



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

La conservación de plantas medicinales constituye una etapa esencial en el procesamiento de las drogas vegetales, ya que sus metabolitos secundarios pueden verse alterados en su estabilidad por factores externos como: luz, oxígeno, temperatura. En relación a los compuestos fenólicos sus propiedades antioxidantes y características organolépticas pueden verse afectadas. El presente estudio se centró en el análisis del período de conservación de las plantas medicinales en bolsas de papel, a través de la cuantificación de ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas, planteando la concentración de estos metabolitos como posibles indicadores debido a que por su estructura química son fácilmente oxidables.

La estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel se realizó mediante la cuantificación espectrofotométrica de los metabolitos en los extractos secos obtenidos, comparando sus concentraciones en función del tiempo. La primera determinación se realizó a tiempo cero (0 meses), la segunda al primer mes, la tercera a los tres meses y la cuarta determinación al sexto mes post secado.

Se utilizó un diseño estadístico basado en un método matemático (regresión lineal) y una escala de medidas (escala logarítmica), así como también el Análisis de varianza (ANOVA) que llevaron a establecer que a través del tiempo existe una disminución en la concentración de todos los compuestos fenólicos y por lo tanto la variación en la concentración puede ser empleada como indicador del estado de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

conservación del material vegetal, a más de confirmar que se encuentran distribuidos de manera diferente en cada una de las especies estudiadas

Palabras clave: Secado Artificial, Ácidos Fenólicos, Flavonoides, Cumarinas, Almacenamiento.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES	16
1.1.1. Generalidades.....	17
1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	17
1.2.1 Elementos y Factores del Clima relacionados con la Producción de Metabolitos Secundarios.....	19
1.2.1.1 Temperatura.....	20
1.2.1.2 Lluvia.....	20
1.2.1.3 Luminosidad.....	21
1.2.1.4 Altitud.....	21
1.2.2 Causas de alteración de los Metabolitos Secundarios.....	21
1.2.2.1 Alteración interna.....	21
1.2.2.2 Alteración externa.....	22
1.2.3 Peligros que implica la Degradación de los Metabolitos Secundarios.....	22
1.3 IMPORTANCIA DEL ALMACENAMIENTO DE DROGAS.....	23
1.4 ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN.....	24
1.5 COMPUESTOS FENÓLICOS.....	25
1.5.1 Ácidos Fenólicos.....	26
1.5.1.1 Estructura.....	26
1.5.1.2 Clasificación.....	27
1.5.1.2.1 Derivados del Ácido Benzoico.....	27
1.5.1.2.2 Derivados del Ácido Cinámico.....	27
1.5.1.3 Acción Farmacológica.....	27
1.5.2 Flavonoides.....	28



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.2.1 Estructura.....	28
1.5.2.2 Propiedades.....	28
1.5.2.3 Acción Farmacológica.....	29
1.5.3 Cumarinas.....	23
1.5.3.1 Estructura.....	29
1.5.3.2 Acción Farmacológica.....	30
1.6 CULTIVO DE PLANTAS MEDICINALES	30
1.7 SEGUIMIENTO FITOQUÍMICO.....	30
1.8 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS	31
1.9 PROCESAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES.....	31
1.9.1 Recolección.....	31
1.9.2 Transporte.....	32
1.9.3 Procesamiento Pos-Cosecha.....	32
1.9.3.1 Selección.....	33
1.9.3.2 Lavado.....	33
1.9.3.3 Secado.....	33
1.9.3.3.1 Deseccación Natural.....	34
1.9.3.3.2 Deseccación Artificial.....	34
1.9.3.4 Almacenamiento.....	34
1.10 PLANTAS CON ÁCIDOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES Y CUMARINAS. 35	
1.10.1 Apio.....	35
1.10.2 Cedrón.....	36
1.10.3 Manzanilla.....	37
1.10.4 Ruda.....	38
1.10.5 Cola De Caballo.....	40
1.10.6 Menta.....	41
1.10.7 Ortiga.....	42
1.10.8 Toronjil.....	43



CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN.....	45
2.2 MATERIALES.....	45
2.2.1 Materia prima.....	45
2.2.2 Reactivos.....	46
2.3 MÉTODOS.....	46
2.3.1 Revisión bibliográfica.....	46
2.3.2 Recolección.....	46
2.3.3 Lavado.....	47
2.3.4 Deseccación.....	47
2.3.5 Obtención de Extractos vegetales.....	48
2.3.6 Concentración del extracto vegetal.....	49
2.3.7 Eliminación del solvente	50
2.3.8 Liofilización.....	51
2.3.9 Análisis cuantitativo.....	51
2.3.9.1 Espectrofotometría.....	51
2.3.9.2 Valoraciones de los Metabolitos.....	52
2.3.9.3 CUANTIFICACIÓN DE CUMARINAS.....	52
2.3.9.3.1 <i>Elaboración de la Curva de Calibración.....</i>	<i>52</i>
2.3.9.3.2 <i>Aplicación del método para el extracto seco.....</i>	<i>53</i>
2.3.9.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	53
2.3.9.4.1 <i>Elaboración de la curva de calibración.....</i>	<i>53</i>
2.3.9.4.2 <i>Aplicación del método para el extracto seco.....</i>	<i>54</i>
2.3.9.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS.....	54
2.3.9.5.1 <i>Principio.....</i>	<i>54</i>
2.3.9.5.2 <i>Elaboración de la curva de calibración.....</i>	<i>55</i>
2.3.9.5.3 <i>Aplicación del Método para el Extracto seco.....</i>	<i>56</i>
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
2.4.1 Regresión Lineal Simple.....	56



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.4.1.1 Metodología.....	57
2.4.2 ANOVA.....	58
2.4.2.1 Metodología.....	58
2.4.2.2 Interpretación de la Prueba	58
2.4.3 Prueba “T”.....	59
2.4.3.1 Interpretación de la prueba T.....	59
2.4.3.2 Metodología.....	59
 CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.....	61
3.2 LIOFILIZACIÓN.....	61
3.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	65
3.3.1 Cuantificación de Cumarinas.....	65
3.3.2 Cuantificación de Flavonoides.....	70
3.3.3 Cuantificación de Ácidos Fenólicos.....	74
3.4 COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES OBTENIDAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE CADA UNA DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO.....	81
3.4.1 Comparación de las concentraciones de cumarinas.....	81
3.4.2 Comparación de las concentraciones de flavonoides.	84
3.4.3 Comparación de las concentraciones de Ácidos Fenólicos.....	84
3.5 ANÁLISIS ANOVA.....	87
3.5.1 Análisis de varianza de un factor para Flavonoides.....	87
3.5.2 Análisis de varianza de un factor para Cumarinas.....	88
3.5.3 Análisis de varianza de un factor para Ácidos Fenólicos.....	89
3.6 Prueba “T”.....	90
4. CONCLUSIONES.....	92
5. RECOMENDACIONES.....	94
6. BIBLIOGRAFÍA.....	98
7. ANEXOS.....	100



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.1 Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.....	17
Figura 1.2 Metabolitos secundarios y sus rutas metabólicas.....	18
Figura 1.3 Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.....	26
Figura 1.4 Ácido Benzoico.....	26
Figura 1.5 Ácido Cinámico.....	26
Figura 1.6 Estructura de los Ácidos derivados del Ácido Benzoico.....	27
Figura 1.7 Estructura de los Ácidos derivados del Ácido Cinámico.....	27
Figura 1.8 Estructura básica de los Flavonoides.....	28
Figura 1.9 Estructura química de la Cumarina.....	29
Figura 2.1A) Selección; B) Lavado; C) Escurrimiento de la droga vegetal.....	47
Figura 2.2 Disposición de plantas medicinales sobre bandeja de la estufa utilizada para el secado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$	48
Figura 2.3 Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.....	49
Figura 2.4. Eliminación del solvente con nitrógeno en baño ultrasónico.....	50
Figura 2.5 Disposición de extractos en tubos para ser cargados en el liofilizador.....	51
Figura 3.1 Curva de calibración para la cuantificación de Cumarinas.....	66
Figura 3.2 Curva de calibración para la cuantificación de Flavonoides.....	70
Figura 3.3 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su primera determinación.....	75
Figura 3.4 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su segunda determinación.....	76
Figura 3.5 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su tercera determinación.....	77
Figura 3.6 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su cuarta determinación.....	78



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.7 Ilustración comparativa de las concentraciones de Cumarinas entre las plantas de estudio.....	82
Figura 3.8 Ilustración comparativa de las concentraciones de Flavonoides entre las plantas de estudio.....	83
Figura 3.9 Ilustración comparativa de las concentraciones de Ácidos Fenólicos entre las plantas de estudio.....	85
Figura 3.10 Materiales y Equipo para la preparación del Reactivo de Folin Ciocalteau.....	98
Figura 3.11 Reactivo de Folin Ciocalteau en reflujo.....	98
Figura 3.12 Patrones para la preparación de la Curva de Calibración de ácidos fenólicos.....	99

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 2.1: Plantas medicinales utilizadas para la cuantificación de metabolitos secundarios.....	45
Tabla 2.2 Estándares para curva de Calibración de Ácidos Fenólicos.....	55
Tabla 3.1 Fracciones del mensturo obtenidas de la percolación.....	61
Tabla 3.2 Peso de los Extractos Secos para cuantificación de Cumarinas, Flavonoides, Ácidos Fenólicos en las cuatro determinaciones.....	62
Tabla 3.3 Rendimiento de los extractos secos en las cuatro determinaciones...	64
Tabla 3.4 Valores de absorbancia y concentración para la elaboración de la curva de calibración.....	66
Tabla 3.5 Tabla de Cuantificación de Cumarinas.....	69
Tabla 3.6 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración.....	70
Tabla 3.7 Tabla de cuantificación de flavonoides.....	73
Tabla 3.8 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su primera determinación.....	74
Tabla 3.9 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su segunda determinación.....	75



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 3.10 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su tercera determinación..... 76

Tabla 3.11 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su cuarta determinación.....77

Tabla 3.12 Tabla de Cuantificación de Ácidos Fenólicos.....80

Tabla 3.13 Tabla de comparación de las concentraciones de cumarinas.....81

Tabla 3.14 Tabla de comparación de las concentraciones de flavonoides.....83

Tabla 3.15 Tabla de comparación de las concentraciones de Ácidos Fenólicos..84

Tabla 3.16. Tabla de concentración de flavonoides a tiempo cero..... 87

Tabla 3.17. Análisis de varianza para la concentración de Flavonoides..... 88

Tabla 3.18. Tabla de concentración de cumarinas a tiempo cero..... 88

Tabla 3.19. Análisis de varianza para la concentración de Cumarinas..... 89

Tabla 3.20. Tabla de concentración de Ácidos Fenólicos a tiempo cero.....89

Tabla 3.21. Análisis de varianza para la concentración de Ácidos Fenólicos.....90

Tabla 3.22 Resultados de la Prueba T para Ácidos Fenólicos.....91



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“ESTIMACIÓN DEL PERIODO DE CONSERVACIÓN DE PLANTAS
MEDICINALES EN FUNDAS DE PAPEL A TRAVÉS DE LA CUANTIFICACIÓN
DE COMPUESTOS FENÓLICOS”



Tesis previa a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico



AUTORAS:

Marithza Lorena Bravo Rodríguez
Gabriela Noemí Jiménez Herráez

DIRECTOR:

Dr. Fabián León Tamariz Ph.D.

Cuenca, Ecuador
2011



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

A mi Señor, Jesús, quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este proyecto. Gracias Señor, por todas las maravillosas cosas que has hecho de mi vida, y por brindarme el regalo más grande, de poner en mi camino a personas que han hecho de mi vida una total Alegría.

A mis padres, Noemí y Florencio por creer en mí y enseñarme desde pequeña a luchar con responsabilidad para alcanzar mis metas. Gracias por sus consejos, comprensión, paciencia, y el apoyo incondicional que han sido para mí el Todo que mueve mi vida. Por todo eso y más ¡Los Amo!

A mis hermanos Fernando y Juan Diego por hacer que sonría en momentos difíciles y su cariño incondicional. Gracias por confiar en mí. ¡Los quiero mucho!

A mi vida William por su amor, apoyo, paciencia y compañía en cada etapa del camino recorrido juntos. Gracias por alegrar mi vida, por apoyarme y confiar en mí cada momento y estar siempre a mi lado. Te Amo mi vida.

A mis amigas Marithza, Adriana por las palabras de aliento para seguir adelante. Gracias Chitosa por hacerme reír y ser una súper Amiga.

Gabriela



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría dedicar esta tesis, por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Al más especial de todos a ti señor por que hiciste realidad este sueño, por todo el amor con el que me rodeas y porque me tienes en tus manos esta tesis es para ti

A mis padres Francisco y Melva

Por haberme educado y soportar mis errores. Gracias a sus consejos, y al amor que siempre me han dado, les agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me han brindado para culminar mi carrera profesional. ¡Gracias por darme la vida! ¡Les quiero mucho!

A mis Hermanos: Verónica y Geovanny

Porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que hemos tenido; por el apoyo y sobre todo por su amistad les adoro ¡Son mi vida!

A mi sobrino: Daniel

Gracias por hacerme reír en los momentos más duros de mi vida te quiero mucho enano

A mis maestros.

Gracias por su tiempo, por su apoyo así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional

A mis amigos.

Que gracias al equipo que formamos logramos llegar hasta el final del camino y que hasta el momento, seguimos siendo amigos: principalmente a mi gran amiga y compañera de tesis Chitosa gracias por todo te quiero mucho.

Marithza



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTO

Al finalizar un trabajo tan arduo como el desarrollo de esta tesis y ver no solo que el objetivo trazado ha sido cumplido, sino también el inicio de una nueva etapa en nuestras vidas es inevitable agradecer de manera infinita a la participación de aquellas personas que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para nosotros un verdadero placer utilizar este espacio para ser justas y consecuentes con ellas, expresándoles nuestros agradecimientos.

Especial reconocimiento al Dr. Fabián León Tamariz Ph.D. director de esta investigación, por aceptar ser nuestro guía en la realización de este proyecto, y por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación, apoyo, paciencia, tiempo y conocimiento brindado a lo largo de esta etapa.

Queremos hacer extensiva nuestra gratitud a todo el equipo humano que forma parte del proyecto VLIR de Plantas Medicinales, de manera especial a la Dra. Isabel Wilches por permitirnos usar las instalaciones y equipos, sin los cuales no habría sido posible la ejecución de este proyecto y al Ing. Vladimiro Tobar por su valiosa ayuda en el análisis estadístico, así también a la Dra. Nancy Cuzco por el ánimo infundido y la confianza en nosotros depositada, y a Dra. Rafaella Ansaloni gracias por su colaboración.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de nuestras familias, maestros y amigos.

A todos ellos, ¡MUCHAS GRACIAS!



UNIVERSIDAD DE CUENCA

INTRODUCCIÓN

Debido a la naturaleza, a menudo compleja y variable, y al número y pequeñas cantidades de principios activos definidos, el control de los materiales de partida, el almacenamiento y la elaboración asumen una importancia particular en la fabricación de medicamentos a base de plantas medicinales, debido a que estos influyen en la conservación del producto y en la efectividad del (los) principio (s) activo(s), y por lo tanto en su calidad, nuestro trabajo se basa en la valoración del almacenamiento de plantas medicinales a través de la cuantificación de compuestos fenólicos”

Con el análisis de la concentración de los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas y flavonoides) en diferentes períodos de tiempo se puede comparar el comportamiento de cada uno de estos con respecto a su estabilidad en las diferentes plantas seleccionadas, y de esta manera saber si el método de almacenamiento utilizado es el óptimo para la conservación de los principios activos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

JUSTIFICACIÓN

Los ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas son metabolitos secundarios que están ampliamente distribuidos en los vegetales superiores.

La escasa información sobre el almacenamiento de plantas medicinales en bolsas de papel es una incógnita sobre las ventajas y desventajas del mismo. El objetivo es obtener un mayor conocimiento sobre el efecto de la técnica de almacenamiento, expresado a través de la concentración de sustancias activas

Como sustento para este estudio nos basamos en la capacidad de oxidación de los compuestos fenólicos, la cual será utilizada para la validación de la técnica de almacenamiento de plantas medicinales empleada en el Proyecto de Plantas Medicinales del programa VLIR-Universidad de Cuenca a través de la cuantificación de estos en el tiempo.

Este será, el primer paso que aportará información que permita adoptar condiciones óptimas de trabajo para la posterior validación de la metodología.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos remotos por el ser humano como tratamiento para sus enfermedades. Sin embargo actualmente las plantas son utilizadas por la ciencia para investigar los principios activos capaces de aliviar o curar enfermedades, así como también sus posibles efectos terapéuticos, estructuras químicas para su posterior síntesis a más de realizar modificaciones estructurales para lograr una mayor actividad terapéutica. (Lock, 2007)

Cabe destacar que si el extracto crudo posee el efecto farmacológico, puede considerarse contradictorio el hecho de tener que aislar el principio activo que contiene, y más aún prescribir médicamente el principio activo; sin embargo, estos se ve justificado si consideramos que:

- La ingestión oral del extracto puede tener, en algunos casos, menos efectos que la aplicación directa del principio activo aislado.
- Debe conocerse la pureza y concentración de la droga al administrarse, lo que no será posible al utilizarse directamente como extracto.
- La concentración del principio activo en las plantas puede ser pequeña.

Por tanto es de gran importancia aislar los principios activos de las plantas, y localizarlos en las diferentes partes de las mismas, o en los diferentes extractos, siendo esto motivo de diversos ensayos, para la posterior aplicación a la humanidad con la finalidad de tratar, prevenir o curar enfermedades. (Lock, 2007)



1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más sencillas, o para degradar las complejas a sustancias sencillas. Las plantas son los seres vivos que presentan dos tipos de metabolismo: el metabolismo primario y el metabolismo secundario como se observa en la (Fig. 1.1). De este último se derivan sustancias denominadas metabolitos secundarios que se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. A los productos del metabolismo secundario se los conocen también como productos naturales. (Carril, 2009)

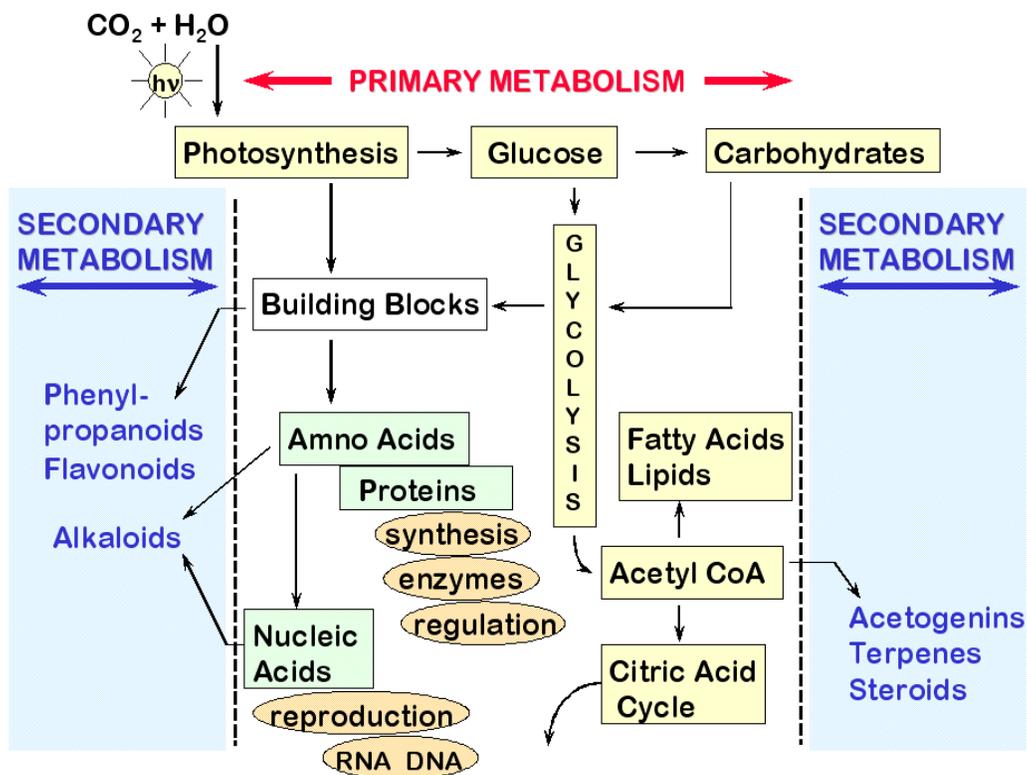


Figura 1.1 Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.(Granada, 2004)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Los metabolitos secundarios se diferencian de los metabolitos primarios en que su distribución está limitada en el reino vegetal, es decir, la producción de metabolitos secundarios se encuentra restringida a un determinado género, familia, o especie. Por lo tanto, debido a su limitada distribución se sintetizan en pequeñas cantidades y no de manera generalizada.

La estructura química entre unos y otros a veces es muy parecida, siendo unos metabolitos primarios y otros secundarios. Así, la diferenciación entre ambos tipos de metabolitos es confusa en ocasiones si consideramos que durante su síntesis muchos de ellos comparten las mismas rutas metabólicas. (Carril, 2009)

En el siguiente esquema (Fig. 1.2), se muestra de manera detallada los metabolitos secundarios y las rutas metabólicas que le dan origen.

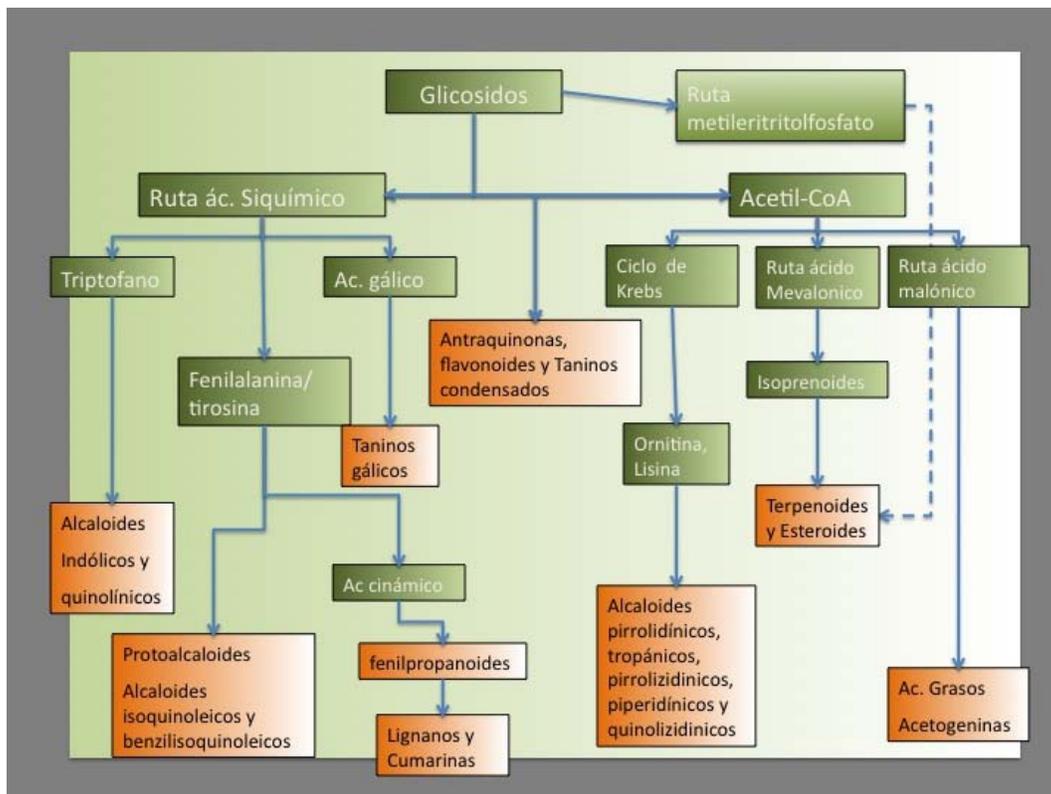


Figura 1.2 Metabolitos secundarios y sus rutas metabólicas. (Dewick, 2002)

En la actualidad, grandes grupos industriales y farmacéuticos trabajan activamente en la detección y caracterización de metabolitos secundarios y que pueden tener



UNIVERSIDAD DE CUENCA

aplicación en muy diversos campos: en medicina y farmacia, en la industria alimentaria, en la industria cosmética, etc. (Encina & Padilla, 2006)

Los Metabolitos Secundarios presentan varios usos medicinales y farmacológicos dentro de los que tenemos:

- Antihemorrágico
- Antiarrítmico
- Protector de la pared vascular
- Antiespasmódico
- Dilatadores Coronarios
- Antihepatotóxicos
- Diuréticos
- Acción antimicrobiana (Encina & Padilla, 2006)

1.2.1 ELEMENTOS Y FACTORES DEL CLIMA RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El clima en una zona depende de varios aspectos físicos como son: humedad, viento, radiación solar, temperatura y lluvia, que se presentan en períodos prolongados.

1.2.1.1 Temperatura

La temperatura es el elemento del clima de mayor importancia para el control y desarrollo del metabolismo de las plantas. Cada especie medicinal se adapta a su propio hábitat; sin embargo las plantas tienen la capacidad de desarrollarse en una amplia variedad de temperaturas.

Algunas plantas de regiones templadas como la manzanilla, ruda, se adaptan a regiones tropicales, desarrollándose de manera satisfactoria durante el verano, sin



UNIVERSIDAD DE CUENCA

embargo en el invierno su crecimiento disminuye y es propensa al ataque de plagas.

Para el cultivo de plantas medicinales hay que tener en cuenta no solo la temperatura máxima sino el intervalo de variación durante el día, la noche y a lo largo del año. Esta variación influye en el crecimiento de las plantas; ya que a mayor crecimiento mayor rendimiento y producción de metabolitos secundarios. (Ocampo Sánchez, 2000)

1.2.1.2 Lluvia

Las lluvias ejercen efectos importantes sobre la vegetación como: su influencia sobre la humedad y sus efectos relacionados con las propiedades de retención de agua por el suelo.

Una lluvia continua puede llevar a una pérdida de sustancias tanto en hojas como en raíces. Esto se relaciona con los bajos rendimientos de algunos principios activos de las plantas en estaciones húmedas. Así también puede darse la disolución del principio activo debido al aumento de agua en la planta. (Trease & Evans, 2001)

1.2.1.3 Luminosidad

Las plantas medicinales varían mucho en cuanto a sus necesidades de luz, tanto en cantidad como intensidad. (Ocampo Sánchez, 2000)

Existe una relación positiva entre la intensidad de la radiación solar y la producción de compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, y antocianinas. Esto se explica, sobre todo en el caso de los flavonoides y fenilpropanoides relacionados con la protección contra la foto-destrucción, ya que estos absorben y disipan la energía solar, evitando así daños en los tejidos internos. (Gobbo-Neto & Lopes, 2007)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En el caso específico de los flavonoides, estos están principalmente acumulados en los tejidos superficiales (epidermis, por ejemplo la cutícula subepidérmica, el pelo y material epicuticular) y son utilizados por la planta como filtros UV, ya que absorben la radiación UV-B, sin alterar la fotosíntesis activa. También actúan como "radical-recolectores de residuos" y antioxidantes. El aumento en la producción de estos metabolitos como "protección solar" está controlado por las enzimas de la vía biosintética de fenilpropanoides. (Ocampo Sánchez, 2000)

La presencia o ausencia de luz, junto con la gama de longitud de onda, ejercen un marcado efecto sobre la producción de metabolitos secundarios de algunas plantas. (Trease & Evans, 2001)

1.2.1.4 Altitud

Otro de los factores del clima que está relacionado con la calidad de las plantas y su composición es la altura con respecto al nivel del mar. La Altitud ejerce efectos sobre el desarrollo y la producción de metabolitos secundarios en plantas, aunque relativamente hay pocos estudios. (Ocampo Sánchez, 2000)

1.2.2 CAUSAS DE ALTERACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Las causas de alteración de los metabolitos secundarios pueden ser internas y externas:

1.2.2.1 Alteración interna: las enzimas presentes en las plantas catalizan reacciones que llevan al deterioro de la misma. La cantidad de agua mayor al 10% en las plantas recolectadas favorece la actividad enzimática. (Kuklinski, 2000)

Las reacciones enzimáticas que mayoritariamente se producen son:

- Hidrólisis de glúcidos, ésteres y heterósidos.
- Condensaciones y polimerizaciones
- Isomerizaciones, racemizaciones y oxidaciones.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Otras causas de alteración interna son las autooxidaciones así como también reacciones entre diferentes componentes de la planta.(Kuklinski, 2000)

Los factores intrínsecos varían de acuerdo a las especies es decir, puede darse la presencia o ausencia de sustancias farmacológicamente activas. (Sharapin, 2000)

La edad de la planta es de gran importancia y se considera un factor intrínseco ya que influye en la cantidad total de principios activos producidos, como también en las proporciones relativas de los componentes de la mezcla activa. (Trease & Evans, 2001)

1.2.2.2 Alteración externa: el calor, las radiaciones, la humedad, temperatura, luz, ataque de parásitos, microorganismos, insectos, etc. El análisis de estos factores tiene que ser considerado para la conservación idónea de los vegetales recolectados. (Kuklinski, 2000)

También, la composición química varía dependiendo con el lugar donde fue realizada la recolección, las condiciones climáticas y del suelo, la época del año, así como las diferentes técnicas de cultivo, es decir factores extrínsecos. (Sharapin, 2000)

1.2.3 PELIGROS QUE IMPLICA LA DEGRADACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Como se mencionó en el punto 1.2.3 los factores de degradación externa son generalmente ambientales (oxígeno, temperatura, luz, agua, etc.), mientras que en el interior de los tejidos los efectos degradativos se deben preferentemente a factores bioquímicos (enzimáticos).

La velocidad de degradación depende de la estabilidad química del metabolito frente a los factores degradativos.(Pulok, 2008)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Así, el proceso degradativo puede continuar originando metabolitos cada vez más simples hasta una mineralización total en forma de agua, anhídrido carbónico o convirtiéndose en residuos ligados (formando parte del propio edificio vegetal), los cuales pierden toda actividad biológica.

Sin embargo los metabolitos secundarios cumplen funciones no esenciales en las plantas, de manera que su ausencia o degradación no es peligroso para la planta, pero puede constituir un riesgo para el individuo que consume el material vegetal, o puede constituir un limitante para la obtención de un producto con características farmacológicas particulares. (Carril, 2009)

1.3 IMPORTANCIA DEL ALMACENAMIENTO DE DROGAS

Las plantas al ser arrancadas de su medio natural, alteran su equilibrio metabólico y proliferan reacciones que degradan la droga vegetal. Por ello, ciertas drogas se deterioran incluso cuando se han almacenado cuidadosamente.

Existen condiciones generales del almacenamiento de las drogas vegetales, y son las siguientes:

- Almacenar en lugar fresco: ya que el calor produce pérdidas de los principios activos, y favorece la alteración de la droga. También un aumento de temperatura aceleran su actividad enzimática favoreciendo el enmohecimiento de las drogas. (Pulok, 2008)(Kuklinski, 2000)
- Almacenar en lugar seco: la humedad excesiva favorece la hidrólisis y degradación de la droga. Las plantas almacenadas en los envases usuales (sacos, cajones de madera, cajas de cartón y bolsas de papel) absorben aproximadamente de 10 a 12% o más humedad. (Pulok, 2008)El uso de sacos de plástico debe evitarse ya que no permiten una ventilación apropiada. (Sharapin, 2000)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Preservar de la luz: principalmente la luz ultravioleta ya que cataliza procesos reactivos en la planta.(Kuklinski, 2000)
- Aislar de la atmósfera: el contacto con el aire facilita la oxidación de principios activos. (Pulok, 2008)

Por ello se deben considerar los factores que influyen en el almacenamiento para la elección de un método adecuado para conservar la especie vegetal por largo tiempo.

1.4 ESTABILIDAD DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN

A sido demostrado que la estabilidad de los compuestos fenólicos se ve afectada por factores externos e internos. Los cambios que pueden ocurrir podrían afectar las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos. Durante los procesos de extracción puede darse una oxidación enzimática o química lo que conlleva a que los compuestos fenólicos puedan ser degradados.

Como ejemplos de estos fenómenos, en primer término podemos mencionar el efecto de la enzima polifenol oxidasa la cual se encuentra en los tejidos de las plantas, la misma que al ponerse en contacto con compuestos fenólicos y en presencia de oxígeno descompone el tejido de la planta, lo que podría catalizar la oxidación de los fenoles a quinonas.(Sikwese, 2005).

Como ejemplo del segundo fenómeno, el grupo fenol de estos compuestos puede transformarse a una quinona al contacto con el aire siendo esta una oxidación no enzimática. A su vez las quinonas formadas sufren una polimerización no enzimática lo que produciría cambios en las propiedades químicas de los compuestos fenólicos. (Sikwese, 2005)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Los compuestos fenólicos por acción de la luz y temperaturas mayores a los 50°C son degradados, dando como resultado una disminución de la actividad antioxidante. (Sikwese, 2005)

1.5 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza. Comprenden alrededor de 4.500 miembros. Son derivados hidroxilados de carburos aromáticos. Dentro del grupo de los fenoles se encuentran los ácidos fenólicos (p.ej. ácido caféico) y los flavonoides, entre otros. La función de los fenoles es proteger a las plantas del daño por oxidación y cumplen la misma función en los humanos, a la vez que son componentes importantes en la dieta humana.

Los compuestos fenólicos son de gran interés debido a su efecto contra ciertos cánceres y enfermedades del corazón derivados de su potente actividad antioxidante.

Para cumplir su acción antioxidante actúan captando radicales libres, neutralizando iones metálicos quelantes y moléculas reactivas de oxígeno. En la mayoría de los casos se encuentran combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o con ellas mismas para formar un polímero debido a su reactividad química. (Vargas, 1992)

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que resultan de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato como se observa en la (Fig. 1.3)

1. De la ruta del ácido shikímico: fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos.



2. De la ruta de los acetatos: antraquinonas, heterósidos antracénicos. (Kuklinski, 2000)

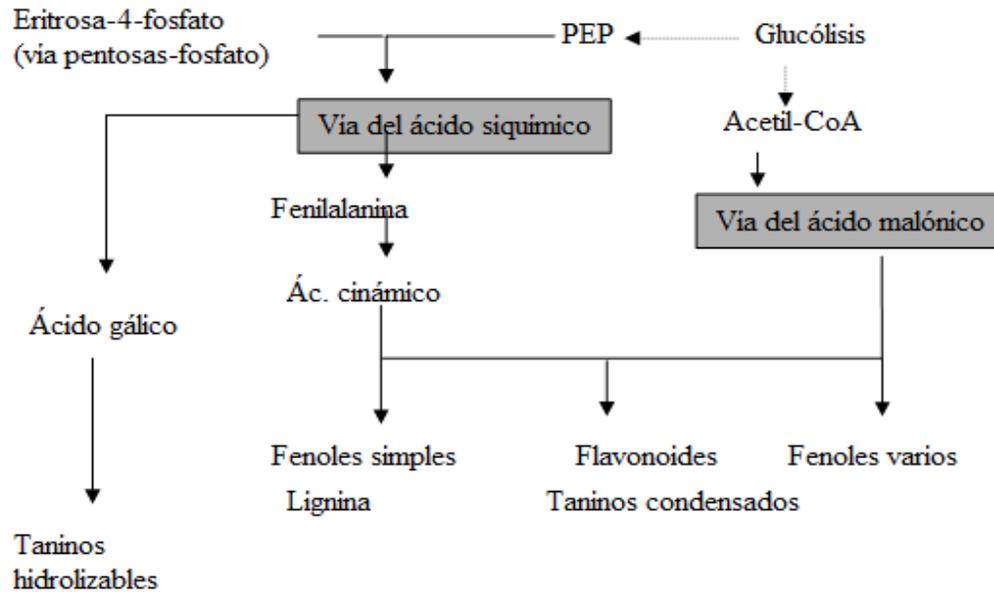


Figura1.3 Rutas de síntesis de compuestos fenólicos.(Kuklinski, 2000)

1.5.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

1.5.1.1 Estructura:

Este grupo de compuestos se caracteriza por poseer en su estructura química el anillo aromático y el grupo hidroxílico y una función carboxílica. Los ácidos fenólicos de interés terapéutico son derivados del ácido benzoico (C6-C1); o del ácido cinámico (C6-C3). (Hahn, 1984)

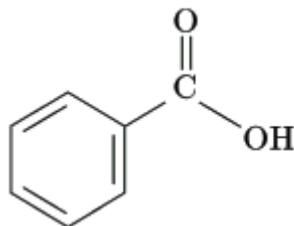


Figura 1.4 Ácido Benzoico

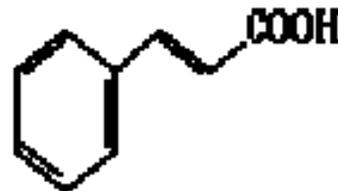


Figura 1.5 Ácido Cinámico

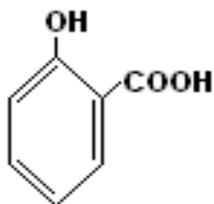


UNIVERSIDAD DE CUENCA

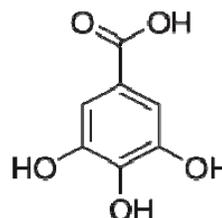
Los primeros derivados del ácido benzoico son muy abundantes en la naturaleza tanto libres, como ácidos o aldehídos (vainillaldehído, anisaldehído), como combinados en formas heterosídicas, correspondiendo a este grupo la unidad básica estructural (ácido gálico). Los segundos también abundantes en la naturaleza pero en este caso se encuentran casi siempre esterificados con azúcares, alcoholes alifáticos, ácido quínico (ácido clorogénico), otros metabolitos secundarios (flavonoides) o bien amidificados. (Hahn, 1984)

1.5.1.2 Clasificación:

1.5.1.2.1 *Derivados del Ácido Benzoico:*



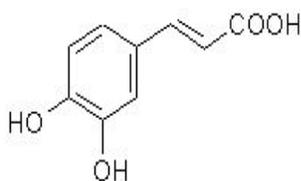
Ácido Salicílico



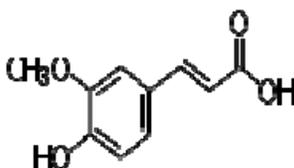
Ácido Gálico

Figura 1.6 Estructura de los Ácidos derivados del Ácido Benzoico.

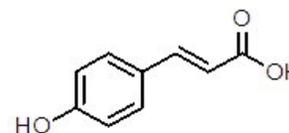
1.5.1.2.2 *Derivados del Ácido Cinámico:*



Ácido Caféico



Ácido ferúlico



Ácido *p*-cumárico

Figura 1.7 Estructura de los Ácidos derivados del Ácido Cinámico.

1.5.1.3 Acción Farmacológica:

- Antimicrobianos (antisépticos y desinfectantes)
- Anti-inflamatorio- analgésico
- Antioxidantes
- Colerética (Fennema, 1985)



1.5.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios, proceden de la ruta del ácido shikímico. Se encuentran ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores y se encuentran en partes aéreas: hojas, flores, y frutos. Las principales familias que contienen Flavonoides son: Rutáceas, Poligonáceas, Compuestas y Umbelíferas. (Kuklinski, 2000)

1.5.2.1 Estructura:

Los flavonoides son estructuras del tipo $C_6-C_3-C_6$, poseen dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. (Kuklinski, 2000)

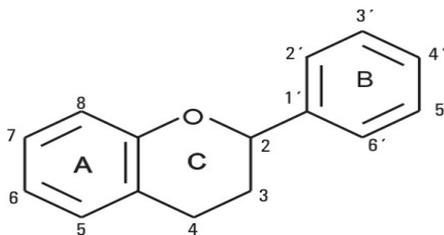


Figura1.8 Estructura básica de los Flavonoides (Pérez Trueba, 2003)

1.5.2.2 Propiedades:

- Solubilidad: depende de la forma en que se encuentren: aglicones libres o heterósidos.
- Son ionizables en medio básico, lo cual permite su identificación porque presentan reacciones coloreadas.
- Ciertos grupos funcionales de los flavonoides forman complejos con metales como el aluminio y hierro.
- Son fácilmente oxidables y por tanto antioxidantes. (Kuklinski, 2000)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.2.3 Acción Farmacológica:

- Antihemorrágico
- Antiarrítmico
- Protector de la pared vascular
- Antiinflamatorio
- Antioxidante
- Antihepatotóxicos
- Diurético
- Antibacteriano, antivírico, antifúngico
- Antiespasmódico (Bocco, Cuvelier, Richard, & Berset, 2004)

1.5.3 CUMARINAS

Las cumarinas son metabolitos secundarios que proceden de la ruta del ácido shikímico. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, principalmente en las familias Umbelíferas, Rubiáceas, Asteráceas y Rutáceas. Se presentan a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos. (Kuklinski, 2000)

1.5.3.1 Estructura:

Estos compuestos poseen como estructura común una benzo-2-pirona o benzo- α -pirona, denominada Cumarina como se observa en la (Fig. 1.9), sobre esta estructura se disponen sustituyentes de diferente naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. (Kuklinski, 2000)(Arango, 2008) (Charles, 1991)

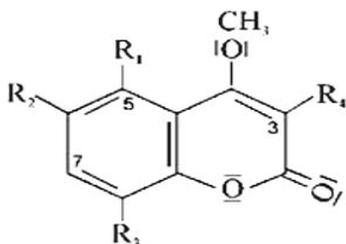


Figura 1.9 Estructura química de la Cumarina (Ariza Sandra Y., 2007)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.3.2 Acción Farmacológica:

- acción anticoagulante
- antibacterial
- acción antibiótica
- acción fotosensibilizadora
- antiinflamatorios
- antiespasmódicos
- sedantes (Kuklinski, 2000)

1.6 CULTIVO DE PLANTAS MEDICINALES

En un cultivo de plantas medicinales la cantidad de principios activos de interés terapéutico (comercial) presentes en la planta es lo fundamental. Los factores genéticos, ontogénicos y ambientales determinan la calidad y la productividad de un cultivo de plantas medicinales como se lo describió anteriormente.

La producción de metabolitos secundarios puede verse alterada por el factor ambiental ya que interviene directamente en la expresión de los genes, los mismos que pueden ser activados o desactivados de acuerdo con las condiciones climáticas, nutricionales, ataques de plagas, etc. (Sharapin, 2000)

1.7 SEGUIMIENTO FITOQUÍMICO

El seguimiento Fitoquímico tiene como base el análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos de la planta. Durante el estudio fitoquímico se realizan evaluaciones periódicas para determinar la curva de evolución del contenido de los principios activos presentes en las plantas. (Sharapin, 2000)



1.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA CONSTANTE DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS

Como se mencionó en el punto 1.2.3 los factores intrínsecos y extrínsecos son de gran importancia ya que debido a ellos se presenta una variabilidad significativa en el contenido de los componentes activos y a su vez se producen grandes diferencias entre los lotes de plantas. Es por ello que para garantizar la homogeneidad de la materia prima y por ende mantener constante la composición de una preparación fitofarmacéutica los fabricantes deben recolectar plantas en espacios diferentes y mezclarlas. (Sharapin, 2000)

De acuerdo a la composición compleja de los extractos, se debe investigar y controlar el comportamiento de sus componentes durante el almacenamiento.

1.9 PROCESAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES

1.9.1 RECOLECCIÓN

Dependiendo de la planta la recolección se puede realizar de forma manual o mecanizada. El momento de la recolección determina tanto la calidad como la cantidad de principio activo de la especie vegetal por lo que es necesario considerar los factores que podrían llegar a alterar la composición de la droga, como son:

- La edad de la especie vegetal, ya que de esta depende la cantidad de principios activos.
- La época del año y el clima influyen en el contenido de principios activos, según sea esta lluviosa o seca.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- El momento del día puede condicionar la obtención de una especie vegetal con un determinado contenido de principio activo. La composición de cierto número de metabolitos vegetales varía según el período del día, ya sea aumentado o disminuyendo su concentración.(Kuklinski, 2000);(Charles, 1991)

Por ejemplo: Las plantas herbáceas y las hojas deben recolectarse cuando se inicia la floración. A veces, cuando hay períodos secos y lluviosos muy definidos, la recolección de hojas se hace durante el período seco, lo que permite que la planta se regenere durante el período de lluvia. (Sharapin, 2000)

1.9.2 TRANSPORTE

El transporte de las plantas se realiza en recipientes aireados, como bolsas de malla, sacos de papel limpios o papel periódico. Debe evitarse el uso de bolsas de polietileno ya que provocan pudrición en pocas horas debido al agua de condensación, además el tiempo entre la recolección y llegada de las plantas al lugar de procesamiento debe ser lo más corto, para evitar cambios en la calidad, apariencia externa y carga microbiana de la droga vegetal.(Kuklinski, 2000); (Martínez, y otros, 2004)

1.9.3 PROCESAMIENTO POS-COSECHA

El objetivo del procesamiento pos-cosecha es la conservación de las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas de la droga vegetal (Vázquez, 2004). Un procesamiento pos-cosecha inadecuado da como resultado una materia prima de baja calidad, pérdida de principios activos, aumento de la carga microbiana. Las pérdidas de principios activos involucran:

- Degradación por procesos metabólicos(Vázquez, 2004)
- Hidrólisis de los compuestos
- Descomposición por la luz
- Descomposición enzimática



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Degradación de las sustancia termolábiles debido al calor
- Volatilización de los aceites esenciales
- Contaminación por hongos y bacterias.(Sharapin, 2000)

Las etapas del procesamiento post-cosecha involucran:

1.9.3.1 Selección: Consiste en la separación manual de las partes deterioradas, manchadas, y con señales de ataques por insectos, hongos o material defectuoso por golpe o maltrato durante la recolección. (Vázquez, 2004);(Kuklinski, 2000); (Sharapin, 2000)

1.9.3.2 Lavado: Es un proceso de limpieza y descontaminación. Este procedimiento origina discusiones, porque con el lavado de la droga se retira tierra y arena adheridas, pero también puede retirar parte de los principios activos, aumentar la humedad del material el cual necesitará más tiempo para ser secado. (Sharapin, 2000)

1.9.3.3 Secado: La etapa más importante del procesamiento post-cosecha es la etapa del secado. La industria utiliza plantas secas, lo cual facilita su conservación por períodos de tiempo más prolongados (1-2 años las hojas y flores y 2-3 años las cortezas y rizomas). El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas, impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación y de hidrólisis.(Sharapin, 2000). Es recomendable reducir la humedad a niveles menores al 10% de forma rápida para evitar la acción enzimática. (Acosta, 2003); (Sung & col, 2004)

La temperatura empleada en cada caso debe estar en función de los componentes y naturaleza física de la droga. Como regla general, las hojas y flores deben secarse entre 20 y 40°C; las cortezas y raíces de 30 a 65°C. (Charles, 1991). La mayoría de las plantas medicinales pueden ser secadas a temperaturas que varían entre 30°C y 60°C. (Sharapin, 2000)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Los métodos utilizados para eliminar el agua de las plantas son:

1.9.3.3.1 *Desección natural:*

Es el procedimiento más lento, económico pero menos efectivo. Este tipo de secado se realiza cuando es necesario estimular la acción enzimática. (Ocampo Sánchez, 2000). Se coloca las plantas sobre plataformas, se las expone al aire libre durante varios días, y se las protege de las condiciones ambientales adversas. (Sung & col, 2004). El tiempo de secado va a depender del clima y de la naturaleza del material a secar. (Acosta, 2003)

1.9.3.3.2 *Desección artificial:*

El secado con calor artificial es el más adecuado ya que permite controlar factores como la temperatura, humedad ambiental, ventilación y tiempo, lo que garantiza una eliminación rápida de la humedad, sin alterar los principios activos. (Kuklinski, 2000)

En este método se emplean temperaturas de 30-40°C, ya que temperaturas mayores producen una evaporación rápida superficial, también puede variar dependiendo del principio activo. (Badilla, 2003)

1.9.3.4 *Almacenamiento:*

Por grandes que hayan sido los cuidados previos al almacenamiento, las plantas pierden principios activos por degradación durante el almacenamiento. El período recomendado para almacenar las hojas y flores es de 12 a 18 meses, para las cortezas y las raíces es de 12 a 36 meses, sin embargo algunas plantas pierden sus principios activos más rápidamente. (Sharapin, 2000). En general, el almacenamiento prolongado (mayor de un año) resulta perjudicial para cualquier droga. (Ocampo Sánchez, 2000)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La conservación de la materia prima vegetal por períodos prolongados de tiempo depende de las condiciones de almacenamiento citados en el punto 1.3.(Sharapin, 2000)

El material vegetal puede ser guardado en fundas de papel, barriles, cajas, debidamente etiquetados en donde consta nombre científico de la planta, parte usada, fecha de recolección, y peso.(Ocampo Sánchez, 2000)

1.10 PLANTAS CON ÁCIDOS FENÓLICOS, FLAVONOIDEOS Y CUMARINAS

1.10.1 APIO



Nombre Científico: *Apium graveolans L.*

Familia: *Apiaceae / Umbelíferas*

Sinónimos: Apio, apio de agua, apio borde. Apio blanco, apio bravo, apio común, apio de huerta, apio de monte.

Hábitat y distribución geográfica: Tiene su origen en los terrenos pantanosos y salados de Europa, África y América.

Descripción botánica: Planta herbácea que alcanza de 30 a 80 cm de alto, su tallo es hueco. Sus hojas son pecioladas por la base y divididas en segmentos triangulares de un color verde brillante. Las flores se encuentran en umbelas pequeñas de color blanco verdoso. Las semillas son pequeños aquenios globulosos, ovados. Toda la planta emana un olor fuerte y aromático.

Parte de la planta utilizada: Hojas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Propiedades etnomédicas: Carminativa, Antiinflamatorio – Antirreumática, anticonvulsionante y expectorante. Al ser un fuerte alcalinizante neutraliza los ácidos del cuerpo. Combate la hipertensión y alivia los espasmos musculares, protege el sistema circulatorio.

Composición química: Las hojas, tallos y frutos contienen limoneno y selileno, compuestos derivados de la ftálica o lactona del ácido o-hidroximetilbenzoico. Contienen un fenol del tipo del guayacol, diacetilo y un derivado de la cumarina, además posee apiina, apiol, inositol y colina. (Berdonces, 1998)

1.10.2 CEDRÓN



Nombre Científico: *Aloysia triphylla*

Familia: Verbenaceae

Sinónimos: Cedrón

Hábitat y distribución geográfica:

Crece desde los 2000 hasta los 4000 metros sobre el nivel del mar.

Descripción botánica: Es un arbusto que alcanza una altura entre 1,5 y 3 metros. Sus tallos son largos, leñosos, redondos, ramificados en la parte superior. Las hojas son simples, rugosas, reunidas en verticilos de tres, de color verde pálido, presenta una nervadura mediana, saliente en la cara inferior, de la cual se destaca una serie de nervaduras secundarias paralelas. Poseen un agradable olor. Las flores son pequeñas, blancas por fuera y azul violáceo por dentro, y se ubican al extremo de los tallos. (Kossman, 1992)

Parte de la planta utilizada: Hojas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Propiedades etnomédicas: Posee propiedades antiespasmódicas, carminativas, mejoran la digestión y estimula el apetito. La planta en maceración con alcohol, se utiliza para tratar el reumatismo y el dolor de cabeza aplicándolo localmente en el área afectada.

Composición química: El aceite esencial del cedrón contiene; cineol, citral (20-39%), l-limoneno (10-15%), sesquiterpenos (40-45%), linalol (4-11%), lipiol, geranial. Las hojas y flores contienen, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos, flavones y alcaloides. (Sung & col, 2004)

1.10.3 MANZANILLA



Nombre Científico:

Matricaria chamomilla

Familia: Asteraceae

Sinónimos: Camomila, manzanilla alemana, manzanilla común.

Hábitat y distribución geográfica: Es una planta originaria del sudeste de Europa, Asia occidental y África, se ha naturalizado en regiones templadas de América y crece en terrenos agrestes entre los 500 y 2500 msnm.

Descripción botánica: Planta herbácea anual ramificada, alcanza desde los 30 hasta los 70cm de alto, de tallo liso brillante. Las hojas son de color verde intenso. Las flores se sitúan en el extremo de las ramas secundarias formando un capítulo floral, el disco floral convexo tiene numerosas flores amarillas de corola tubular. El fruto es un aquenio arqueado. (Berdonces, 1998); (Sung & col, 2004)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Parte de la planta utilizada: Capítulo floral.

Propiedades etnomédicas: Las propiedades atribuidas a la manzanilla son numerosas y se destacan su acción antiinflamatoria, hormonal, antiasmática, sedativa, ansiolítica, antiespasmódica, carminativa, estomacal, febrífuga, tónica, antiséptica. Refuerza el sistema inmunitario y activa el sistema circulatorio.

Composición química: Las flores y hojas poseen aceites esenciales (0,25-1,5%), compuesto por camazuleno y azuleno, además de bisabolol, cadineno, colina, cumarinas (umbeliferona y herniarina), sesquiterpenoides. Glucósidos flavonoides (apigenina, apiina, patuletina, rutina, luteol, quercetol), taninos, mucilago, aminoácidos, fitoesteroles, acidoanthémico, malatos y alcaloides.

1.10.4 RUDA



Nombre Científico: *Ruta graveolens*

Familia: *Rutáceas*

Sinónimos: Arruda, ruda de castilla.
(Sung & col, 2004)

Hábitat y distribución geográfica:
Originaria de Europa, a más de cultivarse crece en terrenos secos, áridos.

Descripción botánica: Arbusto muy ramificado que puede vivir varios años. Alcanza alturas de entre 70 a 100 cm. Las hojas semiperennes, de color verde, son alternas compuestas por varios segmentos, de consistencia algo carnosa.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las flores, forman ramilletes y tienen entre cuatro y cinco pétalos, siendo de un color amarillo vivo. El fruto es una especie de cápsula con cinco lóbulos. La planta entera tiene un aroma característico difícil de confundir con otros.

Parte de la planta utilizada: Hojas.

Propiedades etnomédicas: Estimulante, Antiinflamatorio ocular, antiespasmódica y rubefaciente.

La planta en si es toxica debido a la metilnonil-cetona, que a dosis elevadas puede provocar desordenes gastrointestinales así como depresión, menstruaciones excesivas y abortos.

Composición química: La ruda contiene aceite esencial (0,2-0,7%), compuesto por metilnonil y metilheptil-cetonas (90%), metilnonil-carbinol (aproximadamente 10%), alcoholes, ésteres, fenoles y terpenos. y en menor proporción están los acidos valeriánico, salicílico y caprílico, el éster metílico del acidometilantranílico.

Alcaloides (arborinina, skimianina, graveolina, graveolinina, cocusaginina y alfafagarina), cumarinas (umbelliferona, xanthotoxin), glucósidos flavonoides. (Berdonces, 1998); (Sung & col, 2004); (Arias, 2009)



1.10.5 COLA DE CABALLO



Nombre científico: *Equisetum giganteum*

Familia: Esquisetáceas

Sinónimos: equiseto mayor, hierba del platero, hierba de plata, canutillo, carricillo

Hábitat: Se encuentra en lugares húmedos de Europa, Asia, África y América del norte.

Descripción Botánica: Planta anual con tallos subterráneos, sin flores, los tallos son fértiles y miden de 10 a 20 cm de altura, carece de hojas, mas están presentes, formando vainas cilíndricas desde los nudos de tallos, y comprenden muchas hojuelas lineales. De algunos de los nudos salen ramas, con las mismas características de los tallos principales; en sus extremos aparecen órganos reproductivos con forma de espiga cilíndrica oval, en cuyo eje diminutas hojitas modificadas, hexagonales: los esporófilos, y en su lado interno varios saquitos (esporangios) con esporos.(Berdonces, 1998)

Parte de la planta utilizada: Toda la planta aérea.

Propiedades etnomédicas: Cicatrizante, diurético, antiúrica, hemostática, antiséptica. Astringente. Empleado en los casos de tuberculosis, nefritis y cistitis, hemorragias nasales, pulmonares y estomacales, úlceras, alopecia y hemostático en el caso de menstruaciones fuertes. (Grünwald & Chirstof, 2006)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Composición química: Flavonoides, derivados de ácido silícico, Alcaloides de piridina.(Grünwald & Chirstof, 2006). Ácidos orgánicos: málico, oxálico, ácidos grasos, Ácido aconítico. (Sung & col, 2004)

1.10.6 MENTA



Nombre científico: *Mentha piperita*

Familia: Lamiaceae

Sinónimos: piperita, menta inglesa.

Hábitat: Originaria de Inglaterra, se cultiva en huertos y jardines de las regiones templadas, se encuentra también en terrenos cálidos y húmedos, ricos en humus. (Berdonces, 1998)

Descripción Botánica: Planta que puede alcanzar los 90cm de altura, de tallos cuadrangulares, simples o ramificados en la parte superior. Sus hojas son opuestas, angostas y lanceoladas, algo aserradas y de un olor muy penetrante y característico. Sus flores pecioladas, se encuentran en espigas terminales formando inflorescencias con una gama de color que va del blanco al violeta, pasando por el rosa.

Parte de la planta utilizada: Hojas

Propiedades etnomédicas: Estimulante, tónica, favorece la expectoración y alivia los cólicos de origen nervioso, intestinal, hepático y nefrítico. (Sung & col, 2004)

Las hojas se usan para las náuseas, trastornos menstruales, vómitos producidos por el embarazo y resfriado. (Grünwald & Chirstof, 2006)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Composición química: Aceite esencial (0.8%-2.5%): Mentol ó 5- metil-2-isopropil-ciclohexano, Flavonoides: apigenol, luteol, eriodictiol-7-0 rutósido, Taninos. (Sung & col, 2004)

1.10.7 ORTIGA



Nombre científico: *Urtica urens*

Familia: Urticaceae

Sinónimos: ortiga de león, quisa, yanaquisa, yerba del ciego, tronchona.

Hábitat: Originaria de Europa y Asía y actualmente extendida por todas las zonas templadas. (Berdonces, 1998)

Descripción botánica: Planta arbustiva perenne, puede alcanzar hasta 1,5 m de altura, posee unos pelos urticantes. La raíz, es muy rica en taninos, que le confieren una acción astringente.

Posee un tallo rojizo o amarillento, erguido, cuadrangular, ramificado y ahuecado en los entrenudos. Está dotado en todos los nudos de parejas de hojas.

Las hojas son de figura ovalada, rugosas, aserradas, puntiagudas, y de hasta 15 cm. Son color verde oscuras.

Las flores son verde amarillosas con estambres amarillos, reunidas en panículas pendulares, asilares y terminales. Sus frutos son aquenios (cápsulas) y secos. (Asociación Española, 1999)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Parte de la planta utilizada: Hojas

Propiedades etnomédicas: Depurativo general, antiinflamatorio, hemostático, diurético leve, ayuda en el tratamiento de la gota por excreción del ácido úrico, Analgésicas, Antialérgicas, Antihistamínicas, Antirreumáticas, Astringentes, Colagogas, Galactogenas, Rubefacientes.

Composición química: Contiene aceite esencial rico en cetonas, ésteres y alcoholes libres, además posee carotenoides, flavonoides, taninos, mucílagos, vitamina B2, vitamina K, ácido fólico, ácido pantoténico y ácido ascórbico.

Los pelos urticantes contienen acetilcolina, histamina, colina, ácido acético y ácido fórmico. (Berdonces, 1998); (Sung & col, 2004)

1.10.8 TORONJIL



Nombre científico: *Melissa officinalis L.*

Familia: Labiadas

Sinónimos: melisa, limonera.

Hábitat: Es originario de Europa central. Crece en parajes umbríos y húmedos de setos y bosques, se cultiva en huertos y jardines. (Berdonces, 1998)

Descripción botánica: Se trata de una planta herbácea, perenne, mide de 15 – 40 cm de altura, de tallo erguido cuadrangular y cubierto de vello. Tiene un agradable aroma a limón. Las hojas son de color verde oscuro, de 2-5cm de ancho, ovales y opuestas, con algunos pelillos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Parte de la planta utilizada: Hojas fresca o seca y los extremos de los tallos.

Propiedades etnomédicas: Antiespasmódico y sedativo, estomáquica y carminativa, diaforética, colagoga, estimulante físico e intelectual, antiasmático. (Sung & col, 2004)

Composición química: Flavonoides: Derivados de luteolina y quercetol, Ácidos fenólicos. Derivados triterpénicos, cumarinas, Aceite esencial en muy poca cantidad. (Berdonces, 1998); (Sung & col, 2004)



CAPITULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN

Las actividades prácticas para la elaboración de este estudio se llevaron a cabo en los laboratorios del Proyecto VLIR, Plantas Medicinales, de la Universidad de Cuenca, ubicados en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas, empleando el laboratorio de procesamiento de plantas, para la desecación de las materias vegetales y para su posterior análisis el laboratorio de Fitoquímica.

2.2 MATERIALES

Los recursos materiales que se utilizaron en este trabajo de investigación son:

2.2.1 Materia prima

Las especies vegetales utilizadas para la determinación de estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos se indican en la tabla 2.1.

Cuantificación de Cumarinas, Flavonoides, Ácidos Fenólicos	
Planta	Droga vegetal
Apio	Hojas
Cedrón	Hojas
Manzanilla	Flores
Ruda	Hojas
Cola de caballo	Hojas
Menta	Hojas
Ortiga	Hojas
Toronjil	Hojas

Tabla 2.1 Plantas medicinales utilizadas para la cuantificación de metabolitos secundarios.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.2.2 Reactivos

La quercetina ($\geq 98\%$ de pureza) fue adquirida de Sigma Life Science (U.S.A.), umbelliferone ($\geq 99\%$ de pureza) y ácido caféico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemistry (Steinheim, Alemania)

Metanol absoluto (99,9% puro) de Merck (Darmstadt Alemania)

Ácido clorhídrico fumante (37%), aluminio nitrato nonahidratado ($\geq 98,5\%$ puro), potasio acetato puris, pH Eur, BP, (98,15g/mol), plomo (II) acetato básico o plomo (II) hidroxiacetato anhidro ($\geq 33\%$), Hidróxido de sodio en lentejas, Tungstato de sodio, Molibdato de sodio, Ácido orto-fosfórico al 85%, Sulfato de litio, Bromo, son de Merck (Darmstadt, Alemania) y fueron adquiridos en la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas.

El Agua destilada se obtuvo de un equipo de ósmosis inversa MiliQMilipore, Elix® 3 (UV) (Molsheim, Francia).

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Revisión bibliográfica

La selección de las plantas utilizadas, se realizó en base a una Tesis cuyo estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Proyecto VLIR, de la cual se eligió las especies que poseen mayor contenido de los metabolitos de interés, a su vez que permite la fácil adquisición de las especies existentes en nuestro medio, para lo cual se recurrió a la información descrita por Muñoz y Sarmiento (2010), que se detalla en los apartados 1.10.

2.3.2 Recolección

Se identificó la especie botánica mencionada en la bibliografía y se procedió a la recolección manual obteniendo una muestra representativa que se transportó en



UNIVERSIDAD DE CUENCA

el menor tiempo posible en bolsas de papel rotuladas correctamente, con el nombre común y científico de la planta, fecha y lugar de recolección.

Para la correcta identificación y caracterización botánica el material vegetal fue enviado a la Dra. Rafaela Ansaloni, Directora del Herbario Azuay (HA) de la Universidad del Azuay.

2.3.3 Lavado

Previo al lavado se seleccionó la droga vegetal y se procedió a su limpieza para lo cual se empleó agua potable para eliminar los residuos de tierra o polvo de la superficie, luego se sumergió en agua destilada durante 10 minutos y posteriormente se eliminó el exceso de agua colocando la materia vegetal en bandejas con una malla de acero inoxidable montadas sobre un marco de madera con una alza de aproximadamente 5cm, cubiertas de papel periódico durante 24 horas, depositadas sobre una estructura metálica de aluminio y vidrio como se muestra en la (Fig. 2.1)



2.3.4 Desecación

El material vegetal previamente lavado fue depositado en una bandeja de acero inoxidable provista de una malla del mismo material que fue previamente



UNIVERSIDAD DE CUENCA

sanitizada con alcohol al 70% y cubierta con papel periódico sin impresión, que se llevó a un horno de secado Pro3 (Cuenca) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, como se observa en la (Fig.2.2)

Se removió constantemente la droga vegetal (3 veces al día) en sus respectivos desecadores y una vez obtenido el material vegetal completamente seco (consecución de peso constante en tres pesajes), se procedió a guardar en bolsas de papel correctamente etiquetadas, con su nombre común, nombre científico, fecha, lugar de recolección y peso.



Figura 2.2 Disposición de plantas medicinales sobre bandeja de la estufa utilizada para el secado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

2.3.5 Obtención de Extractos vegetales

Solvente empleado: metanol absoluto (99.9%)

Se pesó 15 g. de droga, se trituró y colocó en un frasco de vidrio sanitizado y seco, se humectó con menstuo (metanol), procurando que no quede líquido residual, se dejó reposar por un período de 4h y se transfirió al percolador previamente cubierto el orificio de salida con algodón hidrofílico. Después se vertió sobre la masa vegetal más disolvente hasta que este cubra completamente la



UNIVERSIDAD DE CUENCA

droga y quede de 3 a 5cm por encima de ella. Se colocó papel filtro cubriendo el frasco percolador. Se procedió al macerado de la muestra por un período de 24h.

Transcurrido el período de tiempo establecido se procedió a la recolección del percolado, regulando la salida del mismo para que su velocidad de salida sea de XX (20) gotas por minuto. Se obtuvo la primera fracción de mensturo que corresponde al 75% del peso inicial de la droga (Fracción A), la cual se colocó en un tubo tapa rosca. Se agregó metanol constantemente hasta agotamiento de la droga vegetal, obteniendo la Fracción B, la cual se colocó directamente al balón de fondo redondo para su posterior concentración.(Martin W. Eric, 1965)

2.3.6 Concentración del extracto vegetal

La fracción B del extracto vegetal se transfirió a un balón de fondo redondo y se adaptó al Rotavapor Laborota 4000 Eficient HB digit (Alemania) que se observa en la (Fig.2.3); se esperó hasta que el solvente se haya eliminado completamente. Se colocó la mitad de la Fracción A para su concentración. Posteriormente se redisolvió el residuo seco adherido en la pared con la mitad restante de la Fracción A y con la menor cantidad de solvente. Se transfirió a un tubo tapa rosca debidamente etiquetado. (Vázquez, 2004)



Figura 2.3 Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.



2.3.7 Eliminación del solvente

El solvente restante se eliminó en un baño ultrasónico Cole-Palmer 8893-21 (Vernon Hills, Illinois), a 40°C, bajo una corriente continua de N₂ como se observa en la (Fig.2.4), hasta obtener una cantidad entre 4 - 5mL del extracto aproximadamente.



Figura 2.4. Eliminación del solvente con nitrógeno en baño ultrasónico

2.3.8 Liofilización

El extracto obtenido se transfirió a un tubo para liofilizar previamente pesado y rotulado, se redisolvió el residuo con aproximadamente 20 mL de agua purificada, se llevaron a congelación (-80°C) en el biofreezer Dairei Freezer, girando los tubos constantemente para permitir la formación de una película uniforme alrededor del tubo por aproximadamente 15-20 minutos.

Se procedió a cargar las muestras en el Liofilizador Labconco 7670520 (Labconco, Kansas, Missouri), como se muestra en la (Fig. 2.5), y se dejó por 22-24h hasta obtener el extracto seco, transcurrido este tiempo se retiraron los tubos. El extracto seco obtenido se pesó y transfirió a un tubo tapa rosca debidamente etiquetado. Los pesos obtenidos se relacionaron con el peso de droga seca (15 g) para el posterior cálculo del rendimiento de los extractos secos.



Figura 2.5 Disposición de extractos en tubos para ser cargados en el liofilizador.

2.3.9 Análisis cuantitativo

2.3.9.1 Espectrofotometría

La espectrofotometría es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones químicas y biológicas. El espectrofotómetro es un instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

Principio de la Espectrofotometría

Cuando la luz atraviesa una sustancia, parte de la energía es absorbida; la energía radiante no puede producir ningún efecto sin ser absorbida. El color de las sustancias se debe a que éstas absorben ciertas longitudes de onda de la luz blanca que incide sobre ellas y solo dejan pasar a nuestros ojos aquellas longitudes de onda no absorbidas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La espectrofotometría ultravioleta-visible usa haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm y en el de la luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro.

Además, no está de menos mencionar el hecho de que la absorción y transmitancia de luz depende tanto de la cantidad de la concentración y de la distancia recorrida. (Pecsok & Shields, 1987)

Las aplicaciones principales son:

- Determinar la cantidad de concentración en una solución de algún compuesto
- Para la determinación de estructuras moleculares.
- La identificación de unidades estructurales específicas ya que estas tienen distintos tipos de absorbancia (grupos funcionales o isomerías). (Pecsok & Shields, 1987)

2.3.9.2 VALORACIONES DE LOS METABOLITOS

Las valoraciones realizadas en este estudio fueron: cuantificación de cumarinas, flavonoides y ácidos fenólicos. Cada una de ellas fue realizada en los tiempos: 0 (0 meses), 1 (1 mes), 2 (3 meses) y 3 (6 meses post secado).

2.3.9.3 CUANTIFICACIÓN DE CUMARINAS

2.3.9.3.1 Elaboración de la Curva de Calibración

Para realizar la curva de calibración se partió de una solución patrón.

Se pesó 0,1g de patrón de Umbelliferona y se disolvió en 5mL de metanol absoluto en un matraz de aforo de 50mL completando el volumen con agua



UNIVERSIDAD DE CUENCA

destilada, se transfirió alícuotas de 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L y 600 μ L de la solución patrón de Umbelliferona en matraces de aforo de 10mL, posteriormente se añadió 2mL de agua destilada y 500 μ L de acetato de plomo al 5% y se completó el volumen con agua destilada, se centrifugó empleando centrífuga Sigma 2-6 (Labor zentrifugen, Alemania) por 10 minutos a 3500rpm y transfirió una alícuota de 1mL de sobrenadante a un tubo llevando a un volumen de 5mL con una solución de HCl 0,1M y se procedió a obtener las lecturas de absorbancia a 320nm, en el espectrofotómetro Genesys 10UV Scanning (Madison, USA) por la técnica de encerado empleando como blanco una solución de HCl 0,1M. (Osório, Seferin, & Luiz, 2004)

2.3.9.3.2 Aplicación del método para el extracto seco

Se preparó una solución de 80mg/mL en metanol absoluto del extracto seco de cada una de las muestras.

Luego se transfirió alícuotas de 200 μ L de la solución anterior a un matraz de aforo de 10mL y se adicionó a cada matraz aproximadamente 2mL de agua destilada, 500 μ L de acetato de plomo al 5% y se completó el volumen con agua destilada, con el centrifugado se procedió de la misma forma que en la curva de calibración hasta obtener las lecturas de las muestras.

Se obtuvieron dos lecturas de cada muestra al preparar una solución de 80mg/mL.

2.3.9.4 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

2.3.9.4.1 Elaboración de la curva de calibración

Para la cuantificación de Flavonoides se partió de una solución patrón.

Para la elaboración de la curva de calibración se pesó 2,7 mg de quercetina en un balón de aforo de 10 mL y se llevó a volumen con etanol al 80%, luego se tomaron alícuotas de 700 μ L, 350 μ L, 175 μ L y 100 μ L de esta solución en balones



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de aforo de 10mL, y se añadió en cada uno 200 μ L de acetato de potasio 1M y 200 μ L de nitrato de aluminio al 10%, se aforó con etanol al 80% y se procedió a su lectura a 415 nm utilizando la técnica de encerado empleando como blanco una solución de todos los reactivos excepto la Quercetina; usando esta curva se calculó la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina. (Lock, 2007)

2.3.9.4.2 Aplicación del método para el extracto seco

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra problema que se disolvió en 1mL de metanol al 80%, se colocó 100 μ L de la solución anterior en un balón de aforo de 10 mL, se adicionó 200 μ L de acetato de potasio 1M, 200 μ L de nitrato de aluminio al 10% y aforó con metanol al 80%, luego se dejó reposar por 40 minutos y procedió a determinar la absorbancia a 415nm.(Lock, 2007)

2.3.9.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS

2.3.9.5.1 Principio

El método inicialmente desarrollado (método de Folin- Denis) ha sido modificado más tarde (método Folin - Ciocalteu) por la adición de sulfato de litio a el reactivo para evitar la formación de precipitados. (Richard W & Laks, 1992).El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (R. Julkunen, 1985)



2.3.9.5.2 Elaboración de la curva de calibración

Método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando el ácido caféico como material de referencia. Para cuantificar fenoles se realizó el siguiente procedimiento. Se elaboró una curva o gráfica de absorbancia contra concentración (0, 5, 10, 25, 50 ppm), utilizando una solución patrón de ácido caféico de 200 ppm (Larrañondo J, 1980)

Para lo cual se pesaron 0.1 g de ácido caféico y se aforó en 100 mL de agua destilada, y se calentó un poco a baño maría para diluir mejor. La concentración de esta solución fue de 1000 ppm. Se tomó 20 mL de la solución de 1000 ppm y se aforó a 100 mL y se obtuvo una solución final de 200 ppm. Posteriormente se prepararon los estándares de acuerdo al siguiente cuadro:

Vol. de la solución Patrón (mL)	Vol. Final* (mL)	Concentración (ppm)
2,5	100 mL	5
5	100 mL	10
12,5	100 mL	25
25	100 mL	50

* Se completó el volumen con agua destilada

Tabla 2.2 Estándares para curva de Calibración de Ácidos Fenólicos

Finalmente a 2 mL de las soluciones obtenidas se agregaron 500 uL del reactivo de Folin Ciocalteu 2N, y 400 uL de una solución de NaOH2N. Se agitó por 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm. (Walter F Galindo, 1989)



2.3.9.5.3 Aplicación del Método para el Extracto seco

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra problema y se disolvió en 1 mL de una mezcla de metanol – agua (1:1). Se llevó la solución hasta un volumen de 50 mL con agua destilada, posteriormente se tomaron 2 mL de la solución anterior y se llevó a un volumen de 100 mL de agua destilada. A 2 mL de la solución finalmente obtenida se agregaron 500 uL del reactivo de Folin 2N, y 400 uL de una solución de NaOH 2N. Se agitó por 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm. Este procedimiento se realizó con cada una de las plantas objeto de estudio.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización de esta tesis se realizó un análisis estadístico basándose en un método matemático (regresión lineal simple) y una escala de medidas (escala logarítmica), con el fin de obtener datos manejables que nos ayuden a interpretar los datos obtenidos, por lo tanto se describirán los fundamentos básicos para llevar a cabo la interpretación de los resultados.

2.4.1 Regresión Lineal Simple

El análisis de regresión lineal es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables. Así, regresión lineal es un proceso experimental en el que intervienen dos variables: una variable dependiente Y, que no es controlada por el experimento, y que depende de otra variable independiente X, que sí es controlada por el experimento, por lo que ésta no es una variable aleatoria. (Vargas S. A., 1995). La herramienta Regresión utiliza la función ESTIMACIÓN LINEAL de la hoja de cálculo.

Para este estudio consideramos como variable independiente al tiempo de almacenamiento y como variable dependiente la concentración de los metabolitos secundarios.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Posteriormente se realizó la Función de Estimación Lineal la cual nos permite calcular la línea recta que mejor se ajuste a los datos, y a su vez esta función devuelve una matriz de valores de los cuales la pendiente, el valor constante y el coeficiente de determinación se consideraron en nuestro estudio. Los valores restantes son datos estadísticos para otros tipos de análisis.

Así: el primer valor de la columna izquierda encontramos la pendiente, el valor de la columna derecha es b (valor constante). Los valores de la segunda fila de la matriz son los errores de la pendiente y constante b , que en este caso no los usaremos.

En la tercera fila encontramos el coeficiente de determinación que es el que nos va a permitir encontrar si existe o no correlación. Por lo que para su interpretación si los valores tienden a ser 1 tendremos una alta correlación, y si tienden a 0 se interpreta como baja correlación o no existe correlación.

2.4.1.1 Metodología

Inicialmente se planteó las hipótesis I para el análisis estadístico realizando dos lecturas de cada uno de los ensayos. Posteriormente se realizó una estimación lineal de los logaritmos de tiempo y concentración con la finalidad de obtener datos que nos permitan conocer la concentración de cada una de los metabolitos de estudio. Finalmente se graficaron las lecturas versus el tiempo de almacenamiento para cada uno de los metabolitos y plantas de investigación. Los valores se analizaron mediante Microsoft Excel 2007.

- **Hipótesis I**
 - La variación en la concentración de compuestos fenólicos puede ser empleada como indicador de la conservación del material vegetal.



2.4.2 ANOVA

2.4.2.1 Metodología

Para el análisis de varianza se tomaron los valores promedio del tiempo cero organizándoles en 3 grupos correspondientes a cada uno de los metabolitos y dentro de cada uno de ellos se consideró a las ocho plantas. Los datos se analizaron mediante Microsoft Excel 2007.

2.4.2.2 Interpretación de la Prueba

La interpretación del diseño consiste en aceptar o rechazar la hipótesis nula, comparando los valores de α (nivel de significancia=0,05) frente a la probabilidad asociada (valor-p) y el estadístico F frente al valor F_c (F crítico), producto de la tabla del análisis de varianza (ANOVA), usando como numerador los grados de libertad del tratamiento, de los factores o sus combinaciones y como denominador los grados de libertad del error.

La hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad asociada es inferior al valor de α (0,05) y cuando la F estimada es superior que la F crítica, de lo contrario la hipótesis nula será aceptada.

Hipótesis II: para al menos una de las plantas la concentración es distinta de las demás.

- **Hipótesis nula:** No hay diferencia en las concentraciones obtenidas en las diferentes plantas.
- **Hipótesis alternativa:** La concentración de compuestos fenólicos depende de cada planta.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.4.3 Prueba “T”

La prueba se usa para comparar dos conjuntos de datos cuantitativos, cuando los datos en cada conjunto de muestras se relacionan. Este diseño se utiliza para poner a prueba una hipótesis alternativa de una hipótesis nula. (Caprette, 2005)

La media de las diferencias entre ambos valores y un intervalo de confianza planteado por el investigador (95%), revela si se debe aceptar o rechazar H_0 (hipótesis nula); si el valor especificado en H_0 ($\mu=0$) está contenido en el intervalo, la hipótesis nula será aceptada; en caso contrario, rechazada.

El valor estadístico t y su probabilidad asociada (valor p), permiten constatar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa.

2.4.3.1 Interpretación de la prueba T

La interpretación de la prueba consiste en aceptar o rechazar la hipótesis nula, comparando los valores de α (nivel de significancia=0,05) frente a la probabilidad asociada y el estadístico t frente al valor t_c (t crítico) encontrado en la tabla de distribución t , para $n-1$ grados de libertad, con un nivel de confianza=95% a una cola. La hipótesis nula se rechaza cuando el valor p es inferior al valor de α (0,05) ó cuando el valor estadístico t es superior al t crítico, de lo contrario la hipótesis nula no se rechaza.

2.4.3.2 Metodología

Se planteó la hipótesis III para la prueba t , en la que se determinó la disminución o no para un mismo metabolito (ácidos fenólicos).

Hipótesis III: para la concentración de Ácidos Fenólicos.

Hipótesis nula: No existe disminución significativa en la concentración de ácidos fenólicos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Hipótesis alternativa: Existe disminución significativa en la concentración de ácidos fenólicos.

Los valores se analizaron mediante Microsoft Excel 2007. Para lo cual se consideraron los datos obtenidos de la Estimación lineal de los Ácidos Fenólicos y se calculó mediante fórmula.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

El proceso de obtención de los extractos vegetales para la determinación de cumarinas, flavonoides y ácidos fenólicos, descrito en el apartado 2.3.5 indica la obtención de dos fracciones de mensturo partiendo de 15 g de droga seca, cuyas cantidades se muestran en la tabla 3.1

Fracción del mensturo	Flavonoides	Cumarinas	Ácidos Fenólicos
Fracción A	11,25mL	11,25mL	11,25mL
Fracción B	180mL	180mL	180mL

Tabla 3.1 Fracciones del mensturo obtenidas de la percolación.

3.2 LIOFILIZACIÓN

Para obtener el valor real del peso del extracto seco se realizó el pesaje de los tubos de liofilizar antes y después del proceso, luego se obtuvo la diferencia que pertenece al extracto seco.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

EXTRACTO SECO													
PLANTA	DROGA	Tiempo 0			Tiempo 1			Tiempo 3			Tiempo 6		
		TUBO VACÍO	TUBO + EXTRACTO	EXTRACTO SECO	TUBO VACÍO	TUBO + EXTRACTO	EXTRACTO SECO	TUBO VACÍO	TUBO + EXTRACTO	EXTRACTO SECO	TUBO VACÍO	TUBO + EXTRACTO	EXTRACTO SECO
Manzanilla	15 g	62,88	65,3647	2,4847	62,5542	65,4678	2,9136	64,957	67,8012	2,8442	64,9557	67,6254	2,6697
Apio	15 g	62,94	64,9797	2,0397	64,1408	66,8475	2,7067	62,5545	65,6229	3,0684	62,689	65,3057	2,6167
Cola de Caballo	15 g	65,09	65,756	0,666	62,927	64,0048	1,0778	62,8822	64,135	1,2528	62,9211	64,0046	1,0835
Menta	15 g	64,55	66,3206	1,7706	62,1908	63,8671	1,6763	62,9232	65,4488	2,5256	62,5521	64,3981	1,846
Ruda	15 g	62,9266	65,6659	2,7393	62,5535	65,01	2,4565	62,5538	65,2538	2,7	62,9224	65,954	3,0316
Cedrón	15 g	64,9549	66,6341	1,6792	64,5491	66,0546	1,5055	63,1265	65,199	2,0725	62,191	64,2322	2,0412
Toronjil	15 g	62,5534	64,0685	1,5151	64,1401	66,0168	1,8767	62,1563	64,4985	2,3422	64,551	66,5791	2,0281
Ortiga	15 g	62,8803	64,4906	1,6103	62,1717	63,8048	1,6331	63,9563	65,653	1,6967	62,1729	64,0922	1,9193

Tabla 3.2 Peso de los Extractos Secos para cuantificación de Cumarinas, Flavonoides, Ácidos Fenólicos en las cuatro determinaciones.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Rendimiento de extractos liofilizados

Para el cálculo del rendimiento de los extractos secos se consideró el peso inicial de la droga vegetal empleado para la percolación (15 g) y el peso del extracto obtenido luego del proceso de liofilización para cada uno, expresando la relación peso: peso, como se muestra en la tabla 3.3. Es decir, se tiene que calcular la relación entre el peso del extracto igualado a la unidad y la cantidad de droga vegetal empleada para obtener dicho extracto.

Ejemplo:

De 15 g de droga vegetal se obtienen 2,48 g de extracto seco

Se calcula: $15g \times 1/2,48 = 6,048$ se redondea la cifra al inferior < que 0,5, a 0,5 si fuera exacto o se sube al superior > 0,5.

Esto quiere decir que la relación es que se necesitan 6 partes de droga vegetal por cada parte de extracto seco 6:1



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS									
PLANTA	DROGA (g)	Tiempo 0		Tiempo 1		Tiempo 3		Tiempo 6	
		EXTRACTO SECO (g)	RENDIMIENTO						
Manzanilla	15	2,4847	6:1	2,9136	5:1	2,8442	5:1	2,6697	6:1
Apio	15	2,0397	7:1	2,7067	6:1	3,0684	5:1	2,6167	6:1
Cola de Caballo	15	0,66	23:1	1,0778	14:1	1,2528	12:1	1,0835	14:1
Menta	15	1,7706	8:1	1,6763	9:1	2,5256	6:1	1,846	8:1
Ruda	15	2,7393	5:1	2,4565	6:1	2,7	6:1	3,0316	5:1
Cedrón	15	1,6792	9:1	1,5055	10:1	2,0725	7:1	2,0412	7:1
Toronjil	15	1,5151	10:1	1,8767	8:1	2,3422	6:1	2,0281	7:1
Ortiga	15	1,6103	9:1	1,6331	9:1	1,6967	9:1	1,9193	8:1

Tabla 3.3 Rendimiento de los extractos secos en las cuatro determinaciones.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

De los resultados expuestos en la tabla anterior se observa que el rendimiento de extracto seco es similar en todos los tiempos en cada una de las plantas a excepción de la cola de caballo en el tiempo 0, lo cual se debe a que para la obtención de este extracto se realizó en 2 frascos de liofilización, por lo que se dio una gran pérdida de extracto seco.

Si bien la materia extraíble total no puede considerarse como un parámetro para determinar la estabilidad de la droga vegetal almacenada debido a las múltiples variables que pueden afectar el proceso de extracción es importante notar la similitud en los rendimientos obtenidos en los diferentes tiempos de extracción. Esto se puede explicar por el método de extracción usado (percolación) que garantiza el agotamiento de la droga y por la estandarización de la metodología empleada. (Gaedcke & Steinhoff, 2003)

3.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO

3.3.1 Cuantificación de Cumarinas

Para obtener la concentración de cumarinas en las drogas vegetales se realizó la curva de calibración según la metodología descrita en el punto 2.3.9.3.1 utilizando como patrón Umbelliferona, partiendo de una solución patrón de la que se preparó las soluciones a concentraciones distintas y de las cuales se obtuvo una doble lectura, obteniendo catorce lecturas en total, de las cuales se calculó la media aritmética y la desviación estándar. En la tabla 3.4 se muestran las concentraciones dependientes de los valores de absorbancia.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CURVA DE CALIBRACIÓN DE CUMARINAS					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ABSORBANCIA 320 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	x ± σ
Umbelliferona		0	0	0	0,000 ± 0
	S1	0,01	0,142	0,142	0,142 ± 0
	S2	0,02	0,238	0,239	0,239 ± 0,00071
	S3	0,04	0,585	0,584	0,585 ± 0,00071
	S4	0,06	0,862	0,862	0,862 ± 0
	S5	0,08	1,073	1,075	1,074 ± 0,00141
	S6	0,1	1,409	1,411	1,410 ± 0,00141
	S7	0,12	1,656	1,657	1,657 ± 0,00071

Tabla 3.4 Valores de absorbancia y concentración para la elaboración de la curva de calibración.

De los datos obtenidos se graficó la curva de calibración Fig.3.1 obteniendo la ecuación de la recta cuyo factor $R^2=0,998$ revela mayor exactitud en la elaboración de la curva, permitiendo utilizar este factor de corrección y la ecuación para el cálculo de las concentraciones de las muestras.

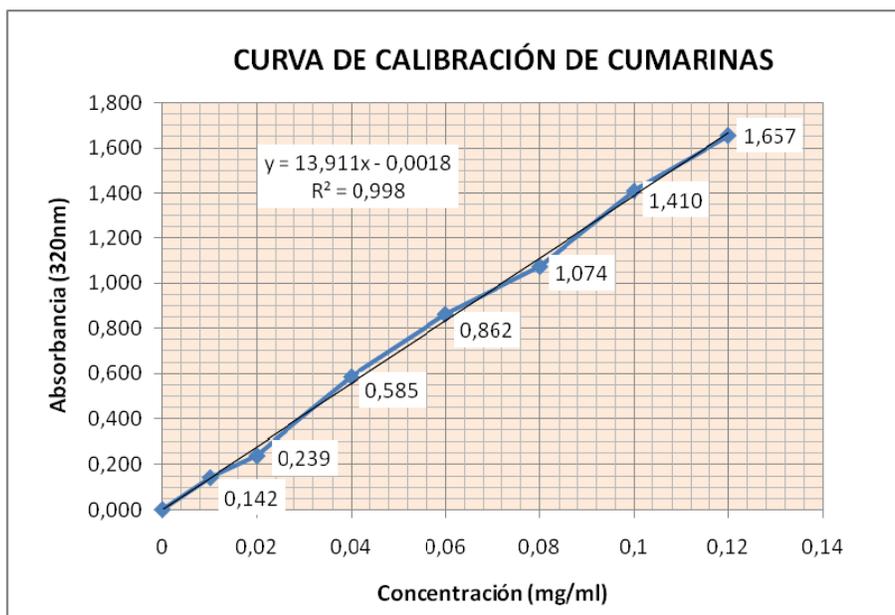


Figura 3.1 Curva de calibración para la cuantificación de Cumarinas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Para conocer la concentración de cumarinas en cada muestra se reemplazó el valor de “y” de la ecuación de la recta por cada lectura de absorbancia, los resultados se muestran en la tabla 3.5.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

PLANTAS	TIEMPO (meses)	Concentración expresada como Umbelliferona mg/ml					
		PATRÓN A			PATRÓN B		
		1	2	x	1	2	x
Apio	0	0,03882099	0,03882099	0,03882099	0,03932423	0,03932423	0,03932423
	1	0,02235802	0,02235802	0,02235802	0,02437096	0,02429907	0,02433501
	3	0,0170381	0,0170381	0,0170381	0,01732566	0,01732566	0,01732566
	6	0,01682243	0,01682243	0,01682243	0,01660676	0,01660676	0,01660676
Manzanilla	0	0,04313444	0,04313444	0,04313444	0,04428469	0,0442128	0,04424874
	1	0,03767074	0,03759885	0,0376348	0,04025881	0,04018692	0,04022286
	3	0,03501078	0,03493889	0,03497484	0,03673616	0,03673616	0,03673616
	6	0,03242272	0,03242272	0,03242272	0,03421999	0,03414809	0,03418404
Cola de Caballo	0	0,00869878	0,00877067	0,00873472	0,00977714	0,00977714	0,00977714
	1	0,00826743	0,00826743	0,00826743	0,00805176	0,00797987	0,00801582
	3	0,00661395	0,00661395	0,00661395	0,00726096	0,00726096	0,00726096
	6	0,00654206	0,00654206	0,00654206	0,0061826	0,0061826	0,0061826
Menta	0	0,00984903	0,00963336	0,00974119	0,01020848	0,01020848	0,01020848
	1	0,00783609	0,00783609	0,00783609	0,008555	0,008555	0,008555
	3	0,00603882	0,00611071	0,00607477	0,00654206	0,00661395	0,006578
	6	0,00661395	0,00661395	0,00661395	0,00625449	0,0061826	0,00621855
Ruda	0	0,11099928	0,11099928	0,11099928	0,1092739	0,1092739	0,1092739
	1	0,10740474	0,10726096	0,10733285	0,10136592	0,10136592	0,10136592
	3	0,09942487	0,09928109	0,09935298	0,09777139	0,0976995	0,09773544
	6	0,09784328	0,09798706	0,09791517	0,09748382	0,09748382	0,09748382
Toronjil	0	0,01301222	0,01301222	0,01301222	0,01445004	0,01452193	0,01448598
	1	0,01207764	0,01222142	0,01214953	0,0124371	0,0124371	0,0124371
	3	0,01035226	0,01028037	0,01031632	0,01078361	0,01063983	0,01071172
	6	0,01013659	0,01013659	0,01013659	0,00977714	0,00984903	0,00981308
Cedrón	0	0,0612509	0,06117901	0,06121495	0,06218548	0,06225737	0,06222142
	1	0,04917326	0,04938893	0,04928109	0,04953271	0,04946082	0,04949676
	3	0,0442128	0,0442128	0,0442128	0,04378145	0,04392523	0,04385334



UNIVERSIDAD DE CUENCA

	6	0,04392523	0,04392523	0,04392523	0,04176851	0,04176851	0,04176851
Ortiga	0	0,00711718	0,00718907	0,00715313	0,00740474	0,00747664	0,00744069
	1	0,00877067	0,00877067	0,00877067	0,00963336	0,00956147	0,00959741
	3	0,01207764	0,01207764	0,01207764	0,01150252	0,01150252	0,01150252
	6	0,01214953	0,01214953	0,01214953	0,01229331	0,01229331	0,01229331

Tabla 3.5 Tabla de Cuantificación de Cumarinas (Ver Anexo 2)



3.3.2 Cuantificación de Flavonoides

Para obtener la concentración de flavonoides en las drogas vegetales se empleó la ecuación de la recta cuyo factor $R^2=0,998$ revela mayor precisión, la cual se obtuvo mediante regresión lineal de la curva de calibración (Fig.3.2), elaborada a partir de los datos que se disponen en la tabla 3.6 obteniendo dos lecturas de cada una de las muestras a partir de una solución patrón, de las cuales se calculó la media aritmética y la desviación estándar.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLAVONOIDES					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA 650 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	$x \pm \sigma$
Quercetina		0	0	0	0,000 \pm 0
	S1	0,0027	0,117	0,117	0,117 \pm 0
	S2	0,0047	0,27	0,27	0,270 \pm 0
	S3	0,0095	0,529	0,53	0,530 \pm 0,00071
	S4	0,0189	1,108	1,109	1,109 \pm 0,00071

Tabla 3.6 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración.

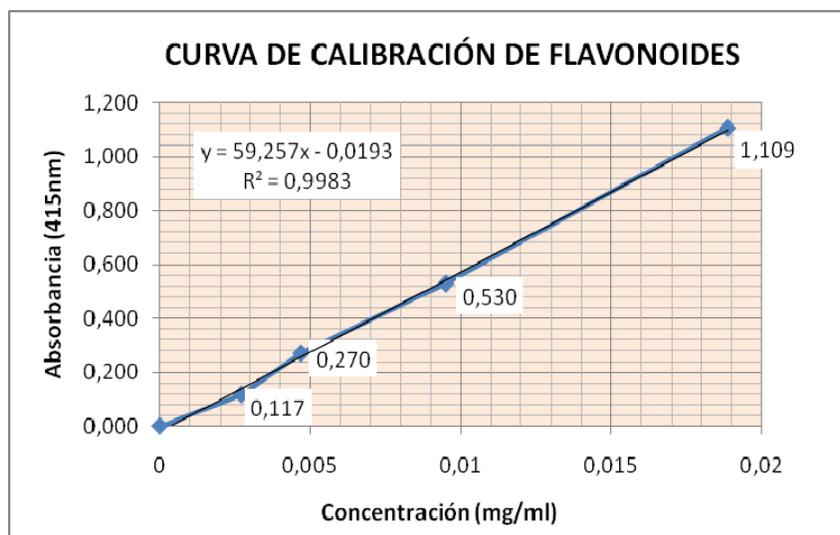


Figura 3.2 Curva de calibración para la cuantificación de Flavonoides



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Para conocer la concentración de Flavonoides en cada muestra se procedió de forma similar que para la cuantificación de cumarinas, los resultados se muestran en la tabla 3.7.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

PLANTAS	TIEMPO (meses)	Concentración expresada como Quercetina mg/ml					
		PATRÓN A			PATRÓN B		
		1	2	x	1	2	x
Apio	0	0,0035443	0,00352743	0,00353586	0,00357806	0,0035443	0,00356118
	1	0,00347679	0,00347679	0,00347679	0,00320675	0,003173	0,00318987
	3	0,00305485	0,00303797	0,00304641	0,00281857	0,00281857	0,00281857
	6	0,00275105	0,00273418	0,00274262	0,00266667	0,00266667	0,00266667
Manzanilla	0	0,00081013	0,000827	0,00081857	0,00087764	0,00087764	0,00087764
	1	0,00064135	0,00062447	0,00063291	0,00069198	0,00067511	0,00068354
	3	0,00057384	0,00057384	0,00057384	0,00060759	0,00059072	0,00059916
	6	0,00054008	0,00052321	0,00053165	0,00057384	0,00057384	0,00057384
Cola de Caballo	0	0,00140084	0,00141772	0,00140928	0,00150211	0,00150211	0,00150211
	1	0,00092827	0,00092827	0,00092827	0,00096203	0,00094515	0,00095359
	3	0,00086076	0,00084388	0,00085232	0,00081013	0,000827	0,00081857
	6	0,000827	0,000827	0,000827	0,00074262	0,00075949	0,00075105
Menta	0	0,00540084	0,00540084	0,00540084	0,00550211	0,00548523	0,00549367
	1	0,00194093	0,00195781	0,00194937	0,00205907	0,00205907	0,00205907
	3	0,00131646	0,00131646	0,00131646	0,00129958	0,00129958	0,00129958
	6	0,0012827	0,0012827	0,0012827	0,00121519	0,00123207	0,00122363
Ruda	0	0,00234599	0,00236287	0,00235443	0,00253165	0,00253165	0,00253165
	1	0,003173	0,00318987	0,00318143	0,00325738	0,00327426	0,00326582
	3	0,0035443	0,0035443	0,0035443	0,00374684	0,00372996	0,0037384
	6	0,0036962	0,0036962	0,0036962	0,00378059	0,00378059	0,00378059
Toronjil	0	0,00239662	0,00239662	0,00239662	0,00231224	0,00231224	0,00231224
	1	0,00214346	0,00212658	0,00213502	0,00214346	0,00214346	0,00214346
	3	0,00207595	0,00207595	0,00207595	0,00199156	0,00199156	0,00199156
	6	0,00195781	0,00195781	0,00195781	0,00183966	0,00185654	0,0018481
Cedrón	0	0,00236287	0,00236287	0,00236287	0,00248101	0,00248101	0,00248101
	1	0,00199156	0,00197468	0,00198312	0,00222785	0,00222785	0,00222785
	3	0,00194093	0,00194093	0,00194093	0,00202532	0,00200844	0,00201688



UNIVERSIDAD DE CUENCA

	6	0,00183966	0,00183966	0,00183966	0,00192405	0,00192405	0,00192405
Ortiga	0	0,00108017	0,00111392	0,00109705	0,00131646	0,00131646	0,00131646
	1	0,00153586	0,00155274	0,0015443	0,00167089	0,00168776	0,00167932
	3	0,00178903	0,00177215	0,00178059	0,00183966	0,00182278	0,00183122
	6	0,00183966	0,00183966	0,00183966	0,00175527	0,00175527	0,00175527

Tabla 3.7 Tabla de cuantificación de flavonoides. (Ver Anexo 3)



3.3.3 Cuantificación de Ácidos Fenólicos

Para conocer la concentración de ácidos fenólicos en cada una de las plantas objeto de estudio se procedió según el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu detallado en el punto 2.3.9.5 en el cual se utilizó una solución patrón de ácido Caféico, a partir de la cual se elaboró los estándares de los que se obtuvo un total de cuatro lecturas que se disponen en la tabla 3.8

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA 650 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	$x \pm \sigma$
Ácido Caféico		0	0	0	0,000 \pm 0
	S1	5	0,087	0,088	0,088 \pm 0,00071
	S2	10	0,165	0,166	0,166 \pm 0,00071
	S3	25	0,415	0,415	0,415 \pm 0
	S4	50	0,882	0,883	0,883 \pm 0,00071

Tabla 3.8 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su primera determinación.

De los datos obtenidos se graficó la curva de calibración (Fig.3.3) obteniendo un factor $R^2=0,998$ el cual muestra mayor exactitud para el cálculo de las concentraciones de las muestras objeto de estudio.

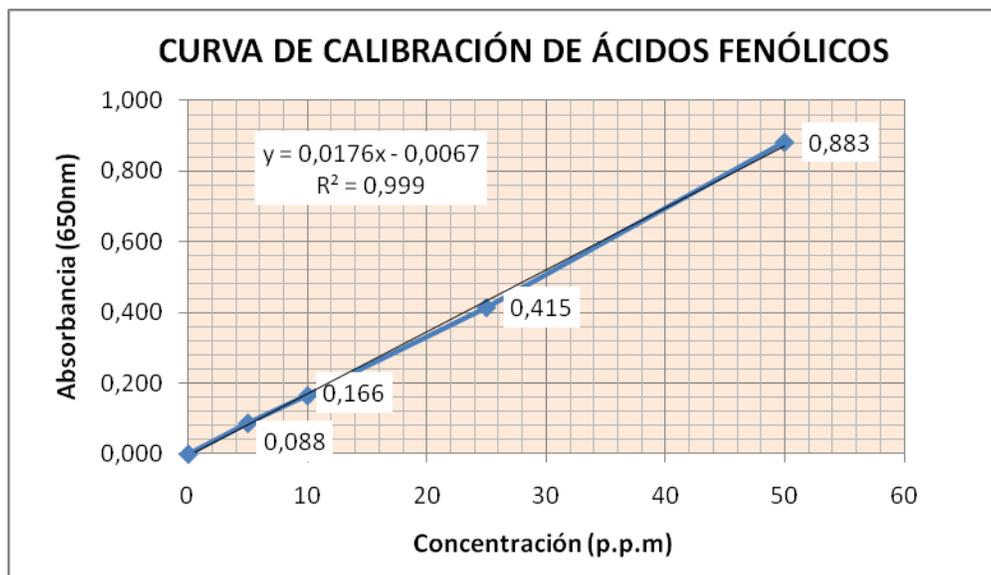


Figura 3.3 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su primera determinación.

Debido a la inestabilidad que presentó el reactivo de Folin Ciocalteau, éste se preparó previo a cada determinación. De igual forma se realizó las respectivas curvas de calibración.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA 650 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	$x \pm \sigma$
Ácido Caféico		0	0	0	0,000 \pm 0
	S1	5	0,126	0,126	0,126 \pm 0
	S2	10	0,199	0,199	0,199 \pm 0
	S3	25	0,484	0,484	0,484 \pm 0
	S4	50	1,018	1,018	1,018 \pm 0

Tabla 3.9 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su segunda determinación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

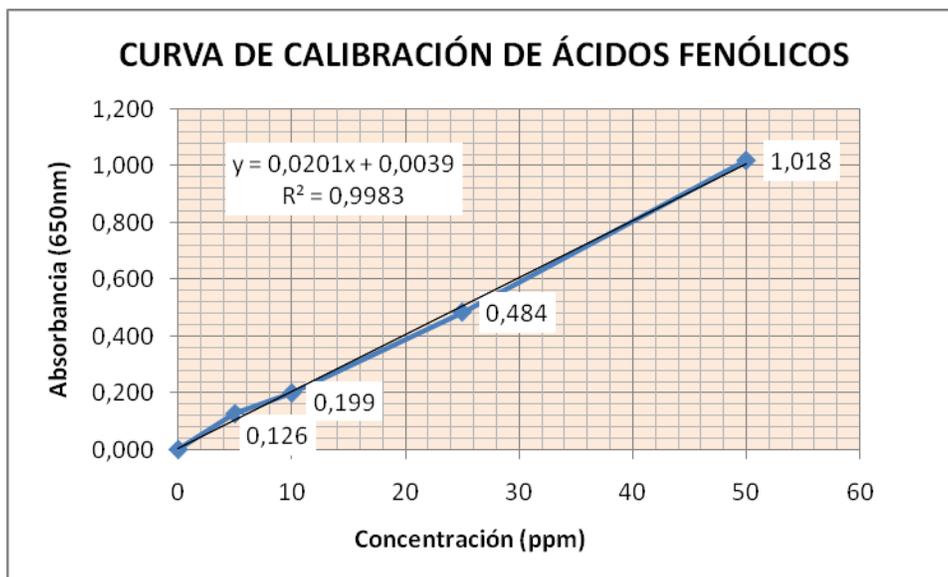


Figura 3.4 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su segunda determinación.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA 650 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	$x \pm \sigma$
Ácido Caféico		0	0	0	0,000 ± 0
	S1	5	0,072	0,073	0,073 ± 0,00071
	S2	10	0,176	0,179	0,178 ± 0,00212
	S3	25	0,543	0,544	0,544 ± 0,00071
	S4	50	1,174	1,179	1,177 ± 0,00354

Tabla 3.10 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su tercera determinación.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

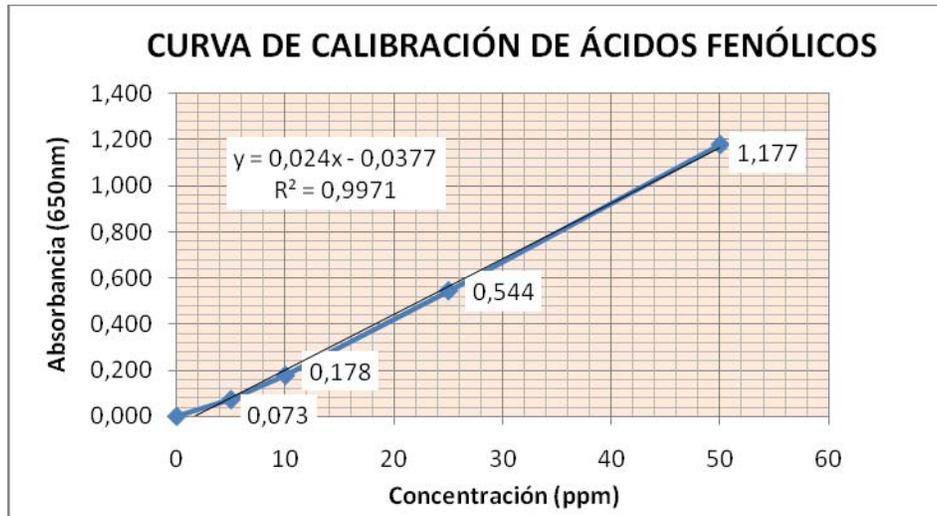


Figura 3.5 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su tercera determinación.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS					
SOLUCIÓN		CONCENTRACIÓN (ppm)	ABSORBANCIA 650 nm		
			Lectura 1	Lectura 2	$x \pm \sigma$
Ácido Caféico		0	0	0	$0,000 \pm 0$
	S1	5	0,083	0,083	$0,083 \pm 0$
	S2	10	0,161	0,162	$0,162 \pm 0,00071$
	S3	25	0,398	0,399	$0,399 \pm 0,00071$
	S4	50	0,868	0,876	$0,872 \pm 0,00566$

Tabla 3.11 Valores de absorbancia y concentración utilizados para la curva de calibración de Ácidos Fenólicos en su cuarta determinación

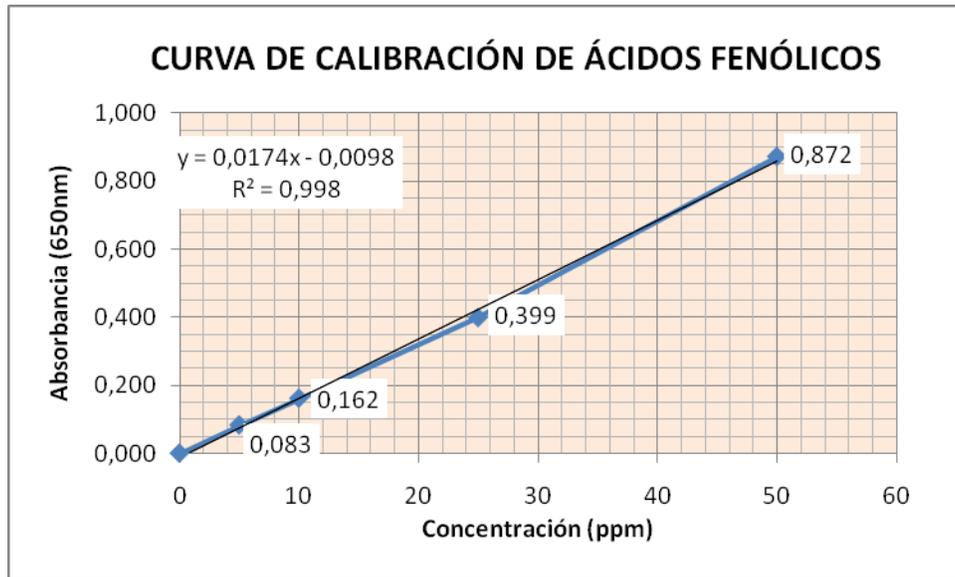


Figura 3.6 Curva de calibración para la cuantificación de Ácidos Fenólicos en su cuarta determinación.

Para conocer la concentración de Ácidos Fenólicos en cada muestra se procedió de forma similar que los metabolitos anteriores (flavonoides y cumarinas), con la diferencia de que se realizó la corrección del rango debido a que los resultados estaban fuera del mismo. Es decir, se consideró los límites superiores e inferiores en los que se encontraban nuestras lecturas, realizando el análisis respectivo como se observa en la tabla 3.12.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

PLANTAS	TIEMPO (meses)	Concentración expresada como Ac. Caféico mg/ml					
		PATRÓN A			PATRÓN B		
		1	2	x	1	2	x
Apio	0	2,11428571	2,11428571	2,11428571	2	2	2
	1	0,55555556	0,51587302	0,53571429	0,47619048	0,47619048	0,47619048
	3	0,13793103	0,06896552	0,10344828	0,06896552	0,06896552	0,06896552
	6	0,06024096	0,06024096	0,06024096	0,06024096	0,06024096	0,06024096
Manzanilla	0	0,68571429	0,68571429	0,68571429	0,74285714	0,74285714	0,74285714
	1	0,27777778	0,27777778	0,27777778	0,31746032	0,31746032	0,31746032
	3	0,34482759	0,34482759	0,34482759	0,27586207	0,27586207	0,27586207
	6	0,12048193	0,12048193	0,12048193	0,12048193	0,12048193	0,12048193
Cola de Caballo	0	0,57142857	0,57142857	0,57142857	0,62857143	0,57142857	0,6
	1	0,1984127	0,15873016	0,17857143	0,11904762	0,15873016	0,13888889
	3	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0
Menta	0	0,74285714	0,74285714	0,74285714	0,8	0,8	0,8
	1	0,47619048	0,47619048	0,47619048	0,47619048	0,47619048	0,47619048
	3	0,75862069	0,68965517	0,72413793	0,68965517	0,68965517	0,68965517
	6	0,42168675	0,42168675	0,42168675	0,54216867	0,48192771	0,51204819
Ruda	0	0,85714286	0,85714286	0,85714286	1,02857143	0,97142857	1
	1	0,51587302	0,51587302	0,51587302	0,47619048	0,47619048	0,47619048
	3	0,34482759	0,34482759	0,34482759	0,27586207	0,27586207	0,27586207
	6	0,18072289	0,18072289	0,18072289	0,12048193	0,12048193	0,12048193
Toronjil	0	1,42857143	1,37142857	1,4	1,54285714	1,42857143	1,48571429
	1	0,83333333	0,79365079	0,81349206	0,87301587	0,87301587	0,87301587
	3	1,37931034	1,24137931	1,31034483	1,37931034	1,44827586	1,4137931
	6	1,08433735	1,08433735	1,08433735	0,96385542	1,02409639	0,9939759
Cedrón	0	1,42857143	1,37142857	1,4	1,54285714	1,54285714	1,54285714
	1	0,67460317	0,67460317	0,67460317	0,83333333	0,83333333	0,83333333
	3	1,10344828	1,10344828	1,10344828	0,96551724	0,96551724	0,96551724



UNIVERSIDAD DE CUENCA

	6	0,84337349	0,84337349	0,84337349	0,78313253	0,72289157	0,75301205
Ortiga	0	0,85714286	0,85714286	0,85714286	0,85714286	0,97142857	0,91428571
	1	0,51587302	0,45	0,48293651	0,43650794	0,47619048	0,45634921
	3	0,75862069	1,95833333	1,35847701	0,55172414	0,62068966	0,5862069
	6	0,36144578	0,88235294	0,62189936	0,24096386	0,24096386	0,24096386

Tabla 3.12 Tabla de Cuantificación de Ácidos Fenólicos. (Ver Anexo 4)



3.4 COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES OBTENIDAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE CADA UNA DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO.

Para realizar una comparación de las concentraciones de los metabolitos obtenidos se consideraron las concentraciones de flavonoides, cumarinas y ácidos fenólicos que se representan en las tablas 3.13, 3.14, 3.15.

3.4.1 Comparación de las concentraciones de cumarinas.

TIEMPO	Apio	Manzanilla	Cola de caballo	Menta	Ruda	Toronjil	Cedrón	ortiga
0	0,03908728	0,04366592	0,009267012	0,00999284	0,11020351	0,01377249	0,06171538	0,00726832
0,05	0,03510311	0,04325563	0,009173249	0,00974996	0,10949781	0,01363673	0,05897162	0,00746852
0,1	0,03274718	0,04288161	0,009085175	0,00954435	0,10889015	0,01351053	0,05726379	0,00764712
0,2	0,02986068	0,04222098	0,008923759	0,00921039	0,10788222	0,01328225	0,05507167	0,00795648
0,4	0,02673519	0,0411519	0,008647726	0,00872877	0,10638	0,01289968	0,05255533	0,00844949
0,6	0,02490986	0,04030765	0,008418072	0,00838556	0,10527163	0,01258761	0,05100646	0,00883926
0,8	0,02364524	0,0396125	0,008222211	0,00812122	0,10439492	0,01232509	0,0498946	0,00916419
1	0,02268922	0,03902319	0,008051988	0,00790753	0,10367065	0,01209918	0,04903107	0,00944426
1,3	0,02159784	0,03828124	0,007832993	0,00764974	0,10277742	0,01181108	0,04801921	0,00980485
1,6	0,02076145	0,03766212	0,007646903	0,00744276	0,10204397	0,0115681	0,04722361	0,01011405
2	0,01989104	0,03697133	0,007436384	0,00721921	0,1012347	0,01129481	0,04637577	0,01046961
2,5	0,01905091	0,03626005	0,007217197	0,00699606	0,10040818	0,01101159	0,04553687	0,01084908
3	0,01838724	0,03566773	0,007033333	0,00681497	0,09972299	0,01077475	0,04485895	0,01117677
3,5	0,0178421	0,03516143	0,006875553	0,00666322	0,0991384	0,01057186	0,04429147	0,01146617
4	0,01738167	0,03472014	0,006737764	0,00653304	0,09862899	0,01039481	0,04380433	0,01172598
5	0,01663644	0,03397975	0,006506469	0,0063186	0,09777328	0,01009767	0,04299983	0,0121791
6	0,01604969	0,03337445	0,006317656	0,00614666	0,09707152	0,00985494	0,04235165	0,012567

Tabla 3.13 Tabla de comparación de las concentraciones de cumarinas.

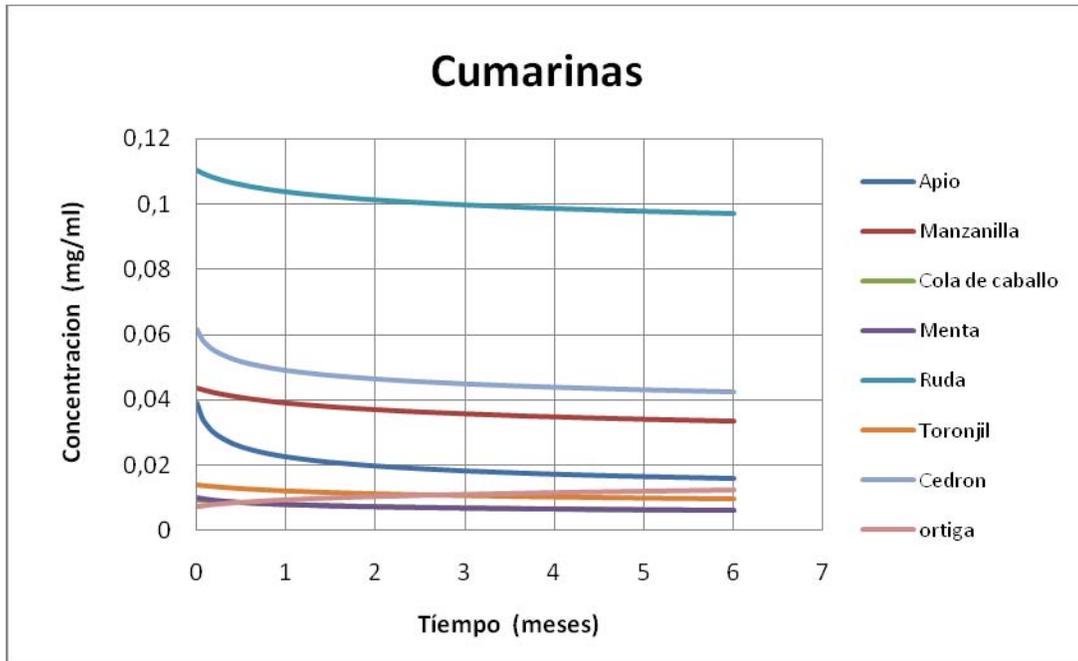


Figura 3.7 Ilustración comparativa de las concentraciones de Cumarinas entre las plantas de estudio.

En la figura 3.7 se observa que la concentración de cumarinas en las diferentes especies vegetales disminuye a excepción de la Ortiga la cual aumenta.

Hay plantas con valores mayores que otras, pero en el transcurso de los 6 meses su concentración en cuanto a cumarinas disminuye más que las que empiezan con valores menores.



3.4.2 Comparación de las concentraciones de flavonoides.

Tiempo	Apio	Manzanilla	Cola de Caballo	Menta	Ruda	Toronjil	Cedrón	Ortiga
0	0,003564046	0,000847661	0,001449673	0,005401197	0,002439648	0,00235053	0,002420336	0,00120193
0,05	0,003547002	0,000809709	0,001274347	0,004175889	0,002633505	0,00233325	0,00237197	0,00135253
0,1	0,003530412	0,000784606	0,001202262	0,003642545	0,00273956	0,0023175	0,002335623	0,00140763
0,2	0,003498508	0,000751239	0,001125017	0,003088694	0,002871763	0,00228968	0,002282464	0,0014689
0,4	0,003439283	0,000711929	0,001047437	0,002569256	0,003025715	0,00224464	0,002213724	0,00153509
0,6	0,003385344	0,000687435	0,001003139	0,002293811	0,003124231	0,00220901	0,002168096	0,0015758
0,8	0,003335889	0,000669783	0,000972448	0,002112863	0,003197494	0,00217962	0,002134082	0,00160552
1	0,00329028	0,000656056	0,000949122	0,001980928	0,003256131	0,00215466	0,002107043	0,00162903
1,3	0,003227985	0,000639969	0,000922268	0,001835102	0,003327015	0,00212316	0,002074756	0,00165719
1,6	0,003171854	0,000627328	0,000901469	0,001726645	0,003384561	0,00209681	0,002048965	0,00167985
2	0,003104859	0,000613873	0,000879574	0,001616709	0,003447799	0,00206731	0,002021131	0,00170459
2,5	0,003031253	0,000600583	0,000858157	0,001513367	0,003512462	0,00203684	0,001993273	0,00172972
3	0,002966586	0,000589864	0,000841013	0,001433621	0,003566344	0,00201138	0,001970551	0,00175055
3,5	0,002909057	0,000580907	0,000826768	0,001369353	0,003612635	0,00198956	0,001951399	0,00176836
4	0,002857347	0,000573232	0,000814612	0,001315937	0,003653276	0,00197048	0,001934867	0,00178395
5	0,002767648	0,000560584	0,000794676	0,001231151	0,003722315	0,00193836	0,001907393	0,00181031
6	0,002691927	0,000550421	0,000778736	0,001165852	0,003779773	0,001912	0,001885111	0,00183214

Tabla 3.14 Tabla de comparación de las concentraciones de flavonoides.

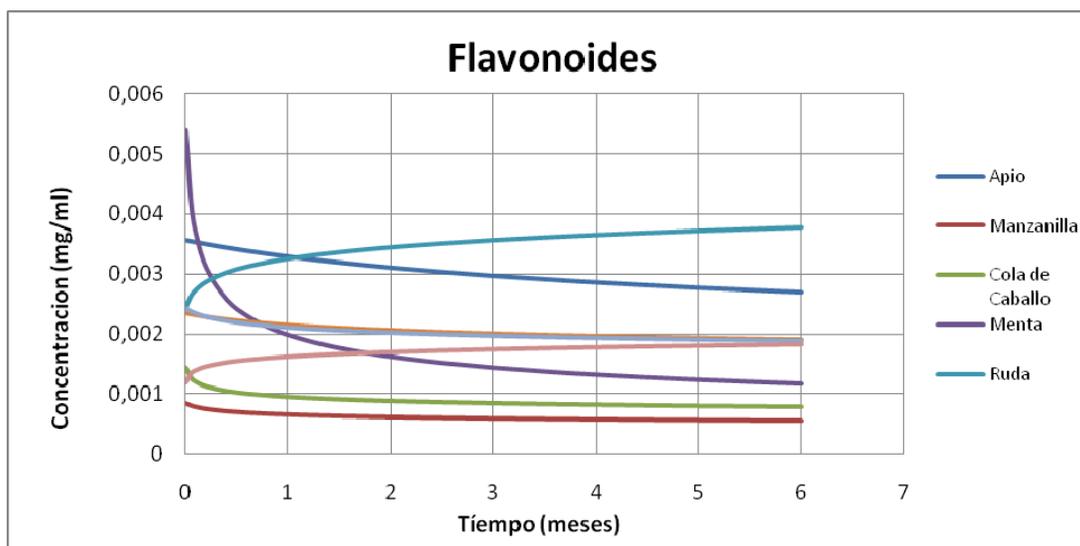


Figura 3.8 Ilustración comparativa de las concentraciones de Flavonoides entre las plantas de estudio.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En la figura 3.8 se observa que la concentración de flavonoides en las diferentes especies vegetales disminuye a excepción de la Ortiga y Ruda las cuales aumentan.

3.4.3 Comparación de las concentraciones de Ácidos Fenólicos.

TIEMPO	Apio	Manzanilla	Menta	Ruda	Toronjil	Cedrón	Ortiga
0	1,937511492	0,67301643	0,671189962	0,950710106	1,367117854	1,427579822	0,775548346
0,05	1,740283331	0,645677894	0,66943619	0,909383775	1,264070992	1,133951898	0,771956511
0,1	1,572983255	0,620769201	0,667687176	0,871654428	1,232143319	1,081221888	0,768381667
0,2	1,306045097	0,577008771	0,664203365	0,80523658	1,199162633	1,030247117	0,761282626
0,4	0,94754122	0,507617785	0,657292243	0,699750153	1,166073155	0,981336395	0,747284862
0,6	0,722956275	0,45485194	0,65045575	0,619611253	1,14688522	0,953725263	0,733549915
0,8	0,57221043	0,41321712	0,643693053	0,556577295	1,133391056	0,93458439	0,72007275
1	0,46571561	0,379427788	0,637003324	0,505645215	1,123003481	0,919993052	0,706848427
1,3	0,355835079	0,339074891	0,627103765	0,445202354	1,110885992	0,903120164	0,68747546
1,6	0,281936567	0,307407483	0,617363839	0,398159588	1,101373127	0,889981515	0,668644574
2	0,215567849	0,274331607	0,604620985	0,349500573	1,0912286	0,876071119	0,644353275
2,5	0,161987744	0,242823952	0,589075412	0,30371581	1,081167464	0,8623751	0,615251859
3	0,126771867	0,21856969	0,573944403	0,26893275	1,073009809	0,851341927	0,587491773
3,5	0,102284231	0,199254825	0,559216508	0,241573829	1,066157172	0,842122672	0,561009953
4	0,084509492	0,183466661	0,544880602	0,219467542	1,060254343	0,834216675	0,535746355
5	0,060865191	0,159109064	0,517341839	0,185885573	1,050459208	0,82116919	0,488647894
6	0,046199298	0,141104833	0,491245309	0,161534462	1,042520283	0,810659387	0,445771085

Tabla 3.15 Tabla de comparación de las concentraciones de Ácidos Fenólicos.

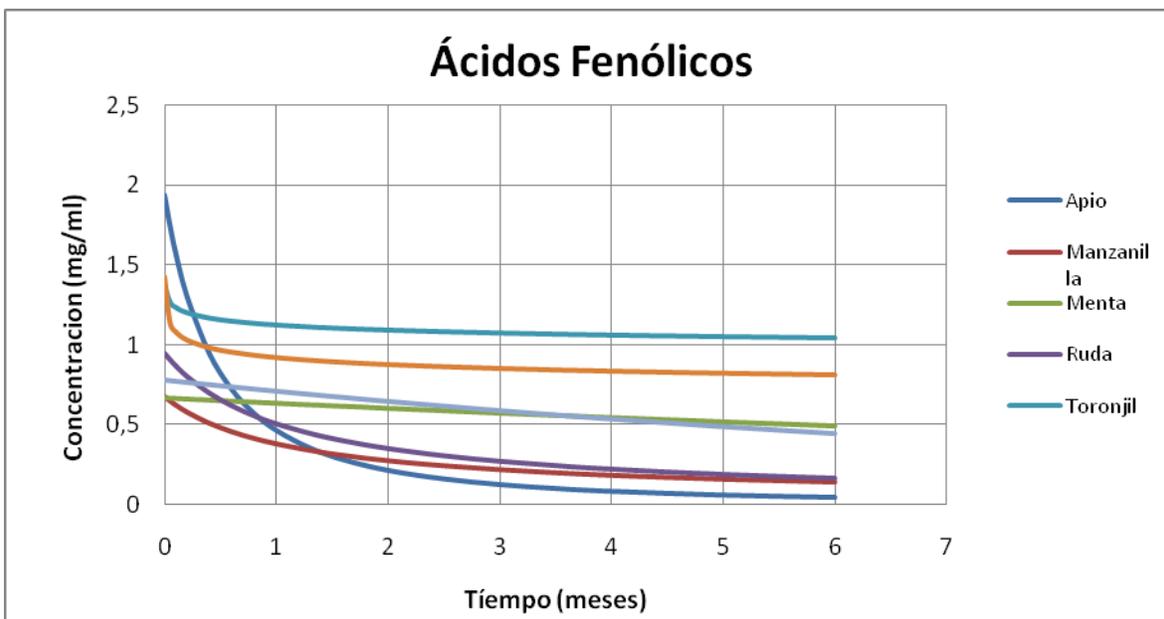


Figura 3.9 Ilustración comparativa de las concentraciones de Ácidos Fenólicos entre las plantas de estudio.

En la figura 3.9 se observa que la concentración de Ácidos fenólicos en la todas las especies vegetales disminuye, siendo la más evidente la cola de caballo ya que esta empezó con concentraciones bajas de ácidos fenólicos y al tercer mes ya no presenta dicho metabolito.

En la bibliografía revisada no se han encontrado datos de concentración de los compuestos fenólicos anteriormente citados que se puedan comparar con los resultados obtenidos en nuestra experimentación.

De los valores de concentración obtenidos se procedió a realizar el análisis estadístico basado en el método matemático de regresión lineal simple a escala logarítmica, planteando la hipótesis I y organizando inicialmente las concentraciones por planta, tiempo y ensayos en Microsoft Excel 2007 que luego se aplicaron para su análisis respectivo, obteniendo los resultados que se muestran en las tablas 3.13, 3.14, 3.15., de los cuales se procedió a elaborar las respectivas gráficas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En las figuras 3.7, 3.8, 3.9, se observa que la concentración de Flavonoides, Cumarinas y Ácidos Fenólicos varía en función del tiempo lo cual puede deberse a:

La disminución de la concentración de los metabolitos puede depender de las condiciones de humedad y temperatura a las que se expuso la droga en el proceso de secado debido a que una cantidad de agua superior al 10%, favorece la actividad enzimática, catalizando reacciones que generan deterioro en la composición química, dando lugar a hidrólisis y oxidación de los principios activos, siendo la oxidación la principal reacción de deterioro de los compuestos fenólicos por considerarse sustancias fácilmente oxidables. Al respecto Acosta (2003) y Oteiza (2003), señalan que la desecación constituye la etapa más importante en el manejo post cosecha de las plantas, pues influye considerablemente en la concentración de los principios activos. Sin embargo en esta investigación no se consideró el peso de cada una de las fundas en cada uno de los tiempos, siendo esto una debilidad para el análisis de este parámetro.

La concentración de compuestos fenólicos depende de la especie vegetal.

Un estudio realizado por Materska en extractos de albahaca, bálsamo de limón, menta, perejil, orégano, demostró que el contenido de compuestos fenólicos de extractos etanólicos muestra un variado grado de susceptibilidad a la oxidación y reducción durante tres y seis meses de almacenamiento. (Materska, 2010)

En el año 2009, Trejo Tapia y colaboradores determinaron el contenido de compuestos fenólicos de cinco plantas de "*Castilleja tenuiflora* Benth" conocida como la hierba del cáncer en donde se observó que la concentración de los compuestos fenólicos y flavonoides de cada una de ellas es variable lo que se debía al efecto de factores ambientales como la radiación solar, temperatura, las cuales dependen de la altitud en la que crecen las plantas.



3.5 ANÁLISIS ANOVA

De los datos obtenidos en el tiempo cero representados en las tablas 3.16, 3.18, 3.20, se procedió a realizar un análisis ANOVA para valorar la relación existente entre las determinaciones al tiempo cero para cada una de las plantas según la hipótesis planteada.

FLAVONOIDES		
Tiempo 0		
	Patrón A	Patrón B
Apio	0,191	0,192
Manzanilla	0,03	0,033
Cola de Caballo	0,065	0,07
Menta	0,301	0,307
Ruda	0,121	0,131
Toronjil	0,123	0,118
Cedrón	0,121	0,128
Ortiga	0,099	0,103

Tabla 3.16. Tabla de concentración de flavonoides a tiempo cero.

3.5.1 Análisis de varianza de un factor para Flavonoides

RESUMEN					
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Apio	2	0,383	0,1915	5E-07	
Manzanilla	2	0,063	0,0315	4,5E-06	
Cola de Caballo	2	0,135	0,0675	0,0000125	
Menta	2	0,608	0,304	0,000018	
Ruda	2	0,252	0,126	5E-05	
Toronjil	2	0,241	0,1205	0,0000125	
Cedrón	2	0,249	0,1245	0,0000245	
Ortiga	2	0,202	0,101	8E-06	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,097112938	7	0,01387328	850,469075	7,58892E-11	3,50046386
Dentro de los grupos	0,0001305	8	1,6313E-05			
Total	0,097243438	15				

Tabla 3.17. Análisis de varianza para la concentración de Flavonoides.

CUMARINAS		
Tiempo 0		
	Patrón A	Patrón B
Apio	0,539	0,546
Manzanilla	0,599	0,615
Cola de Caballo	0,121	0,135
Menta	0,135	0,141
Ruda	1,543	1,519
Toronjil	0,18	0,21
Cedrón	0,851	0,865
Ortiga	0,099	0,103

Tabla 3.18. Tabla de concentración de cumarinas a tiempo cero.

3.5.2 Análisis de varianza de un factor para Cumarinas

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Apio	2	1,085	0,5425	0,0000245
Manzanilla	2	1,214	0,607	0,000128
Cola de Caballo	2	0,256	0,128	9,8E-05
Menta	2	0,276	0,138	1,8E-05
Ruda	2	3,062	1,531	0,000288
Toronjil	2	0,39	0,195	0,00045
Cedrón	2	1,716	0,858	9,8E-05
Ortiga	2	0,202	0,101	8E-06



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,449543438	7	0,49279192	3543,67223	2,53314E-13	3,50046386
Dentro de los grupos	0,0011125	8	0,00013906			
Total	3,450655938	15				

Tabla 3.19. Análisis de varianza para la concentración de Cumarinas.

AC. FENÓLICOS		
Tiempo 0		
	Patrón A	Patrón B
Apio	0,037	0,035
Manzanilla	0,012	0,013
Cola de Caballo	0,01	0,011
Menta	0,013	0,014
Ruda	0,015	0,018
Toronjil	0,025	0,026
Cedrón	0,025	0,027
Ortiga	0,015	0,016

Tabla 3.20. Tabla de concentración de Ácidos Fenólicos a tiempo cero

3.5.3 Análisis de varianza de un factor para Ácidos Fenólicos

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Apio	2	0,072	0,036	2E-06
Manzanilla	2	0,025	0,0125	5E-07
Cola de Caballo	2	0,021	0,0105	5E-07
Menta	2	0,027	0,0135	5E-07



<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,001083	7	0,00015471	112,5194805	2,35007E-07	3,50046386
Dentro de los grupos	0,000011	8	1,375E-06			
Total	0,001094	15				
Ruda		2	0,033	0,0165		0,0000045
Toronjil		2	0,051	0,0255		5E-07
Cedrón		2	0,052	0,026		0,000002
Ortiga		2	0,031	0,0155		5E-07

Tabla 3.21. Análisis de varianza para la concentración de Ácidos Fenólicos.

Al comparar los valores de F experimental y F crítico, este último posee un valor menor, de igual manera la probabilidad es menor que el nivel de significancia (0,05), lo que implica el rechazo de la hipótesis nula planteada, concluyendo que la concentración de compuestos fenólicos es diferente para cada una de las plantas.

Además las graficas de regresión lineal nos ayudan en el análisis ANOVA para ver que todas las plantas empiezan con diferente concentración.

3.6 Prueba “T”

De los datos obtenidos del análisis de Estimación lineal de los Ácidos Fenólicos se procedió a realizar una prueba T para estimar su concentración según las hipótesis planteadas:

Hipótesis III: para la concentración de Ácidos Fenólicos.

Hipótesis nula: No existe disminución significativa en la concentración de ácidos fenólicos.

Hipótesis alternativa: Existe disminución significativa en la concentración de ácidos fenólicos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Planta	to	Valor P	Ho	pendiente
Apio	12,743	0,0000	rechaza	significativa
Manzanilla	6,052	0,0009	rechaza	significativa
Menta	1,452	0,1966	no rechaza	no significativa
Ruda	10,926	0,0000	rechaza	significativa
Toronjil	1,351	0,2254	no rechaza	no significativa
Cedrón	3,453	0,0136	rechaza	significativa
Ortiga	1,171	0,2861	no rechaza	no significativa

Tabla 3.22 Resultados de la Prueba T para Ácidos Fenólicos

De los resultados expuestos mediante el análisis t, se revela que para el Apio, Manzanilla, Ruda y Cedrón se rechaza la hipótesis nula ya que el valor p es inferior al valor de significancia, por lo tanto la disminución de la concentración de ácidos fenólicos en el tiempo es significativa, mientras que para la Menta, Toronjil y Ortiga la hipótesis nula se acepta, por tanto la disminución de la concentración de ácidos fenólicos en el tiempo no es significativa.



4. CONCLUSIONES

Nuestro estudio se fundamentó en la valoración del método de almacenamiento de plantas medicinales, en el que las condiciones de tratamiento pos-cosecha fueron homogéneas para la posterior identificación y cuantificación de flavonoides, cumarinas y ácidos fenólicos. Los resultados de concentración obtenidos de cada uno de los metabolitos secundarios a través del tiempo fueron analizados y se concluyó que:

- Los resultados obtenidos, muestran que estos tres grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos) se encuentran distribuidos de manera diferente en cada una de las especies estudiadas, lo cual se atribuye a la variabilidad biológica de cada especie.
- Los factores externos e internos descritos en este estudio pueden afectar el contenido final de metabolitos secundarios en plantas medicinales, lo que puede tener gran influencia en la calidad y en consecuencia sobre el valor terapéutico de los preparados fitoterapéuticos.
- A partir de los resultados obtenidos en las tablas 3.13, 3.14, 3.15., y a la representación de dichos valores en las gráficas respectivas se concluyó que a mayor tiempo de almacenamiento las concentraciones disminuyen o aumentan según el caso, por lo tanto la variación en la concentración de compuestos fenólicos puede ser empleada como indicador de la conservabilidad de material vegetal.



5. RECOMENDACIONES

- El contenido total de compuestos fenólicos debe determinarse luego de la obtención de los extractos secos para descartar errores que podrían darse por oxidación de los mismos.
- Realizar un control de la temperatura y humedad del lugar de almacenamiento, para de este modo evaluar la influencia de estos factores sobre la concentración de los metabolitos secundarios estudiados.



6. BIBLIOGRAFÍA

- **Acosta, L. (2003).** *La producción Agrícola de Plantas Medicinales en Cuba.* Cuba.
- **Arango, G. J. (2008).** *Introducción al Metabolismo Secundario.* Medellín.
- **Arias, C. L. (2009).** *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.* México: Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana.
- **Ariza Sandra Y., R. D. (2007).** *Efectos Farmacológicos sobre el Sistema Nervioso Central inducidos por Cumarina.* Bogotá, Colombia.
- **Asociación Española, d. M. (1999).** *"Fitoterapia: Vademécum de prescripción de plantas medicinales".* México: Cita.
- **Badilla, P. (2003).** *Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas. Calidad en la Elaboración y Producción de Plantas Medicinales.* Chile.
- **Berdonces, I. S. (1998).** *Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales* (Vols. 1°, 2°, 3°). Barcelona: Tikal.
- **Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (2004).** Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts. *Agricultural and Food Chemistry* , 3389 - 3392.
- **Caprette David R.,** *La prueba t de Student,* 2005.
- **Carril, A. Á.-U. (2009).** Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología)* , 119 - 121.
- **Charles, E. W. (1991).** En Trease, & Evans, *Farmacognosia.* México: Interamericana.
- **Dewick, P. M. (2002).** *Medicinal Natural Products, A biosynthetic.*
- **Encina, C. L., & Padilla, I. M. (2006).** *Producción de Metabolitos Secundarios.*
- **Fennema, O. R. (1985).** *Food Chemistry.* New York.
- **Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2007).** Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quimica Nova* .



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Granada, U. d. (2004).** *Quiored*. Recuperado el 26 de Julio de 2011, de Quiored: http://www.ugr.es/~quiored/biblio/bib_gen.htm
- **Gaedcke, F., & Steinhoff, B. (2003).** *Herbal Medicinal Products Scientific and Regulatory basis for development Quality Assurance and Marketing Authorisation*. Germany: Medpharm, CRC Press.
- **Grünwald, J., & Chirstof, J. (2006).** *La Farmacia Verde*. 324 , 325.
- **Hahn, D. H. (1984).** Tannis and phenols of sorghum. *Cereal Foods World* , 776.
- **Kossman, I. V. (1992).** *Salud y Plantas Medicinales*. Planeta Tierra.
- **Kuklinski, C. (2000).** *Farmacognosia*. Barcelona: Omega.
- **Larrahondo J. (1980).** *Productos naturales: pruebas químicas iniciales en una planta*. Universidad del Valle.
- **Lock, D. O.(2007).** Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. En A. (. Integral), *Manual de Fitoterapia* (págs. 41 - 64). Perú: Fondo Editorial, PUCP.
- **Martin W. Eric, C. E. (1965).** *Farmacia Práctica de Remington* (Segunda Edición ed.). México: Hispano America.
- **Martínez, J., José, R., Bandoni, Arnaldo, Engracia, M. M., Francisco, M., y otros. (2004).** *BLACMA (Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas)* , 5.
- **Materska, M. (2010).** Evaluation of the Lipophilicity and stability of fenolic compounds in herbal extracts. *Acta Sci. Pol, Technol- Aliment*.
- **Muñoz, J. F., & Sarmiento, D. G. (2010).** *Valoración comparativa de dos métodos de secados de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y cumarinas*. Cuenca, Ecuador.
- **Ocampo Sánchez, R. Á. (2000).** *Mnual de Cultivo y Conservación de Plantas Medicinales*. Costa Rica.
- **Osório, d. C., Seferin, E., & Luiz, M. J. (2004).** Determinación de cumarina en extracto fluido y tintura de guaco por espectrofotometría derivada del primer orden. *Rev. Bras. Cienc. Farm* , 481 - 485.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Pecsok, R. L., & Shields, L. D. (1987).** *Métodos modernos de análisis químicos*. LIMUSA.
- **Pérez Trueba, G. (2003).** Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes . *Revista Cubana: Invest Bioméd* .
- **Peterson, G. (1979).** Review of the Folin protein quantitation method de Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry*. Vol. 100 N° 2, 201 - 203.
- **Pulok, P. M. (2008).** *Quality Control Herbal Drugs*. India: Business Horizons.
- **R. Julkunen, T. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 33 N° 2, 263 - 264.
- **Richard W, H., & Laks, P. E. (1992).** Plant polyphenols synthesis, properties, significance. 263 - 264.
- **Sharapin, N. (2000).** *Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos*. Convenio Andres Bello.
- **Sikwese, F. E. (2005).** *Sorghum phenolic extracts: their storage stability and antioxidant activity in sunflower oil*. University of Pretoria.
- **Sinauer Associates, Plant Physiology. (2006).** Secondary Metabolites and Plant Defense.
- **Sung, I., & col. (2004).** En *Fito Medicinal 1100 Plantas Medicinales* (págs. 6,24,68,135,188,254,325). Lima - Perú: Isabel.
- **Trease, & Evans. (2001).** *Farmacognosia*. Interamericana Mc Graw-Hill.
- **University of Life Sciences.** Evaluation of the lipophilicity and stability of phenolic compounds in herbal extracts. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 9(1). 2010. pag.61-69.
- **Vargas, A. (1992).** *Mimex*. Recuperado el Mayo de 2011, de Compuestos Fenólicos y Flavonoides: <http://www.arbolmaguey.com/es/productos/contenido-y-beneficios/compuestos-fenolicos-y-flavonoides>.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Vargas, S. A. (1995).** *Estadística descriptiva e inferencial* (Vol. Volumen 8). La Mancha.
- **Vázquez, H. E. (2004).** *Extracción a nivel de laboratorio de los pigmentos colorantes del tipo Flavonoides contenidos en la Flor del Subín*. Guatemala.
- **Walter F Galindo, M. R. (1989).** *Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarratón. Vol 1.*



7. ANEXOS

ANEXO. 1: PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN CIOCALTEAU

Disolver 10g de Tungstato de sodio y 2,5g de Molibdato de sodio en 70 mL de agua. Añadir 5 mL de ácido fosfórico al 85% y 10 mL de HCl concentrado. Reflujo durante 10 horas. Agregar 15g de Sulfato de litio, 5 mL de agua y una gota de Bromo. Reflujo durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a 100mL con agua destilada.



Figura 3.10 Materiales y Equipo para la preparación del Reactivo de Folin Ciocalteau.



Figura 3.11 Reactivo de Folin Ciocalteau en reflujo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

PREPARACIÓN DE PATRONES PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA
DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS

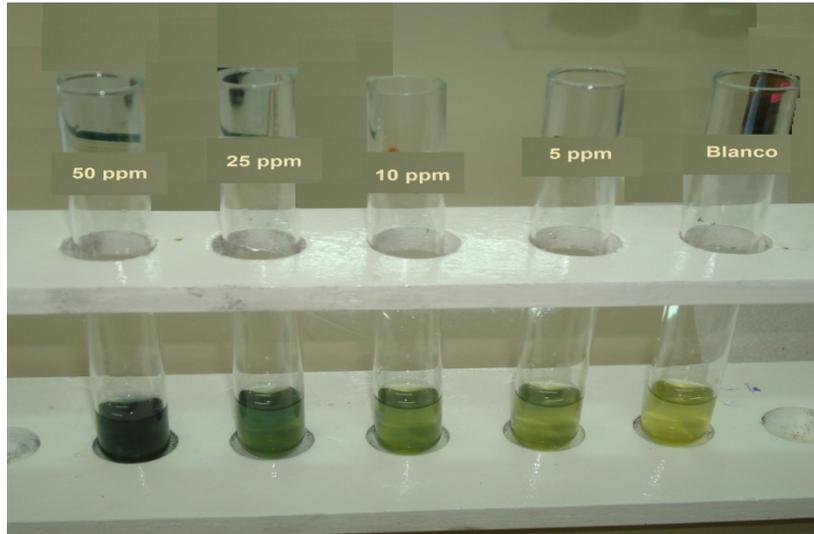


Figura 3.12 Patrones para la preparación de la Curva de Calibración de ácidos fenólicos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXO. 2: TABLA DE CUANTIFICACIÓN DE CUMARINAS

CUANTIFICACIÓN DE CUMARINAS																	
PLANTAS	TIEMPO (meses)	Lecturas Espectrofotométricas (nm)						Concentración expresada como Umbelliferona mg/ml									
		PATRÓN A			PATRÓN B			PATRÓN A					PATRÓN B				
		1	2	x	1	2	x	1	2	x	±	σ	1	2	x	±	σ
Apio	0	0,539	0,539	0,539	0,546	0,546	0,546	0,038820992	0,038820992	0,038820992	±	0	0,039324227	0,039324227	0,039324227	±	0
	1	0,31	0,31	0,31	0,338	0,337	0,3375	0,022358016	0,022358016	0,022358016	±	0	0,024370956	0,024299065	0,024335011	±	5,08344E-05
	3	0,236	0,236	0,236	0,24	0,24	0,24	0,017038102	0,017038102	0,017038102	±	0	0,017325665	0,017325665	0,017325665	±	0
	6	0,233	0,233	0,233	0,23	0,23	0,23	0,01682243	0,01682243	0,01682243	±	0	0,016606758	0,016606758	0,016606758	±	0
Manzanilla	0	0,599	0,599	0,599	0,615	0,614	0,6145	0,043134436	0,043134436	0,043134436	±	0	0,044284687	0,044212797	0,044248742	±	5,08344E-05
	1	0,523	0,522	0,5225	0,559	0,558	0,5585	0,03767074	0,03759885	0,037634795	±	5,08344E-05	0,040258807	0,040186916	0,040222861	±	5,08344E-05
	3	0,486	0,485	0,4855	0,51	0,51	0,51	0,035010784	0,034938893	0,034974838	±	5,08344E-05	0,036736161	0,036736161	0,036736161	±	0
	6	0,45	0,45	0,45	0,475	0,474	0,4745	0,032422717	0,032422717	0,032422717	±	0	0,034219986	0,034148095	0,03418404	±	5,08344E-05
Cola de Caballo	0	0,12	0,121	0,1205	0,135	0,135	0,135	0,008698778	0,008770669	0,008734723	±	5,08344E-05	0,009777139	0,009777139	0,009777139	±	0
	1	0,114	0,114	0,114	0,111	0,11	0,1105	0,008267434	0,008267434	0,008267434	±	0	0,008051761	0,007979871	0,008015816	±	5,08344E-05
	3	0,091	0,091	0,091	0,1	0,1	0,1	0,006613947	0,006613947	0,006613947	±	0	0,007260963	0,007260963	0,007260963	±	0
	6	0,09	0,09	0,09	0,085	0,085	0,085	0,006542056	0,006542056	0,006542056	±	0	0,006182602	0,006182602	0,006182602	±	0
Menta	0	0,136	0,133	0,1345	0,141	0,141	0,141	0,009849029	0,009633357	0,009741193	±	0,000152503	0,010208483	0,010208483	0,010208483	±	0
	1	0,108	0,108	0,108	0,118	0,118	0,118	0,007836089	0,007836089	0,007836089	±	0	0,008554996	0,008554996	0,008554996	±	0
	3	0,083	0,084	0,0835	0,09	0,091	0,0905	0,006038821	0,006110712	0,006074766	±	5,08344E-05	0,006542056	0,006613947	0,006578001	±	5,08344E-05
	6	0,091	0,091	0,091	0,086	0,085	0,0855	0,006613947	0,006613947	0,006613947	±	0	0,006254493	0,006182602	0,006218548	±	5,08344E-05
Ruda	0	1,543	1,543	1,543	1,519	1,519	1,519	0,110999281	0,110999281	0,110999281	±	0	0,109273904	0,109273904	0,109273904	±	0
	1	1,493	1,491	1,492	1,409	1,409	1,409	0,107404745	0,107260963	0,107332854	±	0,000101669	0,101365924	0,101365924	0,101365924	±	0
	3	1,382	1,38	1,381	1,359	1,358	1,3585	0,099424874	0,099281093	0,099352983	±	0,000101669	0,097771387	0,097699497	0,097735442	±	5,08344E-05
	6	1,36	1,362	1,361	1,355	1,355	1,355	0,097843278	0,09798706	0,097915169	±	0,000101669	0,097483825	0,097483825	0,097483825	±	0
Toronjil	0	0,18	0,18	0,18	0,2	0,201	0,2005	0,013012221	0,013012221	0,013012221	±	0	0,014450036	0,014521927	0,014485981	±	5,08344E-05
	1	0,167	0,169	0,168	0,172	0,172	0,172	0,012077642	0,012221423	0,012149533	±	0,000101669	0,012437096	0,012437096	0,012437096	±	0
	3	0,143	0,142	0,1425	0,149	0,147	0,148	0,010352265	0,010280374	0,010316319	±	5,08344E-05	0,010783609	0,010639827	0,010711718	±	0,000101669
	6	0,14	0,14	0,14	0,135	0,136	0,1355	0,010136592	0,010136592	0,010136592	±	0	0,009777139	0,009849029	0,009813084	±	5,08344E-05
Cedrón	0	0,851	0,85	0,8505	0,864	0,865	0,8645	0,061250899	0,061179008	0,061214953	±	5,08344E-05	0,062185478	0,062257369	0,062221423	±	5,08344E-05
	1	0,683	0,686	0,6845	0,688	0,687	0,6875	0,049173257	0,049388929	0,049281093	±	0,000152503	0,04953271	0,04946082	0,049496765	±	5,08344E-05
	3	0,614	0,614	0,614	0,608	0,61	0,609	0,044212797	0,044212797	0,044212797	±	0	0,043781452	0,043925234	0,043853343	±	0,000101669
	6	0,61	0,61	0,61	0,58	0,58	0,58	0,043925234	0,043925234	0,043925234	±	0	0,041768512	0,041768512	0,041768512	±	0
Ortiga	0	0,098	0,099	0,0985	0,102	0,103	0,1025	0,007117182	0,007189073	0,007153127	±	5,08344E-05	0,007404745	0,007476636	0,00744069	±	5,08344E-05
	1	0,121	0,121	0,121	0,133	0,132	0,1325	0,008770669	0,008770669	0,008770669	±	0	0,009633357	0,009561467	0,009597412	±	5,08344E-05
	3	0,167	0,167	0,167	0,159	0,159	0,159	0,012077642	0,012077642	0,012077642	±	0	0,011502516	0,011502516	0,011502516	±	0
	6	0,168	0,168	0,168	0,17	0,17	0,17	0,012149533	0,012149533	0,012149533	±	0	0,012293314	0,012293314	0,012293314	±	0



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXO. 3: TABLA DE CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES																	
PLANTAS	TIEMPO (meses)	Lecturas Espectrofotométricas (nm)						Concentración expresada como Quercetina mg/ml									
		PATRÓN A			PATRÓN B			PATRÓN A					PATRÓN B				
		1	2	x	1	2	x	1	2	x	±	σ	1	2	x	±	σ
Apio	0	0,191	0,19	0,1905	0,193	0,191	0,192	0,003544304	0,003527426	0,003535865	±	1,19343E-05	0,003578059	0,003544304	0,003561181	±	2,38686E-05
	1	0,187	0,187	0,187	0,171	0,169	0,17	0,003476793	0,003476793	0,003476793	±	0	0,003206751	0,003172996	0,003189873	±	2,38686E-05
	3	0,162	0,161	0,1615	0,148	0,148	0,148	0,003054852	0,003037975	0,003046414	±	1,19343E-05	0,002818565	0,002818565	0,002818565	±	0
	6	0,144	0,143	0,1435	0,139	0,139	0,139	0,002751055	0,002734177	0,002742616	±	1,19343E-05	0,002666667	0,002666667	0,002666667	±	0
Manzanilla	0	0,029	0,03	0,0295	0,033	0,033	0,033	0,000810127	0,000827004	0,000818565	±	1,19343E-05	0,000877637	0,000877637	0,000877637	±	0
	1	0,019	0,018	0,0185	0,022	0,021	0,0215	0,00064135	0,000624473	0,000632911	±	1,19343E-05	0,000691983	0,000675105	0,000683544	±	1,19343E-05
	3	0,015	0,015	0,015	0,017	0,016	0,0165	0,00057384	0,00057384	0,00057384	±	0	0,000607595	0,000590717	0,000599156	±	1,19343E-05
	6	0,013	0,012	0,0125	0,015	0,015	0,015	0,000540084	0,000523207	0,000531646	±	1,19343E-05	0,00057384	0,00057384	0,00057384	±	0
Cola de Caballo	0	0,064	0,065	0,0645	0,07	0,07	0,07	0,001400844	0,001417722	0,001409283	±	1,19343E-05	0,00150211	0,00150211	0,00150211	±	0
	1	0,036	0,036	0,036	0,038	0,037	0,0375	0,00092827	0,00092827	0,00092827	±	0	0,000962025	0,000945148	0,000953586	±	1,19343E-05
	3	0,032	0,031	0,0315	0,029	0,03	0,0295	0,000860759	0,000843882	0,000852321	±	1,19343E-05	0,000810127	0,000827004	0,000818565	±	1,19343E-05
	6	0,03	0,03	0,03	0,025	0,026	0,0255	0,000827004	0,000827004	0,000827004	±	0	0,000742616	0,000759494	0,000751055	±	1,19343E-05
Menta	0	0,301	0,301	0,301	0,307	0,306	0,3065	0,005400844	0,005400844	0,005400844	±	0	0,00550211	0,005485232	0,005493671	±	1,19343E-05
	1	0,096	0,097	0,0965	0,103	0,103	0,103	0,001940928	0,001957806	0,001949367	±	1,19343E-05	0,002059072	0,002059072	0,002059072	±	0
	3	0,059	0,059	0,059	0,058	0,058	0,058	0,001316456	0,001316456	0,001316456	±	0	0,001299578	0,001299578	0,001299578	±	0
	6	0,057	0,057	0,057	0,053	0,054	0,0535	0,0012827	0,0012827	0,0012827	±	0	0,00121519	0,001232068	0,001223629	±	1,19343E-05
Ruda	0	0,12	0,121	0,1205	0,131	0,131	0,131	0,002345992	0,002362869	0,00235443	±	1,19343E-05	0,002531646	0,002531646	0,002531646	±	0
	1	0,169	0,17	0,1695	0,174	0,175	0,1745	0,003172996	0,003189873	0,003181435	±	1,19343E-05	0,003257384	0,003274262	0,003265823	±	1,19343E-05
	3	0,191	0,191	0,191	0,203	0,202	0,2025	0,003544304	0,003544304	0,003544304	±	0	0,003746835	0,003729958	0,003738397	±	1,19343E-05
	6	0,2	0,2	0,2	0,205	0,205	0,205	0,003696203	0,003696203	0,003696203	±	0	0,003780591	0,003780591	0,003780591	±	0
Toronjil	0	0,123	0,123	0,123	0,118	0,118	0,118	0,002396624	0,002396624	0,002396624	±	0	0,002312236	0,002312236	0,002312236	±	0
	1	0,108	0,107	0,1075	0,108	0,108	0,108	0,00214346	0,002126582	0,002135021	±	1,19343E-05	0,00214346	0,00214346	0,00214346	±	0
	3	0,104	0,104	0,104	0,099	0,099	0,099	0,002075949	0,002075949	0,002075949	±	0	0,001991561	0,001991561	0,001991561	±	0
	6	0,097	0,097	0,097	0,09	0,091	0,0905	0,001957806	0,001957806	0,001957806	±	0	0,001839662	0,00185654	0,001848101	±	1,19343E-05
Cedrón	0	0,121	0,121	0,121	0,128	0,128	0,128	0,002362869	0,002362869	0,002362869	±	0	0,002481013	0,002481013	0,002481013	±	0
	1	0,099	0,098	0,0985	0,113	0,113	0,113	0,001991561	0,001974684	0,001983122	±	1,19343E-05	0,002227848	0,002227848	0,002227848	±	0
	3	0,096	0,096	0,096	0,101	0,1	0,1005	0,001940928	0,001940928	0,001940928	±	0	0,002025316	0,002008439	0,002016878	±	1,19343E-05
	6	0,09	0,09	0,09	0,095	0,095	0,095	0,001839662	0,001839662	0,001839662	±	0	0,001924051	0,001924051	0,001924051	±	0
Ortiga	0	0,045	0,047	0,046	0,059	0,059	0,059	0,001080169	0,001113924	0,001097046	±	2,38686E-05	0,001316456	0,001316456	0,001316456	±	0
	1	0,072	0,073	0,0725	0,08	0,081	0,0805	0,001535865	0,001552743	0,001544304	±	1,19343E-05	0,001670886	0,001687764	0,001679325	±	1,19343E-05
	3	0,087	0,086	0,0865	0,09	0,089	0,0895	0,00178903	0,001772152	0,001780591	±	1,19343E-05	0,001839662	0,001822785	0,001831224	±	1,19343E-05
	6	0,09	0,09	0,09	0,085	0,085	0,085	0,001839662	0,001839662	0,001839662	±	0	0,001755274	0,001755274	0,001755274	±	0



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXO. 4: TABLA DE CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS																	
PLANTAS	TIEMPO (meses)	Lecturas Espectrofotométricas (nm)						Concentracion expresada como Ac. Cafeico mg/ml									
		PATRÓN A			PATRÓN B			PATRÓN A					PATRÓN B				
		1	2	x	1	2	x	1	2	x	±	σ	1	2	x	±	σ
Apio	0	0,037	0,037	0,037	0,035	0,035	0,035	2,114285714	2,114285714	2,114285714	±	0	2	2	2	±	0
	1	0,014	0,013	0,0135	0,012	0,012	0,012	0,555555556	0,515873016	0,535714286	±	0,028059793	0,476190476	0,476190476	0,476190476	±	0
	3	0,002	0,001	0,0015	0,001	0,001	0,001	0,137931034	0,068965517	0,103448276	±	0,048765985	0,068965517	0,068965517	0,068965517	±	0
	6	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,060240964	0,060240964	0,060240964	±	0	0,060240964	0,060240964	0,060240964	±	0
Manzanilla	0	0,012	0,012	0,012	0,013	0,013	0,013	0,685714286	0,685714286	0,685714286	±	0	0,742857143	0,742857143	0,742857143	±	0
	1	0,007	0,007	0,007	0,008	0,008	0,008	0,277777778	0,277777778	0,277777778	±	0	0,317460317	0,317460317	0,317460317	±	0
	3	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,344827586	0,344827586	0,344827586	±	0	0,275862069	0,275862069	0,275862069	±	0
	6	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,120481928	0,120481928	0,120481928	±	0	0,120481928	0,120481928	0,120481928	±	0
Cola de Caballo	0	0,01	0,01	0,01	0,011	0,01	0,0105	0,571428571	0,571428571	0,571428571	±	0	0,628571429	0,571428571	0,6	±	0,040406102
	1	0,005	0,004	0,0045	0,003	0,004	0,0035	0,198412698	0,158730159	0,178571429	±	0,028059793	0,119047619	0,158730159	0,138888889	±	0,028059793
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	±	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	±	0	0	0	0	±	0
Menta	0	0,013	0,013	0,013	0,014	0,014	0,014	0,742857143	0,742857143	0,742857143	±	0	0,8	0,8	0,8	±	0
	1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,476190476	0,476190476	0,476190476	±	0	0,476190476	0,476190476	0,476190476	±	0
	3	0,011	0,01	0,0105	0,01	0,01	0,01	0,75862069	0,689655172	0,724137931	±	0,048765985	0,689655172	0,689655172	0,689655172	±	0
	6	0,007	0,007	0,007	0,009	0,008	0,0085	0,421686747	0,421686747	0,421686747	±	0	0,542168675	0,481927711	0,512048193	±	0,042596794
Ruda	0	0,015	0,015	0,015	0,018	0,017	0,0175	0,857142857	0,857142857	0,857142857	±	0	1,028571429	0,971428571	1	±	0,040406102
	1	0,013	0,013	0,013	0,012	0,012	0,012	0,515873016	0,515873016	0,515873016	±	0	0,476190476	0,476190476	0,476190476	±	0
	3	0,005	0,005	0,005	0,004	0,004	0,004	0,344827586	0,344827586	0,344827586	±	0	0,275862069	0,275862069	0,275862069	±	0
	6	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,180722892	0,180722892	0,180722892	±	0	0,120481928	0,120481928	0,120481928	±	0
Toronjil	0	0,025	0,024	0,0245	0,027	0,025	0,026	1,428571429	1,371428571	1,4	±	0,040406102	1,542857143	1,428571429	1,485714286	±	0,080812204
	1	0,021	0,02	0,0205	0,022	0,022	0,022	0,833333333	0,793650794	0,813492063	±	0,028059793	0,873015873	0,873015873	0,873015873	±	0
	3	0,02	0,018	0,019	0,02	0,021	0,0205	1,379310345	1,24137931	1,310344828	±	0,09753197	1,379310345	1,448275862	1,413793103	±	0,048765985
	6	0,018	0,018	0,018	0,016	0,017	0,0165	1,084337349	1,084337349	1,084337349	±	0	0,963855422	1,024096386	0,993975904	±	0,042596794
Cedrón	0	0,025	0,024	0,0245	0,027	0,027	0,027	1,428571429	1,371428571	1,4	±	0,040406102	1,542857143	1,542857143	1,542857143	±	0
	1	0,017	0,017	0,017	0,021	0,021	0,021	0,674603175	0,674603175	0,674603175	±	0	0,833333333	0,833333333	0,833333333	±	0
	3	0,016	0,016	0,016	0,014	0,014	0,014	1,103448276	1,103448276	1,103448276	±	0	0,965517241	0,965517241	0,965517241	±	0
	6	0,014	0,014	0,014	0,013	0,012	0,0125	0,843373494	0,843373494	0,843373494	±	0	0,78313253	0,722891566	0,753012048	±	0,042596794
Ortiga	0	0,015	0,015	0,015	0,015	0,017	0,016	0,857142857	0,857142857	0,857142857	±	0	0,857142857	0,971428571	0,914285714	±	0,080812204
	1	0,013	0,012	0,0125	0,011	0,012	0,0115	0,515873016	0,45	0,482936508	±	0,046579256	0,436507937	0,476190476	0,456349206	±	0,028059793
	3	0,011	0,01	0,0105	0,008	0,009	0,0085	0,75862069	1,958333333	1,358477011	±	0,848324946	0,551724138	0,620689655	0,586206897	±	0,048765985
	6	0,006	0,006	0,006	0,004	0,004	0,004	0,361445783	0,882352941	0,621899362	±	0,368336984	0,240963855	0,240963855	0,240963855	±	0