G. K., Semwal, A. D., Mahesh, C., Padmashree, A., Sharma, G. K., Semwal, A. D., & Mahesh, C. (2014). Antioxygenic Activity of *Solanum nigrum* L. Leaves in Sunflower Oil Model System and Its Thermal Stability. *Food and Nutrition Sciences*, 5(11), 1022–1029. <https://doi.org/10.4236/FNS.2014.511113>
- Panero, J. L., & Funk, V. A. (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(2), 757–782. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2008.02.011>
- Pant, D. R., Pant, N. D., Saru, D. B., Yadav, U. N., & Khanal, D. P. (2017). Phytochemical screening and study of antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from stem wood of *Pterocarpus marsupium* Roxburgh. *Journal of inter-cultural ethnopharmacology*, 6(2), 170–176. <https://doi.org/10.5455/jice.20170403094055>
- Paredes, M. E., Morales, R. E., Lima, W. K., Hu, S., Jurado, A. L. V., Farchi, E., & Prieto, J. M. (2019). Morphoanatomical and phytochemical studies for the quality control of *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass. (Asteraceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 18(3), 277–288. <https://doi.org/10.37360/BLACPMA.19.18.3.18>
- Passreiter, C. M., Sandoval-Ramirez, J., & Wright, C. W. (1999). Sesquiterpene lactones from *Neurolaena* *oaxacana*. *Journal of Natural Products*, 62(8), 1093–1095. <https://doi.org/10.1021/np990038t>

- Perera, R. (2017). Medicinal Plants in Monteverde: Efficacy and Local Use of *Neurolaena lobata* (Gavilana) and *Ageratum conyzoides* (Santa Lucia) against *E. coli* and *S. aureus*. University of California Berkeley, 1, 105–112. Retrieved from <https://digital.lib.usf.edu/SFS0062900/00001>
- Perveen, S. & A. Al-Taweel. (2018). Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids. Terpenes and Terpenoids. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79683>
- Pham-Huy Lien Ai, He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89. Retrieved from </pmc/articles/PMC3614697/>
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>
- Pramai, P., Abdul Hamid, N. A., Mediani, A., Maulidiani, M., Abas, F., & Jiamyangyuen, S. (2018). Metabolite profiling, antioxidant, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of germinated rice: nuclear-magnetic-resonance-based metabolomics study. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.023>
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513–523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
- Pruski, J. F., & Ernest, H. (2018). *Flora Mesoamericana*. 3(July).
- Rani, A., Saini, K., Bast, F., Mehariya, S., Bhatia, S., Lavecchia, R., & Zuurro, A. (2021). Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. *Molecules*, 26(4), 1142. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26041142>
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of the*

*Controlled Release Society*, 113(3), 189–207.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>

Reuland, D. J., McCord, J. M., & Hamilton, K. L. (2013). The role of Nrf2 in the attenuation of cardiovascular disease. *Exercise and sport sciences reviews*, 41(3), 162–168.

<https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182948a1e>

Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., & Chávez, A. Á. (2013). The Exogenous Antioxidants. Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - *A Role for Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/52490>

Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–10.

<https://doi.org/10.3390/IJMS22063009>

Saucedo Hernández, Y., Mohamad Safa, B., González Bedia, M. M., González San Migue, H. M., Bravo Sánchez, L. R., Jorge Rodríguez, E., Quintana, A., Alba de Armas, M. Á., Quiñones Ramos, R., & Hernández Monzón, A. (2009). Estabilidad del polvo de *Parthenium hysterophorus* L. (escoba amarga) basado en el contenido de partenina mediante cromatografía líquida de alta eficacia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(3), 4–13. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962009000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=en)

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 8(1), 1–10.

Selman, C., McLaren, J. S., Meyer, C., Duncan, J. S., Redman, P., Collins, A. R., Duthie, G. G., & Speakman, J. R. (2006). Life-long vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression

- of antioxidant protection genes. *Mechanisms of ageing and development*, 127(12), 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.09.008>
- Shi, H., Noguchi, N., & Niki, E. (1999). Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*, 27(3-4), 334–346. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00053-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00053-2)
- Simpson, M. G. (2010). Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. *Plant Systematics*, 275–448. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374380-0.50008-7>
- Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology : The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, 13(3), 129–142. <https://doi.org/10.1016/J.PATHOPHYS.2006.05.002>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Slinkard, K., & Singleton, V. (1967) Total phenol analysis: automatization and comparison with the manual methods. Vol. 28, No. 1. Adaptado al Departamento de nutrición y Calidad del INIAP- Santa Catalina
- Sotler, R., Poljšak, B., Dahmane, R., Jukić, T., Pavan Jukić, D., Rotim, C., Trebše, P., & Starc, A. (2019). Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta clinica Croatica*, 58(4), 726–736. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.20>
- Suarez Ospina, D., y Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4.

- Sülsen, V. P., & Martino, V. S. (2018). Sesquiterpene lactones. Advances in their chemistry and biological aspects. In *Sesquiterpene Lactones: Advances in their Chemistry and Biological Aspects*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78274-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78274-4_1)
- Tiwari, P., Kaur, M., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98–106.
- Tropicos (n.d.). *Neurolaena lobata* (L.) Cass. Retrieved February 2, 2022 [Tabla], from <http://legacy.tropicos.org/Name/2710787>
- United States Pharmacopeial. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. 30 ed.
- Vasantrao, K. (2012). *Determination of ash value of some plants of marathwada region in Maharashtra. International journal of pharmaceutical research and biosciences*. 1. 337-346.
- Vasas, A., Lajter, I., Kúsz, N., Balázs Király, S., Kovács, T., Kurtán, T., Bózsity, N., Nagy, N., Schelz, Z., Zupkó, I., Krupitza, J., Frisch, R., Mandi, A., & Hohmann, J. (2021). Pharmaceutics Isolation, Structure Determination of Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and Their Antiproliferative, Cell Cycle Arrest-Inducing and Anti-Invasive Properties against Human Cervical Tumor Cells. *Pharmaceutics*, 13. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122088>
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. doi:10.1007/978-3-642-00574-9
- Walshe-Roussel, B., Choueiri, C., Saleem, A., Asim, M., Caal, F., Cal, V., Rojas, O.M., Pesek, T., Durst, T., & Arnason, J. T. (2013). Potent anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass., a Q'eqchi' Maya traditional medicine. *Phytochemistry*, 92, 122–127. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2013.05.004>