

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

**“PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES:
DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA”**

Tesis previa a la obtención
del título de Bioquímica y
Farmacéutica

AUTORES:

ANA VICTORIA CARRIÓN JARA
CÁNDIDA RAFAELA GARCÍA GÓMEZ

DIRECTORA:

DRA. ISABEL WILCHES A.

CUENCA - ECUADOR

2010

ÍNDICE

Índice de Gráficos y Figuras

Gráfico 1.1 Estructura molecular base de los flavonoides	15
Gráfico 1.2 Ruta de biosíntesis de los flavonoides en las plantas	16
Gráfico 1.3 Estructura molecular base de la flavanona	17
Gráfico 1.4 Estructura molecular del Dihidroflavonol	17
Gráfico 1.5 Estructura molecular del Flaván-3,4-diol	18
Gráfico 1.6 Estructura molecular de la flavona	18
Gráfico 1.7 Estructura molecular del flavonol	18
Gráfico 1.8 Estructura química de la quercetina	19
Gráfico 1.9 Estructura molecular de las antocianinas	20
Gráfico 1.10 Estructura molecular de la isoflavona	20
Gráfico 1.11 Estructura molecular de la neoflavona	20
Gráfico 1.12 Estructura molecular de la charcona	21
Gráfico 1.13 Estructura molecular de la aurona	21
Figura 2.1 Desecador. Modelo Pro 3 Cuenca-Ecuador	45
Figura 2.2 Evaporador rotativo Laborota 4000 efficient	49
Figura 2.3 Diagrama de estado del agua	52
Figura 2.4 Liofilizador	53
Figura 2.5 Espectrofotómetro Genesys 10	58
Gráfico 3.1 Ilustración comparativa de los pesos de extractos secos obtenidos con los dos métodos de estudio	69
Gráfico 3.2 Ilustración de la determinación cualitativa de flavonoides mediante la reacción de Shinoda	75
Gráfico 3.3 Ilustración de la Curva de Calibración para cuantificación espectrofotométrica de Quercetina a 415 nm	77
Gráfico 3.4 Ilustración comparativa del promedio de concentraciones entre el método 1 y 2	80
Gráfico 3.5 Ilustración de la modificación en la Curva de Calibración utilizando la Quercetina como estándar a 415 nm	81
Gráfico 3.6 Gráfico comparativo entre la media de las concentraciones de flavonoides con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) para el método 1.....	88

Gráfico 3.7 Gráfico comparativo entre la media de las concentraciones de flavonoides con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) para el método 2	88
Gráfico 3.8 Ilustración de la interacción entre las medias de concentración del método 1 y 2 a partir del análisis estadístico ANOVA	88
Gráfico 3.9 Ilustración de la interacción entre las medias de concentración del método 1 y 2 modificados a partir del análisis estadístico ANOVA	91

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Cuadro resumen de los principales metabolitos vegetales primarios y secundarios.....	11
Tabla 1.2 Ventajas de la Maceración y la Percolación	29
Tabla 1.3 Desventajas de la Maceración y la Percolación	30
Cuadro 2.1. Características del Etanol	35
Cuadro 2.2. Características del Ácido Clorhídrico	36
Cuadro 2.3. Características de Limaduras de Magnesio	36
Cuadro 2.4. Características del Acetato de Plomo	37
Cuadro 2.5. Características del Acetato de Sodio	37
Cuadro 2.6. Características del Nitrato de Aluminio	38
Cuadro 2.7. Características de la Quercetina	38
Cuadro 2.8. Características del Agua Purificada	39
Cuadro 2.9. Características del Nitrógeno Comprimido	40
Cuadro 2.10. Características del cloroformo	41
Cuadro 2.11. Características del metanol	42
Cuadro 2.12. Características del ácido fórmico	42
Cuadro 2.13. Características del agua destilada	43
Tabla 3.1 Cuadro de muestra de plantas medicinales que contienen flavonoides.....	73
Tabla 3.2 Cuadro de pesos y partes de las plantas medicinales seleccionadas.....	66
Tabla 3.3 Cuadro de pesos de la droga seca de las plantas medicinales con sus respectivos volúmenes de extracto (V1 y V2)	68
Tabla 3.4 Cuadro de pesos de la droga seca de las plantas medicinales con sus respectivos volúmenes de extracto (V1, V2, V3) obtenidos por expresión luego cada maceración y el total del volumen alcanzado	70
Tabla 3.5 Cuadro de pesos de los extractos secos obtenidos aplicando los Métodos 1 y 2.....	72

Tabla 3.6 Cuadro de resultados de la Reacción de Shinoda para determinación cualitativa de flavonoides	90
Tabla 3.7 Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para quercetina	76
Tabla 3.8 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides obtenidos empleando el método 1.....	78
Tabla 3.9 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides obtenidos empleando el método 2	79
Tabla 3.10 Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para quercetina	81
Tabla 3.11 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides modificados, obtenidas empleando el método 1.....	83
Tabla 3.12 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides modificados obtenidas empleando el método 2.....	84
Tabla 3.13 Cuadro de plantas medicinales con sus promedios de concentración con la adición de acetato de plomo y sin la dición de acetato de plomo para el método 1.....	86
Tabla 3.14 Cuadro de plantas medicinales con sus promedios de concentración con la adición de acetato de plomo y sin la dición de acetato de plomo para el método 2	87
Tabla 3.15 Cuadro de los grados de libertad, F experimental, probabilidad y valor crítico para F obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción	89
Tabla 3.16 Cuadro de los grados de libertad, F experimental, probabilidad y valor crítico para F obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción modificados.....	90

Índice General

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

RESUMEN 1

JUSTIFICACIÓN3

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN USADOS EN PLANTAS MEDICINALES	4
1.2 ORIGEN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE USO EN FARMACIA	9
1.2.1 GENERALIDADES	9
1.2.1.1 Drogas Vegetales	9
1.2.1.2 Principios Activos	9
1.2.1.2.1 Metabolitos Primarios y Secundarios	10
1.2.1.2.1.1 Metabolitos Secundarios	11
1.3 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES	23
1.3.1 Selección	23
1.3.2 Recolección	24
1.3.3 Conservación	24
1.3.4 Almacenamiento	26
1.4 EXTRACCIÓN	27
1.4.1 TIPOS DE EXTRACCIÓN	27
1.4.1.1 Percolación	27
1.4.1.2 Maceración	28
1.4.1.3 Decocción	29
1.4.1.4 Infusión	29
1.4.1.5 Digestión	29
1.4.2 EXTRACTOS	30
1.4.2.1 Extractos Fluidos	30
1.4.2.2 Extractos Secos	30
1.4.2.3 Extractos Blandos	31
1.4.2.4 Crioextractos	31

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 MATERIALES	34
2.1.1 Materiales para elaborar los extractos	34
2.1.1.1 Etanol	34
2.1.2 Materiales para la determinación de Flavonoides	35
2.1.2.1 Ácido Clorhídrico	35

2.1.2.2	Limaduras de Magnesio	36
2.1.2.3	Acetato de Plomo	36
2.1.3	Materiales para la cuantificación de flavonoides	37
2.1.3.1	Acetato de Sodio	37
2.1.3.2	Nitrato de Aluminio	38
2.1.3.3	Quercetina	38
2.1.4	Materiales para la liofilización	39
2.1.4.1	Agua Milli Q	39
2.1.4.2	Nitrógeno Comprimido	39
2.1.5	Materiales para Cromatografía en Capa Fina	41
2.1.5.1	Fase Móvil	41
2.1.5.1.1	Cloroformo	41
2.1.5.1.2	Metanol	42
2.1.5.1.3	Ácido Fórmico	42
2.1.5.1.4	Agua Destilada	43
2.1.6	Materiales para la Fase Estacionaria	43
2.1.6.1	Silica Gel	43
2.1.6.2	Patrón	43
2.1.6.3	Muestras	43
2.1.7	Cálculos	44
2.2 MÉTODOS		45
2.2.1	Método de Desección	45
2.2.2	Método de Pesado	46
2.2.3	Método de Extracción	46
2.2.3.1	Percolación según USP XXX (MÉTODO 1)	46
2.2.3.2	Maceración según L. Tona, K. Kambu, N. Ngimbi, K. Cimanga, A. J. Vlietinck (MÉTODO 2).....	48
2.2.4	Método de Evaporación del Líquido Extractivo	48
2.2.4.1	Concentración mediante Rotavapor	49
2.2.4.2	Baño María provisto de Ultrasonido o Sonicador	51
2.2.4.3	Concentración mediante uso de Nitrógeno	52
2.2.4.4	Método de Liofilización	52
2.2.5	CROMATOGRAFÍA	55

2.2.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES	56
2.2.6.1 ANÁLISIS CUALITATIVO: Reacción de Shinoda	57
2.2.6.2 ANÁLISIS CUANTITATIVO: Espectrofotometría	57
2.2.6.3 Modificación del Método de Detección de Flavonoides	60
2.2.7 Análisis Estadístico: ANOVA	61

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de drogas vegetales	64
3.2 Proceso de Secado y Pesado	65
3.3 Preparación de Extractos fluidos por Percolación USP XXX (Método 1)	67
3.4 Preparación de Extractos fluidos por Maceración según el método de Tona y col. (Método 2)	69
3.5 Obtención de Extractos secos a partir del Método 1 y Método 2	71
3.6 Detección de Flavonoides Totales	73
3.6.1 Cualificación de Flavonoides Totales	73
3.6.2 Cuantificación de Flavonoides Totales	76
3.6.2.1 Curva de Calibración	76
3.6.2.2 Cuantificación de Flavonoides en los extractos obtenidos mediante método 1 y 2	77
3.7 Modificación en la determinación de Flavonoides Totales	80
3.7.1 Curva de Calibración	80
3.7.2 Modificación en la cuantificación de Flavonoides mediante los métodos 1 y 2	82
3.7.3 Comparación del promedio de las concentraciones con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) y sin la dición de acetato de plomo en los método 1 y 2	85
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
4. CONCLUSIONES	93
5. RECOMENDACIONES	95

6. BIBLIOGRAFÍA	97
7. GLOSARIO	105
8. ABREVIATURAS	107
7. ANEXOS	109

“Nunca consideres el estudio como un deber, sino como una oportunidad para penetrar en el maravilloso mundo del saber”.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Al culminar nuestra tesis queremos agradecer en primer lugar a Dios por habernos dado fortaleza y sabiduría para asumir los retos que se nos presentaron a lo largo de la misma.

A nuestras madres queridas por brindarnos el apoyo incondicional, quienes siempre nos alentaron a seguir adelante y a no rendirnos hasta cumplir nuestros sueños.

Un agradecimiento muy especial a nuestra directora de tesis la doctora Isabel Wilches A., quien nos brindó su apoyo, dedicación y ante todo paciencia al momento de responder nuestras dudas e inquietudes.

Además agradecemos a las personas que de uno u otro modo nos han colaborado en el desarrollo de nuestra tesis, dedicando parte de su tiempo a brindarnos sus conocimientos y consejos:

Dr. Fabián León

Dra. Nancy Cuzco

Dra. Eugenia Peñaherrera

Ing. Vladimiro Tobar

Dra. Lourdes Jerves

Dra. Raffaella Anzaloni

Ing. Karina Quinde

Dra. Adelina Astudillo

Dr. Jaime Ulloa

Dra. Marcela Galarza

Dra. Silvana Donoso

No podemos dejar de agradecer al proyecto VLIR de Plantas Medicinales por habernos abierto las puertas de sus instalaciones para el desarrollo práctico de nuestra tesis, ya que sin sus equipos y materiales no habría sido posible la realización de la misma.

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado principalmente a Dios y a la Virgencita de la Nube quienes han sido mis guías espirituales y por medio de quienes he logrado culminar otra meta de mi vida.

A mi madre querida **MÉLIDA** por haberme dado su apoyo en todo momento, por ser mi mejor amiga y quien puso su alma, vida y corazón en mi crianza, a ti mamita gracias por ser como eres y por ofrecerme tu paciencia y comprensión.

A mi esposo **LUIS MIGUEL** por ser mi compañero y amigo con el que comparto mis penas y alegrías, quien me ha enseñado que la vida es un camino por recorrer y que es mejor cuando estamos juntos.

A la personita más importante en mi vida mi hijo **LUIS ALEJANDRO**, por quien me encuentro aquí culminando un sueño más, a ti hijo querido por ser mi aliento, mis ganas de luchar y de seguir adelante. Gracias por existir.

A mis papás **LUIS REMIGIO (+)** y **LUIS ENRIQUE (+)** que cada uno en su momento supo darme su amor y cariño incondicional, quienes me dieron su ejemplo de responsabilidad y perseverancia, a ellos que desde el cielo se que siguen velando por mi.

Ana Victoria Carrión Jara

DEDICATORIA

A **DIOS**, por darme la sabiduría y la fortaleza para culminar una etapa más de mi vida.

A **mi mami**, Marianita por ser mi guía permanente, quien siempre ha confiado en mí y me ha dado su amor incondicional.

A **mi hermana**, por su cariño y por esas palabras adecuadas en el momento oportuno.

A **mi hermano**, por su cariño y confianza que ha depositado en mí.

A **mi cuñada**, por su amistad y apoyo.

A **mis sobrinos**, por esas sonrisas y abrazos inocentes que alegran mis momentos tristes.

Cándida Rafaela García Gómez.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA

RESUMEN

Muchos artículos se han descrito sobre procesos de extracción de plantas medicinales, siendo la percolación y la maceración los métodos más importantes dentro de la literatura científica.

La presente investigación se ha planteado como hipótesis que la Percolación (USP XXX, United States Pharmacopeia, 30th revisión, 2006) es un método de extracción que permite la obtención de extractos secos con mayor concentración de principios activos que los extractos obtenidos según la técnica de extracción descrita por Tona y colaboradores y referida frecuentemente en la literatura científica actual; y los objetivos planteados que nos permitan responder a nuestra pregunta de investigación son los siguientes:

- Compilar los métodos de extracción reportados por la literatura científica actual.
- Recolectar, desecar y caracterizar botánicamente las plantas objeto de estudio.
- Fabricar extractos secos por percolación, según la USP XXX
- Fabricar extractos secos según metodología propuesta por Tona y colaboradores (Journal of Ethnopharmacology 61 (1998) 57-65).
- Comparar estadísticamente (estudio de la eficiencia) las medias de las concentraciones de flavonoides; determinadas colorimétricamente y expresados como concentración de quercetina.

Para la presente investigación se usaron veinte y cuatro plantas medicinales escogidas siguiendo criterios basados en revisiones bibliográficas en cuanto a su

uso etnomédico y que contengan flavonoides. A partir de la extracción por percolación según USP XXX y por maceración propuesta por Tona y colaboradores.

En todos los extractos obtenidos se cuantificaron los flavonoides mediante dos metodologías colorimétricas: Lock y colaboradores, obteniéndose resultados óptimos mediante la técnica de Martínez y colaboradores en la que se obvia la interferencia de la clorofila que contienen los extractos.

El rendimiento de los extractos obtenidos fue superior al usar la Percolación USP XXX en un 70.8% de las plantas usadas en la presente investigación, sin embargo el análisis estadístico ANOVA en el que se compararon las medias de las concentraciones de flavonoides ha permitido concluir que el método de extracción propuesto por Tona y colaboradores es más eficiente que el método de percolación según la USP XXX.

JUSTIFICACIÓN

No existen referencias bibliográficas sobre estudios experimentales que demuestren la mayor o menor eficiencia de los métodos de extracción referidos en la literatura científica y comparados con los métodos oficiales que se detallan en Farmacopeas como la USP XXX (United States Pharmacopeia, 30th revisión, 2006). La realización de un screening farmacológico requiere de una mayor concentración de principios activos, lo cual se consigue al preparar un extracto seco por agotamiento de los mismos, por lo que el estudio comparativo de las metodologías propuestas será un aporte importante para la investigación en este campo.

CAPÍTULO I



CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN USADOS EN PLANTAS MEDICINALES:

Revisión bibliografía científica actual

Los siguientes métodos de extracción para investigación son los detallados en la literatura científica actual en los últimos años:

1. En 1993, Franco S. L., obtuvo los extractos a partir de las hojas de las plantas problema, para lo cual empleó la maceración por cinco días y utilizó etanol al 50%.
2. En 1998, Tona L. y col., extraen los principios activos de varias plantas de las que se cree existe una actividad antiamebiana, para lo cual utilizaron maceraciones sucesivas con cambio de solvente, empleando etanol absoluto.
3. En 1999, Woodward Emily J., señala la extracción de principios activos mediante la decocción de salvia, el tomillo, orégano, y menta. Para lo cual se procedió a hervir un 1/4 taza (59.1 mililitros) de material de la planta disuelto en 1 taza (236.6 mililitros) de agua destilada durante 5 minutos. El recipiente que contiene la decocción fue cubierto y retirado del calor y se dejó enfriar durante 5 minutos. Se procedió a colar la decocción y el líquido obtenido se esterilizó mediante autoclave.
4. En 2002, Hosseinzadeh H., utilizó dos métodos para la obtención de los extractos, estos son la decocción acuosa, y maceración con el etanol. En la decocción, a un litro de agua caliente se agregó 100 gramos de la planta, se



hirvió durante 15 minutos y se filtró a través de una tela. Este extracto se concentró a presión reducida. En la maceración, se agregaron 200 gramos de la planta a 500 mililitros etanol (85%, v/v) y se maceró durante tres días. El macerado se filtró y se concentró bajo presión reducida a 50°C.

5. En 2004, Akhondzadeh y col., utilizaron el azafrán para extraer los principios activos, para lo cual usaron la percolación, tomaron 120 gramos de estigma triturada y secada con 1800 mililitros de etanol al 80%. Se obtuvo el extracto seco al evaporizar el extracto etanólico a una temperatura de 35-40°C.
6. En 2004, Raj Kapoor y col. utilizaron la percolación continua en caliente con 250 gramos de hojas trituradas de *Indigofera aspalathoides* y 450 mililitros de solvente (etanol al 95% v/v), durante ocho horas en un aparato Soxhlet.
7. En 2004, Nia y col., obtuvieron los extractos de diferentes partes de la planta (hojas, tallos, raíces), utilizando la percolación por 48 horas y usaron metanol al 100% como líquido extractor.
8. En 2004, Hoet y col., extrajeron los principios activos usando la percolación como método de extracción, para lo cual utilizaron 20-50 gramos de hojas o ramas secas trituradas, como líquido extractor se utilizó cloruro de metileno, metanol y agua, la cantidad de solvente fue de por lo menos diez veces la cantidad de la planta usada, la extracción duró aproximadamente 24 horas y se realizó a temperatura ambiente. Los extractos con cloruro de metileno y metanol fueron evaporados a sequedad a presión reducida a 30° C, mientras que el extracto con agua fue deshidratado por congelación.
9. En 2005, Vogel y col., obtuvieron los extractos usando la maceración y la infusión. En la maceración se utilizó 100 gramos de planta seca y 500 mililitros de metanol, macerándose por 72 horas, el solvente orgánico fue eliminado para obtener un extracto seco. En la infusión se utilizó 5 gramos de hojas secas tratadas con 50 ml de agua bidestilada hirviendo por cinco minutos. Los extractos fueron liofilizados.



10. En 2005, Moundipa y col., utilizan la maceración y la decocción para extraer los principios activos de algunas plantas medicinales. En la maceración se utilizó 50 gramos de la planta seca y 200 mililitros de metanol (v/v) se procedió a la maceración por 24 horas. La *Codiaeum variegatum* se extrajo en agua por decocción. El solvente fue evaporado usando un rotavapor. El residuo de cada extracto se conservó a - 41°C.
11. En 2005, Suvakanta y col. utilizaron la percolación para extraer los principios activos de la raíz de *Heracleum nepalense*, para lo cual se utilizó un Kilogramo de raíz pulverizada y tres litros de metanol al 70% v/v, a éste conjunto se lo colocó en un percolador por 72 horas y a temperatura ambiente.
12. En 2005, Chattopadhyay y col. utilizaron la percolación para extraer los principios activos de la *Azadirachta indica*, empleando un Kilogramo de planta pulverizada y como solvente al etanol al 70%, el proceso fue realizado a temperatura ambiente; luego el extracto fue concentrado sometándolo a presión reducida y desecado en una estufa.
13. En 2005, Tamboura y col., obtuvieron los extractos utilizando las hojas, tallos y raíces de las plantas en estudio, estas fueron secadas a temperatura ambiente, se utilizó 150 gramos de planta seca macerada con agua destilada a 48° C, el producto macerado fue filtrado a través del Rotavapor.
14. En 2006, Lino y col. utilizaron 200 gramos de la planta triturada para obtener extractos metanólicos y acuosos para lo que emplearon 500 mililitros de metanol al 99.5% y 1000 mililitros de agua destilada respectivamente, al conjunto de droga más solvente se lo sometió a un mezclador durante dos horas.
15. En 2006, Duraipandiyan y col. utilizaron el método de extracción en frío para la extracción de principios activos de 18 plantas, en donde se utilizó 50



gramos de planta seca y pulverizada que fue colocada en 600 mililitros de hexano por 48 horas con movimiento continuo, luego los extractos fueron filtrados y el filtrado resultante fue desecado hasta conseguir un peso seco constante. El residuo que quedó del filtrado anterior fue desecado y colocado en 300 mililitros de metanol y se procedió tal como se describió anteriormente.

16. En 2006, Ríos y col., obtuvieron el extracto de *Hamelia patens*, usando 790 gramos de hojas secas, y macerándolas por tres días con tres litros de acetona. El disolvente de maceración fue recuperado a presión reducida con ayuda de un evaporador rotatorio.
17. En 2006, Ouattara Y. y col., extrajeron los principios activos de diferentes plantas usando las raíces y hojas, utilizando como líquido extractor el metanol concentrado y metanol al 50% y agua. Para la extracción con agua se utilizó 20 gramos de planta seca y 200 mililitros de agua destilada y se realizó la percolación a diferentes tiempos: 1, 24 o 48 horas, se filtró los extractos y el filtrado se deshidrató por congelación. Para la extracción con metanol absoluto y metanol al 50% previo a la percolación se maceró por 24 horas con diclorometano para eliminar la clorofila y lípidos, para la percolación se utilizó 20 gramos de planta triturada y 200 mililitros de líquido extractor por 18 horas.
18. En 2007, Mahmoudabadi y col., obtuvieron los extractos por destilación utilizando diferentes solventes, procediendo de la siguiente manera a 100 gramos de droga seca se añadió 1400 mililitros de etanol, 1400 mililitros de metanol y 2150 mililitros de agua durante 24 horas, luego se filtró con una tela. Los extractos se concentraron a sequedad a una temperatura de 53 a 55°C.
19. En 2007, Gujrati y col., las hojas de *Tylothora indica* fueron desecadas a la sombra, el extracto alcohólico se obtuvo con 95% de alcohol v/v por 18 horas usando el Soxhlet. El extracto fue obtenido con la masa remanente



por maceración por siete días. Los extractos secos se obtuvieron a 50°C a baño maría.

20. En 2008, Dutra y col., obtienen extractos de las plantas a partir de 30 gramos de semillas previamente trituradas con algunos solventes como son: hexano, acetato de etilo, butanol, metanol usando el extractor de Soxhlet. Las fracciones fueron concentradas en un rotavapor hasta la eliminación completa del solvente.
21. En 2008, Said y col. utilizaron 10 Kilogramos de planta molida los cuales fueron extraídos con 30 gramos de planta y alcohol etílico al 50% por 2.5 horas a 70°C, luego se filtró y centrifugó; al residuo resultante se volvió a extraer con otros 30 Kilogramos de alcohol al 50%, uniéndose los dos extractos y desecándolos.
22. En 2008, Chan y col. utilizaron 2.5 gramos de *Folium Murraya keonigii*, 5 gramos de las partes aéreas de *Typhonium flageliforme*, cada uno fue extraído con 200ml de agua o etanol. Tres métodos de extracción fueron empleados: 1) agua a ebullición por 1 hora, 2) maceración por 24 horas en agua, 3) etanol al 80% v/v a temperatura ambiente.
23. En 2008, Sun y col. comparan la extracción por el método de ultrasonido frente al método de percolación y fluido supercrítico; donde tres variables (concentración del solvente, proporción de solvente/muestra (ml/g) y el tiempo de extracción) fueron incluidas, puesto que tienen gran influencia en la extracción por ultrasonido. La extracción óptima fue con etanol puro en una proporción solvente/muestra (ml/g) de 8:1 y el tiempo de extracción 30 minutos, obteniéndose con el método de ultrasonido 8.8% de rendimiento; éste método mostró mayor concentración de principio activo que los otros dos métodos utilizados.



1.2 ORIGEN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE USO EN FARMACIA

1.2.1 GENERALIDADES.

Los principios activos o fármacos tienen origen en las diferentes drogas que no son más que partes específicas de ciertos animales o plantas medicinales, de las cuales serán extraídas dichas sustancias con poderes curativos. Existen también fármacos de origen mineral, sin embargo el presente trabajo de investigación se centrará en los fármacos de origen vegetal.

1.2.1.1 Drogas Vegetales.

Son aquellas partes de una planta medicinal que contienen en mayor o menor proporción uno o varios de los principios activos que se extraerán posteriormente; y son hojas, flores, frutos, tallos, raíces, semillas. Las hojas son ricas en heterósidos y alcaloides, el tallo es solo una vía de tránsito entre las raíces y las hojas sin embargo pueden tener los principios activos en la corteza o en la albura. La raíz extrae el agua con sales minerales del suelo y la bombea hacia las hojas, acumula a menudo azúcares, otras veces vitaminas y alcaloides; la flor también contiene principios activos sobre todo es rica en pigmentos.

El conjunto de las pequeñas hojas y pedúnculos florales constituye las sumidades florales.

Los frutos carnosos constituyen una reserva de vitaminas, ácidos orgánicos y azúcares.

1.2.1.2 Principios Activos

Son los fármacos y son aquellos componentes de las plantas medicinales que tienen acción farmacológica y son extraídos a partir de una droga vegetal, con la finalidad de provocar una acción en el organismo, estos pueden ser de diferentes tipos y se los puede clasificar en dos grandes grupos: metabolitos primarios y



secundarios.

1.2.1.2.1 Metabolitos Primarios y Secundarios.

Las especies vegetales poseen diversos componentes en su estructura, los cuales sin lugar a duda son importantes para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de las plantas. Estos componentes son de diversa naturaleza química, por lo que se les clasifica en dos grandes grupos: orgánicos e inorgánicos.

Los componentes inorgánicos más importantes son el agua y los minerales.

El agua, se encuentra en cantidad variable de acuerdo a la especie y a la parte de la planta así, “las hojas y los tallos contienen más cantidad de agua, hasta un 80% en algunos casos, mientras que las semillas contienen menos cantidad” (Kuklinski, 2000).

Los minerales pueden presentarse en diversas formas como sales solubilizadas (cloruros, nitratos, fosfatos, etc.), sales cristalizadas (carbonato cálcico, oxalato cálcico, etc.), además se encuentran oligoelementos (magnesio, hierro, manganeso, flúor, etc.). Los minerales se encuentran combinados con las sustancias orgánicas dentro de las especies vegetales.

Dentro de los **componentes orgánicos** podemos citar tanto a los metabolitos básicos o primarios relacionados con el metabolismo esencial celular y los metabolitos secundarios que no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial pero son en su mayoría responsables de la actividad terapéutica de las drogas vegetales, los más importantes se resumen en la Tabla 1.



Compuestos procedentes del Metabolismo Primario	Compuestos procedentes del Metabolismo Secundario
<ul style="list-style-type: none">• Glúcidos• Lípidos y Grasas• Aminoácidos• Proteínas• Ácidos Nucleicos• Compuestos Nitrogenados (glucósidos cianogenéticos, enzimas)	<ul style="list-style-type: none">• Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos• Derivados Fenólicos: fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides: antocianinas• Alcaloides

Tabla 1.1 Resumen de los principales metabolitos vegetales primarios y secundarios. (Kuklinski; 2000, p.p: 51)

Debido a que nuestro estudio requiere la utilización de los metabolitos secundarios para la comparación de los métodos propuestos, se describirán brevemente los mismos, poniendo énfasis en los Flavonoides los cuales han sido escogidos para realizar el análisis.

1.2.1.2.1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Las rutas metabólicas básicas constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dando lugar a una variada serie de compuestos, algunos de estos son responsables de olores, colores de los vegetales, otros son responsables de virtudes culinarias, medicinales o venenosas.

Los metabolitos secundarios se acumulan en grandes cantidades en las células



vegetales o pueden ser expulsados fuera de éstas.

Los metabolitos secundarios más importantes son:

1.2.1.2.1.1.1 ISOPRENOIDES

Se forman a través de la ruta del ácido mevalónico a partir de la AcetilCoA, en donde se incorpora unidades de C₅, presentan estructuras diversas y pueden encontrarse como tal o formando parte de compuestos más complejos.

A los isoprenoides se los puede clasificar de la siguiente manera:

A.1 TERPENOS

Los elementos estructurales básicos de los terpenos se conocen como unidades de isopreno, porque los terpenos pueden descomponerse a elevadas temperaturas dando isopreno.

B.2 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son sustancias volátiles de naturaleza compleja, con frecuencia están asociadas a gomas y a resinas. Estas esencias se encuentran exclusivamente en vegetales superiores.

Muchos aceites esenciales son de origen terpenoide, solo un pequeño número de ellos contienen derivados aromáticos (bencénicos) mezclados con terpenos.

C.3 SAPONINAS

Son estructuras formadas por una parte glusídica y una parte no glusídica (aglicón) y su nombre se debe a sus propiedades jabonosas.



D.4 HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

Están formados por una parte glusídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un aglicón que tiene un núcleo esteroídico (C₂₇ tetracíclico) unido a un anillo lactónico insaturado. (Kuklinski, 2000)

1.2.1.2.1.1.2 ALCALOIDES

Los alcaloides típicos son de origen vegetal, contienen uno o más átomos de nitrógeno (generalmente en anillo heterocíclico).

1.2.1.2.1.1.3 DERIVADOS FENÓLICOS

Las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo hidroxilo en un anillo aromático, que les confiere una estructura fenólica. Existen dos rutas básicas implicadas en su biosíntesis: La **ruta del acetato** que conduce a la formación de cadenas policíclicas que mediante ciclación, dan lugar a compuestos policíclicos aromáticos y la **ruta del ácido shikímico** que es precursor de una serie de ácidos benzoicos hidroxilados y aminados. En la mayoría de los casos los compuestos aromáticos provienen de ésta ruta y suelen formarse por desaminación de aminoácidos aromáticos. (Encarna, 2007).

Se describirán los compuestos fenólicos más importantes, entre ellos tenemos: fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides: antocianinas, etc.

a.1) FENOLES SIMPLES

Son poco frecuentes y se encuentran en las plantas en forma de heterósidos.

b.2) ÁCIDOS FENÓLICOS

Se pueden encontrar libres o unidos a azúcares (heterósidos), pueden formar ésteres al unirse tanto con el ácido quínico como con otro ácido fenólico.



c.3) TANINOS

Los taninos poseen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica.

d.4) CUMARINAS

Las cumarinas son derivados de la benzo- α -pirona, muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos.

e.5) LIGNANOS

Los lignanos son compuestos que poseen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano.

f.6) QUINONAS

Son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles.

g.7) FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen un grupo amplio de fenoles naturales, se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos.

En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos, de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre. (Evans, 1991)

Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y policétidos. Están ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores, frutos.

g.7.1 Estructura.

Los flavonoides poseen como unidad básica un esqueleto de quince átomos de carbono provenientes de la malonil CoA y del p-cumaril CoA. Son estructuras del tipo C6-C3-C6 con dos anillos aromáticos (A y B) unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno (anillo C). Todos los flavonoides poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las



posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C_3 y en el anillo B. son estructuras hidroxiladas (OH) en el anillo aromático y por lo tanto son estructuras polifenólicas. De los tres anillos, el anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el anillo B y C proceden de la ruta del ácido shikímico

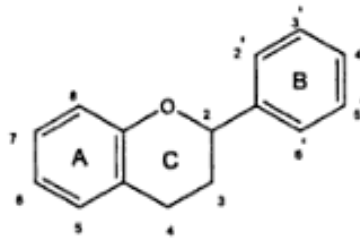


Figura 1.1 Estructura molecular base de los flavonoides

g.7.2 Biosíntesis

La vía del ácido shikímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido shikímico, del cual derivan directamente algunos fenoles en los vegetales. Pero la vía del ácido shikímico normalmente prosigue, y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina.

La vía biosintética de los flavonoides comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumarínico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en cumaril-SCoA, el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides.

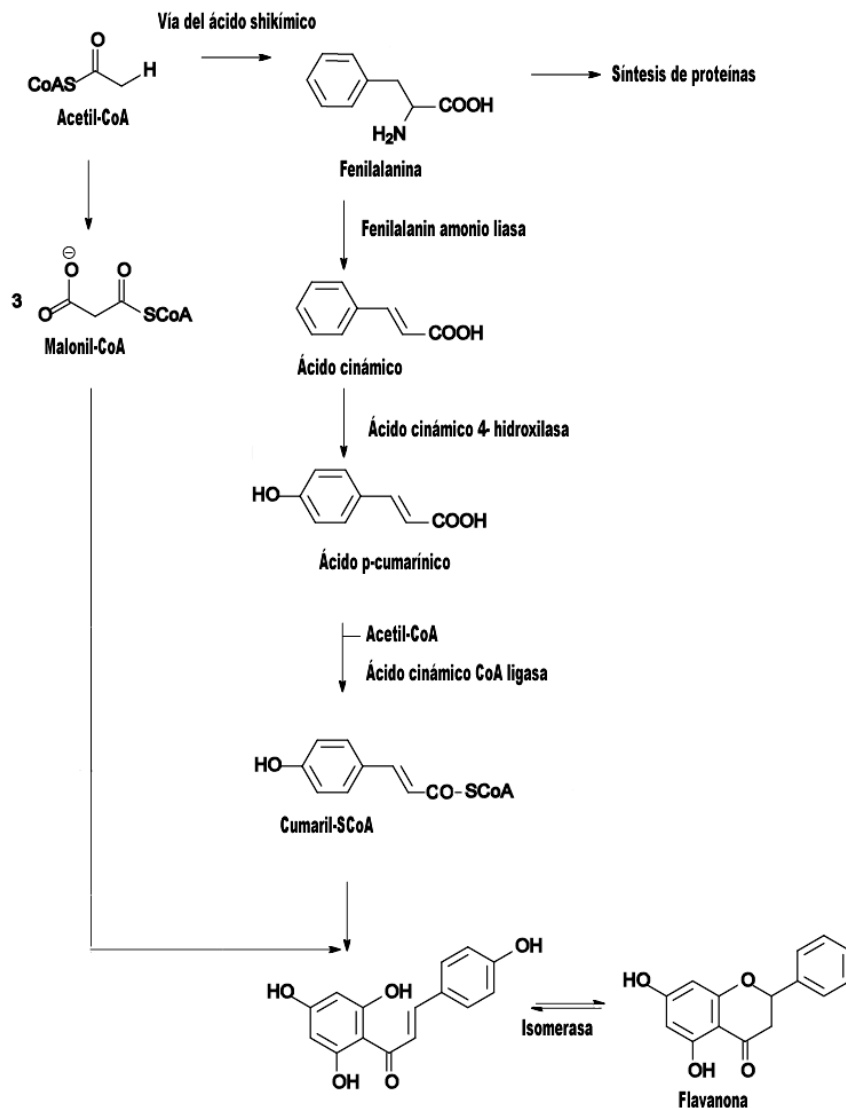


Figura 1.2 Ruta de biosíntesis de los flavonoides en las plantas

La biosíntesis de los flavonoides se regula mediante dos vías:

- La vía del ácido shikímico que es dependiente de la luz.
- La acción de la fenilalanina amonioliasa, que inicia la vía biosintética de los flavonoides, es también activada por la luz pero depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. Su actividad suele



aumentar cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como puede ser la falta de agua, infecciones fúngicas o bacterianas, radiaciones UV y el frío.

g.7.3 Clasificación de los flavonoides

Según Romo de Vivar, los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base, teniéndose, así:

Flavanona: cuando la estructura base posee un grupo carbonilo en la posición cuatro. Son precursores de otros flavonoides más complejos, pero se encuentran como tales en altas concentraciones en los cítricos.

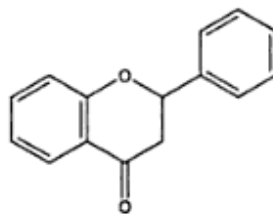


Figura 1.3 Estructura molecular base de la flavanona.

Dihidroflavonol: cuando además de poseer la estructura base un carbonilo, se hidroxila la posición tres.

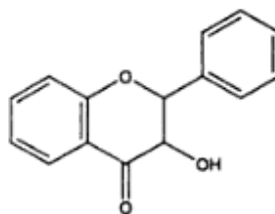


Figura 1.4 Estructura molecular del Dihidroflavonol.

Flaván-3,4-diol: cuando en el dihidroflavonol se reduce el grupo carbonilo de la posición cuatro.

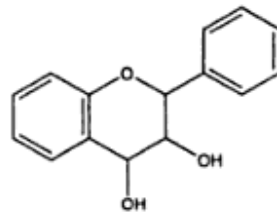


Figura 1.5 Estructura molecular del Flaván-3,4-diol

Flavona: cuando se introduce un doble enlace entre las posiciones dos y tres de la flavanona. Son amarillas y pueden estar en algunas flores o frutos. Son frecuentes en los tejidos jóvenes, se encuentran tanto en estado libre como en forma de heterósidos. La intensidad de su color amarillo aumenta con el número de grupos hidroxilos y el incremento del pH.

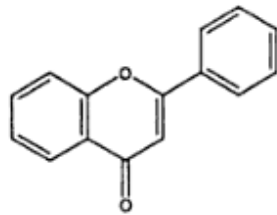


Figura 1.6 Estructura molecular de la flavona

Flavonol: cuando se introduce un doble enlace entre las posiciones dos y tres del dihidroflavonol.

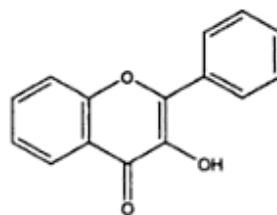


Figura 1.7 Estructura molecular del flavonol

Dentro de éste grupo se describirá a la Quercetina que es el más importante dentro de este grupo de flavonoles.



- **Quercetina**

Se obtiene por hidrólisis de la quercetrina. La quercetina es un flavonoide que proporciona el color a flores, frutas, hortalizas. Presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antihistamínicas, entre otras.

Las fuentes principales de flavonoles son, entre otras el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra que contienen cerca de 4 g/kg de quercetina.

La quercetina ofrece una variedad de posibles usos terapéuticos, principalmente en la prevención y tratamiento de las siguientes condiciones:

Alergias, el asma y la urticaria: la quercetina puede inhibir la liberación de histamina de los basófilos y los mastocitos.

Cáncer: la quercetina puede ser beneficiosa en el tratamiento de cáncer de piel y puede tener efectos anti-tumor en otros tipos de cáncer.

Aftas: la quercetina puede reducir la frecuencia de las llagas en la boca y produce alivio de los síntomas leves.

Diabetes mellitus: la quercetina podría ayudar a prevenir las cataratas, trastornos de la retina, enfermedades nerviosas, y otras complicaciones de la diabetes. Los flavonoides, como la quercetina, también promueven la secreción de insulina, aumentar los niveles de vitamina C, protege los vasos sanguíneos, prevenir moretones con facilidad, y apoyan el sistema inmune.

Infección: La quercetina puede controlar la propagación de ciertos virus en el cuerpo.

Artritis reumatoide: la quercetina podría ayudar a reducir la destrucción del tejido.

La quercetina también puede ser beneficiosa en el tratamiento de la disentería, gota, y la psoriasis.

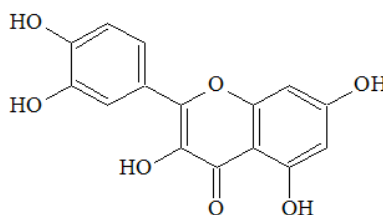


Figura 1.8 Estructura química de la quercetina



Antocianinas: poseen un sistema conjugado de dobles ligaduras, que le confiere características coloridas típicas.

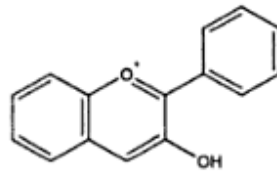


Figura 1.9 Estructura molecular de las antocianinas

Isómero de isoflavona: cuando el anillo C se une a través del carbono tres o cuatro del esqueleto general.

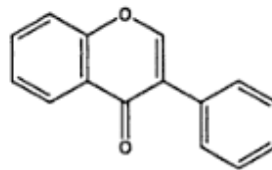


Figura 1.10 Estructura molecular de la isoflavona

Isómero de neoflavona: cuando el anillo C se une a través del carbono tres o cuatro del esqueleto general.

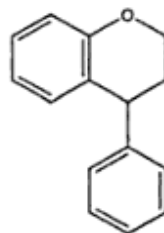


Figura 1.11 Estructura molecular de la neoflavona.

Chalcona: cuando el esqueleto de 15 átomos de carbono no forma un heterósido. Están implicadas en la estimulación de la polinización gracias a que inducen el



desarrollo de colores en el espectro visible y en el UV que atraen a insectos (mariposas y abejas).

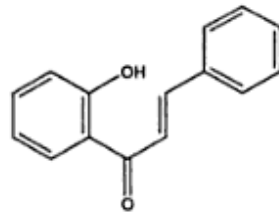


Figura 1.12 Estructura molecular de la chalcona

Aurona: cuando el heterósido C formado es de cinco miembros. Son responsables de la coloración de algunas plantas.

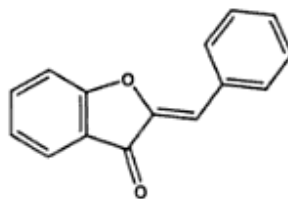


Figura 1.13 Estructura molecular de la aurona

g.7.4 Propiedades

- **Solubilidad**

Aglicones: son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en compuestos orgánicos.

Heterósidos: son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en compuestos orgánicos apolares.



- **Acidez**

Son ionizables en medio básico (debido a la función fenol). Producen generalmente soluciones amarillas que al acidificar cambian a incoloras.

- **Capacidad de formar quelatos**

Ciertos grupos funcionales de los flavonoides son capaces de formar complejos con metales como el hierro, aluminio, etc.

- **Antioxidación**

Se oxidan con mayor rapidez que otros compuestos. Por lo que se los utiliza en la conservación de grasas y jugos de frutas.

g.7.5 Funciones protectoras en los vegetales

- Antibacterianos
- Dan coloración y sabor característico de las partes vegetales que los poseen.
- Proporcionan protección contra las radiaciones UV.

g.7.6 Actividad terapéutica

Los flavonoides disponen de las siguientes propiedades farmacológicas: antihemorrágicos, antiarrítmicos, protectores de la pared vascular, antiinflamatorios, antihepatotóxicos, antimicrobianos, diuréticos y antiurémicos, antiespasmódicos, etc. (Kuklinski, 2000)



1.3 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES

Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de salud. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo.

La obtención de las drogas vegetales se realiza a partir de las plantas medicinales, las cuales se pueden clasificar en silvestres y cultivadas.

1.3.1. Selección

La selección de las plantas se realiza según el contenido del principio activo en las diferentes drogas, así también, que permita su fácil recolección y manipulación.

Se pueden describir dos tipos de selección:

- Aquella que nos permite seleccionar las mejores plantas de cada cosecha.
- Selección que consiste en modificar genéticamente a una planta en particular, para obtener plantas con características deseadas.

1.3.2. Recolección

La recolección de las especies vegetales depende de las características de cada especie, esta puede ser manual o mecanizada.

Según Kuklinski, los factores que afectan la concentración de los principios activos en las drogas vegetales son:

- La edad de la especie vegetal: no solo influye en la cantidad total de principio activo, sino también en la proporción de los componentes de la mezcla activa.
- La época del año: el clima y la época del año influye en la cantidad de



principio activo.

- Hora del día: se ha evidenciado que existe una variación del día a la noche, en los metabolitos vegetales secundarios.

1.3.3. Conservación

Al ser arrancados de su medio natural, los vegetales ven alterado su equilibrio metabólico por lo que se presentan reacciones y fenómenos de degradación. Las causas de alteración pueden ser internas y externas:

1.3.3.1 Causas internas

- a. Reacciones enzimáticas.
- b. Autooxidaciones.
- c. Reacciones entre diferentes componentes de la droga.

1.3.3.2 Causas externas

- A. Calor
- B. Humedad
- C. Radiaciones
- D. Microorganismos
- E. Insectos, etc.

Existen dos métodos para evitar la acción enzimática:

a.1) INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

Es un proceso reversible, consiste en eliminar el agua de la droga hasta valores inferiores al 10%. Al disminuir la cantidad de agua las enzimas detienen su actividad, quedando inhibidas, por lo que se puede conservar la droga vegetal.



a.1.1 Procedimientos para eliminar el agua

a.1.1.1 Deseccación

La desecación puede realizarse de manera lenta cuando es necesario estimular la acción enzimática, o puede ser rápida cuando se quiere evitar la misma.

El proceso de desecación lo podemos dividir en:

Deseccación natural: es un proceso lento, económico. Se pueden emplear cobertizos, bandejas, telas metálicas galvanizadas, papeles extendidos sobre un armazón de madera, etc.

Deseccación artificial: permite un control de la temperatura, de la humedad y del tiempo que tarda el proceso. Es generalmente el más adecuado, de corta duración, útil en donde la humedad es muy elevada.

Para la desecación artificial se puede utilizar: túneles de secado, torres de secado, estufa al vacío, etc.

“La desecación artificial contribuye a que las flores y hojas conserven su color y las drogas aromáticas su aroma, pero la temperatura empleada en cada caso ha de ajustarse en función de los componentes y la naturaleza física de la droga. Como regla general, las hojas, sumidades y flores deben secarse entre 20 y 40 °C y las cortezas y raíces de 30 a 65 °C” (Evans, 1991)

Con la desecación artificial se debe tener siempre presente determinar el punto exacto de desecación; debido a que si las drogas delicadas se desecan en exceso se tornan quebradizas, tendiendo a romperse durante el transporte.

a.2) INACTIVACION ENZIMATICA

Este proceso de conservación es irreversible y consiste en la destrucción de las enzimas; con lo que se consigue que la planta no se degrade. A continuación se



enumeran varios métodos para la inactivación enzimática:

- Con alcoholes a ebullición
- Con vapores líquidos (vapor de agua, vapores alcohólicos)
- Con calor seco

1.3.4. Almacenamiento

Para el almacenamiento de las drogas vegetales se necesita de lugares frescos y secos.

“Las drogas almacenadas en envases usuales (sacos, cajones de madera, cajas de cartón y bolsas de papel) absorben aproximadamente de 10 a 12% de humedad” (Evans. William, 1991).

Se debe tomar en cuenta tanto la humedad propia de la droga y la humedad ambiental. Para controlar este problema se recomienda colocar las drogas en envases herméticos con un agente deshidratante. El tiempo almacenamiento es variable dependiendo de la parte de la planta. Las drogas deben ser perfectamente rotuladas para su fácil identificación.



1.4 EXTRACCIÓN

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo. A continuación se citarán los métodos de extracción más importantes:

1.4.1 TIPOS DE EXTRACCIÓN

1.4.1.1 Percolación

Es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP XXX. Es un método que consiste en que el menstro (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de menstro acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva. (Selles, 1992)

Éste tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el menstro y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. “La percolación es el método extractivo menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las drogas son muy voluminosas” (Voigt, 1979)

Cabe recalcar que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del menstro en las membranas celulares durante la percolación.



1.4.1.2 Maceración

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstruo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstruo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular. (Selles, 1992)

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento”. (Voigt, 1982)

Las tablas 1.2 y 1.3 nos muestran algunas ventajas y desventajas entre los procedimientos de extracción (percolación y maceración) más utilizados dentro de la Fitoquímica:

Maceración	Percolación
Sirve para drogas rígidas (tallos, raíces)	Extracción completa de principios activos y es posible conocer la concentración exacta de principios activos.
Reducción de costos de solventes	No se produce saturación del solvente y se requiere menor tiempo para la extracción comparado con la maceración.

Tabla 1.2 Ventajas de la Maceración y la Percolación.



Maceración	Percolación
Lentitud del proceso	Alto consumo de solvente
Extracción incompleta de la droga	
Saturación del solvente	

Tabla 1.3 Desventajas de la Maceración y la Percolación.

1.4.1.3 Decocción

Llamada también **cocimiento**, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga más menstuo a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos. (Selles, 1992)

1.4.1.4 Infusión

Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5%.

1.4.1.5 Digestión

“Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C”. (Selles, 1992) Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos.



1.4.2 EXTRACTOS

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos.

1.4.2.1 Extractos Fluidos

Los extractos fluidos son extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación. (Voigt, 1982)

1.4.2.2 Extractos Secos

Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5%. (Voigt, 1982) Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua.

Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados que son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos.



1.4.2.3 Extractos Blandos

Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga* original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan.

1.4.2.4. Crioextractos

Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70°C. (Castillo, 2007) Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies.

CAPÍTULO II



CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materiales para elaborar los extractos

Los solventes (menstruos) para preparar los extractos deben cumplir con los requisitos para los excipientes de uso farmacéutico señalados en las farmacopeas. A continuación describiremos las materias primas empleadas para la elaboración de los extractos objeto de nuestro estudio:

2.1.1.1 Etanol

Líquido incoloro, claro volátil y móvil. Aun a bajas temperaturas se volatiliza rápidamente. Olor suave característico y sabor ardiente. Es inflamable. Hierve a cerca de 78°C (Farmacopea Mexicana, 1988).

En el tabla 2.1 se enumeran las especificaciones del producto usado.



Producto: Etanol absoluto Proveedor: Merck No lote: 1.00983.2500	
Características	Valor
Pureza (GC)	= 99.9 %
Color	= 10 Hazen
Densidad (20 °C)	0,790 – 0,793 g/cm ³
Viscosidad (20 °C)	1,2 mPas
Valor de pH (10 g/l H ₂ O, 20 °C)	7,0
Punto/intervalo de fusión	-114,5 °C
Punto/intervalo de ebullición	78,3 °C
Presión de vapor (20 °C)	59 hPa
Punto de ignición	425 °C
Punto de destello	12 °C
Solubilidad en agua (20 °C)	Miscible
Acidez o alcalinidad	< 30 ppm

Tabla 2.1 Características del Etanol

2.1.2 Materiales para la determinación de Flavonoides (Reacción de Shinoda)

A continuación se describirán los reactivos que son utilizados para la reacción general de identificación de flavonoides:

2.1.2.1 Ácido Clorhídrico

En el tabla 2.2 se describen las características del Ácido Clorhídrico, provistas por el proveedor Merck.



Producto: Ácido Clorhídrico	
Proveedor: Universidad de Cuenca	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Densidad del líquido (1.013 bar en el punto de ebullición)	1191 kg/m ³
Punto de ebullición (1.013 bar)	-85.1 °C
Presión de vapor (a 20 °C o 68 °F)	42.6 bar
Temperatura Crítica	51.4 °C
Presión Crítica	82.58 bar

Tabla 2.2 Características del Ácido Clorhídrico

2.1.2.2 Limaduras de Magnesio

La PANREAC (Panamericana de Reactivos) señala las siguientes características para las limaduras de magnesio que se detallan en la tabla 2.3.

Producto: Limaduras de Magnesio	
Proveedor: Universidad de Cuenca	
No lote: No disponible	
Ensayos	Características
Punto de Fusión	651°C
Punto de Ebullición	1107°C
Densidad (20/4)	1.75
Solubilidad	Insoluble en agua

Tabla 2.3 Características de Limaduras de Magnesio

2.1.2.3 Acetato de Plomo

En la tabla 2.4 se describen las características del Acetato de Plomo, descritas por Merck.



Producto: Acetato de Plomo	
Proveedor: Universidad de Cuenca	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Densidad	2.5g/cm ³ (20°C)
Masa	379.34 g/mol
Punto de Fusión	75°C
Solubilidad en Agua	443g/l (20°C)
pH	5.5 – 6.5 (50g/l, H ₂ O, 20°C)

Tabla 2.4 Características del Acetato de Plomo

2.1.3 Materiales para la cuantificación de flavonoides

2.1.3.1 Acetato de Sodio

En la tabla 2.5 se describen las características del Acetato de Sodio, provistas por Merck.

Producto: Acetato de Sodio	
Proveedor: Merck	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Densidad	1.52 g/cm ³ (20 °C)
Punto de ebullición	> 400 °C (descomposición)
Punto de fusión	324 °C (descomposición)
pH	7.5 – 9.0 (50 g/l, H ₂ O, 20 °C)
M	82.03 g/mol
Solubilidad en agua	365 g/l (20 °C)
Punto de inflamación	> 250 °C

Tabla 2.5 Características del Acetato de Sodio



2.1.3.2 Nitrato de Aluminio

En la tabla 2.6 se describen las características del Nitrato de Aluminio, descritas en el manual de especificaciones Merck.

Producto: Nitrato de Aluminio Proveedor: Merck No lote: No disponible	
Características	Valor
Punto de fusión	73° C
Valor de pH	2,0 – 4,0 (50 g/l, H ₂ O, 20° C)
Solubilidad en agua	419 g/l (20° C)
Masa	375.13g/mol
Absorción de Agua	Higroscópico

Tabla 2.6 Características del Nitrato de Aluminio

2.1.3.3 Quercetina

En la tabla 2.7 se describen las características de la quercetina, descritas en el manual de especificaciones Sigma Spectrocrom.

Producto: Quercetina Proveedor: Sigma Spectrocrom No lote: Q4951 10G	
Características	Valor
Pureza	≥ 98.0% (HPLC)
Almacenamiento	Temperatura ambiente

Tabla 2.7 Características de la Quercetina



2.1.4 Materiales para la liofilización

2.1.4.1 Agua Milli Q

En la tabla 2.8 se describen las características del agua purificada, descritas por la farmacopea.

- Agua obtenida por osmosis inversa

Requisitos de pureza del 'agua purificada' según la USP XXIV

Producto: Agua Purificada	
Proveedor:	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Nitratos	<0,2 ppm
Metales pesados	<0,1 ppm
Carbono orgánico total	<500 µg/L C
Conductividad	<4,3 µS/cm a 20°C
Bacteria (orientativo)	<100 CFU/ml

Tabla 2.8 Características del Agua Purificada

2.1.4.2 Nitrógeno Comprimido

En la tabla 2.9 se describen las características del nitrógeno comprimido, descritas en la hoja de seguridad de AGA.



Producto: Nitrógeno Comprimido	
Proveedor: AGA	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Densidad de gas a 0°C (32°F), 1 atm	1.153 kg/m ³ (0.072 lbs/ft ³)
Punto de ebullición a 1 atm	-195.8°C
Punto de congelación / fusión a 1 atm	-210°C
pH	No aplica
Peso específico (aire = 1) a 21.1°C (70°F)	0.906
Solubilidad en agua vol/vol a 0°C (32 °F) y 1 atm	0.023
Presión de vapor a 21.1°C (70°F)	No aplica
Peso molecular	28.01

Tabla 2.9 Características del Nitrógeno Comprimido



2.1.5 Materiales para Cromatografía en Capa Fina

2.1.5.1 Fase Móvil:

2.1.5.1.1 Cloroformo

En la tabla 2.10 se describen las características del cloroformo, descritas en el manual de especificaciones Merck.

Producto: Cloroformo	
Proveedor: Merck	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Presión de Vapor	213 hPa (20 °C)
Densidad	1.47 g/cm ³ (20 °C)
Solubilidad en agua	8 g/l (20 °C)
M	119.38 g/mol
Punto de Fusión	- 63 °C
Punto de Ebullición	61 °C

Tabla 2.10 Características del cloroformo



2.1.5.1.2 Metanol

En la tabla 2.11 se describen las características del metanol, descritas en el manual de especificaciones Merck.

Producto: Metanol	
Proveedor: Merck	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Pureza	≥ 99 %
Densidad	0.79 g/cm ³ (20 °C)
Solubilidad en agua	Soluble (20 °C)
M	32.04 g/mol
Punto de Fusión	- 98 °C
Punto de Ebullición	64.5 °C

Tabla 2.11 Características del metanol

2.1.5.1.3 Ácido Fórmico

En la tabla 2.12 se describen las características del ácido fórmico, descritas en el manual de especificaciones Merck.

Producto: Ácido Fórmico	
Proveedor: Merck	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Densidad	~1.2 g/cm ³ (20 °C)
Solubilidad en agua	Soluble (20 °C)
pH	Fuertemente ácido
Punto de ebullición	107 °C
Punto de Fusión	- 9 °C
Punto de Ignición	485 °C

Tabla 2.12 Características del ácido fórmico



2.1.5.1.4 Agua Destilada

En el cuadro 2.13 se describen las características del agua destilada, descritas por Prats y col., 1992.

Producto: Agua Destilada	
Proveedor: Laboratorio del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales	
No lote: No disponible	
Características	Valor
Nitratos y amonio	< 0.2 ppm
Metales Pesados	< 1 ppm
Aluminio	< 0.01 ppm m/v
Residuo de evaporación	< 0.001 %
Punto de Fusión	- 9 °C
Punto de Ignición	485 °C

Tabla 2.13 Características del agua destilada

2.1.6 Materiales para la Fase Estacionaria

2.1.6.1 Silica Gel

Placa de silica gel 40 x 80 milímetros (Polygram SIL G/UV₂₅₄)

2.1.6.2 Patrón

Solución 0,1% de quercetina en etanol absoluto

2.1.6.3 Muestras

Ana Carrión
Cándida García



Solución 0,25% de extracto seco problema (correspondiente a cada droga vegetal objeto de nuestra investigación) en etanol absoluto.

2.1.7 Cálculos

Para las determinaciones espectrofotométricas de flavonoides totales se necesitan las siguientes cantidades de reactivos que se citan a continuación.

- Solución 1M de Acetato de Sodio
- Solución 10% de Nitrato de Aluminio
- Solución 1% de Acetato de Plomo al
- Alcohol Etilico al 80%



2.2 MÉTODOS

2.2.1 MÉTODO DE DESECACIÓN

En el proceso de desecación por acción del calor se aprovecha la circulación del viento caliente dentro del horno, con lo que se aumenta la transmisión de calor y se ahorra la energía. Además en éste proceso existe un control de la temperatura y tiempo de secado según las necesidades de cada especie vegetal.

DISPOSITIVO: Desecador

Modelo: Pro 3

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.



Figura 2.1 Desecador. Modelo Pro 3 Cuenca-Ecuador

PROCEDIMIENTO

Según la USP XXIII para el secado se selecciona las partes de la planta a ser utilizadas (hojas, flores, tallos, raíces) se las coloca sobre papel absorbente y se



las somete a una temperatura no mayor a 40°C debido a la inestabilidad los componentes.

Almacenar la parte de la planta tras su secado en doble funda de papel con su respectiva identificación y colocarlas en un lugar seco con mínima humedad.

2.2.2 MÉTODO DE PESADO

Para las pesadas de los materiales se han empleado balanzas analíticas y de precisión que se detallan a continuación:

DISPOSITIVO: Balanza de Precisión y Balanza Analítica

Balanza de precisión

Marca: Metter Toledo PB1502-L

Serie: 1129070512

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.

Balanza analítica

Marca: Boeco Germany

Serie: 19509555

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de la Universidad de Cuenca.

2.2.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

2.2.3.1 PERCOLACIÓN (USP XXX)

La USP XXX describe el siguiente método para la preparación de extractos fluidos.

Ana Carrión
Cándida García



PROCEDIMIENTO

1. Cuidadosamente humectar la droga pulverizada y pesada con suficiente cantidad de disolvente prescrito o mezcla de disolventes hasta obtener una humedad uniforme.
2. Macerar por 14 horas, transferir a un percolador adecuado y presionar la droga firmemente sin llegar a compactar.
3. Verter el solvente o mezcla de solventes hasta saturar la droga (1 centímetro sobre el nivel de la droga).
4. Cubrir la parte superior del percolador y cuando el líquido esté a punto de gotear del percolador cerrar el orificio inferior y permitir la maceración de la droga por 24 horas o por el tiempo especificado en la monografía.
5. Sin ningún ensayo previo permitir la percolación despacio (XX por minuto).
6. Recolectar un volumen de extracto correspondiente al 75% del peso inicial de la droga, acondicionar y rotular (volumen 1).
7. Continuar la percolación hasta agotamiento de la droga, lo cual se comprueba mediante cromatografía en capa fina hasta reacción negativa para quercetina según metódica descrita en el apartado 2.2.6.; el volumen resultante se mezcla con el volumen 1 dando como resultado el volumen 2.
8. Con la finalidad de conservar los principios activos el extracto fluido obtenido (volumen 2), se reduce a extracto seco mediante el procedimiento detallado en el apartado 2.2.4.



2.2.3.2 MACERACIÓN SEGÚN L. TONA, K. KAMBU, N. NGIMBI, K. CIMANGA, A. J. VLIETINCK

Tiene por objeto el extraer los principios activos de una planta, tras la maceración sucesiva de la droga hasta agotamiento de la misma.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento descrito por Tona y col. consiste en:

1. Pesar la droga a razón de un gramo por diez volúmenes de menstruo en la proporción 5:50, P/V.
2. Según lo descrito en 1 se humecta la droga uniformemente usando una alícuota de menstruo hasta esponjamiento por 14 horas.
3. Se adiciona el solvente sobrante y se macera por 48 horas, luego de lo cual se filtra la muestra usando papel filtro y a éste primer macerado, se lo almacena debidamente rotulado en refrigeración y protegido de la luz.
4. Al macerado del punto 3 se le adiciona un volumen igual de solvente (50ml), y se macera por 48 horas más a temperatura ambiente y se filtra. El filtrado se conserva en refrigeración.
5. Se repite el procedimiento 4, de forma que se ha macerado y filtrado por tres ocasiones.
6. El extracto obtenido se concentra hasta obtener un extracto seco según la metodología descrita en el apartado 2.2.4.

2.2.4 MÉTODO DE EVAPORACIÓN DEL LÍQUIDO EXTRACTIVO

Los extractos secos son preparados pulveriformes que se obtienen a partir de extractos normales de las drogas por evaporación del disolvente (Voigt, 1982), en nuestra investigación y para estabilizar los extractos hemos combinado tres métodos de evaporación del menstruo, los mismos que se han aplicado en el siguiente orden:

Ana Carrión
Cándida García



- Evaporación a presión reducida y a 40 °C mediante el uso de rotavapores.
- Concentración mediante uso de Nitrógeno
- Liofilización

2.2.4.1 CONCENTRACIÓN MEDIANTE ROTAVAPOR

Este procedimiento consiste en evaporar mediante una combinación de temperatura provista por un baño calefactor y la generación de presión de vacío. Se produce una rotación que aminora el peligro de ebullición y se acelera la evaporación mediante el aumento de la superficie de la solución.

DISPOSITIVO: Rotavapor

Marca: Laborota 4000 efficient

Serie: 120718287

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.

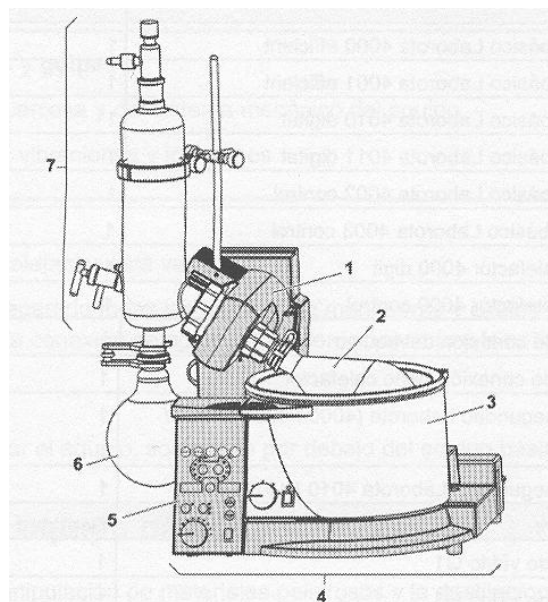


Figura 2.2 Evaporador rotativo Laborota 4000 efficient. 1) Propulsión con paso de vapor 2) Matraz evaporador 3) Baño calefactor 4) Equipo básico 5) Panel de control 6) Matraz receptor 7) Refrigerante



PROCEDIMIENTO

1. Colocar en el baño calefactor agua destilada hasta la marca señalada.
2. Encender el equipo presionando los botones de encendido (panel de control), se regula la temperatura (40°C) con el botón giratorio de temperatura (panel de control) y se espera que alcance la misma.
3. Abrir la llave de agua que está conectada al refrigerante y colocar la muestra en el adaptador para el paso de vapor. El extracto se coloca en un balón fondo redondo hasta la mitad de capacidad de dicho balón.
4. Con el botón giratorio de rotación (panel de control), se ajusta las revoluciones (90-110 revoluciones por minuto), evitando un exceso de velocidad y procurando la formación de una película de extracto. Bajas velocidades deben también obviarse para evitar temperaturas heterogéneas dentro del balón.
5. Se enciende la bomba de vacío y se introduce ligeramente el balón en el baño calefactor, luego se cierra la llave conectada al refrigerante para crear el vacío.
6. Previo a la introducción total del balón en el baño, esperar que empiece a caer el solvente en el matraz receptor y se espera que se evapore todo el solvente.
7. Una vez evaporado todo el solvente, es decir cuando se ha llegado a sequedad del extracto se retira el balón del baño calefactor.
8. Apagar la bomba, abrir la llave que se conecta al refrigerante, esperar a que salga todo el aire, bajar la presión y apagar el equipo.
9. El extracto contenido en el balón se procede a retirarlo con 15 mililitros de solvente, y se recoge en un tubo tapa rosca debidamente etiquetado. Si el



extracto ya concentrado es difícil de remover se introduce el tubo en un baño de María provisto de ultrasonido.

2.2.4.2 BAÑO MARÍA PROVISTO DE ULTRASONIDO O SONICADOR

DISPOSITIVO: Baño maría

Marca: Cole – Parmer

Serie: QDC040846T37F

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar agua destilada en el baño maría con ultrasonido, hasta la marca nivel operativo.
2. Presionar el botón power (encendido) localizado en el panel de control.
3. Pulsar la opción ON/OFF y escoja la opción requerida: temperatura (1-69 ° C), ultrasonido (1-99 minutos).
4. Escoger la temperatura (40 °C) o el tiempo de ultrasonido (60 minutos) según la opción escogida anteriormente.
5. Apagar el baño con el botón power (apagado).

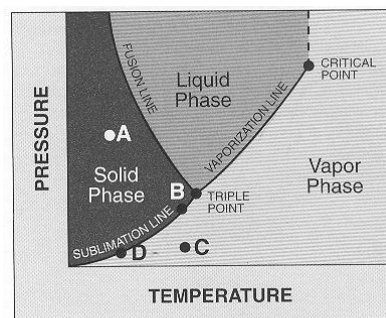


2.2.4.3 CONCENTRACION MEDIANTE USO DE NITRÓGENO

Los tubos con las muestras de extractos desecadas en el rotavapor (metódica 2.2.4.1) se deben concentrar hasta un volumen aproximado de 5 mililitros con nitrógeno, burbujeando el mismo dentro del tubo que contiene el extracto a través de una pipeta Pasteur, evitando el contacto de la misma con las paredes del tubo. Todo el dispositivo se debe introducir en un baño de María a 40 °C.

2.2.4.4 MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN

Según Voigt la liofilización se basa en el hecho de que el agua en estado de congelación, todavía tiene cierta presión de vapor y que, por tanto, puede ser separada del sistema por sublimación. En el diagrama de fases del agua adjunto, se puede observar el punto triple del agua (0,00075 °C; 4,58 Torr), para lo cual si se elige una presión inferior a 4.58 Torr, se puede comprobar que a temperaturas inferiores a 0.0075 °C se produce una transformación directa de la fase sólida en fase gaseosa, sin pasar por el estado líquido, es decir, que el hielo se sublima.



A typical phase diagram.

Figura 2.3 Diagrama de estado del agua (Voigt, 1982)

DISPOSITIVO:

a) Liofilizador

Marca: Labconco

Serie: 080587321

Ana Carrión

Cándida García



Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales la Universidad de Cuenca.

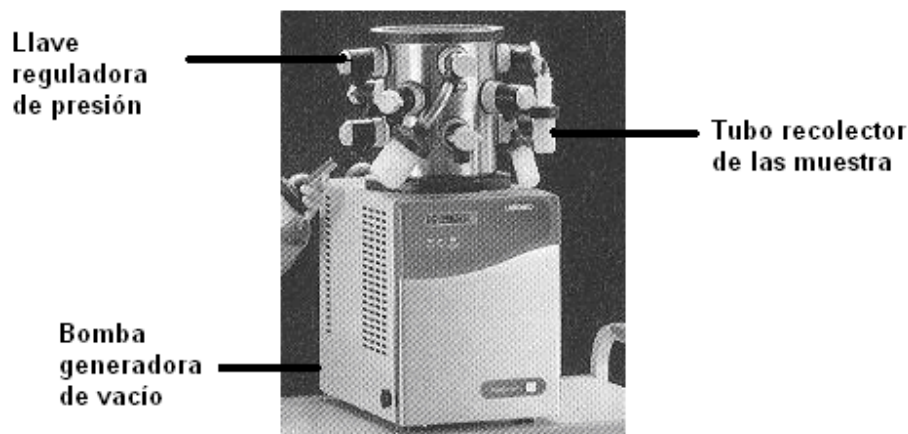


Figura 2.4 Liofilizador (Manual del Liofilizador)

b) Biofreezer

Marca: Labconco

Serie: 080587321

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.

PROCEDIMIENTO

• Preparación de la Muestra

1. A las muestras obtenidas según metodología descrita en el apartado 2.2.4.3. se adiciona aproximadamente 15 mililitros de agua purificada y obtenida por ósmosis inversa; para homogenizar la muestra se le somete a la acción del sonicador (ver apartado 2.2.4.1.1) transfiriendo este volumen a los tubos del liofilizador.
2. Una vez tapados los tubos del liofilizador conteniendo la muestra se colocan dentro del Bio-Freezer (ver apartado 2.2.5 b) a una temperatura de -80°C . y por cinco minutos, luego de lo cual se rotan los tubos para

Ana Carrión
Cándida García



congelar homogéneamente los extractos por tres minutos más; se vuelven a rotar los tubos y se repite este procedimiento hasta observar que la muestra esté totalmente congelada.

3. Se retiran los tapones de los tubos de liofilización que contienen las muestras del punto 3 y se tapan con papel aluminio y se mantienen por tres horas más dentro del Bio-Freezer, para asegurar que tanto el mensturo como el extracto estén congelados.

- **Procedimiento para Liofilizar:**

1. Pulsar el botón de refrigeración y esperar hasta que la temperatura baje a -4°C, después pulsar el botón de vacío y esperar hasta que la presión baje a 0.180 mBar.
2. Las muestras descritas en el punto 4 del apartado 2.2.4.2 y contenidas en los tubos del liofilizador con sus respectivos tapones adaptarlos al liofilizador.
3. Al momento de introducir los tubos al equipo debe observarse que las llaves que regulan la presión en cada tubo estén abiertas, para luego ser cerradas al introducirlos. Entre tubo y tubo se debe esperar a que la presión llegue a 0.180 mBar nuevamente.
4. La Liofilización tiene un tiempo de duración de 20 a 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo establecido para este proceso, se procede a suprimir el vacío hasta que la presión se encuentre entre 1-2 mBar,
5. Luego pulsar el botón de refrigeración para que la temperatura suba a 4°C y retirar cada tubo.
6. Retirar cada tubo abriendo suavemente la llave que regula la presión.
7. Apagar el equipo.



2.2.5 CROMATOGRAFÍA

- **Cromatografía en Capa Fina.**

La cromatografía en capa fina es un método analítico de separación. Se basa en la preparación de una capa, uniforme de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. La fase estacionaria será un componente polar y la fase móvil (eluyente) será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La constante RF (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:

$$RF = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide en centímetros, generalmente desde el centro de la mancha. El máximo valor de RF que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un RF entre 0.65 y 0.7.

La elección de la fase móvil se realiza de forma empírica, hay que estudiar la polaridad del componente y probar con solventes cada vez menos polares y que generen una mejor elución.

Por medio de la experimentación se demostró que la siguiente fase es adecuada para las propiedades que presenta la Quercetina.



PROCEDIMIENTO

- **Preparación de la Fase Móvil**

Cloroformo, Metanol, Ácido Fórmico, Agua (70:26:2:2)

- **Preparación de la Muestra**

1. En una lámina de Sílica Gel debidamente identificada, colocar una gota de patrón (Quercetina) al 0,1% (Peso/Volumen en Etanol Absoluto) y una gota de extracto 0,1% (Peso/Volumen en Etanol Absoluto) y dejar secar por cinco minutos aproximadamente.
2. Durante cinco minutos colocar la lámina de sílica de manera vertical e introducirla en la fase móvil de manera que ésta alcance una altura de un centímetro sobre el borde inferior de la placa, y dejar secar.
3. Observar bajo luz UV usando una cámara de cromatografía.
4. Medir los Rf usando una regla.

2.2.6 ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES

Según Olga Lock y colaboradores, para la detección y cuantificación de flavonoides totales expresados como Quercetina, se utilizaron los siguientes métodos:



2.2.6.1 ANALISIS CUALITATIVO: Reacción de Shinoda

PROCEDIMIENTO

Con la finalidad de determinar la concentración de flavonoides en los extractos obtenidos usando los dos métodos cuya eficiencia queremos determinar se utilizó la siguiente metódica.

1. Pesar 2.5 miligramos (± 0.1 miligramos) de extracto seco y disolver en 1 mililitro de etanol absoluto en un tubo de ensayo.
2. Añadir algunas limaduras de magnesio.
3. Sujetar el tubo con unas pinzas y añadir cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de coloración naranja cuya intensidad debe valorarse por cruces, es prueba positiva para flavonoides.

- **Interpretación de la reacción.**

- * naranja pálido
- ** naranja
- *** naranja encendido
- **** naranja intenso

2.2.6.3 ANÁLISIS CUANTITATIVO: Espectrofotometría

La espectrofotometría se refiere a métodos cuantitativos de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como espectrofotometría de adsorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja.

DISPOSITIVO: Espectrofotómetro Genesys 10 UV

Ana Carrión
Cándida García



Marca: Genesys 10

Serie: SN. 2L3M064003

Ubicación: Laboratorio de Fotoquímica del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca.

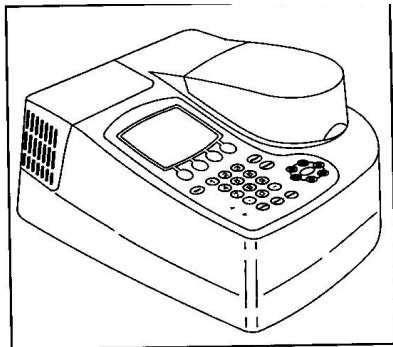


Figure 1 GENESYS 10 spectrophotometer

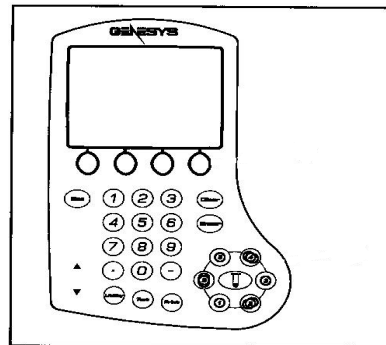


Figure 4 Keypad of the GENESYS 10 spectrophotometer

Figura 2.5 Espectrofotómetro Genesys 10 (Manual del espectrofotómetro)

PROCEDIMIENTO

1. Encender el espectrofotómetro y esperar 10 minutos.
2. Seleccionar la longitud de onda (415 nanómetros).
3. Una vez que está estandarizado el equipo se procede a realizar la curva de calibración.

• Preparación de curva de calibración

1. Pesar 2,7 miligramos de quercetina en un balón de aforo de 10 mililitros y llevar a volumen con etanol al 80% (Solución madre)
2. En sendos balones de aforo de 10 mililitros colocar 700 micro litros, 350 micro litros, 175 micro litros y 100 micro litros de la solución madre, añadir 200 micro litros de acetato de potasio 1M y 200 micro litros de nitrato de aluminio al 10% a cada balón y aforar finalmente con etanol al 80%. Esto



nos permite obtener cuatro soluciones de trabajo para la construcción de la curva con concentraciones de 18,9%; 9,45% 4,725% y 2,7% de quercetina.

3. Determinar la absorbancia de estas soluciones a 415 nanometros.

• **Cuantificación de quercetina en los extractos problema**

En condiciones normalizadas de trabajo y realizando cuantificaciones por triplicado, se realiza el siguiente procedimiento (Olga Lock y colaboradores, 2006)

1. En un balón de aforo de 10 mililitros colocar 2.5 miligramos (\pm 0.1miligramos) de extracto seco y disolverlo con 2 mililitros de etanol al 80%.
2. Adicionar 200 micro litros de solución de acetato de potasio 1M y 200 micro litros de nitrato de aluminio al 10% y aforar a 10 mililitros con etanol al 80%.
3. Dejar reposar por 40 minutos y proceder a determinar las absorbancia de a 415 nanometros. De manera que al preparar 24 extractos preparados por dos métodos distintos a compararse y haciendo cuantificaciones en tres muestras de cada extracto se han procesado 144 determinaciones de quercetina.
4. Para calcular la concentración de flavonoides totales expresados como quercetina en los extractos problema se utilizó la ecuación de la recta, en donde se reemplazó el valor de "x" de la ecuación por el valor de la absorbancia de cada planta, y al valor resultante se lo multiplicó por el valor de R (regresión lineal), obteniéndose un valor más preciso de concentración. Los valores de los parámetros mencionados están detallados en los gráficos 3.3 y 3.5.



2.2.6.3 Modificación del Método de Detección de Flavonoides

La aplicación de la metódica 2.2.6.2 determinó lecturas elevadas (no cumplen la Ley de Beer), por lo que para obviar este problema se realizó una revisión bibliográfica que permitió utilizar la misma técnica propuesta por Lock y col. pero modificada por Martínez y col., según la cual al realizar la cualificación y cuantificación de flavonoides la clorofila interfiere en el análisis de los mismos, por lo cual es necesario precipitarla con una solución de acetato de plomo al 1% y filtrarla previo a la aplicación de la metódica 2.2.6.2..



2.2.7 Análisis Estadístico: ANOVA

Según Azzimonti Renzo, el ANOVA puede ser considerado como una manera de verificar si dos o más medias muestrales fueron extraídas de una misma población o de poblaciones con el mismo valor esperado, para una magnitud dada. En consecuencia, cuando estas medias muestrales no sean coincidentes habrá que suponer que provienen de poblaciones diferentes por el efecto causado por un factor en estudio.

Los tests estadísticos a realizar se basan en comparar el valor muestral calculado con los datos medidos: F contra un valor crítico de tablas F_{α} . La idea básica del método es que si las muestras son *normales, independientes y aleatorias*; y se supone que todas tienen la misma varianza (*homocedásticas*), entonces, para que provengan de una misma población se necesita únicamente que las medias muestrales sean todas iguales. Esta será la hipótesis nula H_0 que se usará en todos los modelos de ANOVA, junto con los cuatro supuestos mencionados.

- **ANOVA para más de un factor**

El cálculo del modelo de ANOVA de dos factores se puede clasificar en dos casos básicos: el primero, *sin repetición*, es cuando hay un solo dato por cada combinación posible de los dos factores y el segundo, *con repetición*, cuando hay más de un dato para cada caso o combinación de factores posibles.

En el modelo de ANOVA de dos factores con repetición aparece un nuevo concepto estadístico de gran utilidad para el investigador: la *interacción* de ambos factores analizados. Cuando el efecto de ambos factores actuando en conjunto es menor que el que tienen por separado, se habla de *interferencia*. Esto agrega una nueva hipótesis de trabajo a los cuatro parámetros para los modelos de ANOVA: Normalidad, Aleatoriedad, Independencia y Homoscedasticidad. Este quinto supuesto básico es: *No hay interacción*. Por su parte, si no se realiza más de una



medición por cada combinación de los dos factores, no se puede detectar la interacción y no se requiere del quinto supuesto.

El análisis estadístico que se realizó para este estudio comparativo se basa en los datos obtenidos de la concentración de flavonoides totales para cada uno de los métodos de extracción empleados en las plantas en estudio. Los resultados fueron analizados mediante Software Microsoft Excel 2007, empleando el análisis de Varianza (ANOVA).

Todo el análisis estadístico ha sido realizado con un nivel de significancia del 0,05. Las hipótesis para esta prueba son las siguientes:

- **Ho (Hipótesis nula):** Los factores no inducen diferencias en la concentración (no existe diferencia en la concentración).
- **H1 (Hipótesis alternativa):** La concentración de al menos una de las combinaciones de factores (tipo de planta y método de extracción) es diferente.

Se debe tener en cuenta que si se acepta la Ho (Hipótesis nula) no significa que se haya probado que es verdad, solo que no se ha demostrado que sea falsa.

Interpretación:

- Si el valor de la probabilidad de la prueba es menor que 0.05, se rechaza la Ho (Hipótesis nula) planteada.
- Si F experimental es mayor que F crítico, se rechaza la Ho planteada; en caso contrario, se aceptaría.

CAPÍTULO III



CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de drogas vegetales

La presente investigación tiene por objeto comparar la eficiencia de dos métodos de extracción.

Para estudios experimentales comparativos como la prueba ANOVA (comparación de las medias de concentración considerando varianzas iguales) el mínimo valor asignado para un muestreo es de veinte, para un estudio confiable.

Para el muestreo se realizó una revisión bibliografía para determinar las plantas disponibles en nuestro medio y que contengan flavonoides, cuyas concentraciones medias se emplearán para la prueba ANOVA, la selección de las drogas (parte de las plantas seleccionadas) se efectuó en función del uso etnomédico que reporta la bibliografía (Ríos, 2007), seleccionándose 24 plantas que se enumeran en la tabla 3.1. y que se han usado en nuestra investigación.



Plantas Medicinales	
1 Ajenjo	13 Llantén
2 Apio	14 Malva
3 Arrayán	15 Manzanilla
4 Boldo	16 Menta
5 Borraja	17 Nogal
6 Capulí	18 Ortiga
7 Chanca Piedra	19 Perejil
8 Cola de Caballo	20 Romero
9 Diente de León	21 Ruda
10 Escancel	22 Sen
11 Eucalipto	23 Tomillo
12 Guarmi Poleo	24 Toronjil

Tabla 3.1 Cuadro de muestra de plantas medicinales que contienen flavonoides.

3.2 Proceso de Secado y Pesado

Las partes de las plantas medicinales seleccionadas y los pesos de las drogas procesadas y desecadas según metódica descrita en el apartado 2.2.1. se detallan en la tabla 3.2., eligiéndose en función del uso etnomédico que la bibliografía reporta. Su caracterización botánica se basó en la documentación existente en el Herbario Azuay de la Universidad del Azuay y se reporta en el Anexo 1 (Ver sección anexos).



Nombre de la Planta	Droga	Peso Plantas secas (g)
Romero	Hojas	77,11
Sen	Hojas	81,88
Menta	Hojas	28,95
Escancel	Flores-Hojas	40,4
Cola de caballo	Tallos-Raíces	71,12
Arrayán	Hojas	106,9
Capulí	Hojas	64,5
Tomillo	Hojas	42,96
Guarmi poleo	Flores-Hojas	29,89
Chanca piedra	Tallos-Raíces	48,12
Boldo	Hojas	47,2
Eucalipto	Hojas	98,62
Toronjil	Hojas	13,79
Manzanilla	Flores-Hojas	68,14
Apio	Hojas	30,01
Perejil	Tallos-Raíces	26,55
Malva	Flores-Hojas	34,97
Ruda	Flores-Hojas	55,13
Diente de león	Flores-Hojas	31,4
Borraja	Flores-Hojas	33,15
Llantén	Tallos-Raíces	58,64
Ajenjo	Hojas	21,42
Nogal	Hojas	49,28
Ortiga	Hojas	14,9

Tabla 3.2 Cuadro de pesos y partes de las plantas medicinales seleccionadas.

3.3 Preparación de Extractos fluidos por Percolación USP XXX (Método 1)



Los extractos fluidos preparados según metodología descrita en el apartado 2.2.3.1 permitieron obtener los siguientes volúmenes correspondientes, volumen 1 (V1) al 75% de agotamiento de la droga y los volúmenes 2 (V2) correspondiente al volumen de agotamiento total y se describen en la tabla 3.3.



Nombre de la Planta	Droga	V 1 (ml)	V 2 (ml)
Romero	Hojas	3,75	200
Sen	Hojas	3,75	200
Menta	Hojas	3,75	200
Escancel	Flores-Hojas	3,75	200
Cola de caballo	Tallos-Raíces	3,75	200
Arrayán	Hojas	3,75	200
Capulí	Hojas	3,75	200
Tomillo	Hojas	3,75	200
Guarmi poleo	Flores-Hojas	3,75	200
Chanca piedra	Tallos-Raíces	3,75	200
Boldo	Hojas	3,75	200
Eucalipto	Hojas	3,75	200
Toronjil	Hojas	3,75	200
Manzanilla	Flores-Hojas	3,75	200
Apio	Hojas	3,75	200
Perejil	Tallos-Raíces	3,75	200
Malva	Flores-Hojas	3,75	200
Ruda	Flores-Hojas	3,75	200
Diente de león	Flores-Hojas	3,75	200
Borraja	Flores-Hojas	3,75	200
Llantén	Tallos-Raíces	3,75	200
Ajenjo	Hojas	3,75	200
Nogal	Hojas	3,75	200
Ortiga	Hojas	3,75	200

Tabla 3.3 Cuadro de pesos de la droga seca de las plantas medicinales con sus respectivos volúmenes de extracto (V1 y V2)



3.4 Preparación de Extractos fluidos por Maceración según el método de Tona y col. (Método 2)

En la tabla 3.4 se anotan los volúmenes correspondientes a cada etapa de maceración (tres maceraciones en total), dichos volúmenes varían en función de la parte de la droga usada, pues algunas tales como hojas y flores al tener mayor esponjamiento por su estructura distinta a la de tallos y raíces, drogas de estructura rígida, retienen mayor cantidad de solvente a pesar de la presión que se ejerza.



Nombre de la Planta	Droga	1°	2°	3°	V Total (ml)
		Maceración	Maceración	Maceración	
		V 1 (ml)	V 2 (ml)	V 3 (ml)	
Romero	Hojas	50	50	50	150
Sen	Hojas	49	49	50	148
Menta	Hojas	50	50	50	150
Escancel	Flores-Hojas	50	50	50	150
Cola de caballo	Tallos-Raíces	50	50	50	150
Arrayán	Hojas	48	50	50	148
Capulí	Hojas	50	50	50	150
Tomillo	Hojas	49	49	50	148
Guarmi poleo	Flores-Hojas	49	49	50	148
Chanca piedra	Tallos-Raíces	50	50	50	150
Boldo	Hojas	50	50	50	150
Eucalipto	Hojas	50	50	50	150
Toronjil	Hojas	48	50	50	148
Manzanilla	Flores-Hojas	49	50	50	149
Apio	Hojas	50	50	50	150
Perejil	Tallos-Raíces	50	50	50	150
Malva	Flores-Hojas	48	50	50	148
Ruda	Flores-Hojas	50	50	50	150
Diente de león	Flores-Hojas	50	50	50	150
Borraja	Flores-Hojas	50	49	50	149
Llantén	Tallos-Raíces	50	50	50	150
Ajenjo	Hojas	50	50	50	150
Nogal	Hojas	50	50	50	150
Ortiga	Hojas	49	49	50	148

Tabla 3.4 Cuadro de pesos de la droga seca de las plantas medicinales con sus respectivos volúmenes de extracto (V1, V2, V3) obtenidos por expresión luego cada maceración y el total del volumen alcanzado



3.5 Obtención de Extractos secos a partir del Método 1 y Método 2

Los volúmenes finales de los extractos obtenidos mediante los métodos 1 y 2, cuya eficiencia se estudia en esta investigación, se concentraron a extractos secos usando los mismos procedimientos de concentración en ambos casos y que se describen en los apartados 2.2.4.1, 2.2.4.3 y 2.2.4.4. Los pesos de los extractos secos obtenidos por percolación según U.S.P XXX (Método 1) y por la técnica descrita por Tona y col. (Método 2) se describen a continuación en la tabla 3.5.



Nombre de la Planta	Droga	Método 1	Método 2
		Pesos de Extracto seco (g)	Pesos de Extracto seco (g)
Romero	Hojas	0,642	0,680
Sen	Hojas	0,373	0,406
Menta	Hojas	0,191	0,299
Escancel	Flores-Hojas	0,447	0,358
Cola de caballo	Tallos-Raíces	0,359	0,261
Arrayán	Hojas	0,321	0,408
Capulí	Hojas	0,744	0,886
Tomillo	Hojas	0,259	0,308
Guarmi poleo	Flores-Hojas	0,281	0,234
Chanca piedra	Tallos-Raíces	0,260	0,098
Boldo	Hojas	0,452	0,436
Eucalipto	Hojas	0,684	1,922
Toronjil	Hojas	0,406	0,290
Manzanilla	Flores-Hojas	0,285	0,263
Apio	Hojas	0,336	0,301
Perejil	Tallos-Raíces	0,233	0,232
Malva	Flores-Hojas	0,485	0,286
Ruda	Flores-Hojas	0,320	0,223
Diente de león	Flores-Hojas	0,505	0,372
Borraja	Flores-Hojas	0,307	0,183
Llantén	Tallos-Raíces	0,340	0,232
Ajenjo	Hojas	0,574	0,380
Nogal	Hojas	0,454	0,289
Ortiga	Hojas	0,321	0,141

Tabla 3.5 Cuadro de pesos de los extractos secos obtenidos aplicando los Métodos 1 y 2.

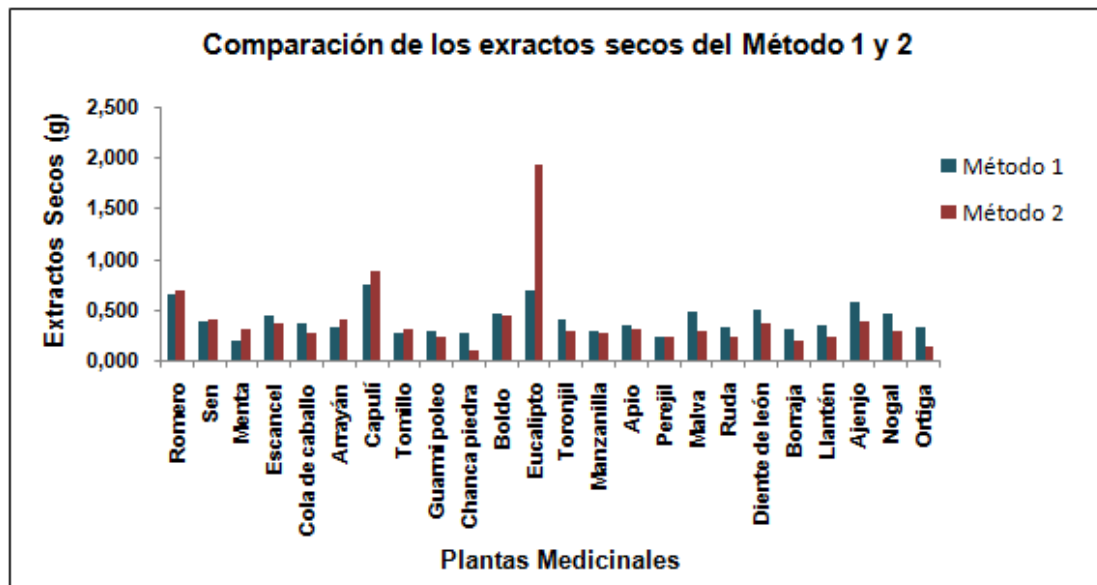


Gráfico 3.1 Ilustración comparativa de los pesos de extractos secos obtenidos con los dos métodos de estudio

La observación del gráfico 3.1 nos permite deducir que el Método 1 de Percolación detallado en la USP XXX permite obtener un mayor rendimiento en la extracción pues en el 70.8 % de las drogas vegetales usadas (diecisiete de veinte y cuatro drogas) el peso de los extractos secos es mayor que el peso de los mismos cuando se emplea el método 2.

3.6 Detección de Flavonoides Totales

3.6.1 Cualificación de Flavonoides Totales

La determinación cualitativa de flavonoides totales se realizó mediante la reacción de Shinoda, la cual se describe en el apartado 2.2.6.1, la tabla 3.6 muestra los resultados obtenidos. La reacción se considera positiva por la aparición de coloración naranja cuya intensidad debe valorarse por cruces.



Nombre de la Planta	Reacción Positiva	Intensidad de la reacción
Romero	✓	*
Sen	✓	*
Menta	✓	***
Escancel	✓	*
Cola de caballo	✓	*
Arrayán	✓	****
Capulí	✓	*
Tomillo	✓	***
Guarmi poleo	✓	**
Chanca piedra	✓	***
Boldo	✓	**
Eucalipto	✓	*
Toronjil	✓	**
Manzanilla	✓	***
Apio	✓	**
Perejil	✓	*
Malva	✓	**
Ruda	✓	****
Diente de león	✓	**
Borraja	✓	****
Llantén	✓	*
Ajenjo	✓	**
Nogal	✓	*
Ortiga	✓	***

Tabla 3.6 Cuadro de resultados de la Reacción de Shinoda para determinación cualitativa de flavonoides.

Interpretación de la reacción (*naranja pálido, ** naranja, *** naranja encendido, **** naranja intenso)



La reacción de Shinoda para la determinación cualitativa de flavonoides practicada en todas las plantas seleccionadas para la presente investigación es positiva para todas las drogas vegetales muestreadas, lo que nos permite concluir que la investigación bibliográfica realizada para el muestreo y que señalaba presencia de flavonoides en las plantas citadas, coincide con los resultados obtenidos en la investigación experimental. La observación de la tabla 3.6 nos permite apreciar la variación de la concentración de flavonoides en las distintas plantas objeto de nuestro estudio.

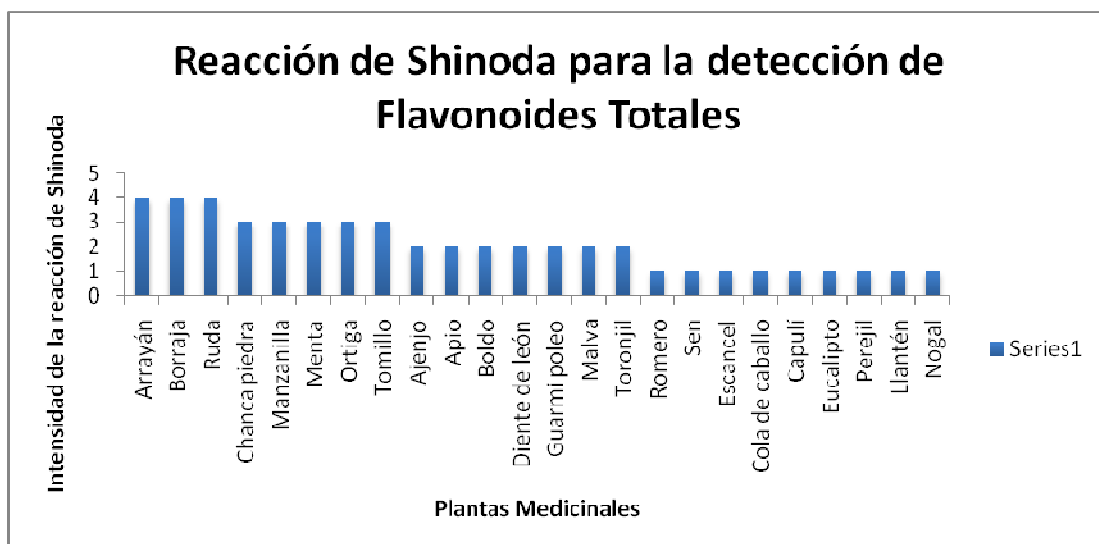


Gráfico 3.2 Ilustración de la determinación cualitativa de flavonoides mediante la reacción de Shinoda.

Es importante hacer notorio que algunas plantas nativas usadas por la sociedad ecuatoriana, algunas con fines curativos y otras con fines culinarios, tienen una cantidad importante de flavonoides, información que podría ser utilizada y socializada para optimizar el uso de nuestros recursos naturales.



3.6.2 Cuantificación de Flavonoides Totales

3.6.2.1 Curva de Calibración

Para la cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales se realizó la curva de calibración respectiva, mediante la aplicación de la metodología descrita en el apartado 2.2.6.2. Se elaboraron cuatro patrones (P1, P2, P3 y P4), cada uno por triplicado, de tal manera que se efectuaron nueve determinaciones por patrón, treinta y seis en total y se encuentran detalladas en el anexo 5, se calculó la media aritmética y las desviaciones estándar en cada caso.

En la tabla 3.5 se sintetizan las mediciones, realizadas para el trazado de la curva de calibración para la cuantificación de quercetina.

Patrones de Quercetina (mg/ml)	Concentraciones de Quercetina (mg)	Absorbancia (nm) $\bar{x} \pm \sigma$	CV
P 1	0,189	1,214 \pm 0,081	6,69%
P 2	0,094	0,583 \pm 0,004	0,61%
P 3	0,047	0,284 \pm 0,004	1,44%
P 4	0,027	0,153 \pm 0,008	4,92%

Tabla 3.7 Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para quercetina

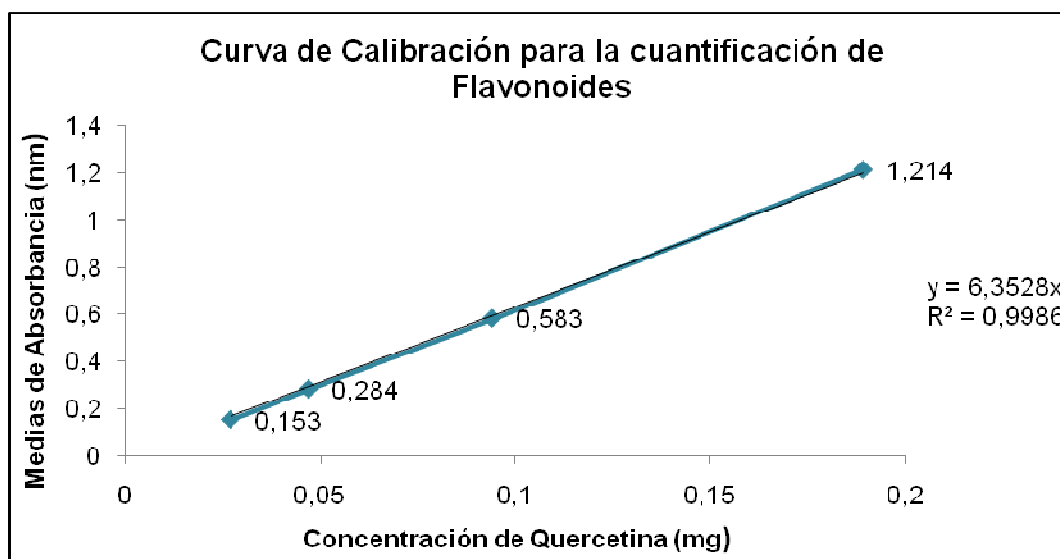


Gráfico 3.3 Ilustración de la Curva de Calibración para cuantificación espectrofotométrica de Quercetina a 415 nm

Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones de quercetina empleados para el trazado de la curva de la calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0,9986$) lo que indica la precisión en la preparación y dilución de patrones utilizados, lo que a su vez indica confiabilidad.

3.6.2.2 Cuantificación de Flavonoides en los extractos obtenidos mediante método 1 y 2.

Bajo condiciones normalizadas de trabajo y según la técnica descrita en el apartado 2.2.6.2. se realizaron cuantificaciones por triplicado para cada extracto, setenta y dos para toda la muestra de plantas, ciento cuarenta y cuatro en total tomando en cuenta los dos métodos, en el mismo apartado se detalla además la forma para obtener la concentración de flavonoides totales, todos los datos se detallan en el anexo 6. En los cuadros resumen 3.8 y 3.9 se reportan la media de las tres determinaciones para cada extracto con su desviación estándar y coeficiente de variación, para los métodos 1 y 2.



Nombre de la Planta	Método 1	
	Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
Romero	0,051 ± 0,001	1,69%
Sen	0,125 ± 0,002	1,38%
Menta	0,302±0,0004	0,14%
Escancel	0,065 ± 0,001	1,36%
Cola de caballo	0,115 ± 0,001	0,96%
Arrayan	0,112 ± 0,001	0,54%
Capulí	0,164 ± 0,002	1,05%
Tomillo	0,054 ±0,0004	0,80%
Guarmi poleo	0,401 ± 0,003	0,77%
Chanca piedra	0,030 ± 0,001	1,75%
Boldo	0,034 ± 0,002	4,56%
Eucalipto	0,077 ± 0,001	0,78%
Toronjil	0,385 ± 0,010	2,47%
Manzanilla	0,121 ± 0,001	0,49%
Apio	0,299 ± 0,001	0,26%
Perejil	0,022 ± 0,001	5,83%
Malva	0,160 ± 0,002	1,50%
Ruda	0,151 ± 0.012	7,63%
Diente de león	0,256 ± 0,004	1,37%
Borraja	0,102 ± 0,007	7,02%
Llantén	0,035 ± 0,002	4,40%
Ajenjo	0,248 ± 0,006	2,45%
Nogal	0,142 ± 0,002	1,30%
Ortiga	0,220 ± 0,008	3,64%

Tabla 3.8 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides obtenidos empleando el método 1



Nombre de la Planta	Método 2	
	Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
Romero	0,083 ± 0,001	1,35%
Sen	0,183 ± 0,003	1,80%
Menta	0,398 ± 0,005	1,25%
Escancel	0,304 ± 0,006	1,88%
Cola de caballo	0,167 ± 0,009	5,56%
Arrayan	0,135 ± 0,002	1,54%
Capulí	0,242 ± 0,001	0,30%
Tomillo	0,101 ± 0,003	3,34%
Guarmi poleo	0,407 ± 0,003	0,68%
Chanca piedra	0,072 ± 0,005	7,47%
Boldo	0,058 ± 0,001	0,89%
Eucalipto	0,081 ± 0,001	1,17%
Toronjil	0,464 ± 0,001	0,19%
Manzanilla	0,188 ± 0,003	1,86%
Apio	0,389 ± 0,001	0,17%
Perejil	0,039 ± 0,003	6,83%
Malva	0,256 ± 0,004	1,46%
Ruda	0,259 ± 0,003	1,33%
Diente de león	0,393 ± 0,011	2,88%
Borraja	0,217 ± 0,005	2,38%
Llantén	0,072 ± 0,006	7,97%
Ajenjo	0,305 ± 0,013	4,34%
Nogal	0,144 ± 0,004	2,75%
Ortiga	0,462 ± 0,003	0,65%

Tabla 3.9 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides obtenidos empleando el método 2

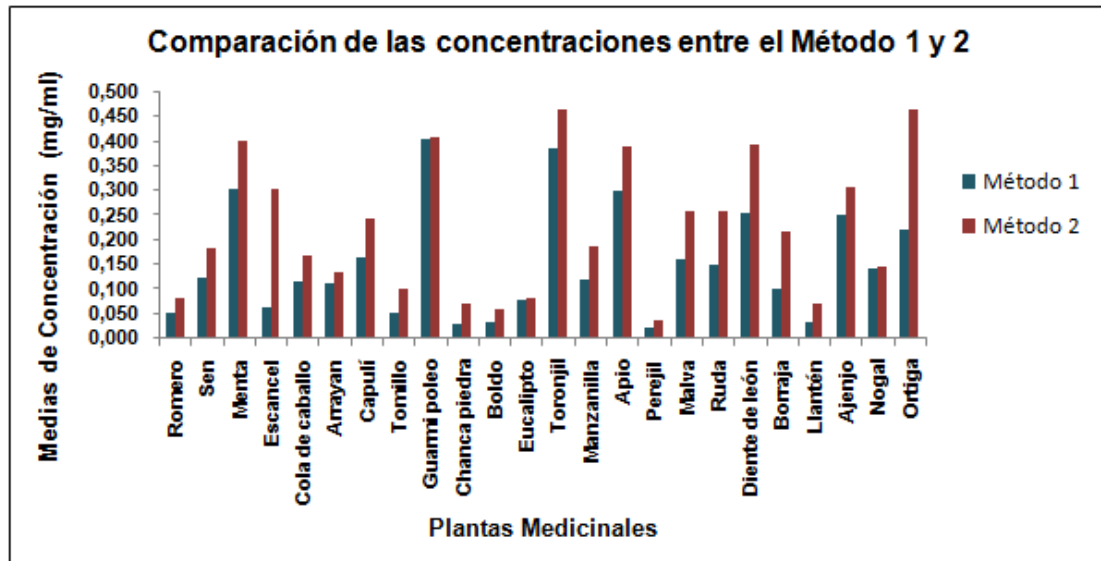


Gráfico 3.4 Ilustración comparativa del promedio de concentraciones entre el método 1 y 2

3.7 Modificación en la determinación de Flavonoides Totales

3.7.1 Curva de Calibración

El gráfico 3.4 muestra la curva de calibración del patrón de Quercetina modificada con la adición de acetato de plomo al 1%, cuyo procedimiento se describe en el apartado 2.2.6.3., tomando en cuenta que los patrones de quercetina siguieron la misma explicación descrita en el inciso 3.1.6.2.1.



Patrones de Quercetina (mg/ml)	Concentraciones de Quercetina (mg)	Absorbancia (nm) $\bar{x} \pm \sigma$	CV
P 1	0,189	1,072 \pm 0,012	1,14%
P 2	0,094	0,553 \pm 0,012	2,15%
P 3	0,047	0,289 \pm 0,007	2,39%
P 4	0,027	0,159 \pm 0,005	3,30%

Tabla 3.10 Cuadro de concentraciones para la construcción de la curva de calibración para quercetina

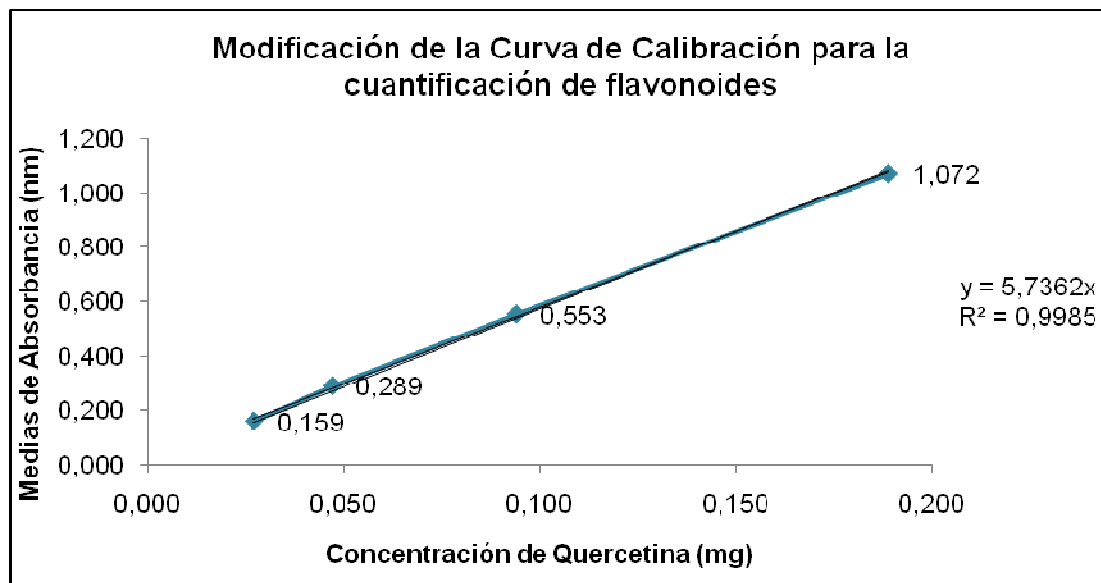


Gráfico 3.5 Ilustración de la modificación en la Curva de Calibración utilizando la Quercetina como estándar a 415 nm

Al haberse modificado el método de la cuantificación de flavonoides con la adición de acetato de plomo 1% para la precipitación de la clorofila, se observa que éste reactivo no interfiere en lo más mínimo en la cuantificación de la quercetina, además mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones empleados, podemos decir que, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 =$



0,9985), por lo tanto existe precisión en la preparación y dilución de patrones utilizados, lo que a su vez indica confiabilidad.

3.7.2 Modificación en la cuantificación de Flavonoides mediante los métodos 1 y 2.

La cuantificación de flavonoides totales modificada se desarrolló como se indica en el apartado 2.2.6.3., realizándose cuatro patrones (P1, P2, P3, P4) a partir de los cuales se elaboraron nueve determinaciones por patrón, en total treinta y seis determinaciones; finalmente se obtienen los siguientes resultados descritos en las tablas 3.11 y 3.12, en donde se observan la media total de las nueve concentraciones, su desviación estándar y coeficiente de variación.



Nombre de la Planta	Método 1	
	Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
Romero	0,015 ± 0,001	3,65%
Sen	0,067 ± 0,003	4,96%
Menta	0,105 ± 0,003	2,99%
Escancel	0,051 ± 0,003	6,79%
Cola de caballo	0,056 ± 0,002	3,98%
Arrayan	0,044 ± 0,002	3,66%
Capulí	0,029 ± 0,003	5,28%
Tomillo	0,028 ± 0,002	6,07%
Guarmi poleo	0,124 ± 0,004	3,15%
Chanca piedra	0,016 ± 0,001	3,17%
Boldo	0,017 ± 0,001	3,59%
Eucalipto	0,046 ± 0,002	4,95%
Toronjil	0,119 ± 0,0005	0,41%
Manzanilla	0,059 ± 0,003	4,55%
Apio	0,109 ± 0,002	1,90%
Perejil	0,017 ± 0,001	8,46%
Malva	0,081 ± 0,002	2,04%
Ruda	0,074 ± 0,001	0,72%
Diente de león	0,088 ± 0,001	1,23%
Borraja	0,051 ± 0,001	1,63%
Llantén	0,016 ± 0,001	5,37%
Ajenjo	0,039 ± 0,003	2,26%
Nogal	0,033 ± 0,001	3,13%
Ortiga	0,103 ± 0,001	1,11%

Tabla 3.11 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides modificados, obtenidas empleando el método 1



Nombre de la Planta	Método 2	
	Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
Romero	0,031 ± 0,001	3,15%
Sen	0,119 ± 0,006	5,35%
Menta	0,119 ± 0,003	2,57%
Escancel	0,114 ± 0,006	5,22%
Cola de caballo	0,091 ± 0,006	7,08%
Arrayan	0,080 ± 0,003	4,10%
Capulí	0,054 ± 0,001	4,13%
Tomillo	0,071 ± 0,001	1,16%
Guarmi poleo	0,125 ± 0,001	0,86%
Chanca piedra	0,038 ± 0,002	3,92%
Boldo	0,044 ± 0,001	2,39%
Eucalipto	0,043 ± 0,002	4,17%
Toronjil	0,118 ± 0,010	8,61%
Manzanilla	0,109 ± 0,002	1,92%
Apio	0,158 ± 0,005	3,04%
Perejil	0,028 ± 0,001	5,36%
Malva	0,113 ± 0,008	6,83%
Ruda	0,139 ± 0,005	3,68%
Diente de león	0,101 ± 0,001	0,94%
Borraja	0,106 ± 0,003	2,59%
Llantén	0,027 ± 0,001	4,42%
Ajenjo	0,148 ± 0,001	2,78%
Nogal	0,076 ± 0,002	2,63%
Ortiga	0,107 ± 0,003	2,80%

Tabla 3.12 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivos ensayos de concentración de flavonoides modificados obtenidas empleando el método 2



De lo revisado en la bibliografía, se confirma que todas las plantas en estudio presentan flavonoides tanto en estado libre como en glicósido; como ejemplos tenemos a la cola de caballo que presenta entre 0,2 a 0,9 % de flavonoides, en forma de glucósidos de kampferol y quercetina. La manzanilla posee cantidades por encima del 6% de flavonoides dentro de los cuales se ha identificado apigenina, glucósidos de apigenina, quercetina, rutina, etc. El sen posee particularmente kampferol y derivados. La ortiga posee entre el 1 – 2 % de flavonoides, destacándose glucósidos y rutósidos de quercetina, kampferol, etc. El capulí posee glucósidos de quercetina y kampferol. El nogal presenta alrededor de 3,4 % de flavonoides especialmente quercetina, un 0,2 – 0,6 % de hiperósidos de quercetina y kampferol están presentes. (Brinckmann J., Lindenmarer, 2004, Evans W., 2009, Restrepo M. y col, 2005, Muñoz F., 1998)

De las plantas en estudio no todas especifican ni la cantidad ni tipo de flavonoide que contienen, solamente mencionan su presencia.

Así mismo se realizó cromatografía en capa fina usando quercetina como patrón, de algunas plantas (toronjil, llantén y nogal), la cual esta descrita en el apartado 2.2.5 de materiales y métodos. En donde se observó que las tres plantas presentaban flavonoides pero ninguna quercetina, de las cuales la bibliografía cita que el nogal posee quercetina, su ausencia se puede deber a que no se trata de la misma especie de nogal o que la cantidad de quercetina es insuficiente para ser detectada, etc.

3.7.3 Comparación del promedio de las concentraciones con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) y sin la adición de acetato de plomo en los método 1 y 2

A partir de la modificación realizada en el método de cuantificación de flavonoides, con la adición de acetato de plomo para la precipitación de la clorofila, procedimiento que se encuentra detallado en el apartado 2.2.6.3.

En las tablas 3.13 y 3.14 se observan las medias de la concentración de flavonoides para cada caso. (ver anexo 8, tablas 8.1 y 8.2)



Nombre de la Planta	Método 1	
	\bar{x} Concentraciones mg/ml (sin adición de acetato)	\bar{x} Concentraciones mg/ml (con adición de acetato)
Romero	0,051	0,015
Sen	0,125	0,067
Menta	0,302	0,105
Escancel	0,065	0,051
Cola de caballo	0,115	0,056
Arrayan	0,112	0,044
Capulí	0,164	0,029
Tomillo	0,054	0,028
Guarmi poleo	0,401	0,124
Chanca piedra	0,030	0,016
Boldo	0,034	0,017
Eucalipto	0,077	0,046
Toronjil	0,385	0,119
Manzanilla	0,121	0,059
Apio	0,299	0,109
Perejil	0,022	0,017
Malva	0,160	0,081
Ruda	0,151	0,074
Diente de león	0,256	0,088
Borraja	0,102	0,051
Llantén	0,035	0,016
Ajenjo	0,248	0,039
Nogal	0,142	0,033
Ortiga	0,220	0,103

Tabla 3.13 Cuadro de plantas medicinales con sus promedios de concentración con la adición de acetato de plomo y sin la adición de acetato de plomo para el método 1



Nombre de la Planta	Método 2	
	\bar{x} Concentraciones mg/ml (sin adición de acetato)	\bar{x} Concentraciones mg/ml (con adición de acetato)
Romero	0,083	0,031
Sen	0,183	0,119
Menta	0,398	0,119
Escancel	0,304	0,114
Cola de caballo	0,167	0,091
Arrayan	0,135	0,080
Capulí	0,242	0,054
Tomillo	0,101	0,071
Guarmi poleo	0,407	0,125
Chanca piedra	0,072	0,038
Boldo	0,058	0,044
Eucalipto	0,081	0,043
Toronjil	0,464	0,118
Manzanilla	0,188	0,109
Apio	0,389	0,158
Perejil	0,039	0,028
Malva	0,256	0,113
Ruda	0,259	0,139
Diente de león	0,393	0,101
Borraja	0,217	0,106
Llantén	0,072	0,027
Ajenjo	0,305	0,148
Nogal	0,144	0,076
Ortiga	0,462	0,107

Tabla 3.14 Cuadro de plantas medicinales con sus promedios de concentración con la adición de acetato de plomo y sin la dición de acetato de plomo para el método 2



Al observar los resultados obtenidos podemos deducir que con la adición de acetato de plomo la cantidad de flavonoides cambia, lo cual puede deberse a la interferencia de la clorofila como se menciona en el apartado 2.2.6.3 para la cualificación y cuantificación de flavonoides.

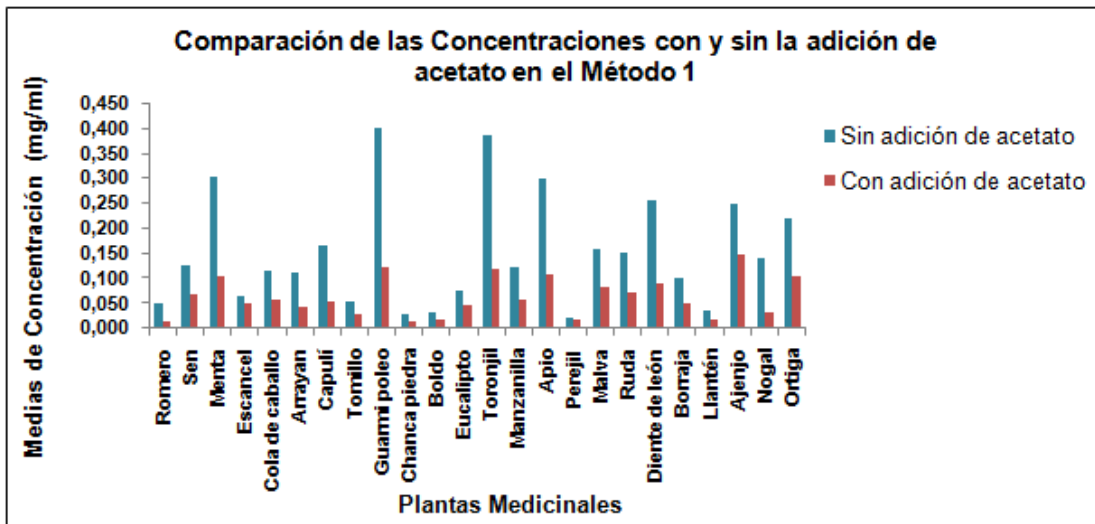


Gráfico 3.6 Gráfico comparativo entre la media de las concentraciones de flavonoides con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) para el método 1

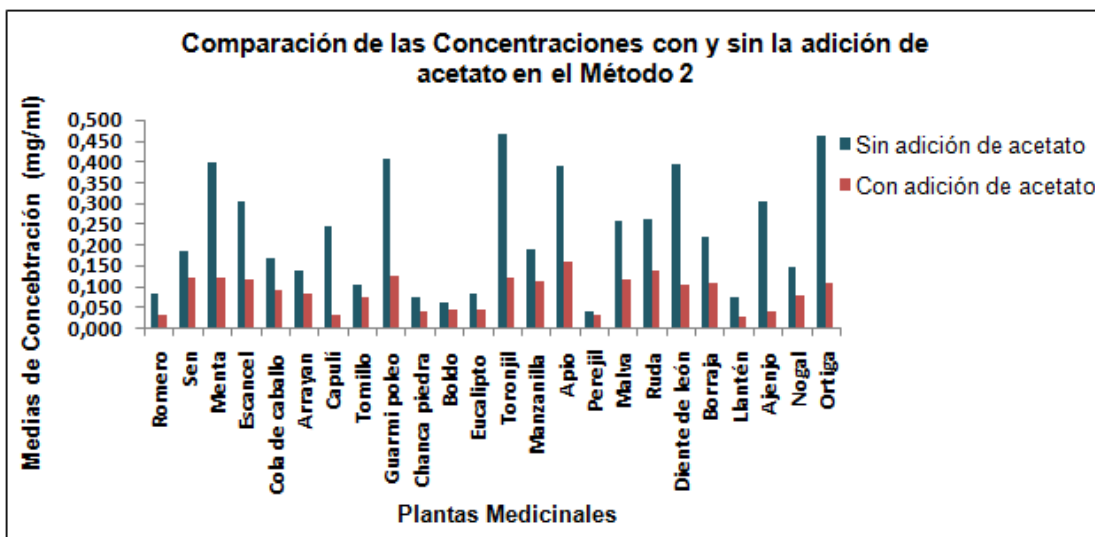


Gráfico 3.7 Gráfico comparativo entre la media de las concentraciones de flavonoides con la adición de acetato de plomo (precipitación de la clorofila) para el método 2



3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la tabla 3.15 se observan los resultados del análisis de varianza obtenido por la comparación entre método 1 y método 2.

Origen de las variaciones	Grados de libertad	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Métodos de Extracción	1	6504,0173	5,29231E-90	3,94016252
Tipo de Planta	23	2976,4248	1,2575E-126	1,64234351
Interacción	23	204,33811	2,9089E-71	1,64234351

Tabla 3.15 Cuadro de los grados de libertad, F experimental, probabilidad y valor crítico para F obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción

Se observa que los valores de F experimental son mayores a los de F crítico, de igual manera la probabilidad es menor que 0.05, por lo tanto se rechaza la H_0 planteada.

- **INTERPRETACION:**

De lo expuesto en la tabla 3.15, obtenemos lo siguiente:

Como indica el gráfico 3.8, existe una interacción significativa, correspondiente a la probabilidad de la interacción. El hecho de que las líneas no sean paralelas es un índice de la presencia de una interacción, tal como se observa en el gráfico.

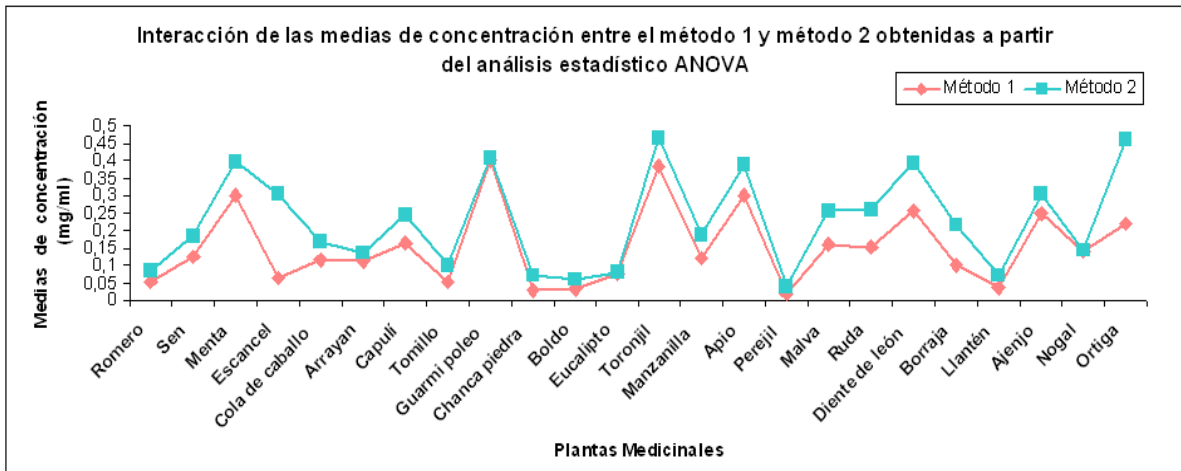


Gráfico 3.8 Ilustración de la interacción entre las medias de concentración del método 1 y 2 a partir del análisis estadístico ANOVA

Además se rechaza que no hay diferencias entre las 24 plantas analizadas dentro de este estudio, debido a que al menos una es diferente.

El siguiente análisis estadístico corresponde a los resultados obtenidos a partir de la modificación de la detección de flavonoides detallada en el apartado 2.2.6.3, en donde se precipita la clorofila y se obtiene un valor más preciso de la concentración de flavonoides presentes en cada uno de los 24 extractos.

En la tabla 3.16 se observan los resultados del análisis de varianza obtenido por la comparación entre método 1 y método 2 modificados.

Origen de las variaciones	Grados de libertad	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Métodos de Extracción	1	2727,29103	2,69016E-72	3,940162523
Tipo de Planta	23	546,1004761	1,95214E-91	1,642343509
Interacción	23	76,08743853	1,65049E-51	1,642343509

Tabla 3.16 Cuadro de los grados de libertad, F experimental, probabilidad y valor crítico para F obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción modificados



Se observa que los valores de F experimental son mayores a los de F crítico, de igual manera la probabilidad es menor que 0.05, por lo tanto se rechaza la Ho planteada.

• **INTERPRETACION:**

De lo expuesto en la tabla 3.16, obtenemos lo siguiente:

Como indica el gráfico 3.9, existe una interacción significativa, de igual manera como se presentó en el caso anterior sin la precipitación de la clorofila, correspondiente a la probabilidad de la interacción. El hecho de que las líneas no sean paralelas es un índice de la presencia de una interacción, tal como se observa en el gráfico.

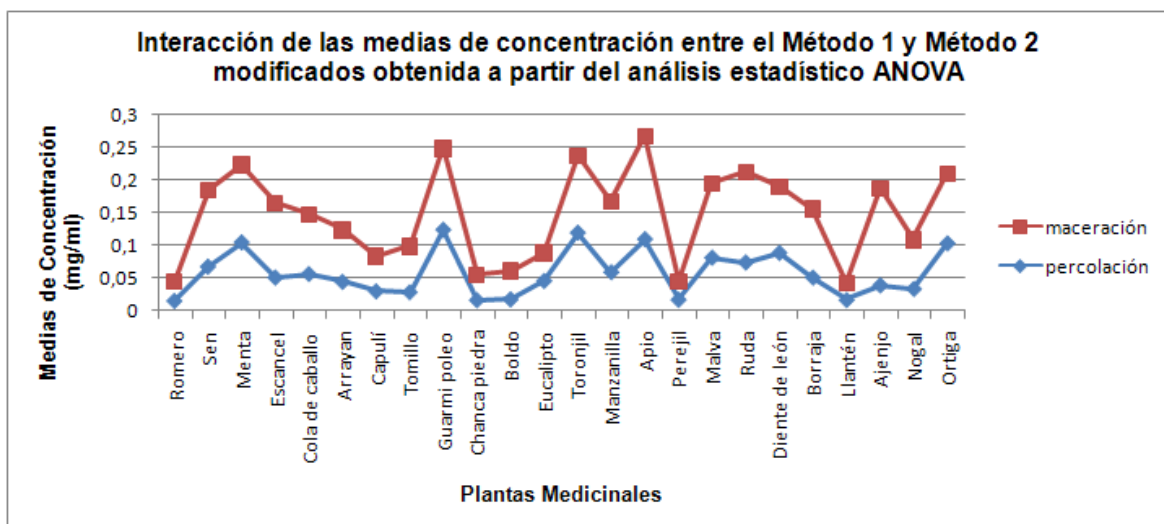


Gráfico 3.9 Ilustración de la interacción entre las medias de concentración del método 1 y 2 modificados a partir del análisis estadístico ANOVA

Además en éste caso de la modificación de los métodos 1 y 2 también se rechaza que no hay diferencias entre las 24 plantas analizadas dentro de este estudio, debido a que al menos una es diferente.

CONCLUSIONES



4. CONCLUSIONES

Se han elaborado extractos etanólicos de las plantas medicinales seleccionadas para el estudio y se han cuantificado los flavonoides que contienen a fin de comparar las medias de las concentraciones y determinar la eficiencia de extracción de cada uno de los métodos usados. La presente investigación ha permitido concluir lo siguiente:

- Se ha determinado el estado del arte de los métodos de extracción que se emplean en investigaciones reportadas en la literatura científica actual, observándose una gran variedad de métodos.
- Las plantas usadas para el estudio fueron recolectadas en Cuenca - Ecuador y caracterizadas botánicamente para tener la garantía de que se trabajó con la especie de planta correcta.
- Los extractos secos obtenidos mediante Percolación según la USP XXX permiten un mayor rendimiento en el 70.8 % de las plantas objeto de estudio comparado con el rendimiento que genera la extracción por el método propuesto por Tona y colaboradores lo que podría deberse probablemente a la estructura de la droga (hojas y flores).
- El estudio ANOVA planteado permite concluir que el método de extracción propuesto por Tona y colaboradores es más eficiente que la Percolación USP XXX cuando se comparan las medias de las concentraciones de flavonoides obtenidos por los dos métodos citados.

RECOMENDACIONES



5. RECOMENDACIONES

- Para la cuantificación de flavonoides usando el método colorimétrico, se recomienda usar la técnica de Martínez y colaboradores con la finalidad de evitar la interferencia de la clorofila en la cuantificación.
- Para el agotamiento de la droga (cromatografía) se recomienda proceder con un método más general para probar un mayor número de metabolitos.
- Se recomienda tener presente que en el momento de precipitar la clorofila con el acetato de plomo, otras sustancias pueden precipitar con la misma.
- Se recomienda socializar los resultados de este estudio ya que las plantas investigadas son usadas en la alimentación y poseen importantes concentraciones de flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFÍA

- Akhondzadeh Shahin, Fallah-Pour Hasan, Afkham Khosro, Jamshidi Amir-Hosseini, Khalighi-Cigaroudi Farahnaz, *Comparison of Crocus sativus L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression*, Complementary and Alternative Medicine, 4 (1), (2004), p. 12 .
- Azzimonti Carlos,. *BIOESTADÍSTICA APLICADA A BIOQUÍMICA Y FARMACIA* (SEGUNDA ed.). UNIVERSITARIA
- BRINCKMANN Josef A., LINDENMAIER Michael P., *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*, Medpharm. Scientific Publishers Stuttgart, 2004.
- CASTILLO García Encarna, MARTÍNEZ Solís Isabel, *Manual de Fitoterapia*, Elsevier, España, 2007.
- Chan Lai Wah, Cheah Emily LC, Saw Constance LL, Weng Wanyu, Heng Paul WS, *Antimicrobial and antioxidant activities of Cortex Magnoliae Officinalis and some other medicinal plants commonly used in South-East Asia*, Chinese Medicine, 3 (1), (2008), p.15.
- Chattopadhyay R. R., Bandyopadhyay M., *Effect of Azadirachta indica leaf extract on serum lipid profile changes in normal and streptozotocin induced diabetic rats*, African Journal of Biomedical Research, 8, (2005), p. 101-104.
- DOMINGUEZ Xorge A.; *Métodos de Investigación Fitoquímica* I. Limusa, 1973.
- Duraipandiyan Veeramuthu, Ayyanar Muniappan, Ignacimuthu Savarimuthu , *Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India*, BMC Complementary and Alternative Medicine, 6, (1), (2006), p.35.



- Dutra Rafael C., Magda N. Leite, Nádia R. Barbosa, *Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant activity of Pterodon emarginatus Vogel Seeds*, International Journal of Molecular Sciences, 9, (2008), p. 606-614.
- EVANS William C., *Pharmacognosy*, Elsevier Limited, 16^o Edition, 2009.
- EVANS William Charles, *Farmacognosia*, Interamericana, 1991.
- FONNEGRA G. Ramiro, JIMENEZ R. Silvia Luz, *Plantas Medicinales aprobadas en Colombia*, 2^{da} Edición, Editorial Universidad de Antioquia, 2007.
- Franco S. L., *Maytenus Illicifolia Martius Ex. Reiss. Celastraceae- Technological Development of Macerates*, Cuaderno de Farmacia, 9, (1), (1993), p. 44-45.
- Gujrati Vipul, Nilesh Patel, Venkat N. Rao, K. Nandakumar, T.S. Gouda, Md. Shalam, S.M. Shanta Kumar, *Hepatoprotective activity of alcoholic and aqueous extracts of leaves of Tylophora indica (Linn) in rats*, Indian Journal Pharmacology, 39 (1), (2007), p. 43-47.
- Hoet Sara, Frederik Opperdoes, Reto Brun, Victor Adjakidjé, Joëlle Quetin-Leclercq, *In vitro antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants*, Journal of Ethnopharmacology, 91, (2004), p. 37-42.
- Hosseinzadeh H., *Anti-nociceptive Effects of the Aerial Parts of Salvia Nemorosa L. Extracts in Mice*, (2002).
- ICART Isern M. Teresa, FUENTELESAZ Gallego Carmen, PULPÓN Segura Anna M., *Elaboración y Presentación de un Proyecto de Investigación y una Tesina*, Edicions de la Universitat de Barcelona, 2000.
- JAVER Botella Alejandro, GARCÍA Bermejo María José, *Manual Auxiliar de Farmacia*, Eduforma, Madrid, 2000.
- KUKLINSKI Claudia, *Farmacognosia*, Barcelona, Omega S.A., 2001.



- Lino Apak, Deogracious Olila, *The in-vitro antibacterial activity of Annona senegalensis, Securidacca longipendiculata and Steganotaenia araliacea - Ugandan medicinal plants*, African Health Sciences, 6, (1), (2006), p. 31-35.
- Lock Olga, Cabello Isabel, Doroteo Victor Hugo, *Análisis de Flavonoides en Plantas*, Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias – Sección Química, Lima – Perú, 2006
- LUCK Sing de Ugaz Olga, *Colorantes Naturales*, PUCP, 1997.
- Mahmoudabadi Ali Zarei, Dabbagh Muhammad Ali, Fouladi Zahra , *In Vitro Anti- Candida Activity of Zataria multiflora Boiss*, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 4 (3), (2007), p. 351-353.
- Manual Balanza: Metter Toledo, línea de balanzas PB-L
- Manual del Espectrofotómetro Genesys 10, Thermo Electron Corporation
- Manual del Liofilizador: A Guide to Freeze Drying for the Laboratory, Labconco Corporation
- Manual Rotavapor: Heidolph Research mode easy A/CH/D 0800-Heidolph-all others: 499122-992068
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M., Tuñón M. J., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*, Departamento de Fisiología, Universidad de León y *Hospital de León. España, Nutr. Hosp. (2002) XVII (6) 271-278, 2003
- MILLER James, MILLER Jane, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Cuarta Edición, Pearson Educación S.A., Madrid, 2002
- MILTON Susan J., *Estadística para Biología y Ciencias de la Salud*, 3^{era} Edición, Interamericana, España, 2007
- MONTGOMERY Douglas, *Applied Statistics and Probability for Engineers*, John Wiley & Sons, Inc., Third Edition, United States of America, 2002



- Moundipa Paul F., Flore Kamini G. Melanie, Bilong Charles F. Bilong, Bruchhau Iris, *In vitro amoebicidal activity of some medicinal plants of the Bamun region (Cameroon)*, 2 (2), (2005), p. 113 – 121.
- MUÑOZ Fernando, *Plantas Medicinales y Aromáticas*, Editorial Mundiprensa libros, 1998
- MUÑOZ Orlando, MONTS Marco, WILKOMIRSKY Tatiana, *Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología*, Editorial Universitaria, 2001.
- NAVIDI William, *Estadística para Ingenieros y Científicos*, Interamericana, México, 2006
- Nia R., Paper D. H., Essien E.E., Iyadi K. C., Bassey A. I. L., Antai A. B., Franz G., *Evaluation of the Anti-oxidant and Anti-angiogenic Effects of Sphenocentrum Jollyanum Pierre*, African Journal of Biomedical Research, 7, (2004), p. 129-132.
- OLAYA J. M., MENDEZ Alzadora Jacobo, *Guía de Plantas y Productos Medicinales*, Convenio Andrés Bello, 2003.
- Ouattara Y., Sanon S., Traoré Y., Mahiou V., Azase N., Sawadogo L., *Antimalarial activity of Swartzia madagascariensis desv. (leguminosae), Combretum glutinosum guill. & Perr. (Combretaceae) and Tinospora bakis miers (menispermaceae), burkina faso medicinal plants*, Afr. J. Traditional, 3, (1), (2006), p. 75-81.
- PRATS Gravet Soledad, RODRIGUEZ Galán Inés, ROIG Montblanch Alfredo, SALAZAR Macián Ramón, SALVADO Llados Ma. Angeles, SELLES Flores Eugenio, SANCHEZ Morcillo José, SOLAN Marsa Concepción, SUIÑE Negre Joseph, TICO Grau Joseph, *Tratado de Farmacia Galénica*, Madrid, 1992
- Raj Kapoor B., Jayakar B., Murugesh N., *Antitumor activity of Indigofera aspalathoides on Ehrlich ascites carcinoma in mice*, Indian J. Pharmacol., 36, (1), (2004), p. 38-40.



- REICH Eike, SCHIBLI Anne, *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Análisis of Medicinal Plants*, Thieme, New York, 2006
- RESTREPO de Fraume Mélida, ROMERO Quintero Pedro, FRAUME Néstor, *El Milagro de las Plantas: Aplicaciones Medicinales y Oroferíngas*, Editorial San Pablo, 2005
- Ríos Maria Y., Aguilar Berenice, *Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de Hamelia patens Jacquin (Rubiaceae)*, Rev Cubana Plant Med, 11, (1), (2006), p. 1-5.
- RÍOS Monserrat, KOZIOT Michael J., BORGTOFT Pederson Henrik, GRANDA Gabriela, *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, Retos y perspectivas*, Primera Edición, Quito, 2007
- ROMO De Vivar Alfonso, *Química de la flora mexicana*, UNAM, 2005.
- Said Omar, Fulder Stephen, Khalil Khaled, Azaizeh Hassan, Kassis Eli, Saad Bashar, *Maintaining A Physiological Blood Glucose Level with 'Glucolevel', A Combination of Four Anti-Diabetes Plants Used in the Traditional Arab Herbal Medicine*, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 5, (4), (2008), p. 421-428.
- SHELLES FLORES, *Farmacia galénica*. Madrid, Selsa, 1992.
- STRASBURGER E., *Tratado de Botánica*, Marin S.A., 1974.
- Sun Y., Wang W., *Ultrasonic extraction of ferulic acid from Ligusticum chuanxiong*, Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers, 39, (6), (2008), p.653-656.
- Suvakanta Dash, Lila Kanta Nath, Satish Bhise, Nihar Bhuyan, *Antioxidant and antimicrobial activities of Heracleum nepalense D Don root*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 4, (1), (2005), p. 341-347.
- Tamboura H., B. Bayala, M. Lompo, I. P. Guissou and L. Sawadogo, Ecological distribution, morphological characteristics and acute toxicity of aqueous extracts of *holarrhena floribunda* (g. don) durand & schinz,



leptadenia hastata (pers.) decne and *cassia sieberiana* (d c) used by veterinary healers in burkina faso, African Journal Ethnomedicines, 2 (1), (2005), p. 13 – 24.

- The United States Pharmacopeia, 24th revisión. USP Convention, INC. Rockeville, 1994.
- The United States Pharmacopeia, 30th revisión. USP Convention, INC. Rockeville, 2006.
- Tona L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K., Vlietinck A.J., *Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants*, Journal of Ethnopharmacology, 61, (1998), 57-65
- Vogel Hermine, Mauricio González, Francesca Faini, Iván Razmilic, Jaime Rodríguez, José San Martín, Francisco Urbina, *Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean Haplopappus-species Known as bailahuén*, Journal of Ethno-Pharmacology, 97, (2005), p. 97-100.
- VOIGT Rudolf, *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España : Acriba, 1982.
- Woodward Emily J., *The Effects of Traditionally Prepared Herbal Decoctions*, (1999).
- ZEIGER Eduardo, LINCOLN Taiz, *Fisiología Vegetal*, 3^{era} Edición, 2007.



ENLACES WEB

- <http://www.hierbitas.com/principiosactivos/heterosidos.htm>
- http://www.medicoscubanos.com/diccionario_medico.aspx?q=aglicona
- <http://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/capa-fina>
- www.elgalabwater.com/?id=502&language=es
- www.labconco.com

GLOSARIO



7. GLOSARIO

HETERÓSIDO: son el resultado de la condensación de una o varias osas (azúcares simples), con una estructura no glucídica llamada genina o aglicona.

ALBURA: es el último anillo de crecimiento producido por el cámbium vascular en el tallo de una planta, que corresponde al único xilema funcional.

CÁMBIUM: es un tejido vegetal meristemático específico de las plantas leñosas, situado entre la corteza y el leño.

AGLICONA: es una porción de una molécula glicídica que carece de azúcar.

ÁCIDO QUÍNICO: la fórmula del ácido cristalino es $C_{14}H_{11}O_{11}.OH$, se encuentra en todas las quininas en estado de quinato de cal. Se disuelve algo en agua fría y en mayor cantidad en agua hirviendo, pero sus verdaderos disolventes son el alcohol y el éter.

ABREVIATURAS



8. ABREVIATURAS

A: Absorbancia

g: gramos

mg: miligramos

ml: mililitros

°C: grados Celsius

C: concentración

CV: coeficiente de variación

\bar{x} : media aritmética

σ : desviación estándar

nm: nanómetros

ANEXOS



ANEXO 1

Caracterización Botánica de la muestra de plantas medicinales realizada en el Herbario de la Universidad del Azuay



ANEXO 2

**TABLA DE PLANTAS CON LA DROGA SELECCIONADA Y SUS
RESPECTIVAS FECHAS DE RECOLECCIÓN Y LAVADO, ASÍ COMO TAMBIÉN
EL PESO DE LA DROGA SECA Y EL LUGAR DE RECOLECCIÓN**



Nombre de la Planta	Droga	Fecha de recolección	Fecha de lavado	Peso de la planta seca (g)	Sitio de recolección
Ajenjo	Hojas	15/06/2009	16/06/2009	21,42	Cuenca-Azuay
Apio	Hojas	30/06/2009	01/07/2009	30,01	Cuenca-Azuay
Arrayán	Hojas	17/05/2009	22/05/2009	106,9	Cuenca-Azuay
Boldo	Hojas	05/06/2009	-----	41,2	Cuenca-Azuay
Borraja	Flores-Hojas	01/07/2009	02/07/2009	33,15	Cuenca-Azuay
Capulí	Hojas	31/05/2009	01/06/2009	64,5	Cuenca-Azuay
Chanca piedra	Tallos-Raíces	05/06/2009	-----	48,12	Cuenca-Azuay
Cola de caballo	Tallos-Raíces	02/06/2009	03/06/2009	71,12	Cuenca-Azuay
Diente de león	Flores-Hojas	01/07/2009	02/07/2009	31,4	Cuenca-Azuay
Escancel	Flores-Hojas	17/05/2009	22/05/2009	40,4	Cuenca-Azuay
Eucalipto	Hojas	17/05/2009	22/05/2009	98,62	Cuenca-Azuay
Guarmi poleo	Flores-Hojas	17/05/2009	22/05/2009	29,89	Cuenca-Azuay
Llantén	Tallos-Raíces	29/06/2009	30/06/2009	58,64	Cuenca-Azuay
Malva	Flores-Hojas	01/07/2009	02/07/2009	34,97	Cuenca-Azuay
Manzanilla	Flores-Hojas	30/06/2009	01/07/2009	68,17	Cuenca-Azuay
Menta	Hojas	02/06/2009	03/06/2009	28,95	Cuenca-Azuay
Nogal	Hojas	17/05/2009	22/05/2009	49,28	Cuenca-Azuay
Ortiga	Hojas	17/05/2009	22/05/2009	14,9	Cuenca-Azuay
Perejil	Tallos-Raíces	29/06/2009	30/06/2009	26,55	Cuenca-Azuay
Romero	Hojas	16/06/2009	-----	77,11	Cuenca-Azuay
Ruda	Flores-Hojas	30/06/2009	01/07/2009	55,13	Cuenca-Azuay
Sen	Hojas	05/06/2009	-----	81,88	Cuenca-Azuay
Tomillo	Hojas	05/06/2009	-----	42,96	Cuenca-Azuay
Toronjil	Hojas	15/06/2009	16/06/2009	13,79	Cuenca-Azuay

Tabla 2.1 Indica el período en el que se realizó la recolección, lavado de las Plantas Medicinales; así como la ubicación de su recolección.



ANEXO 3
ESQUEMA GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS SECOS Y
DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

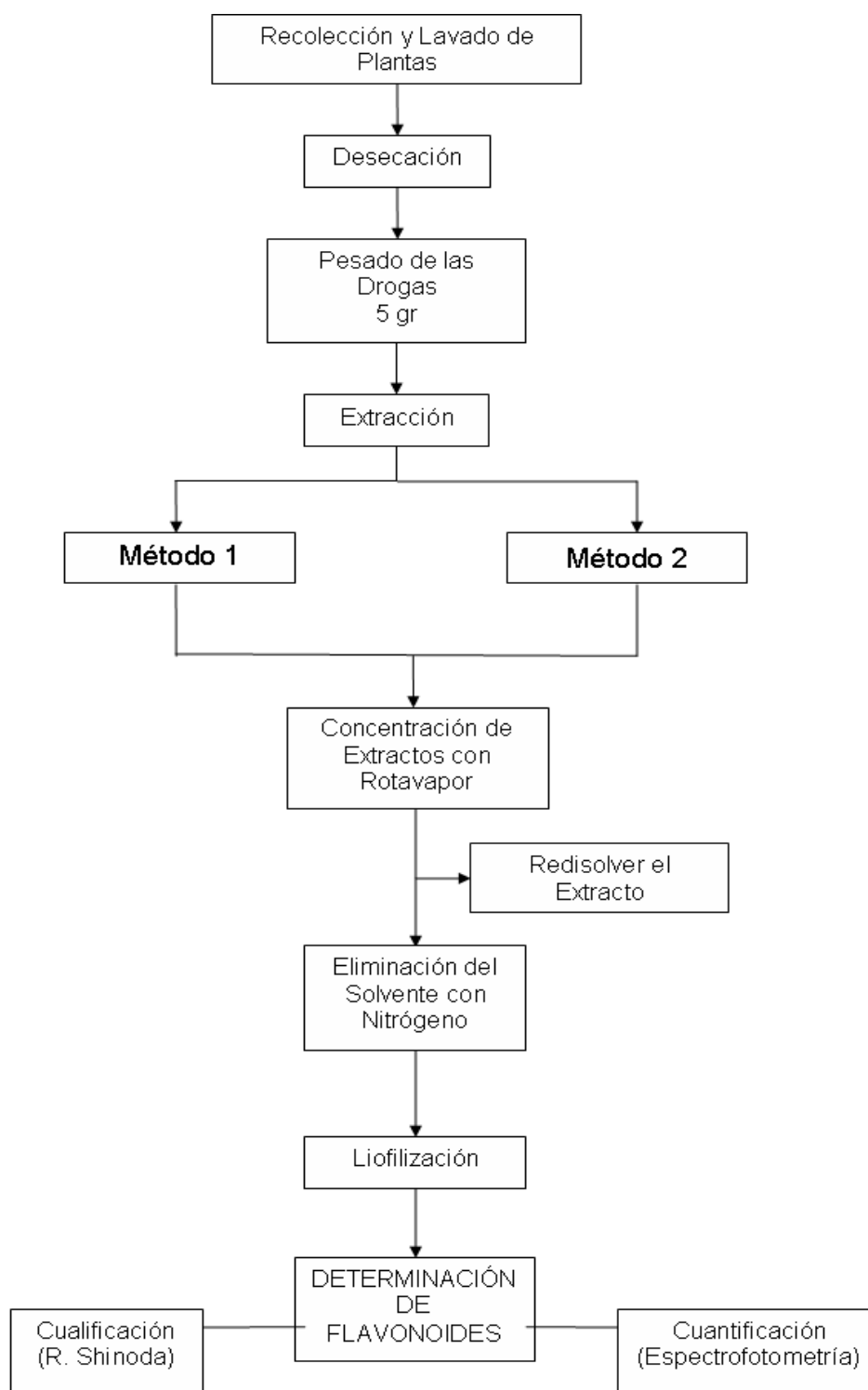


Tabla 3.1 Indica el Procedimiento General para la obtención de Extractos Secos



ANEXO 4
TABLAS DE RENDIMIENTO OBTENIDO DE LAS 24 PLANTAS MEDICINALES
A PARTIR DE LOS MÉTODO 1 Y MÉTODO 2



Nombre de la Planta	Droga seca (g)	Tubo vacío (g)	Tubo con extracto seco (g)	Extracto seco (g)
Romero	5	65,107	65,749	0,642
Sen	5	62,520	62,893	0,373
Menta	5	63,375	63,567	0,191
Escancel	5	64,131	64,578	0,447
Cola de caballo	5	64,413	64,772	0,359
Arrayán	5	62,691	63,013	0,321
Capulí	5	62,574	63,318	0,744
Tomillo	5	63,908	64,167	0,259
Guarmi poleo	5	62,940	63,220	0,281
Chanca piedra	5	62,208	62,468	0,260
Boldo	5	64,146	64,597	0,452
Eucalipto	5	65,322	66,006	0,684
Toronjil	5	65,314	65,720	0,406
Manzanilla	5	64,150	64,435	0,285
Apio	5	62,214	62,550	0,336
Perejil	5	62,941	63,174	0,233
Malva	5	63,904	64,390	0,485
Ruda	5	62,570	62,890	0,320
Diente de león	5	62,707	63,212	0,505
Borraja	5	64,418	64,725	0,307
Llantén	5	64,130	64,470	0,340
Ajenjo	5	63,375	63,950	0,574
Nogal	5	62,522	62,976	0,454
Ortiga	5	65,108	65,429	0,321

Tabla 4.1 Indica el rendimiento del extracto seco obtenido a partir de la droga seca por el método 1



Nombre de la Planta	Droga seca (g)	Tubo vacío (g)	Tubo con extracto seco (g)	Extracto seco (g)
Llantén	5	64,144	64,376	0,232
Diente de león	5	62,198	62,569	0,372
Escancel	5	65,300	65,658	0,358
Eucalipto	5	62,929	64,851	1,922
Manzanilla	5	62,560	62,822	0,263
Romero	5	63,894	64,574	0,680
Malva	5	63,364	63,650	0,286
Cola de caballo	5	64,121	64,383	0,261
Tomillo	5	64,406	64,713	0,308
Sen	5	62,515	62,921	0,406
Perejil	5	62,697	62,929	0,232
Capulí	5	68,978	69,864	0,886
Ortiga	5	62,203	62,344	0,141
Toronjil	5	64,143	64,434	0,291
Boldo	5	65,304	65,740	0,436
Nogal	5	62,562	62,851	0,289
Apio	5	62,697	62,998	0,301
Arrayan	5	62,516	62,924	0,408
Ruda	5	63,900	64,124	0,223
Borraja	5	64,125	64,308	0,183
Menta	5	62,935	63,233	0,299
Chanca piedra	5	62,184	62,282	0,098
Ajenjo	5	68,981	69,362	0,380
Guarmi poleo	5	63,368	63,602	0,234

Tabla 4.2 Cuadro de rendimientos de los extractos secos obtenidos por el método 2



ANEXO 5
TABLA DE RESULTADOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON SU
RESPECTIVO GRÁFICO



Patrones de Quercetina (mg/ml)	Concentraciones de Quercetina (mg)	Absorbancia 1 (nm)			Absorbancia 2 (nm)			Absorbancia 3 (nm)			Absorbancia (nm) $\bar{x} \pm \sigma$	CV	Factor
		A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3			
P 1	0,189	1,321	1,319	1,324	1,168	1,172	1,168	1,151	1,151	1,149	1,214 ± 0,081	6,69%	0,156
P 2	0,094	0,581	0,583	0,578	0,582	0,586	0,584	0,589	0,582	0,578	0,583 ± 0,004	0,61%	0,161
P 3	0,047	0,280	0,279	0,280	0,290	0,287	0,289	0,285	0,282	0,283	0,284 ± 0,004	1,44%	0,166
P 4	0,027	0,161	0,162	0,163	0,152	0,150	0,153	0,146	0,143	0,146	0,153 ± 0,008	4,92%	0,177

0,165

Tabla 5.1. Cuadro de las concentraciones del patrón y el factor utilizado para la determinación de las concentraciones de las muestras

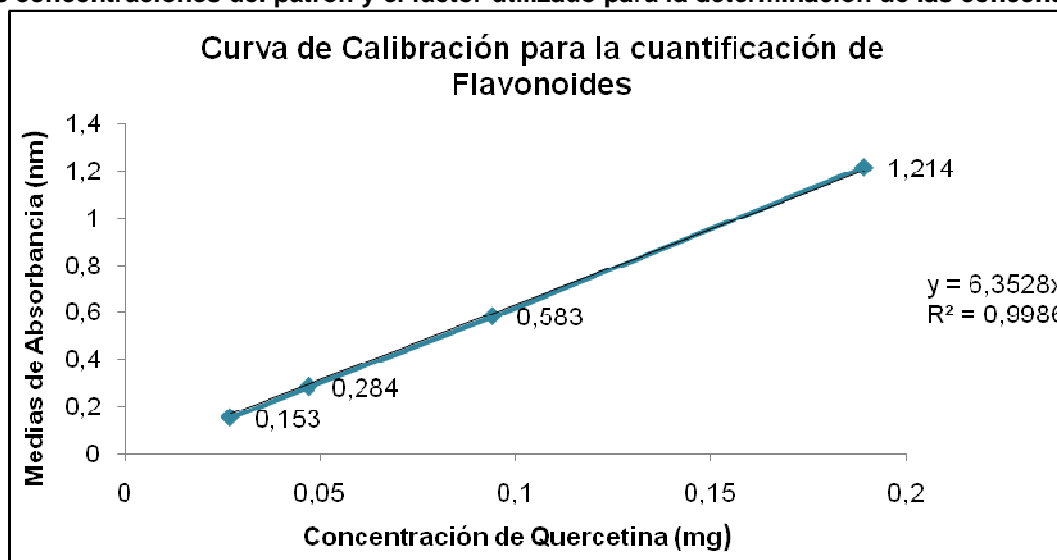


Gráfico 5.1 Ilustración de las concentraciones y absorbancias de la quercetina como estándar a 415 nm



ANEXO 6
TABLAS DE CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES OBTENIDAS DE LAS 24
PLANTAS MEDICINALES A PARTIR DEL MÉTODO 1 Y MÉTODO 2



Nombre de la Planta	Método 1																				
	Ensayo 1 Absorbancia (nm)			Ensayo 2 Absorbancia (nm)			Ensayo 3 Absorbancia (nm)			Factor	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)			Ensayo 2 Concentración (mg/ml)			Ensayo 3 Concentración (mg/ml)			Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3		
Romero	0,306	0,308	0,302	0,314	0,316	0,310	0,303	0,307	0,301	0,165	0,050	0,051	0,050	0,052	0,052	0,051	0,050	0,051	0,050	0,051 ± 0,001	1,69%
Sen	0,747	0,742	0,745	0,763	0,766	0,768	0,766	0,763	0,765	0,165	0,123	0,122	0,123	0,126	0,126	0,127	0,126	0,126	0,126	0,125 ± 0,002	1,38%
Menta	1,833	1,831	1,834	1,827	1,830	1,828	1,829	1,827	1,832	0,165	0,302	0,302	0,302	0,301	0,302	0,301	0,301	0,301	0,301	0,302 ± 0,0004	0,14%
Escancel	0,401	0,400	0,399	0,396	0,399	0,395	0,389	0,389	0,387	0,165	0,066	0,066	0,066	0,065	0,066	0,065	0,064	0,064	0,064	0,065 ± 0,001	1,36%
Cola de caballo	0,708	0,701	0,706	0,696	0,692	0,697	0,691	0,693	0,689	0,165	0,117	0,116	0,116	0,115	0,114	0,115	0,114	0,114	0,114	0,115 ± 0,001	0,96%
Arrayan	0,673	0,677	0,675	0,680	0,685	0,679	0,676	0,680	0,675	0,165	0,111	0,112	0,111	0,112	0,113	0,112	0,111	0,112	0,111	0,112 ± 0,001	0,54%
Capulí	1,012	1,005	1,008	0,985	0,988	0,987	0,988	0,989	0,991	0,165	0,167	0,166	0,166	0,162	0,163	0,163	0,163	0,163	0,163	0,164 ± 0,002	1,05%
Tomillo	0,325	0,323	0,327	0,326	0,328	0,325	0,331	0,330	0,329	0,165	0,054	0,053	0,054	0,054	0,054	0,054	0,055	0,054	0,054	0,054 ± 0,0004	0,80%
Guarmi poleo	2,410	2,413	2,410	2,439	2,436	2,435	2,455	2,451	2,456	0,165	0,397	0,398	0,397	0,402	0,401	0,401	0,405	0,404	0,405	0,401 ± 0,003	0,77%
Chanca piedra	0,177	0,179	0,176	0,185	0,183	0,184	0,183	0,182	0,180	0,165	0,029	0,030	0,029	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030	0,030 ± 0,001	1,75%
Boldo	0,197	0,193	0,194	0,215	0,216	0,216	0,200	0,205	0,204	0,165	0,032	0,032	0,032	0,035	0,036	0,036	0,033	0,034	0,034	0,034 ± 0,002	4,56%
Eucalipto	0,460	0,460	0,462	0,467	0,463	0,465	0,470	0,468	0,467	0,165	0,076	0,076	0,076	0,077	0,076	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077 ± 0,001	0,78%
Toronjil	2,258	2,257	2,256	2,372	2,370	2,374	2,373	2,372	2,373	0,165	0,372	0,372	0,372	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391	0,385 ± 0,010	2,47%
Manzanilla	0,733	0,736	0,738	0,735	0,730	0,736	0,728	0,739	0,735	0,165	0,121	0,121	0,122	0,121	0,120	0,121	0,120	0,122	0,121	0,121 ± 0,001	0,49%
Apio	1,812	1,811	1,810	1,816	1,819	1,815	1,803	1,808	1,810	0,165	0,299	0,298	0,298	0,299	0,300	0,299	0,297	0,298	0,298	0,299 ± 0,001	0,26%
Perejil	0,126	0,121	0,124	0,140	0,141	0,141	0,136	0,133	0,138	0,165	0,021	0,020	0,020	0,023	0,023	0,023	0,022	0,022	0,023	0,022 ± 0,001	5,83%
Malva	0,951	0,952	0,954	0,986	0,986	0,985	0,974	0,973	0,969	0,165	0,157	0,157	0,157	0,163	0,163	0,162	0,161	0,160	0,160	0,160 ± 0,002	1,50%
Ruda	0,925	0,925	0,923	1,001	0,987	0,986	0,832	0,830	0,831	0,165	0,152	0,152	0,152	0,165	0,163	0,163	0,137	0,137	0,137	0,151 ± 0,012	7,63%
Diente de león	1,526	1,525	1,523	1,576	1,571	1,571	1,562	1,551	1,550	0,165	0,252	0,251	0,251	0,260	0,259	0,259	0,257	0,256	0,255	0,256 ± 0,004	1,37%
Borraja	0,653	0,644	0,648	0,564	0,559	0,558	0,647	0,644	0,645	0,165	0,108	0,106	0,107	0,093	0,092	0,092	0,107	0,106	0,106	0,102 ± 0,007	7,02%
Llantén	0,223	0,221	0,221	0,202	0,203	0,202	0,207	0,204	0,203	0,165	0,037	0,036	0,036	0,033	0,033	0,033	0,034	0,034	0,033	0,035 ± 0,002	4,40%
Ajenjo	1,517	1,516	1,516	1,549	1,543	1,543	1,464	1,462	1,458	0,165	0,250	0,250	0,250	0,255	0,254	0,254	0,241	0,241	0,240	0,248 ± 0,006	2,45%
Nogal	0,853	0,858	0,856	0,876	0,869	0,875	0,851	0,850	0,846	0,165	0,141	0,141	0,141	0,144	0,143	0,144	0,140	0,140	0,139	0,142 ± 0,002	1,30%
Ortiga	1,409	1,392	1,393	1,297	1,298	1,293	1,307	1,306	1,311	0,165	0,232	0,229	0,230	0,214	0,214	0,213	0,215	0,215	0,216	0,220 ± 0,008	3,64%

Tabla 6.1. Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivas absorbancias y concentración de flavonoides obtenidas empleando el método1



Nombre de la Planta	Método 2																				Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
	Ensayo 1 Absorbancia (nm)			Ensayo 2 Absorbancia (nm)			Ensayo 3 Absorbancia (nm)			Factor	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)			Ensayo 2 Concentración (mg/ml)			Ensayo 3 Concentración (mg/ml)					
	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3			
Romero	0,504	0,499	0,500	0,510	0,511	0,512	0,506	0,498	0,492	0,165	0,083	0,082	0,082	0,084	0,084	0,084	0,083	0,082	0,081	0,083 ± 0,001	1,35%	
Sen	1,122	1,123	1,123	1,085	1,085	1,082	1,125	1,124	1,126	0,165	0,185	0,185	0,185	0,179	0,179	0,178	0,185	0,185	0,186	0,183 ± 0,003	1,80%	
Menta	2,453	2,454	2,457	2,394	2,396	2,395	2,391	2,396	2,395	0,165	0,404	0,404	0,405	0,395	0,395	0,395	0,394	0,395	0,395	0,398 ± 0,005	1,25%	
Escancel	1,889	1,887	1,891	1,830	1,828	1,824	1,813	1,816	1,814	0,165	0,311	0,311	0,312	0,302	0,301	0,301	0,299	0,299	0,299	0,304 ± 0,006	1,88%	
Cola de caballo	0,992	0,989	0,992	1,092	1,087	1,089	0,965	0,966	0,967	0,165	0,163	0,163	0,163	0,180	0,179	0,179	0,159	0,159	0,159	0,167 ± 0,009	5,56%	
Arrayan	0,824	0,829	0,826	0,801	0,800	0,800	0,825	0,823	0,825	0,165	0,136	0,137	0,136	0,132	0,132	0,132	0,136	0,136	0,136	0,135 ± 0,002	1,54%	
Capulí	1,464	1,466	1,466	1,472	1,470	1,471	1,475	1,477	1,474	0,165	0,241	0,242	0,242	0,243	0,242	0,242	0,243	0,243	0,243	0,242 ± 0,001	0,30%	
Tomillo	0,587	0,583	0,584	0,629	0,626	0,629	0,622	0,624	0,620	0,165	0,097	0,096	0,096	0,104	0,103	0,104	0,103	0,103	0,102	0,101 ± 0,003	3,34%	
Guarmi poleo	2,479	2,475	2,479	2,479	2,478	2,479	2,443	2,447	2,444	0,165	0,409	0,408	0,409	0,409	0,408	0,409	0,403	0,403	0,403	0,407 ± 0,003	0,68%	
Chanca piedra	0,460	0,461	0,465	0,391	0,391	0,393	0,450	0,449	0,448	0,165	0,076	0,076	0,077	0,064	0,064	0,065	0,074	0,074	0,074	0,072 ± 0,005	7,47%	
Boldo	0,350	0,352	0,353	0,354	0,356	0,353	0,351	0,357	0,360	0,165	0,058	0,058	0,058	0,058	0,059	0,058	0,058	0,059	0,059	0,058 ± 0,001	0,89%	
Eucalipto	0,499	0,496	0,496	0,498	0,497	0,496	0,486	0,489	0,483	0,165	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082	0,082	0,080	0,081	0,080	0,081 ± 0,001	1,17%	
Toronjil	2,816	2,817	2,818	2,821	2,825	2,826	2,815	2,812	2,811	0,165	0,464	0,464	0,464	0,465	0,466	0,466	0,464	0,463	0,463	0,464 ± 0,001	0,19%	
Manzanilla	1,128	1,126	1,125	1,125	1,124	1,123	1,170	1,166	1,166	0,165	0,186	0,186	0,185	0,185	0,185	0,185	0,193	0,192	0,192	0,188 ± 0,003	1,86%	
Apio	2,356	2,359	2,361	2,356	2,361	2,362	2,364	2,364	2,369	0,165	0,388	0,389	0,389	0,388	0,389	0,389	0,390	0,390	0,390	0,389 ± 0,001	0,17%	
Perejil	0,233	0,232	0,232	0,259	0,256	0,259	0,221	0,221	0,223	0,165	0,038	0,038	0,038	0,043	0,042	0,043	0,036	0,036	0,037	0,039 ± 0,003	6,83%	
Malva	1,531	1,532	1,534	1,543	1,540	1,539	1,581	1,580	1,582	0,165	0,252	0,252	0,253	0,254	0,254	0,254	0,261	0,260	0,261	0,256 ± 0,004	1,46%	
Ruda	1,588	1,585	1,589	1,541	1,546	1,540	1,578	1,579	1,581	0,165	0,262	0,261	0,262	0,254	0,255	0,254	0,260	0,260	0,261	0,259 ± 0,003	1,33%	
Diente de león	2,475	2,472	2,472	2,352	2,337	2,344	2,329	2,329	2,328	0,165	0,408	0,407	0,407	0,388	0,385	0,386	0,384	0,384	0,384	0,393 ± 0,011	2,88%	
Borraja	1,355	1,354	1,356	1,281	1,284	1,283	1,313	1,317	1,318	0,165	0,223	0,223	0,223	0,211	0,212	0,211	0,216	0,217	0,217	0,217 ± 0,005	2,38%	
Llantén	0,400	0,400	0,405	0,426	0,421	0,430	0,480	0,480	0,479	0,165	0,066	0,066	0,067	0,070	0,069	0,071	0,079	0,079	0,079	0,072 ± 0,006	7,97%	
Ajenjo	1,741	1,742	1,743	1,900	1,901	1,899	1,904	1,902	1,908	0,165	0,287	0,287	0,287	0,313	0,313	0,313	0,314	0,313	0,314	0,305 ± 0,013	4,34%	
Nogal	0,898	0,897	0,900	0,843	0,843	0,844	0,876	0,876	0,877	0,165	0,148	0,148	0,148	0,139	0,139	0,139	0,144	0,144	0,145	0,144 ± 0,004	2,75%	
Ortiga	2,788	2,789	2,791	2,826	2,825	2,824	2,785	2,788	2,790	0,165	0,459	0,460	0,460	0,466	0,466	0,465	0,459	0,459	0,460	0,462 ± 0,003	0,65%	

Tabla 6.2. Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivas absorbancias y concentración de flavonoides obtenidas empleando el método 2



ANEXO 7
TABLA DE RESULTADOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN CON LA
ADICIÓN DE ACETATO DE PLOMO (PRECIPITACIÓN DE LA CLOROFILA)
CON SU RESPECTIVO GRÁFICO



Patrones de Quercetina (ml)	Concentraciones de Quercetina (mg/ml)	Absorbancia 1 (nm)			Absorbancia 2 (nm)			Absorbancia 3 (nm)			Absorbancia (nm) $\bar{x} \pm \sigma$	CV	Factor
		A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3			
P 1	0,189	1,060	1,065	1,067	1,086	1,088	1,089	1,062	1,062	1,066	1,072 ± 0,012	1,14%	0,176
P 2	0,094	0,542	0,539	0,538	0,566	0,569	0,566	0,553	0,554	0,554	0,553 ± 0,012	2,15%	0,170
P 3	0,047	0,297	0,295	0,297	0,282	0,281	0,280	0,286	0,293	0,289	0,289 ± 0,007	2,39%	0,163
P 4	0,027	0,165	0,162	0,164	0,153	0,152	0,152	0,162	0,161	0,161	0,159 ± 0,005	3,30%	0,170

0,170

Tabla 7.1. Cuadro de las concentraciones de quercetina, absorbancias y el factor utilizado en la determinación de las concentraciones de las muestras

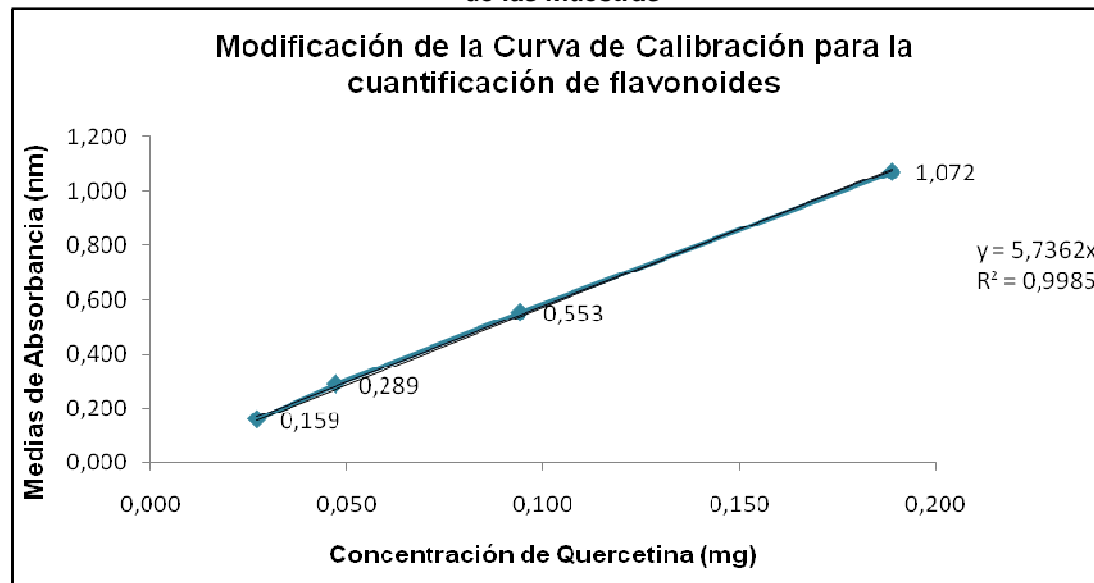


Gráfico 7.2 Curva de las concentraciones y absorbancias de la quercetina con la adición de Acetato de Plomo a 415 nm



t

ANEXO 8

**TABLAS DE CONCENTRACIÓN DE FLAVONOIDES OBTENIDAS DE LAS 24
PLANTAS MEDICINALES CON LA ADICIÓN DE ACETATO DE PLOMO
(PRECIPITACIÓN DE CLOROFILA), A PARTIR DE LOS MÉTODOS 1 Y 2**



Nombre de la Planta	Método 1																				Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$	C V
	Ensayo 1 Absorbancia (nm)			Ensayo 2 Absorbancia (nm)			Ensayo 3 Absorbancia (nm)			Factor	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)			Ensayo 2 Concentración (mg/ml)			Ensayo 3 Concentración (mg/ml)					
	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3			
Romero	0,086	0,088	0,091	0,089	0,092	0,087	0,084	0,083	0,084	0,170	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016	0,015	0,014	0,014	0,014	0,015 ± 0,001	3,65%	
Sen	0,424	0,421	0,423	0,379	0,380	0,380	0,386	0,390	0,390	0,170	0,072	0,071	0,072	0,064	0,064	0,064	0,065	0,066	0,066	0,067 ± 0,003	4,96%	
Menta	0,639	0,642	0,638	0,609	0,610	0,610	0,599	0,598	0,599	0,170	0,108	0,109	0,108	0,103	0,103	0,103	0,102	0,101	0,102	0,105 ± 0,003	2,99%	
Escancel	0,308	0,312	0,314	0,271	0,271	0,272	0,311	0,313	0,312	0,170	0,052	0,053	0,053	0,046	0,046	0,046	0,053	0,053	0,053	0,051 ± 0,003	6,79%	
Cola de caballo	0,312	0,313	0,313	0,336	0,340	0,340	0,338	0,339	0,340	0,170	0,053	0,053	0,053	0,057	0,058	0,058	0,057	0,058	0,058	0,056 ± 0,002	3,98%	
Arrayan	0,253	0,250	0,250	0,259	0,253	0,255	0,273	0,266	0,274	0,170	0,043	0,042	0,042	0,044	0,043	0,043	0,046	0,045	0,046	0,044 ± 0,002	3,66%	
Capulí	0,315	0,310	0,312	0,305	0,305	0,308	0,340	0,343	0,344	0,170	0,053	0,053	0,053	0,052	0,052	0,052	0,058	0,058	0,058	0,054 ± 0,003	5,28%	
Tomillo	0,155	0,152	0,154	0,163	0,168	0,170	0,176	0,177	0,176	0,170	0,026	0,026	0,026	0,028	0,029	0,029	0,030	0,030	0,030	0,028 ± 0,002	6,07%	
Guarmi poleo	0,758	0,760	0,763	0,713	0,717	0,716	0,714	0,713	0,714	0,170	0,129	0,129	0,129	0,121	0,122	0,121	0,121	0,121	0,121	0,124 ± 0,004	3,15%	
Chanca piedra	0,097	0,098	0,098	0,090	0,093	0,095	0,092	0,091	0,094	0,170	0,016	0,017	0,017	0,015	0,016	0,016	0,016	0,015	0,016	0,016 ± 0,001	3,17%	
Boldo	0,102	0,100	0,100	0,098	0,097	0,099	0,105	0,106	0,107	0,170	0,017	0,017	0,017	0,017	0,016	0,017	0,018	0,018	0,018	0,017 ± 0,001	3,59%	
Eucalipto	0,273	0,273	0,272	0,250	0,250	0,254	0,283	0,282	0,277	0,170	0,046	0,046	0,046	0,042	0,042	0,043	0,048	0,048	0,047	0,046 ± 0,002	4,95%	
Toronjil	0,700	0,701	0,707	0,701	0,708	0,702	0,702	0,704	0,701	0,170	0,119	0,119	0,120	0,119	0,120	0,119	0,119	0,119	0,119	0,119 ± 0,0005	0,41%	
Manzanilla	0,336	0,335	0,336	0,331	0,342	0,338	0,369	0,367	0,366	0,170	0,057	0,057	0,057	0,056	0,058	0,057	0,063	0,062	0,062	0,059 ± 0,003	4,55%	
Apio	0,619	0,650	0,651	0,656	0,655	0,655	0,636	0,638	0,641	0,170	0,105	0,110	0,110	0,111	0,111	0,111	0,108	0,108	0,109	0,109 ± 0,002	1,90%	
Perejil	0,105	0,109	0,111	0,096	0,096	0,093	0,090	0,090	0,091	0,170	0,018	0,018	0,019	0,016	0,016	0,016	0,015	0,015	0,015	0,017 ± 0,001	8,46%	
Malva	0,473	0,474	0,470	0,490	0,491	0,491	0,470	0,470	0,471	0,170	0,080	0,080	0,080	0,083	0,083	0,083	0,080	0,080	0,080	0,081 ± 0,002	2,04%	
Ruda	0,435	0,437	0,440	0,431	0,430	0,432	0,434	0,436	0,435	0,170	0,074	0,074	0,075	0,073	0,073	0,073	0,074	0,074	0,074	0,074 ± 0,001	0,72%	
Diente de león	0,515	0,519	0,517	0,529	0,528	0,530	0,516	0,514	0,519	0,170	0,087	0,088	0,088	0,090	0,090	0,090	0,088	0,087	0,088	0,088 ± 0,001	1,23%	
Borraja	0,294	0,299	0,298	0,290	0,296	0,295	0,304	0,301	0,305	0,170	0,050	0,051	0,051	0,049	0,050	0,050	0,052	0,051	0,052	0,051 ± 0,001	1,63%	
Llantén	0,101	0,105	0,100	0,094	0,092	0,093	0,096	0,091	0,090	0,170	0,017	0,018	0,017	0,016	0,016	0,016	0,016	0,015	0,015	0,016 ± 0,001	5,37%	
Ajenjo	0,876	0,877	0,877	0,894	0,897	0,897	0,851	0,850	0,851	0,170	0,149	0,149	0,149	0,152	0,152	0,152	0,144	0,144	0,144	0,148 ± 0,003	2,26%	
Nogal	0,201	0,203	0,206	0,191	0,191	0,190	0,190	0,197	0,194	0,170	0,034	0,034	0,035	0,032	0,032	0,032	0,032	0,033	0,033	0,033 ± 0,001	3,13%	
Ortiga	0,597	0,599	0,599	0,610	0,614	0,610	0,613	0,612	0,610	0,1696	0,101	0,102	0,102	0,103	0,104	0,103	0,104	0,104	0,103	0,103 ± 0,001	1,11%	

Tabla 8.1 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivas absorbancias y concentración de flavonoides obtenidas empleando el método 1 modificado



Nombre de la Planta	Método 2																				C V	
	Ensayo 1 Absorbancia (nm)			Ensayo 2 Absorbancia (nm)			Ensayo 3 Absorbancia (nm)			Factor	Ensayo 1 Concentración (mg/ml)			Ensayo 2 Concentración (mg/ml)			Ensayo 3 Concentración (mg/ml)			Concentración (mg/ml) $\bar{x} \pm \sigma$		
	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3	A 1	A 2	A 3		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3			
Romero	0,173	0,174	0,175	0,188	0,188	0,185	0,185	0,184	0,185	0,170	0,029	0,030	0,030	0,032	0,032	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031	0,031 ± 0,001	3,15%
Sen	0,720	0,720	0,724	0,649	0,652	0,646	0,723	0,728	0,726	0,170	0,122	0,122	0,123	0,110	0,111	0,110	0,123	0,124	0,123	0,123	0,119 ± 0,006	5,35%
Menta	0,686	0,689	0,689	0,720	0,727	0,728	0,688	0,692	0,693	0,170	0,116	0,117	0,117	0,122	0,123	0,124	0,117	0,117	0,118	0,118	0,119 ± 0,003	2,57%
Escancel	0,627	0,625	0,628	0,681	0,680	0,682	0,706	0,704	0,707	0,170	0,106	0,106	0,107	0,116	0,115	0,116	0,120	0,119	0,120	0,120	0,114 ± 0,006	5,22%
Cola de caballo	0,560	0,567	0,565	0,486	0,486	0,490	0,560	0,565	0,563	0,170	0,095	0,096	0,096	0,082	0,082	0,083	0,095	0,096	0,096	0,096	0,091 ± 0,006	7,08%
Arrayan	0,482	0,481	0,485	0,447	0,448	0,446	0,485	0,490	0,489	0,170	0,082	0,082	0,082	0,076	0,076	0,076	0,082	0,083	0,083	0,083	0,080 ± 0,003	4,10%
Capulí	0,175	0,177	0,179	0,182	0,180	0,178	0,164	0,165	0,165	0,170	0,030	0,030	0,030	0,031	0,031	0,030	0,028	0,028	0,028	0,028	0,029 ± 0,001	4,13%
Tomillo	0,412	0,417	0,411	0,420	0,425	0,424	0,415	0,416	0,416	0,170	0,070	0,071	0,070	0,071	0,072	0,072	0,070	0,071	0,071	0,071	0,071 ± 0,001	1,16%
Guarmi poleo	0,728	0,730	0,730	0,736	0,736	0,739	0,743	0,745	0,743	0,170	0,124	0,124	0,124	0,125	0,125	0,125	0,126	0,126	0,126	0,126	0,125 ± 0,001	0,86%
Chanca piedra	0,219	0,214	0,212	0,232	0,233	0,234	0,229	0,233	0,232	0,170	0,037	0,036	0,036	0,039	0,040	0,040	0,039	0,040	0,039	0,039	0,038 ± 0,002	3,92%
Boldo	0,254	0,259	0,256	0,253	0,255	0,250	0,269	0,265	0,262	0,170	0,043	0,044	0,043	0,043	0,043	0,042	0,046	0,045	0,044	0,044	0,044 ± 0,001	2,39%
Eucalipto	0,238	0,241	0,241	0,263	0,267	0,261	0,254	0,256	0,256	0,170	0,040	0,041	0,041	0,045	0,045	0,044	0,043	0,043	0,043	0,043	0,043 ± 0,002	4,17%
Toronjil	0,688	0,692	0,691	0,764	0,760	0,765	0,624	0,625	0,627	0,170	0,117	0,117	0,117	0,130	0,129	0,130	0,106	0,106	0,106	0,106	0,118 ± 0,010	8,61%
Manzanilla	0,631	0,636	0,637	0,659	0,661	0,660	0,639	0,637	0,634	0,170	0,107	0,108	0,108	0,112	0,112	0,112	0,108	0,108	0,108	0,108	0,109 ± 0,002	1,92%
Apio	0,889	0,895	0,900	0,955	0,956	0,958	0,943	0,943	0,945	0,170	0,151	0,152	0,153	0,162	0,162	0,163	0,160	0,160	0,160	0,160	0,158 ± 0,005	3,04%
Perejil	0,162	0,159	0,162	0,174	0,176	0,175	0,153	0,157	0,157	0,170	0,027	0,027	0,027	0,030	0,030	0,030	0,026	0,027	0,027	0,027	0,028 ± 0,001	5,36%
Malva	0,692	0,690	0,691	0,703	0,709	0,707	0,606	0,609	0,610	0,170	0,117	0,117	0,117	0,119	0,120	0,120	0,103	0,103	0,103	0,103	0,113 ± 0,008	6,83%
Ruda	0,857	0,857	0,855	0,788	0,792	0,794	0,801	0,804	0,804	0,170	0,145	0,145	0,145	0,134	0,134	0,135	0,136	0,136	0,136	0,136	0,139 ± 0,005	3,68%
Diente de león	0,591	0,592	0,595	0,597	0,607	0,604	0,592	0,598	0,601	0,170	0,100	0,100	0,101	0,101	0,103	0,102	0,100	0,101	0,102	0,102	0,101 ± 0,001	0,94%
Borraja	0,617	0,624	0,621	0,606	0,605	0,608	0,638	0,643	0,647	0,170	0,105	0,106	0,105	0,103	0,103	0,103	0,108	0,109	0,110	0,110	0,106 ± 0,003	2,59%
Llantén	0,154	0,154	0,154	0,165	0,165	0,167	0,150	0,153	0,149	0,170	0,026	0,026	0,026	0,028	0,028	0,028	0,025	0,026	0,025	0,025	0,027 ± 0,001	4,42%
Ajenjo	0,224	0,222	0,226	0,235	0,238	0,237	0,223	0,225	0,226	0,170	0,038	0,038	0,038	0,040	0,040	0,040	0,038	0,038	0,038	0,038	0,039 ± 0,001	2,78%
Nogal	0,447	0,445	0,441	0,466	0,457	0,459	0,436	0,435	0,433	0,170	0,076	0,075	0,075	0,079	0,078	0,078	0,074	0,074	0,073	0,073	0,076 ± 0,002	2,63%
Ortiga	0,606	0,607	0,609	0,642	0,645	0,646	0,637	0,643	0,640	0,170	0,103	0,103	0,103	0,109	0,109	0,110	0,108	0,109	0,109	0,109	0,107 ± 0,003	2,80%

Tabla 8.2 Cuadro de Plantas Medicinales con sus respectivas absorbancias y concentración de flavonoides obtenidas empleando el método 2 modificado



Anexo 9

**Tabla de datos del Análisis Comparativo de Varianzas (ANOVA) para el
Método 1 y Método 2**



Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Romero	Sen	Menta	Escancel	Cola de caballo	Arrayan	Capulí	Tomillo	Guarmi poleo	Chanca piedra	Boldo	Eucalipto
<i>Percolación</i>												
Cuenta	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Suma	0,15200999	0,37494333	0,90486323	0,19530015	0,344618242	0,33511418	0,49184874	0,1617338	1,20338954	0,089491968	0,10108362	0,22974549
Promedio	0,05067	0,12498111	0,30162108	0,06510005	0,114872747	0,11170473	0,16394958	0,05391127	0,401129847	0,029830656	0,03369454	0,07658183
Varianza	7,2534E-07	3,8118E-06	1,3984E-07	9,8087E-07	1,41245E-06	2,847E-07	3,7917E-06	1,8209E-07	1,2713E-05	3,10859E-07	3,0372E-06	4,014E-07
<i>Maceración</i>												
Cuenta	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Suma	0,24897336	0,54909283	1,19383055	0,91151058	0,502066971	0,40394993	0,72708791	0,30237188	1,219760692	0,214692825	0,17502849	0,24391918
Promedio	0,08299112	0,18303094	0,39794352	0,30383686	0,167355657	0,13464998	0,24236264	0,10079063	0,406586897	0,071564275	0,05834283	0,08130639
Varianza	1,166E-06	1,4403E-05	3,2783E-05	4,3219E-05	0,000115465	5,686E-06	6,8308E-07	1,4974E-05	1,01678E-05	3,80405E-05	1,2978E-07	1,0956E-06
<i>Total</i>												
Cuenta	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Suma	0,40098335	0,92403616	2,09869378	1,10681073	0,846685213	0,73906412	1,21893664	0,46410568	2,423150232	0,304184793	0,27611211	0,47366467
Promedio	0,06683056	0,15400603	0,3497823	0,18446846	0,141114202	0,12317735	0,20315611	0,07735095	0,403858372	0,050697465	0,04601869	0,07894411
Varianza	0,00031415	0,00101822	0,00279657	0,01711626	0,000873088	0,00016033	0,00184637	0,00066536	1,80861E-05	0,000537849	0,00018353	7,2952E-06

Tabla 9.1 Cuadro de resultados del Análisis de Varianza obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción de método 1 y método 2



Toronjil	Manzanilla	Apio	Perejil	Malva	Ruda	Diente de león	Borraja	Llantén	Ajenjo	Nogal	Ortiga	Total
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	72
1,15394646	0,36313193	0,8956888	0,0659241	0,47959784	0,45267883	0,766642366	0,30555821	0,10361071	0,74538184	0,42488084	0,65957064	11,0007549
0,38464882	0,12104398	0,29856293	0,0219747	0,15986595	0,15089294	0,255547455	0,10185274	0,0345369	0,24846061	0,14162695	0,21985688	0,15278826
0,00012044	3,1186E-08	6,4083E-07	2,0734E-06	7,6266E-06	0,00017613	1,59363E-05	6,7806E-05	3,0251E-06	4,9105E-05	4,2947E-06	8,4421E-05	0,0120558
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	72
1,39325095	0,56326651	1,16751584	0,1173449	0,76702692	0,77609149	1,177734077	0,65160481	0,215407	0,91414754	0,43147325	1,38473576	16,2518842
0,46441698	0,1877555	0,38917195	0,03911497	0,25567564	0,25869716	0,392578026	0,2172016	0,07180233	0,30471585	0,14382442	0,46157859	0,22572061
8,8831E-07	1,6135E-05	3,8933E-07	9,4736E-06	1,8401E-05	1,5655E-05	0,000170366	3,5602E-05	4,3351E-05	0,0002329	2,0815E-05	1,2081E-05	0,01832027
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2,54719742	0,92639844	2,06320464	0,183269	1,24662476	1,22877032	1,944376443	0,95716302	0,31901772	1,65952939	0,85635408	2,04430639	
0,4245329	0,15439974	0,34386744	0,03054483	0,20777079	0,20479505	0,324062741	0,15952717	0,05316962	0,27658823	0,14272568	0,34071773	
0,00195742	0,0013416	0,00246341	9,2755E-05	0,00276426	0,00356324	0,005707734	0,00403297	0,00043516	0,0010622	1,1493E-05	0,01756742	

9.2 Continuación de la tabla de datos 9.1

**ANÁLISIS DE VARIANZA**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0,19148861	1	0,19148861	6504,017	5,2923E-90	3,94016252
Columnas	2,015505618	23	0,087630679	2976,425	1,257E-126	1,64234351
Interacción	0,138368893	23	0,006016039	204,3381	2,9089E-71	1,64234351
Dentro del grupo	0,002826393	96	2,94416E-05			
Total	2,348189513	143				

9.3 Tabla resumen del análisis estadístico ANOVA



Anexo 10

**Tabla de datos del Análisis Comparativo de Varianzas (ANOVA) para el
Método 1 y Método 2 modificados**



Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	Romero	Sen	Menta	Escancel	Cola de caba Arrayan	Capulí	Tomillo	Guarmi pole	Chanca piedi	Boldo	Eucalipto	
<i>percolación</i>												
Cuenta	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Suma	0,04433463	0,20205055	0,31350917	0,15177825	0,16800789	0,13192945	0,08849961	0,08431496	0,37141562	0,04795378	0,05168603	0,13650994
Promedio	0,01477821	0,06735018	0,10450306	0,05059275	0,05600263	0,04397648	0,02949987	0,02810499	0,12380521	0,01598459	0,01722868	0,04550331
Varianza	2,6329E-07	1,4803E-05	1,2961E-05	1,561E-05	6,5694E-06	3,1509E-06	1,9006E-06	3,7351E-06	2,0173E-05	2,5689E-07	4,7754E-07	6,6174E-06
<i>maceración</i>												
Cuenta	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Suma	0,09248633	0,35535563	0,35685418	0,34144451	0,27372675	0,24030613	0,16300328	0,21259699	0,37486513	0,11550189	0,13139223	0,12867787
Promedio	0,03082878	0,11845188	0,11895139	0,11381484	0,09124225	0,08010204	0,05433443	0,07086566	0,12495504	0,03850063	0,04379741	0,04289262
Varianza	1,4984E-06	5,2528E-05	1,2349E-05	4,7872E-05	5,5053E-05	1,3975E-05	1,0804E-05	6,1105E-07	1,552E-06	2,3746E-06	1,2144E-06	4,337E-06
<i>Total</i>												
Cuenta	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
Suma	0,13682096	0,55740618	0,67036335	0,49322275	0,44173464	0,37223558	0,25150289	0,29691195	0,74628075	0,16345567	0,18307827	0,26518781
Promedio	0,02280349	0,09290103	0,11172722	0,08220379	0,07362244	0,06203926	0,04191715	0,04948533	0,12438012	0,02724261	0,03051304	0,04419797
Varianza	7,7991E-05	0,00081035	7,275E-05	0,0012245	0,0003972	0,00039837	0,00019011	0,00055028	9,0866E-06	0,00015314	0,00021245	6,4265E-06



Tabla 10.1 Cuadro de resultados del Análisis de Varianza obtenidos a partir de la comparación de los métodos de extracción de método 1 y método 2

Toronjil	Manzanilla	Apio	Perejil	Malva	Ruda	Diente de le Borraja	Llantén	Ajenjo	Nogal	Ortiga	Total	
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	72
0,3577307	0,17643373	0,32804233	0,04981991	0,24316187	0,22110765	0,26504644	0,15166515	0,04874547	0,1162653	0,09969637	0,30898522	4,15869003
0,11924357	0,05881124	0,10934744	0,01660664	0,08105396	0,07370255	0,08834881	0,05055505	0,01624849	0,0387551	0,03323212	0,10299507	0,05775958
1,3857E-08	9,2321E-06	2,5273E-06	2,5114E-06	3,6146E-06	2,9527E-07	1,4625E-06	6,9393E-07	8,3889E-07	1,4625E-06	1,261E-06	1,6639E-06	0,0012116
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	72
0,35258471	0,32744856	0,4736567	0,08332535	0,34025697	0,41586335	0,30386751	0,31715659	0,07979102	0,4450145	0,22755427	0,32077575	6,47350621
0,11752824	0,10914952	0,15788557	0,02777512	0,11341899	0,13862112	0,10128917	0,10571886	0,02659701	0,14833817	0,07585142	0,10692525	0,08990981
0,00013653	6,0282E-06	3,3427E-05	2,9135E-06	7,9975E-05	3,5324E-05	8,9726E-07	9,6518E-06	1,7854E-06	1,4883E-05	4,8905E-06	1,2339E-05	0,00155683
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0,71031541	0,50388229	0,80169903	0,13314526	0,58341884	0,636971	0,56891395	0,46882174	0,1285365	0,5612798	0,32725064	0,62976097	
0,1183859	0,08398038	0,13361651	0,02219088	0,09723647	0,10616183	0,09481899	0,07813696	0,02142275	0,09354663	0,05454177	0,10496016	
5,55E-05	0,00076629	0,00072117	3,959E-05	0,00034768	0,00127857	5,118E-05	0,00091705	3,3177E-05	0,00360907	0,00054738	1,0235E-05	



10.2 Continuación de la tabla de datos 10.1

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>
Muestra	0,03721093	1	0,03721093	2727,291	2,69016E-72	3,940162523
Columnas	0,17137183	23	0,007450949	546,1005	1,95214E-91	1,642343509
Interacción	0,023877005	23	0,001038131	76,08744	1,65049E-51	1,642343509
Dentro del grupo	0,001309816	96	1,36439E-05			
Total	0,233769581	143				

10.3 Tabla resumen del análisis estadístico ANOVA



ANEXO 11
Imágenes



Figura 11.1 Procesamiento de las plantas



Figura 11.2 Proceso de Percolación según USP XXX (Método 1)



Figura 11.3 Proceso de Maceración según Tona y col. (Método 2)



Figura 11.4 Concentración de extractos fluidos (rotavapores)



Figura 11.5 Eliminación del solvente mediante nitrógeno usando baño ultrasónico



Figura 11.6 Extractos secos obtenidos por liofilización



Figura 11.7 Cromatografía en capa fina

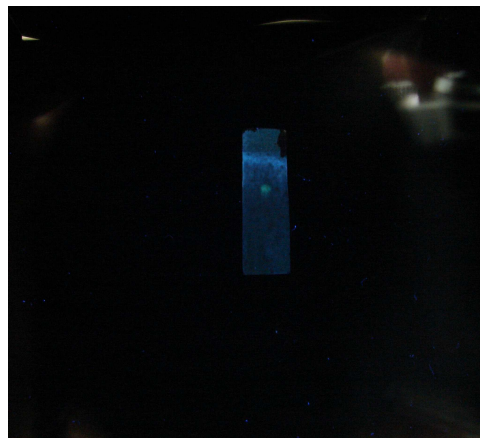


Figura 11.8 Placa de cromatografía observada en la cámara y bajo UV (patrón Quercetina)

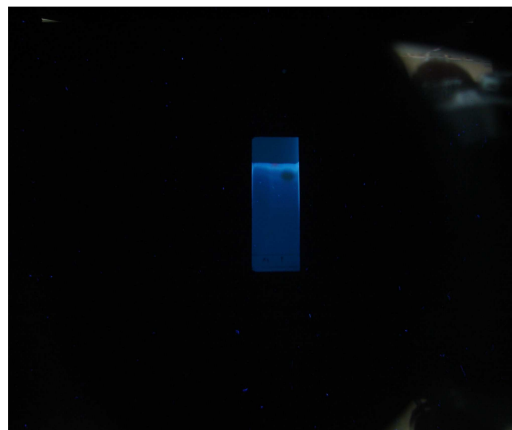


Figura 11.9 Placa de cromatografía observada en la cámara y bajo UV (muestra)