



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

“EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS OBTENIDOS A
PARTIR DE DISTINTOS PROCESOS DE SECADO DE *Jungia rugosa*”

Tesis previa a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico

AUTORAS:

Karina Patricia Criollo Sumba
C.I. 0106038888
Nelly Johanna Molina Fernández
C.I. 0104962360

TUTOR:

Dr. Fabián León Tamariz Ph.D.
C.I. 0102311610

Cuenca - Ecuador

2016



UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

El tratamiento post cosecha que las plantas medicinales reciban intervienen en sus características organolépticas y farmacológicas, dentro de este ámbito el método de secado influye directamente en la estabilidad de los metabolitos secundarios, por lo tanto nuestro estudio se basó en la comparación de dos métodos de secado: estufa y liofilización, mediante la cuantificación de fenoles totales, flavonoides y la evaluación de la actividad antioxidante a través de las técnicas de DPPH (2, 2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl) y poder reductor, planteando que el método de secado por liofilización favorece la estabilidad de los polifenoles, en comparación con el método de secado en estufa.

La estimación de la estabilidad de los polifenoles se realizó mediante la cuantificación espectrofotométrica de los metabolitos en los extractos secos obtenidos, comparando sus concentraciones en función del tiempo. Se realizaron cinco determinaciones en los tiempos 0, 1, 2, 4 y 6 meses.

A través de la cromatografía de capa fina se realizó la identificación de los metabolitos presentes en *Jungia rugosa*, siendo los principales los polifenoles, los cuales presentaron una mayor intensidad al ser analizados bajo fluorescencia, en las plantas sometidas a secado por liofilización.

Mediante un análisis estadístico se estableció que a medida que pasa el tiempo existe una disminución en la concentración de fenoles totales, flavonoides y disminución de los valores de AAEC para las técnicas de DPPH y poder reductor.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Por otro lado, también se determinó que en el método de secado por liofilización se obtienen mayores concentraciones que en el método de secado por estufa.

Palabras claves: *Jungia rugosa*, estufa, liofilización, flavonoides, fenoles totales, DPPH, poder reductor.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABSTRACT

The post harvest treatment applied to medicinal plants get directly involved in their organoleptic and pharmacological characteristics. Within this field, drying methods directly influences on the stability of secondary metabolites, therefore our study was based on the comparison of two methods of drying: stove and lyophilization. By quantifying total phenols, flavonoids and by the evaluation of antioxidant activity through techniques such as DPPH (2, 2 - diphenyl - 1 - picrylhydrazyl) and reducing power, suggesting that the method of drying by lyophilization promotes stability of the polyphenols in comparisson to the method of drying oven.

The estimation of the stability of polyphenols was performed by spectrophotometric quantification of metabolites in the dry extracts obtained by comparing their concentrations versus time. Five determinations at times 0, 1, 2, 4 and 6 months were made.

Through thin layer chromatography, metabolites present in *Jungia rugosa* were identifying. The main present compounds were polyphenols, which showed a higher intensity under fluorescence in plants subjected to freeze-drying.

By statistical analysis established that as time goes on there is a decrease in the concentration of total phenols, flavonoids and decrease values AAEAC techniques for reducing power and DPPH. Furthermore, it was also determined that the freeze drying method are obtained higher concentrations than in the oven drying method.

Keywords: *Jungia rugosa*, stove, lyophilization, flavonoids, total phenolics, DPPH, reducing power.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	22
CAPÍTULO I	25
MARCO TEÓRICO.....	25
1.1 PLANTAS MEDICINALES	25
1.1.1 Generalidades	25
1.2. FARMACOERGASIA	26
1.2.1 Cultivo.....	27
1.2.1.1 Factores que influyen en la calidad de las plantas medicinales	27
1.2.2 Recolección	28
1.2.3 Transporte	28
1.2.4 Conservación.....	29
1.2.5 Procesamiento Post Cosecha.....	30
1.2.5.1 Selección	30
1.2.5.2 Lavado.....	31
1.2.5.3 Secado	31
1.2.5.3.1 Objetivos del secado	31
1.2.5.3.2 Temperatura de secado	32
1.2.5.3.2 Equipos de secado.....	33
1.2.5.3.3 Liofilización.....	34
1.2.5.4 Almacenamiento.....	35
1.3 <i>Jungia rugosa</i>	36
1.3.1 Descripción de la planta.....	36
1.3.2 Descripción botánica.....	37
1.3.3 Hábitat	38
1.3.4 Información etnomédica sobre la planta	38
1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>Jungia rugosa</i> Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	38



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5 COMPONENTES DE LAS DROGAS VEGETALES.....	39
1.5.1 Metabolismo primario.....	39
1.5.2 Metabolismo secundario	40
1.6 COMPUESTOS FENÓLICOS	40
1.6.1 ÁCIDOS FENÓLICOS	42
1.6.1.1 Estructura	42
1.6.1.2 Clasificación	42
1.6.2 FLAVONOIDES	42
1.6.2.1 Estructura	43
1.6.2.2 Clasificación	43
1.6.2.2.1 Flavonoles	44
1.6.2.2.2 Flavonas.....	44
1.6.2.2.3 Flavanonas.....	44
1.6.2.2.4 Isoflavonas	44
1.6.2.2.5 Antocianidinas	44
1.6.2.2.6 Flavanoles	45
1.7 ESTRÉS OXIDATIVO	45
1.8 RADICALES LIBRES	46
1.9 ESPECIES REACTIVAS.....	46
1.10 ANTIOXIDANTES	47
1.11 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	48
1.11.1 Efecto antiinflamatorio	49
1.12 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	49
CAPÍTULO II	50
MATERIALES Y MÉTODOS	50
2.1. LOCALIZACIÓN.....	50
2.2. MATERIALES	50
2.2.1. Materia prima.....	50
2.2.2 Materiales y Reactivos.....	51



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.2.3 Equipos.....	51
2.3 MÉTODOS.....	52
2.3.1 Recolección.....	52
2.3.2 Lavado.....	53
2.3.3 Deseccación.....	54
2.3.4 Obtención de extractos vegetales.....	55
2.3.5 Concentración del extracto vegetal.....	55
2.3.6 Eliminación del solvente.....	56
2.3.7 Liofilización.....	56
2.3.8 ANÁLISIS CUALITATIVO.....	57
2.3.8.1 Cromatografía en capa fina.....	57
2.3.8.2 Activación de las placas para TLC.....	58
2.3.8.3 Identificación de las placas para TLC.....	58
2.3.8.4 Preparación de la Fase Móvil.....	58
2.3.8.5 Preparación de las muestras.....	58
2.3.8.6 Siembra de las muestras y patrones.....	59
2.3.8.7 Elución sobre la placa.....	59
2.3.8.8 Revelado poscromatográfico.....	59
2.3.9. ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	59
2.3.9.1. Espectrofotometría.....	60
2.3.9.2 Valoraciones de los metabolitos.....	60
2.3.9.2.1 Cuantificación de Fenoles Totales.....	60
2.3.9.2.1.1 Principio.....	60
2.3.9.2.1.2 Elaboración de la curva de calibración.....	61
2.3.9.2.1.3 Aplicación del método para el extracto seco.....	62
2.3.9.2.2 Cuantificación de flavonoides.....	62
2.3.9.2.2.1 Elaboración de la curva de calibración.....	63
2.3.9.2.2.2 Aplicación del método para el extracto seco.....	63



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.9.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de DPPH	63
2.3.9.2.3.1 Principio	63
2.3.9.2.3.2. Preparación de la solución de DPPH	64
2.3.9.2.3.3 Elaboración de la curva de calibración.....	65
2.3.9.2.3.4 Aplicación del método para el extracto seco.....	66
2.3.9.2.4 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de poder reductor férrico	66
2.3.9.2.4.1 Principio	66
2.3.9.2.4.2 Elaboración de la curva de calibración.....	67
2.3.9.2.4.3 Preparación del extracto seco.....	67
2.3.9.2.4.4 Método	68
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
2.4.1 Análisis de varianza (ANOVA)	69
2.4.2 Prueba t de Student	70
CAPÍTULO III	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.1 DESECACIÓN	71
3.2 RENDIMIENTO DE EXTRACTO.....	72
3.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	73
3.3.1 Resultados de TLC en el t=0	73
3.3.2 Resultados de TLC en el t=6	77
3.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO.....	82
3.4.1 Cuantificación de Fenoles Totales.....	82
3.4.2 Cuantificación de flavonoides	85
3.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante	88
3.4.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de DPPH (2, 2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl)	88



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3.4.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor	90
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	92
3.5.1 Análisis de varianza	92
3.5.3 Regresión lineal	96
3.5.4 Prueba de Scheffe (post-hoc ANOVA).....	96
3.5.5 Prueba t de Student de dos muestras pareadas de dos colas.....	98
CAPÍTULO IV	102
CONCLUSIONES.....	102
CAPÍTULO V	103
RECOMENDACIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	104
ANEXOS	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Taxonomía de Jungia rugosa.....	37
Tabla 1.2 Clasificación de los principales compuestos fenólicos de origen vegetal, de acuerdo con su estructura química básica.	41
Tabla 3.1 Comparación de los pesos de las drogas secas obtenidas por los dos métodos de secado.	71
Tabla 3.2 Rendimiento de extractos secos.	72
Tabla 3.3 Cuantificación de fenoles totales.....	84
Tabla 3.4 Cuantificación de flavonoides.	87
Tabla 3.5 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH.	89
Tabla 3.6 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor.	91
Tabla 3.7 Resumen general y por meses, por tipo de secado.	93
Tabla 3.8 Regresión lineal para secado por estufa y liofilización.....	96



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 3.9 Prueba de Scheffe.	97
Tabla 3.10 Resultados de la prueba t de Student de dos muestras pareadas de dos colas.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructuras de los ácidos fenólicos simples más importantes.	42
Figura 1.2 Estructura general de los flavonoides.	43
Figura 1.3 Estructuras químicas de algunos de los flavonoides más importantes.	45
Figura 2.1 Recolección en “El Cajas”	53
Figura 2.2 Recolección en Cañar	53
Figura 2.3 A) Selección; B) Lavado; C) Escurrimiento de la droga vegetal.	53
Figura 2.4 Deseccación en horno Pro3.	54
Figura 2.5 Deseccación en liofilizador.	54
Figura 2.6 Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.	56
Figura 3.1 A Fotografía del cromatograma de la muestras Criollo 1, 2,3 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.	74
Figura 3.1 B Fotografía del cromatograma de la muestras Criollo 4, 5, 6 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.	75
Figura 3.2 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y 3 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides. .	76
Figura 3.2 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4, 5, 6 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides. .	77
Figura 3.3 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y3 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.	78



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Figura 3.3 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4,5 y 6 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.	79
Figura 3.4 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y 3 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides..	80
Figura 3.4 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4, 5 y 6 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides..	81
Figura 3.5 Disminución de la concentración de fenoles totales en función del tiempo.	94
Figura 3.6 Disminución de la concentración de flavonoides en función del tiempo.	94
Figura 3.7 Disminución del valor del AAEAC para DPPH en función del tiempo..	94
Figura 3.8 Disminución del valor del AAEAC para poder reductor en función del tiempo.	94
Figura 3.9 Disminución de la concentración de fenoles totales en función del tiempo.	95
Figura 3.10 Disminución de la concentración de flavonoides en función del tiempo.	95
Figura 3.11 Disminución del valor del AAEAC para DPPH en función del tiempo.	95
Figura 3.12 Disminución del valor del AAEAC para poder reductor en función del tiempo.	95
Figura 3.13 Reactivo de Folin Ciocalteau en reflujo.	113



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ABREVIATURAS

DPPH	2, 2 difenil – 1 – picrilhidrazilo
AAEAC	miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 gramos de droga seca
TLC	Thin Layer Chromatography
cm	Centímetros
rpm	Revoluciones por minuto
ml	Mililitros
h	Hora
mg	Miligramos
µl	Microlitros
nm	Nanómetros
g	Gramos
ppm	Partes por millón
N	Normalidad
M	Molaridad
% P/V	Porcentaje peso/volumen
UV	Ultravioleta
Min	Minutos
UTM	Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Karina Patricia Criollo Sumba, autora de la tesis "**Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de *Jungia rugosa***", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de octubre de 2018.

Karina Patricia Criollo Sumba

C.I: 0106038888



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Yo, Karina Patricia Criollo Sumba, autora de la tesis "**Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de *Jungla rugosa***", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 26 de octubre de 2016.

Karina Patricia Criollo Sumba

C.I: 0106038888



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Nelly Johanna Molina Fernández, autora de la tesis "Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de *Jungia rugosa*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de octubre de 2016.

Nelly Johanna Molina Fernández

C.I: 0104962360



UNIVERSIDAD DE CUENCA



Universidad de Cuenca
Cláusula de derechos de autor

Yo, Nelly Johanna Molina Fernández, autora de la tesis "**Evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado de *Jungia rugosa***", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 26 de octubre de 2016.

Nelly Johanna Molina Fernández

C.I: 0104962360



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTOS

Una de las etapas más importantes de nuestra vida culmina, nuestra formación como profesionales está ahora completa, es momento de asumir nuestro rol de servicio dentro de la sociedad y es importante reconocer y dar las gracias a aquellas personas que fueron base en nuestra formación académica.

En primer lugar a Dios por darnos la vida, la sabiduría y guiarnos en momentos difíciles a lo largo de nuestra vida universitaria, por su amor infinito y por la fortaleza brindada para día a día luchar por cumplir nuestra meta.

A nuestras familias, por su comprensión, paciencia y apoyo durante toda la carrera, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Gracias familia.

De manera especial queremos agradecer a nuestro tutor de tesis, Dr. Fabián León Tamariz Ph.D. quien supo guiarnos durante la realización de este proyecto, gracias por compartir con nosotras sus conocimientos, por corregir amablemente nuestros errores, por estar pendiente del avance de este proyecto y sobre todo por su responsabilidad para culminar con éxito este trabajo de investigación.

A la Dra. Isabel Wilches por permitirnos hacer uso de las instalaciones del proyecto VLIR, sin los cuales no hubiéramos podido realizar el presente trabajo. A la Dra. Nancy Cuzco, Bqf. Fernando Huiracocha, Bqf. Diana Morales por cada palabra de ánimo brindada y por la confianza en nosotras depositada. A la Dra. Mariana Saa e Ing. Vladimiro Tobar por compartir sus conocimientos con nosotras.

Queremos hacer extensivo nuestro agradecimiento a la Dra. Johanna Ortiz, quien amablemente nos ayudó con el análisis estadístico de nuestra tesis, de corazón gracias.

Como no agradecer a aquellos amigos que siempre estuvieron con nosotras en las buenas y malas épocas, aquellas personas que nos sacaban una sonrisa en



UNIVERSIDAD DE CUENCA

momentos difíciles y por quienes la vida universitaria fue una gran experiencia de vida.

A todos Uds. Gracias

Karina y Johanna



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

“Una vida de éxito se forja paso a paso, lo importante es saber hacia dónde vas a dar el primero” Andrés Rada.

Al culminar una de las etapas más importantes de mi vida, quiero dedicar todo el esfuerzo realizado a todas aquellas personas que día a día, estuvieron junto a mí.

En primer lugar a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado la fuerza y salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi mami, Olga, por ser el pilar fundamental en mi vida, por ser la mamá maravillosa que es, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por el coraje mostrado para salir adelante, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor, por su infinito amor.

A mi tío César, quien más que mi tío ha sido un papá para mí, por confiar en mí y no dejarme decaer, por cada palabra de aliento, por cada consejo que siempre está dispuesto a brindarme.

Como no dedicar este trabajo de tesis a aquella persona que fue, es y será mi gran apoyo, mi amigo, mi esposo, a ti Henry, por toda tu paciencia, por esas palabras cariñosas que me dabas cuando estaba a punto de decaer, por ser parte importante en el logro de mis metas profesionales. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más que eso. Muchas gracias, amor.

A mi hijo, Santiago, luz de mis ojos, razón de vivir, para ti y por ti todo el esfuerzo realizado, por ser el motorcito que mueve mi vida, porque cuando sonrías haces que me olvide de todos los problemas. Gracias por llenar mi vida.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

A mi amiga y compañera de tesis, Johanna, gracias por ser mi compañera de batallas, por tu paciencia y amistad incondicional, por todo el esfuerzo realizado para cumplir una de nuestras grandes metas. Te quiero amiga.

Por Uds. y para Uds. este trabajo de tesis.

Karina



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación principalmente a Dios, por haberme dado la vida, la sabiduría y las fuerzas necesarias para llegar a culminar ésta etapa tan importante de mi vida profesional.

A mis padres, José y Victoria, por todo el amor, comprensión y apoyo incondicional brindado a lo largo de esta carrera universitaria, por todos sus consejos que me ayudaron a crecer como una mejor persona, por esas palabras de aliento que me daban fuerzas para continuar sin desfallecer en el intento, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, sin Uds. nada de esto hubiera sido posible, mil gracias.

Para mis hermanas, Lourdes, por estar constantemente pendiente de mí, por ayudarme en todo cuanto podía e impartirme sus conocimientos, por ser mi mejor amiga, mi confidente, mi cómplice. A Verónica y María José por todo el apoyo y los ánimos que me brindaban cada día para seguir adelante, por todas esas sonrisas que me sacaban con sus ocurrencias, gracias ñañitas.

A mi esposo, Marcelo, por estar siempre a mi lado y darme fuerzas en los momentos en los que sentía decaer, porque me enseñaste a no tener miedo y afrontar los problemas de una mejor manera. A mi hija, Danielita, por ser el motor y mi impulso a seguir en cada despertar, porque tú eres mi felicidad y el mejor regalo que Dios me pudo dar, te amo mi pequeña.

Y para Karina, que más que mi compañera de tesis es mi amiga, gracias por todos los buenos y malos momentos compartidos juntas.

Johanna



UNIVERSIDAD DE CUENCA

INTRODUCCIÓN

El Ecuador cuenta con miles de plantas medicinales, las cuales han sido utilizadas con fines curativos. Antiguamente estas plantas eran utilizadas en forma empírica, mientras que en la actualidad han llamado la atención de los investigadores, con el fin de descubrir sus principios activos y así justificar sus usos terapéuticos. Una de las plantas utilizadas ancestralmente por la población del Ecuador es *Jungia rugosa*, conocida comúnmente como carne humana, la cual ha sido utilizada por sus diversos efectos terapéuticos: cicatrizante, antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, etc.

Se sabe por algunas publicaciones (Enciso E.; Arroyo J.) que los polifenoles son altamente responsables de la actividad antioxidante y antiinflamatoria que presenta *Jungia rugosa*, sin embargo no existen datos sobre la estabilidad de estos elementos cuando nos referimos a un extracto. La no disponibilidad de datos sobre la degradación de estos elementos, plantea la necesidad de interesarse en proyectos para evaluar el efecto que tiene la aplicación de diferentes métodos de secado y el deterioro natural, por sí mismo, sobre los polifenoles.

Teóricamente se sabe que los polifenoles presentes en los vegetales son compuestos que presentan inestabilidad frente a diferentes factores, tales como: el tratamiento térmico excesivo para su extracción, presencia de humedad o actividad enzimática durante el almacenamiento, o tiempos largos de contacto con elevada temperatura para el secado, lo que influye de manera directa en su presencia o concentración en los extractos obtenidos a partir de una planta.

La estandarización de los procesos a fin de conseguir el control o la reducción de la influencia de las variables antes mencionadas es de gran relevancia para la consecución de extractos vegetales que preserven estas moléculas naturales con reconocida actividad farmacológica. El secado de las drogas vegetales constituye el primer paso en la cadena metodológica que permite la obtención de extractos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

vegetales de calidad; por ende, un análisis comparativo entre diversas metódicas de secado, evaluadas a partir de su capacidad conservadora de moléculas lábiles como los polifenoles es de relevancia para el campo profesional de un farmacéutico.

El presente estudio propone analizar la concentración de metabolitos secundarios del tipo polifenol en extractos metanólicos obtenidos a partir de la planta *Jungia rugosa Less*, como criterio evaluador de conservación posterior a la aplicación de dos metódicas de secado para plantas medicinales como son la liofilización y el secado en horno a temperatura controlada.

Con este estudio se pretende valorar la estabilidad de los polifenoles mediante la aplicación de estos dos métodos de secado, utilizando como herramienta analítica su actividad antioxidante, y los estudios fitoquímicos que revelen su composición. Además, se espera evaluar la estabilidad de estos elementos a través del tiempo por un lapso de 6 meses.

La hipótesis planteada para este estudio fue:

La estabilidad de los polifenoles, que son fácilmente oxidables, se va a ver favorecida cuando se utiliza la liofilización como método de secado, debido a que esta mantiene la temperatura a niveles bajos durante todo el proceso, en comparación con el método de secado en estufa que aumenta la temperatura hasta los 40°C.

Se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

- Evaluar la estabilidad de los polifenoles presentes en extractos de *Jungia rugosa* obtenidos mediante diferentes procesos de secado.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Objetivos específicos:

- Someter la planta (*Jungia rugosa*) procesada a diferentes métodos estandarizados de secado: secado en estufa y liofilización.
- Obtener diferentes extractos metanólicos de la planta sometida a cada uno de los procesos de secado.
- Determinar la cantidad de polifenoles totales presentes en cada uno de los extractos en relación al tiempo de conservación durante un periodo de 6 meses.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos como herramienta complementaria para la evaluación de los mismos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

1.1.1 Generalidades

Durante miles de años las plantas medicinales han ocupado vital importancia en la vida del hombre, en diferentes épocas y culturas han sido y son en la actualidad utilizadas en la prevención y tratamiento de diversas dolencias.

En su artículo acerca de la importancia de las Plantas Medicinales (Teolinda Carrillo & Moreno, 2006) dice que aproximadamente el 60-80% de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos.

Refiriéndonos al uso de las plantas medicinales en el Ecuador podemos decir que su uso se evidencia principalmente en algunas comunidades de zonas rurales donde existe dificultad para recibir atención médica y a tener acceso a medicamentos, ya sea por su ubicación lejana o por falta de recursos económicos, los pobladores recurren a la medicina ancestral. Así mismo en algunas comunidades, donde grupos étnicos utilizan la fitoterapia popular entre sus terapéuticas ancestrales, las plantas medicinales forman parte de su acervo cultural, a más de esto es importante resaltar que el conocimiento médico ancestral en nuestro país es inmenso y que éste ha sido transmitido de generación en generación durante centenares de años (De la Torre, Alarcón S., Kvist, & Salazar Lecaro, 2008)

Debido a que la medicina tradicional sigue vigente en varios sectores de la población, este conocimientos se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

y clínicos que busca los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo (Muñoz, Montes, & Wilkomirsky, 2001) (Teolinda Carrillo & Moreno, 2006) (De la Torre, Alarcón S., Kvist, & Salazar Lecaro, 2008).

Para entender la importancia del uso que desde tiempos pasados se le da a las plantas medicinales es necesario presentar algunos conceptos básicos como los expuestos a continuación:

Droga: Es todo material de origen natural, ya sea en bruto (por ejemplo, las hojas, la corteza de un árbol) u obtenido por sencillas operaciones (por ejemplo, los extractos) que contienen los principios activos con actividad farmacológica para su uso directo o para la elaboración de medicamentos.

Droga vegetal: Es la parte de la planta que contiene el o los principios activos y que se utiliza en terapéutica, rara vez se emplea la planta completa, lo normal es seleccionar la parte que tiene el interés farmacológico (raíz, tallo, hojas, flores, frutos, semillas) enteros o fragmentados, sin procesar, generalmente desecados o en algunas ocasiones también en estado fresco.

Planta medicinal: Es todo vegetal que contiene en sus órganos sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos, o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por hemisíntesis (Perales, 2008).

Principio activo: Sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga.

Medicamento: Toda sustancia medicinal (natural o sintética) con propiedades para prevenir, curar, diagnosticar una enfermedad: se prescribe a una dosis y se ha elaborado de una forma correcta para su administración. (Osorio, 2009)

1.2. FARMACOERGASIA



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Se encarga del estudio del cultivo, recolección, secado y almacenamiento de las plantas. Estos son los denominados factores implicados en la producción de drogas. (Osorio, 2009)

1.2.1 Cultivo

Durante mucho tiempo las necesidades de plantas medicinales han sido cubiertas mediante la recolección de plantas silvestres, es decir de aquellas plantas que crecen espontáneamente, este método es utilizado cuando se necesita recolectar especies que son relativamente abundantes en la naturaleza; sin embargo, hay que tener en cuenta que para llevar a cabo una recolección de este tipo se necesita de una planificación y control , para evitar la recolección indiscriminada que pueda poner en peligro la especie de interés o que impida el desarrollo de otras especies. (Martín & Woodcock, 1983)

Es por esto que en la actualidad se prefiere cultivar las plantas medicinales de interés, ya sea porque permite un mayor control en los factores que afecten el crecimiento (control de suelos, poda, control de insectos) y por ende la producción de los metabolitos de interés o también porque dan mayores facilidades para el tratamiento tras la recolección. (Osorio, 2009) (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000)

1.2.1.1 Factores que influyen en la calidad de las plantas medicinales

La acción medicinal de las plantas se debe a ciertas sustancias que éstas poseen denominadas metabolitos primarios y secundarios; a los segundos, se les atribuye la mayoría de acciones curativas sobre las diferentes enfermedades; el potencial medicinal que cierta especie posea por ende, depende mayoritariamente del mayor o menor contenido de metabolitos secundarios que una planta posea.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

(Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000)

Existen ciertos factores tanto internos como externos que afectan la producción de estos metabolitos. Entre los factores internos están aquellos que se relacionan directamente con la planta e influyen directamente en su desarrollo como: la edad de la planta, estadio de desarrollo o el órgano de la planta.

Al ser las plantas seres vivos, van a estar en un constante intercambio de energía y nutrientes con el medio que las rodea, de modo que los factores externos también son importantes en el momento que una planta produzca o no ciertos metabolitos secundarios, es así que factores como el suelo, la temperatura, duración del día (incluyendo la calidad de la luz) y altitud también afectan la producción de metabolitos secundarios porque las plantas toman agua y nutrientes del suelo, asimilan la luz solar, liberan oxígeno, etc. (Osorio, 2009) (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000)

1.2.2 Recolección

El momento de cosecha o recolección de las plantas medicinales y/o aromáticas depende de cada especie y del órgano en el cual se encuentran los principios activos que le confieren su condición medicinal. (Banchemo, Carballo, & Telesca, 2008)

1.2.3 Transporte

El transporte de la droga se hace en recipientes bien aireados, tales como bolsas de malla, sacos harineros limpios o papel periódico. Hay que evitar el uso de bolsas de polietileno (plástico), porque provocan un comienzo de pudrición en pocas horas debido al agua de condensación. (Astudillo Machuca, 2011)



1.2.4 Conservación

Dado que es trascendental conservar la droga hasta el momento de su empleo o procesamiento, debemos tener muy presente que una vez que la planta es arrancada de su medio natural, se va a alterar su equilibrio metabólico y esto va a desencadenar una serie de reacciones y fenómenos que degradan la droga vegetal recolectada lo que va a influir directamente en la actividad terapéutica de la misma (Osorio, 2009). Estas alteraciones pueden ser internas o externas. Dentro de las alteraciones internas tenemos a las que son causadas principalmente por las enzimas propias de las plantas, las cuales catalizan reacciones de naturaleza enzimática tales como la hidrólisis de los glúcidos, de ésteres, oxidaciones, condensaciones, entre otras. Esta degradación enzimática principalmente es causada por la presencia en la droga de cantidades de agua superiores al 70%, esta alteración a más de afectar los principios activos, va a favorecer los procesos de putrefacción y enmohecimiento que afectan también la calidad de la droga. Otra causa de alteración interna son las autooxidaciones y las reacciones entre diferentes componentes de la planta. (Abril Novillo & Calle López, 2012)

Entre las causas de alteración externa tenemos el calor, las radiaciones, la humedad, el ataque de insectos, parásitos y microorganismos, estos factores deben ser controlados muy minuciosamente durante el almacenamiento de la muestra. (Osorio, 2009)

Existen dos procesos fundamentales para evitar la acción enzimática y con esto la degradación de las drogas vegetales:

Inhibición enzimática: Se basa fundamentalmente en la eliminación del agua presente en la planta hasta llegar a valores inferiores al 10%, con esto logramos



UNIVERSIDAD DE CUENCA

que la acción de las enzimas se paralice, queden inhibidas y la droga se conserve, al mismo tiempo se evita la proliferación de los hongos y bacterias.

Es importante destacar que cuando tratamos a la droga conservada con agua, las enzimas pueden recuperar su actividad catalítica, por lo que es un proceso reversible. (Osorio, 2009) (Abril Novillo & Calle López, 2012)

Inactivación enzimática: Es un proceso irreversible que consiste en la destrucción completa de las enzimas que pierden así su capacidad catalizadora y así evitar la degradación de la droga (Osorio, 2009). En este proceso se utilizan vapores líquidos como el agua, alcoholes o calor seco, siempre buscando el mejor mecanismo para no alterar los principios activos de interés presentes en la planta medicinal. (Abril Novillo & Calle López, 2012)

1.2.5 Procesamiento Post Cosecha

La calidad del producto que se obtenga a partir de una droga vegetal dependerá en gran parte del tratamiento post cosecha que este reciba (Acosta de la Luz, 2006)

Una vez que la materia vegetal es recolectada debe protegerse de la lluvia, de la humedad, de su exposición a la luz solar directa y otras circunstancias que pudieran ocasionar su deterioro; para que de esta manera la materia prima vegetal conserve sus características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas. Así mismo es importante que el material fresco se procese de manera inmediata para evitar la fermentación microbiana y la degradación térmica, con esto obviar pérdidas innecesarias y lograr un producto de óptima calidad (Del Cid Vásquez, 2004) (Acosta de la Luz, 2006).

1.2.5.1 Selección



UNIVERSIDAD DE CUENCA

La selección consiste en la eliminación de materias extrañas, tales como otras partes de la misma planta, impurezas. Es necesario seleccionar las drogas para que cumplan con los requisitos de calidad. En el caso de hojas debe eliminarse el exceso de ramas y rizomas. La tierra y la arena se separan por tamización o por medio de corrientes de aire. (Rubio Taipe, 2013)

1.2.5.2 Lavado

Consiste en aplicar en primer lugar una corriente de agua potable a la parte de la planta que se va a deshidratar con el propósito de eliminar la tierra y otros materiales extraños, para finalmente enjuagar con agua destilada, al órgano vegetal seleccionado (Bagué & Álvarez, 2012).

1.2.5.3 Secado

Dentro del procesamiento post cosecha, la etapa más importante es el secado que consiste en la reducción de la humedad en el material vegetal recolectado hasta niveles inferiores al 10%, lo que permite su conservación prolongada sin que exista un deterioro en la calidad del material y así el producto esté en condiciones de comercializarse, consumirse y conservarse por periodos prolongados, (1 – 2 años las hojas y flores y 2 – 3 años las cortezas y rizomas), además el secado fija los constituyentes y facilita la trituración y la molienda. (Del Cid Vásquez, 2004) (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000).

1.2.5.3.1 Objetivos del secado



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Reducir el contenido de agua en la droga para lograr una reducción sustancial de su peso y volumen. (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000)
- Con la reducción del agua disponible, se disminuirá la actividad de agua y la velocidad de las reacciones en el producto y se impedirá el desarrollo de los microorganismos.
- Interrumpir los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, además de las reacciones de oxidación y de hidrólisis. (Acosta de la Luz, 2006)
- Estabilizar el color, el olor, el sabor, la textura y/o la composición química. En este sentido, el proceso más crítico es la melanosis o amarronamiento de las partes verdes, provocada por la destrucción de la clorofila y numerosas reacciones de oxidación generadas por las fenoloxidasas presentes en las plantas. (Bagué & Álvarez, 2012)

Existen varios métodos de secado: al aire libre (protegidas de la exposición al sol, a la sombra), colocadas en capas delgadas sobre bastidores de secado, salas de secado, secadores solares, hornos de secado, liofilización, microondas o dispositivos infrarrojos (OMS, 2003). Hay que tener presente que cuando en el proceso de secado se utiliza calor (natural o artificial) existe la posibilidad de que se presenten pérdidas en compuestos volátiles como los aceites esenciales, además de la degradación de sustancias termolábiles. (Acosta de la Luz, 2006)

1.2.5.3.2 Temperatura de secado

Para determinar una temperatura óptima a la que se debe llevar a cabo el secado es importante tener en cuenta las características de la planta tales como el órgano que se va a desecar, composición de la droga vegetal, la sensibilidad del producto a la temperatura, este último factor es importante debido a que la mayoría de los



UNIVERSIDAD DE CUENCA

componentes secundarios de las plantas son termolábiles imposibilitando así el elevar la temperatura por temor a ocasionar daños en la calidad de la droga. (Fuentes Fiallo, Lemes Hernández, Rodríguez Ferradá, & Germosén Robineau, 2000)

Debido a que el método y la temperatura influyen considerablemente en la calidad de las drogas vegetales, se debe mantener, en lo posible, un registro de las condiciones de secado, de temperatura y un control de humedad para evitar el daño a los compuestos químicos activos. (Otazu Larrasoña, 2010)

El secado artificial es el que mayormente se utiliza, éste se realiza en secadores de conducción de aire caliente forzado a baja humedad relativa. En función de la sensibilidad de los componentes de las plantas, se determina la temperatura óptima del aire de secado (Acosta de la Luz, 2006).

1.2.5.3.2 Equipos de secado

✓ Secado en estufa

En este método se emplea una temperatura de 30 - 40°C, ya que si la temperatura es muy alta solamente se produce una evaporación rápida superficial y se forma una costra que impide que la desecación progrese, para cortezas la temperatura oscila entre 60 – 70 °C, o también puede variar dependiendo del principio activo. (Muñoz & Sarmiento, 2010)

El equipo consta de un espacio cerrado en cuyo interior se sitúan unas bandejas perforadas en las que se coloca el producto a desecar. El aire entra del exterior aspirado por una turbina, este pasa a través de un filtro y a través de un sistema de calefacción que lo calientan a la temperatura deseada circulando por el recinto, secando el producto, este equipo presenta la desventaja de que el secado no es uniforme ni homogéneo a más de que el proceso es muy lento. (Fauli i Trillo, 2000)

✓ Túnel de secado



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Consiste en un recinto de determinada longitud por donde circulan vagones provistos de aire filtrado y calentado, cuya función es la de desecar la droga vegetal. La ventaja que presenta es que la desecación es gradual, evitando así la formación de costras (Fauli i Trillo, 2000)

✓ **Estufa al vacío**

Empleados para la desecación de productos termolábiles a baja temperatura entre 20 – 35 °C. (Muñoz & Sarmiento, 2010)

1.2.5.3.3 Liofilización

Es el método que más reduce la cantidad de agua de una droga. Consiste en congelar rápidamente la droga a temperaturas muy bajas, entre -40° C y -80° C, y luego sublimar el agua aplicando vacío y una energía necesaria para que se produzca el trabajo, es decir, la sublimación del solvente. El agua pasa directamente del sólido a vapor, y la droga queda con una cantidad de agua muy baja y adquiere una consistencia esponjosa. (Osorio, 2009)

La sublimación ocurre cuando la presión de vapor y la temperatura de la superficie del hielo se encuentran por debajo del punto triple del agua. La liofilización se considera uno de los mejores métodos de conservación de las propiedades organolépticas y nutricionales de productos biológicos. Los productos liofilizados se caracterizan por su baja actividad de agua, bajos cambios de volumen y de forma, alta capacidad de rehidratación, aumento en su porosidad y por presentar un estado vítreo. La porosidad influye fuertemente en la capacidad de rehidratación de los vegetales deshidratados; a mayor porosidad mayor capacidad de rehidratación. (Ayala A., Serna C., & Mosquera V., 2010)

Ventajas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- ✓ Se obtienen productos de redisolución rápida.
- ✓ La forma y características del producto final son esencialmente las originales.
- ✓ La baja temperatura de trabajo impide la alteración de productos termolábiles.
- ✓ Los constituyentes oxidables están protegidos.
- ✓ Contenido muy bajo de humedad final.
- ✓ Compatible con la elaboración en medio aséptico. (Bermejo, 1999)

Inconvenientes

- ✓ Alto coste de instalaciones y equipos.
- ✓ Elevado gasto energético.
- ✓ Operación de larga duración (entre 4 y 10 h/ciclo secado). (Bermejo, 1999)

1.2.5.4 Almacenamiento

Cuando nos referimos al almacenamiento de drogas vegetales ya desecadas; y nos hemos asegurado de seguir cuidadosamente los pasos anteriormente mencionados para asegurar un producto vegetal seco de buena calidad, es necesario que exista una adecuada conservación ya que el periodo de almacenamiento puede muchas veces ser prolongado. Si el producto se almacena adecuadamente, se garantizará su estabilidad y permitirá conservar todas sus propiedades.

En el texto de Aspectos Básicos de Farmacognosia su autor (Osorio, 2009) indica que las condiciones de almacenamiento de las drogas, dependen de las características propias de cada especie y de la parte de la planta utilizada.

Del almacenamiento, además, depende que el producto no vuelva a absorber humedad del ambiente, lo que favorecería el crecimiento de moho. Por otro lado,



UNIVERSIDAD DE CUENCA

el almacenamiento adecuado contribuirá a que el producto no esté en contacto con otros factores que lo arruinen como sol, polvo, roedores e insectos y garantizará que no haya pérdida de sus propios aceites volátiles. (Del Cid Vásquez, 2004)

Se debe considerar también que la droga esté en un lugar fresco, seco, preservado de la luz, principalmente de la luz ultravioleta que cataliza muchos procesos reactivos en la planta y acelera su degradación y en lo posible aislado de la atmósfera, porque el contacto con el aire facilita la oxidación de los principios activos. (Osorio, 2009)

El almacenamiento depende de los recursos disponibles, cuando el volumen es pequeño (familiar) puede guardarse en botes limpios con tapadera a presión o rosca.; cuando el volumen es mayor y se dispone de recurso económico para invertir en infraestructura, se aconseja adquirir barriles plásticos (no es recomendable el PVC), de fibra de vidrio o cartón piedra con tapadera a presión o rosca o bien de cierre plástico con argolla de metal. (Del Cid Vásquez, 2004) (OMS, 2003)

1.3 *Jungia rugosa*

1.3.1 Descripción de la planta

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tribu	<i>Nassauvieae</i>
Género	<i>Jungia</i>
Especie	<i>Jungia rugosa</i> Less

Tabla 1.1 Taxonomía de *Jungia rugosa*
(Solís Bowen, 2014)

La familia Asteraceae se caracteriza por su amplia distribución y por la diversidad de especies vegetales presentes en la Sierra Sur Ecuatoriana.

La región andina de nuestro país posee una variada flora y dentro de ella, muchas especies con reconocida actividad benéfica para la salud. Dentro de estas especies se encuentra *Jungia rugosa*, una especie vegetal que crece en la región andina de nuestro país. Es conocida por la población como “carne humana”, fompo, guayombo, trikache. (Región Andina de Ecuador y Perú)

1.3.2 Descripción botánica

La *Jungia rugosa* es un arbusto de la familia de las asteráceas, crece entre altitudes de 2900 a 3800 metros sobre el nivel del mar.

- **Raíz.-** Su sistema radicular es abundante, y poco profunda, la raíz principal se ramifica en raíces primarias y estas a su vez se vuelven a subdividirse.
- **Tallo.-** Los tallos son leñosos, duros, verdes sin estrías longitudinales, trepadoras y largas. La longitud del tallo puede alcanzar hasta 5 metros, siendo delgados y lisos.
- **Hojas.-** Miden de 3 X 5 cm hasta 10 X 12 cm. Las hojas están alternadas y cubiertas de vellosidades, sus lóbulos son muy marcados pudiendo tener hasta ocho. Presenta una marcada nervadura antiparalela, y son pecioladas. El haz presenta una coloración verde intensa y de aspecto rugoso. El envés presenta en color verde pálido.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- **Flores.-** Se encuentra en una cápsula verde, y son de color blanquecinos, las flores en inflorescencia.
- **Semilla.-** Posee semillas de color negro, muy pequeñas. (Campoverde L. & Verdugo P., 2008)

1.3.3 Hábitat

Se adapta a climas húmedos y fríos. La carne humana es resistente a las heladas y fuertes temporadas de invierno.

La carne humana se da en suelos provistos de materia orgánica, la que puede ser incorporada como abono verde. (Campoverde L. & Verdugo P., 2008)

1.3.4 Información etnomédica sobre la planta

Jungia rugosa ha sido utilizada ancestralmente para tratar lesiones de la piel, con efecto antiinflamatorio y cicatrizante.

Según las personas que conocen de esta planta, la utilizan con diversos fines: cicatrizante para heridas en forma de emplastos y decocciones, ulceraciones en la piel, problemas gástricos, trastornos renales, entre otros. (Campoverde L. & Verdugo P., 2008)

1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Jungia rugosa* Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Las propiedades antiinflamatorias de la carne humana fueron comprobadas científicamente por Edwin Enciso Roca, en su tesis "Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa*, "matico



UNIVERSIDAD DE CUENCA

de puna". En su investigación se realizó un estudio en ratas a las que se les indujo una inflamación según los métodos de "Edema subplantar inducida por carragenina", el método de la "Bolsa de aire en ratas" y la determinación de interleucina 1, interleucina 6 y proteína C reactiva, pudo comprobar las propiedades antiinflamatorias de la planta (Enciso & Arroyo, 2011).

1.5 COMPONENTES DE LAS DROGAS VEGETALES

Los organismos vivos pueden ser considerados como un laboratorio biosintético, no solo por los componentes químicos (hidratos de carbono, proteínas y grasas) que son utilizados como alimentos por humanos y animales, sino por una gran cantidad de compuestos (polifenoles, terpenoides, alcaloides) que ejercen efectos fisiológicos. Estos últimos compuestos fitoquímicos, son los que, principalmente, le dan a las drogas vegetales sus características terapéuticas. En el caso de las drogas vegetales y extractos se trata de sistemas multicomponentes, con una composición generalmente compleja. (Debenedetti, 2011)

Los productos naturales se han dividido con cierta arbitrariedad en dos grupos: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. (Debenedetti, 2011)

1.5.1 Metabolismo primario

Denominamos metabolitos primarios a aquellos que son fundamentales en los procesos metabólicos básico y en el mantenimiento de las células vegetales, estos metabolitos son: hidratos de carbono, lípidos, proteínas, hemo, la clorofila y ácidos nucleicos.

Es así que los metabolitos primarios comprenden aquellas sustancias de muy amplia difusión en la naturaleza y que se encuentran en todos los organismos vivos. Por lo tanto son metabólicamente esenciales. (Debenedetti, 2011)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.5.2 Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios se producen debido a situaciones de estrés que la planta experimenta y por las cuales se ven en la necesidad de fabricar nuevos compuestos, estas sustancias no son esenciales para su supervivencia. Estas sustancias, simplemente aportan una ventaja a la especie que las produce para responder a estímulos del entorno. (Castro Restrepo, y otros, 2013)

Los principales metabolitos secundarios se pueden clasificar en tres grupos diferentes: los compuestos fenólicos, los terpenoides (o isoprenoides) y los alcaloides. Los compuestos fenólicos provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del acetato/malonato (policétidos). Los terpenoides derivan del isopentil difosfato (IPP) o del metil alil pirofosfato por medio de la ruta del ácido mevalónico. Mientras que los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y derivan principalmente de aminoácidos. (Castro Restrepo, y otros, 2013)

1.6 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos constituyen una familia muy numerosa puesto que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, conociéndose en la actualidad entre unos 8.000 a 10.000 compuestos. Son productos del metabolismo secundario y cumplen diversas funciones en las plantas: la mayoría les confieren resistencia frente a agentes patógenos y depredadores, mientras que otros participan en el soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y dispersantes de frutos, en la absorción de la radiación ultravioleta dañina o en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas y en cierta parte, estos compuestos son responsables del color, aroma y sabor de los alimentos que los contienen. (Gil & Ruiz, 2010) (Taiz & Zeiger, 2006)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En cuanto a su estructura presentan un anillo aromático (C_6) en común, con uno o más grupos hidroxilo y pueden ser divididos en diferentes grupos de acuerdo a su estructura química básica, como se observa en la tabla 3. (Gil & Ruiz, 2010)

Esqueleto carbonado	Clasificación
C_6	Fenoles simples, benzoquinonas
$C_6 - C_1$	Ácidos fenólicos
$C_6 - C_2$	Ácido fenilacético, acetofenoles
$C_6 - C_3$	Ácido hidroxicinámico, polipropano, cumarina, isocumarina
$C_6 - C_4$	Naftoquinona
$C_6 - C_1 - C_6$	Xantanos
$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbeno, antraquinona
$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides, isoflavonas
$(C_6 - C_3)_2$	Lignanos, neolignano
$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Bioflavonoides
$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas
$(C_6)_n$	Melonoidinas
$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos

Tabla 1.2 Clasificación de los principales compuestos fenólicos de origen vegetal, de acuerdo con su estructura química básica.
(Gil & Ruiz, 2010)



1.6.1 ÁCIDOS FENÓLICOS

1.6.1.1 Estructura

Están formados por un esqueleto fenólico, que se compone de un anillo aromático con un grupo hidroxilo y una función carboxílica. (Iglesias Neira, 2009)

1.6.1.2 Clasificación

Los ácidos fenólicos se clasifican en tres grupos. En primer lugar los derivados del ácido benzoico que poseen 7 átomos de carbono ($C_6 - C_1$) y dentro de los cuales se encuentran: el ácido salicílico, ácido gálico, ácido vanílico. El segundo grupo está formado por los ácidos cinámicos que contienen 9 átomos de carbono ($C_6 - C_3$), entre éstos tenemos al ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico. Y por último, se encuentran las cumarinas, que son compuestos derivados del ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido o-cumárico. (Iglesias Neira, 2009)

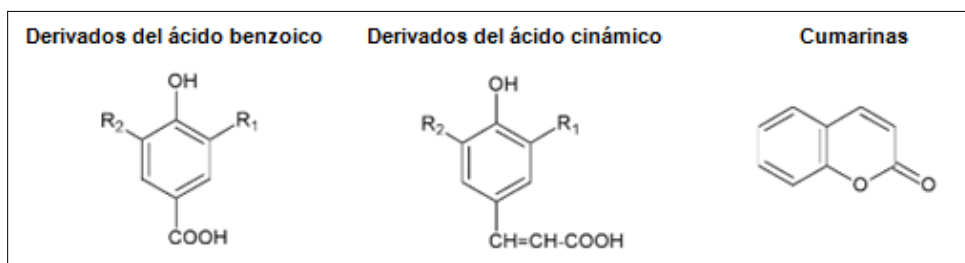


Figura 1.1 Estructuras de los ácidos fenólicos simples más importantes. (Iglesias Neira, 2009)

1.6.2 FLAVONOIDES

La palabra flavonoides deriva del latín “flavus” que significa “amarillo” y constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro de la naturaleza. Se encuentran



UNIVERSIDAD DE CUENCA

principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, con excepción de los tubérculos de cebolla que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012) (Iglesias Neira, 2009)

1.6.2.1 Estructura

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico, comparten un esqueleto común difenilpirano ($C_6-C_3-C_6'$), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran mediante números ordinarios (del 2 al 8), y los del anillo B con números primos (del 2' al 6') (Fig. 3). (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012) (Cusco Vásquez, 2009)

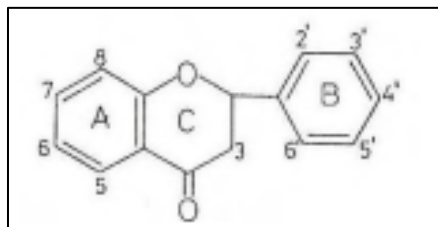


Figura 1.2 Estructura general de los flavonoides.
(Cusco Vásquez, 2009)

1.6.2.2 Clasificación

Los flavonoides se clasifican en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B (Fig. 3). Dentro de cada familia la diferenciación de los compuestos se hace por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas (dihydroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

1.6.2.2.1 Flavonoles

Poseen un doble enlace entre los carbonos C_2 y C_3 , un grupo ceto en el carbono C_4 y un grupo hidroxilo adicional en el carbono C_3 . Debido a que se sintetizan mediante un proceso fotosintético se encuentran principalmente en el tejido externo y aéreo de frutas y verduras. Su principal representante es la quercetina. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

1.6.2.2.2 Flavonas

Contienen un grupo ceto en el carbono C_4 y una insaturación entre los carbonos C_2 y C_3 . Están presentes en pequeñas cantidades en vegetales y se encuentran principalmente en perejil y apio. (Mercader Ros, 2010)

1.6.2.2.3 Flavanonas

Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se encuentran principalmente en frutas cítricas, tomates y plantas aromáticas como la menta. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

1.6.2.2.4 Isoflavonas

Poseen un anillo bencénico lateral en posición C_3 y grupos hidroxilos en los carbonos C_7 y C_4' . A menudo pueden unirse a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se encuentran principalmente en las leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

1.6.2.2.5 Antocianidinas

Se encuentran como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. Estos compuestos aparecen principalmente en las frutas y en menor cantidad en los cereales y el vino tinto. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

1.6.2.2.6 Flavanoles

Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C₃. Pueden presentarse en forma monomérica, denominándose flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y en forma polimérica (proantocianidinas). (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012) (Mercader Ros, 2010)

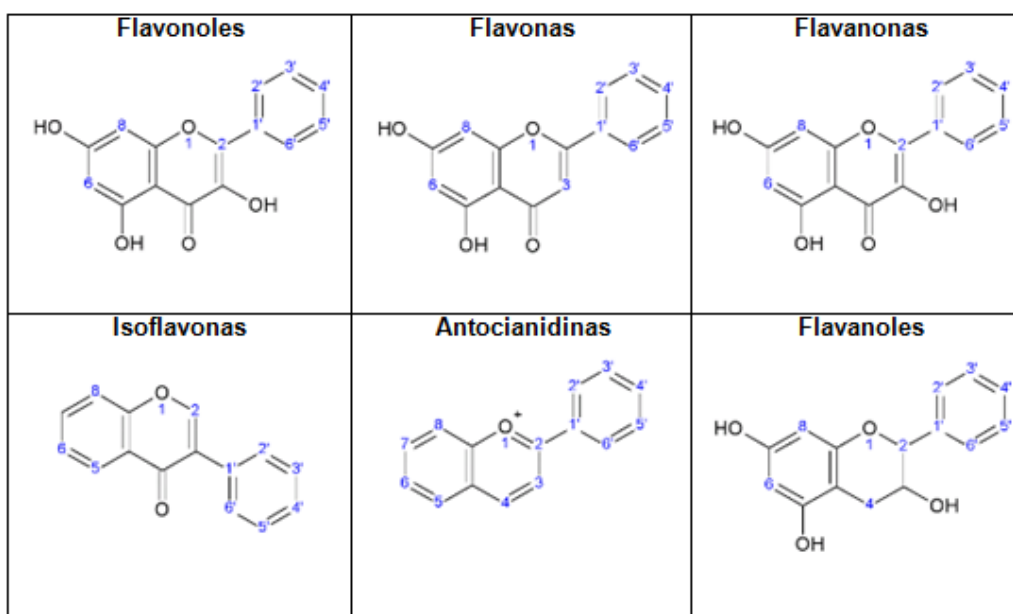


Figura 1.3 Estructuras químicas de algunos de los flavonoides más importantes. (Iglesias Neira, 2009)

1.7 ESTRÉS OXIDATIVO

En condiciones normales el cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, existiendo un equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y los sistemas de defensa antioxidantes. Sin embargo, cuando hay una pérdida de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

este balance se presenta el denominado estrés oxidativo, estado en el cual hay un exceso de radicales libres y especies reactivas, que no pueden ser neutralizados por los antioxidantes causando daño y muerte celular. (Dorado Martínez, Rugerío Vargas, & Rivas Arancibia, 2003) (Elejalde Guerra, 2001)

1.8 RADICALES LIBRES

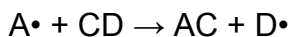
Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado en su orbital más externo, lo cual los convierte en sustancias altamente reactivas y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, generándose una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos, dicha reacción se detendrá únicamente cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí. (Dorado Martínez, Rugerío Vargas, & Rivas Arancibia, 2003) (Elejalde Guerra, 2001) (Corrales & Muñoz, 2012)

Estas reacciones bioquímicas se clasifican en tres grupos:

1. Reacciones de iniciación: formación de un radical libre a partir de no radicales.



2. Reacciones de propagación: consisten en la formación de un radical libre a partir de la reacción entre una molécula estable y un radical libre.



3. Reacciones de terminación: reacción química entre dos radicales libres, en donde sus electrones desapareados son cancelados y se genera un producto estable. (Corrales & Muñoz, 2012)



1.9 ESPECIES REACTIVAS



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Las especies reactivas se forman a partir del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que fácilmente pueden convertirse en radicales libres lo cual les convierte en compuestos muy dañinos para las células. Entre las especies reactivas tenemos las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de hierro (RIS), las especies reactivas de cobre (RCS) y las especies reactivas de nitrógeno. (Dorado Martínez, Rugerio Vargas, & Rivas Arancibia, 2003)

Entre las principales ROS destacan:

Radicales: ión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO), peroxilo (ROO) y óxido de nitrógeno (NO)

No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete O_2 y peroxinitrito (ONOO). (Martínez, 2007)

1.10 ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación mediante la donación de electrones para estabilizar a los radicales libres y neutralizar sus efectos dañinos, éstas pueden ser de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas). (Cajas, 2012) (Delgado Olivares, Betanzos Cabrera, & Sumaya Martínez, 2010)

Los antioxidantes endógenos son las enzimas (proteínas) con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres, dentro de éstos se encuentran: la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Por otra parte, los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen, entre estos están las vitaminas A, E y C, los β -carotenos, luteína, flavonoides, licopenos, el



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ácido tióico o lipoico, los cofactores (cobre, zinc manganeso, hierro y selenio) que son necesarios para la actividad del sistema enzimático endógeno y la coenzima Q. (Cajas, 2012) (Delgado Olivares, Betanzos Cabrera, & Sumaya Martínez, 2010) (Venereo Gutiérrez, 2002)

1.11 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Los polifenoles en general, poseen acciones antibacterianas, molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha comprobado que inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), la autoxidación del ascorbato, además inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento. (Paladino, 2008)

Por su parte, los flavonoides presentan una gran variedad de efectos biológicos incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica, vasodilatadora, efectos sobre la fragilidad capilar, habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas, otras de sus propiedades incluyen: inhibición de ciertas enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A₂, ciclooxigenasa, lipoxigenasa) y captación de radicales libres. Además se ha descrito que los flavonoides poseen distintos efectos moduladores de la apoptosis, un ejemplo claro es el de la teasinensina A, un polímero formado por unidades de antocianidinas procedente del té de *oolong*, que induce apoptosis en células tumorales. Es así, que un aumento en la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes fenólicos naturales, principalmente frutas y verduras, se relaciona con una reducción de enfermedades coronarias, y por



UNIVERSIDAD DE CUENCA

consiguiente en una mayor expectativa de vida. (Gimeno Creus, 2004) (Paladino, 2008) (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012) (Porras Loaiza & López Malo, 2009)

1.11.1 Efecto antiinflamatorio

Durante el estrés oxidativo se produce un aumento de ciertas enzimas como la ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LPO), las cuales liberan factores responsables de la reacción inflamatoria como son las interleucinas y las quimosinas. Se ha comprobado que los polifenoles, y especialmente la quercetina, inhiben la COX y la LPO. Por otra parte, el resveratrol inhibe la síntesis de prostaglandinas, considerándose por lo tanto también una molécula con actividad antiinflamatoria. (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012)

1.12 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está relacionada con su capacidad para quelar metales, inhibir la lipoxigenasa y captar radicales libres, aunque también pueden promover reacciones de oxidación in vitro. Un compuesto fenólico es considerado antioxidante cuando cumple los siguientes requisitos:

1. Cuando se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado pueda retrasar o prevenir la autooxidación o la oxidación mediada por un radical libre.
2. El radical formado tras el secuestro sea estable y no pueda actuar en oxidaciones posteriores (González Jiménez, 2010).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN

Las actividades prácticas para la elaboración de este estudio se llevaron a cabo en los laboratorios del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad de Cuenca.

2.2. MATERIALES

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

2.2.1. Materia prima

Para la realización de este estudio se trabajó con las hojas de la planta *Jungia rugosa* Less denominada comúnmente como “carne humana”, utilizando esta especie vegetal para la evaluación de la estabilidad de extractos obtenidos a partir de distintos procesos de secado, a través de la cuantificación de compuestos fenólicos y de la evaluación de la actividad antioxidante que esta posee.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.2.2 Materiales y Reactivos

Percoladores, probetas, embudos, balones de aforo, balones, pipetas, tubos de ensayo, tubos para liofilizar, viales ámbar.

La quercetina (98%), ácido ascórbico (99%), nitrito de sodio (69 g/mol), ácido cafeico, ácido fosfórico ($\geq 85\%$), ácido tricloroacético ($\geq 99\%$), ferricianuro de potasio (99%), cloruro férrico ($\geq 98\%$) y 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Chemistry (Steinheim, Alemania). Metanol absoluto calidad ACS, ISO, Reag. Ph Eur. (99,9% puro), ácido clorhídrico fumante (37%), hidróxido de sodio en lentejas, sodio dihidrógenofosfato dihidratado, sodio monohidrógenofosfato heptahidratado, cloruro de aluminio hexahidratado, tungstato de sodio, molibdato de sodio, sulfato de litio y el bromo fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania).

El Agua destilada se obtuvo de un equipo Fanem.

2.2.3 Equipos

- Balanza analítica Mettler Toledo, serie N° 1129070512, Suiza, 2007.
- Balanza analítica Boeco BBL - 31, serie N° 19509555, Alemania, 2007.
- Manta de calentamiento Thermoscientific, serie N° 10898182, Gran Bretaña, 2009.
- Baño ultrasónico Cole - Palmer 8893-21, serie QDC 040846137F, USA, 2008.
- Baño María Memmert, serie L315.0629, Alemania, 2016.
- Estufa VWR, serie N° 01053410, USA, 2009.
- Equipo de fotodocumentación Camag TLC Visualizer, serie N° 200239, Suiza, 2013.
- Cámara extractora de gases Quimis, serie N° 07111126, Brasil, 2005.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Biofreezer Fisher Scientific, serie N° 0145903101140804, USA, 2014
- Espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, Genesys 10-S, serie 2L3M064003, USA, 2009.
- Potenciómetro Boeco BT - 600, serie N° 0811001720, Alemania, 2009.
- Centrífuga sigma 2-6, serie N° 120303, Alemania, 2007.
- Rotavapor Heildolph, Laborota 4000 efficient, serie N° 04819293, Alemania, 2006.
- Congelador dairei freezer -45/-85°C ULTF80, USA, 2009.
- Destilador de agua Fanem, modelo 724, serie TAD – 30979, Brasil, 2005.
- Horno Pro-3 TC-96N, Ecuador, 2007.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Recolección

Se identificó la especie botánica mencionada en la bibliografía y se procedió a la recolección manual obteniendo una muestra representativa que se transportó en el menor tiempo posible en bolsas de papel rotuladas correctamente, con el nombre común y científico de la planta, fecha y lugar de recolección.

Las muestras de la planta fueron recolectadas en las coordenadas fijadas por el Proyecto VLIR de Plantas Medicinales del Departamento de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas.

Para este estudio, se llevó a cabo la recolección en dos lugares distintos: el primero fue en las cercanías del Parque Nacional “El Cajas”, en el sector denominado Llaviuco (figura 2.1), en donde se recolectaron tres individuos: Criollo 1, Criollo 2 y Criollo 3, cuyas coordenadas expresadas en UTM son: (17 706540; 9685407), (17 706 540; 9685407) y (17 708108; 9685549) respectivamente. El



UNIVERSIDAD DE CUENCA

segundo lugar de recolección fue en Cañar, sector Mosquera (figura 2.2), en donde se recolectaron tres individuos más: Criollo 4, Criollo 5 y Criollo 6, de coordenadas (17 729902; 9705820), (17 730161; 9705853) y (17 730999; 9705907), respectivamente.



Figura 2.1 Recolección en "El Cajas"



Figura 2.2 Recolección en Cañar

2.3.2 Lavado

Antes del lavado se seleccionó la droga vegetal y se procedió a su limpieza utilizando agua potable hasta eliminar los residuos de tierra o polvo de la superficie, posteriormente se sumergió en agua destilada durante 10 minutos y se escurrió para eliminar el exceso de agua, para lo cual se colocó la especie vegetal sobre unas bandejas provistas de una malla de acero inoxidable montadas sobre un marco de madera, cubiertas con papel periódico durante 24 horas, colocadas sobre una estructura metálica de aluminio y vidrio como se muestra en la figura 2.3.

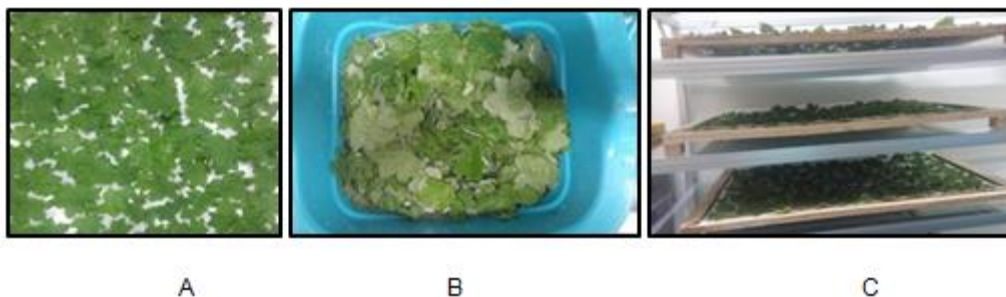


Figura 2.3 A) Selección; B) Lavado; C) Escurrimiento de la droga vegetal.



2.3.3 Deseccación

Previo a la desecación la droga vegetal fue troceada en partes iguales y pesada en una balanza de precisión Mettler Toledo. Se dividió la droga en partes iguales y se colocó en bolsas de papel. La mitad del material vegetal fue depositada en una bandeja provista de una malla de acero inoxidable previamente sanitizada con etanol al 70% y cubierta con papel periódico, que se llevó a un horno de secado a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 2.4). La otra mitad de la droga vegetal se colocó, en partes iguales, en tres tubos para liofilizar previamente pesados y rotulados, se llevaron a congelación (-80°C) en el congelador, girando los tubos continuamente hasta obtener la formación de una película uniforme alrededor de los tubos por aproximadamente 15 - 20 minutos. Luego de este tiempo se retiró el tapón y se cubrió con suficiente papel aluminio para dejar reposar en el congelador hasta que la droga se congele completamente, lo cual se lleva a cabo en aproximadamente 2 horas.

Posteriormente se cargaron las muestras en el liofilizador, como se muestra en la figura 2.5.



Figura 2.4 Deseccación en horno Pro3.



Figura 2.5 Deseccación en liofilizador.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Una vez obtenida la droga vegetal, por los distintos métodos de secado, se procedió a guardar en bolsas de papel correctamente etiquetadas, con su nombre común, nombre científico, fecha, lugar de recolección y peso.

2.3.4 Obtención de extractos vegetales

Solvente empleado: metanol absoluto (99.9%).

Se pesó una determinada cantidad de droga seca, se trituró y colocó en un frasco de vidrio previamente sanitizado y rotulado, se humectó con metanol, procurando que no quede líquido residual, se dejó en humectación por un periodo de 12-15 horas. Posteriormente se transfirió a un percolador previamente colocado algodón hidrófilo en su orificio de salida. Luego se colocó papel filtro sobre el material vegetal vertiendo más disolvente hasta que éste cubra totalmente la droga y quede a 1 cm por encima de ella. Se procedió a la maceración de la muestra por un periodo de 24 horas.

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

2.3.5 Concentración del extracto vegetal

La fracción B del extracto vegetal anteriormente colocada en un balón de fondo redondo se adaptó al rotavapor, figura 2.6, en el cual se procedió a eliminar el solvente a presión reducida a una temperatura de 40°C con rotación de 90rpm y



UNIVERSIDAD DE CUENCA

se esperó hasta que el solvente se haya eliminado completamente. Finalmente se redisolvió el residuo seco adherido en la pared con la Fracción A del extracto y con la menor cantidad de solvente. Se transfirió a un tubo tapa rosca correctamente etiquetado.



Figura 2.6 Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.

2.3.6 Eliminación del solvente

El solvente obtenido de la redisolución se eliminó en un baño ultrasónico, a no más de 40°C, bajo una corriente continua de N₂, hasta obtener una cantidad entre 4 - 5 ml del extracto aproximadamente.

2.3.7 Liofilización

El extracto obtenido se transfirió a un tubo para liofilizar previamente pesado y rotulado, se redisolvió el residuo con aproximadamente 20 ml de agua ultrapura, se taparon los tubos con el tapón de goma e inmediatamente se llevaron a congelación (-80°C) en el biofreezer, girando los tubos constantemente para permitir la formación de una película uniforme alrededor del tubo por aproximadamente 15-20 minutos. Luego de este tiempo se retiró el tapón y se cubrió con suficiente papel aluminio para dejar reposar en el congelador hasta que el extracto se congele completamente, lo cual se consigue en aproximadamente 2h.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Se procedió a cargar las muestras en el liofilizador y se dejó por 22-24h hasta obtener el extracto seco, transcurrido este tiempo se retiraron los tubos.

El extracto seco obtenido se pesó y transfirió a varios viales ámbar debidamente etiquetados. En cada vial se procedió a pesar 5 mg de extracto seco.

2.3.8 ANÁLISIS CUALITATIVO

2.3.8.1 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. (Guarnizo & Martínez, 2009)

La constante R_f (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:

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

La distancia recorrida por el compuesto se mide en centímetros, generalmente desde el centro de la mancha. El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f 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 (Guarnizo & Martínez, 2009)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.8.2 Activación de las placas para TLC

Se utilizaron placas de sílica gel las cuales fueron previamente activadas, colocándolas en una estufa a 100°C por un lapso de 12-15 horas.

2.3.8.3 Identificación de las placas para TLC

Se procedió a trazar una línea de siembra de 1 cm del borde inferior y a 8 cm de ésta se trazó la línea de frente del solvente. Luego se identificó la placa colocando en el borde inferior el nombre de los patrones y muestras que se van a sembrar, y sobre la línea de frente se coloca: en la parte izquierda la fase móvil a utilizar, en el centro los metabolitos a investigar, y en la parte derecha el revelador y la fecha de realización.

2.3.8.4 Preparación de la Fase Móvil

Fase Móvil A: Acetato de Etilo, Metanol, Agua (100:13.5:10)

Fase Móvil B: Acetato de Etilo, Acido Fórmico, Ácido Acético, Agua (100:11:11:26).

La fase móvil debe prepararse en un frasco herméticamente cerrado y debe ser colocada en las cámaras de vidrio 30 min antes de la elución de la placa, para lograr la saturación completa de la misma.

2.3.8.5 Preparación de las muestras

Se pesó 5 mg del extracto seco que se disolvieron en 1 ml de metanol analítico y se homogenizó hasta disolución completa, obteniéndose así una concentración de 5 mg/ml.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.8.6 Siembra de las muestras y patrones

En la lámina de sílica gel previamente identificada, se colocó 5µl de cada uno de los patrones a utilizar, que en este caso fueron: quercetina 1mg/ml, quercetin - 3 glucorónido 1mg/ml, umbeliferona 0,25 mg/ml y ácido cafeico 0,5mg/ml; a una distancia de 1.5 cm entre ellos y a 1 cm del borde inferior.

En el caso de las muestras se sembró 5 µl del extracto en solución a 1cm de distancia entre ellas y a 1cm del borde inferior. Se dejó secar la placa por cinco minutos aproximadamente.

2.3.8.7 Elución sobre la placa

Se colocó la lámina de sílica de manera vertical dentro de la cámara de vidrio que contenía la fase móvil de manera que ésta alcance una altura de 1 cm sobre el borde inferior de la placa, y dejar para que ascienda por capilaridad la fase móvil hasta que llegue a la línea de frente. En ese momento retiramos la placa y dejamos que se seque dentro de la cabina para su posterior observación en el equipo de fotodocumentación y cuantificación, identificando la separación de los distintos compuestos, se procedió a tomar las respectivas fotos en las diferentes longitudes de onda.

2.3.8.8 Revelado poscromatográfico

Para revelar las placas se seleccionó los reveladores dependiendo de la fase móvil que se haya utilizado (Anexos A y B).

Dejamos secar las placas y nuevamente observamos y tomamos las fotografías utilizando el equipo de fotodocumentación y cuantificación.

2.3.9. ANÁLISIS CUANTITATIVO



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.9.1. Espectrofotometría

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida. (Abril, y otros, 2010)

Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución. (Abril, y otros, 2010)

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida, absorbancia, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto. (Abril, y otros, 2010)

2.3.9.2 Valoraciones de los metabolitos

Las valoraciones realizadas en este estudio fueron: cuantificación de fenoles totales y flavonoides, evaluación de la actividad antioxidante según el método de DPPH y poder reductor férrico. Cada una de ellas fue realizada en los tiempos: 0 (0 meses), 1 (1 mes), 2 (2 meses), 3 (4 meses) y 4 (6 meses).

2.3.9.2.1 Cuantificación de Fenoles Totales

2.3.9.2.1.1 Principio

La determinación de fenoles totales mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes. Este



UNIVERSIDAD DE CUENCA

reactivo contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno y molibdeno, cromógenos de color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la molécula de interés. (Cruzado, Pastor, Castro, & Cedrón, 2013)

2.3.9.2.1.2 Elaboración de la curva de calibración

Para realizar la cuantificación de Fenoles Totales en la especie vegetal en estudio, por el método de Folin-Ciocalteu se procedió a realizar en primer lugar una curva de calibración utilizando un espectrofotómetro que mide la absorbancia de una muestra a la longitud de onda determinada para el complejo en función de concentración de la misma. Una vez determinados los valores de absorbancia para cada concentración de ácido cafeico (sustancia de referencia para realizar la curva de calibrado) se graficó la concentración en función de la absorbancia a 650 nm para determinar el rango de concentraciones en el cual se obtenía una linealidad aceptable (r^2 mayor a 0.99) asegurando así que el método es capaz de producir resultados proporcionales, directamente o mediante una transformación matemática, a la concentración del analito en las muestras, dentro de un determinado rango. (Anusic, 2011)

Para la elaboración de la curva de calibración se procedió de la siguiente manera: Se pesó 0.1 g de ácido cafeico y se aforó en 100 ml de agua destilada. La concentración de esta solución fue de 1000 ppm. Se tomó 20 ml de la solución de 1000 ppm y se aforó a 100 ml y se obtuvo una solución final de 200 ppm. Posteriormente se prepararon los estándares de acuerdo al siguiente cuadro:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Volumen de la solución Patrón (ml)	Volumen final * (ml)	Concentración (ppm)
2.5	100	5
5	100	10
12.5	100	25
25	100	50

* Se completó el volumen con agua destilada.

Posteriormente a 2 ml de las soluciones obtenidas se agregaron 500 μ l del reactivo de Folin Ciocalteau 2N (Anexo C), y 400 μ l de una solución de NaOH 2N. Se agitó por 5 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm.

2.3.9.2.1.3 Aplicación del método para el extracto seco

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra problema y se disolvió en 1 ml de una mezcla de metanol – agua (1:1). Se llevó la solución hasta un volumen de 50 ml con agua destilada, posteriormente se tomaron 2 ml de la solución anterior y se llevó a un volumen de 100 ml de agua destilada.

A 2 ml de la solución finalmente obtenida se agregaron 500 μ l del reactivo de Folin 2N, y 400 μ l de una solución de NaOH 2N. Se agitó por 5 minutos. Posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm. Este procedimiento se realizó con cada una de las muestras de estudio.

2.3.9.2.2 Cuantificación de flavonoides

El contenido total de flavonoides fue determinado de acuerdo al método colorimétrico de cloruro de aluminio, usando como patrón una solución stock de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

quercetina (0.5 mg/ml). A cada una de las muestras y patrones preparados se les adicionó 1250 μ l de agua destilada, 75 μ l de NaNO_2 al 5%, se dejó reposar por 6 minutos, se adicionaron 150 μ l de AlCl_3 al 10% y se dejó reposar otros 5 minutos, posteriormente se adicionaron 500 μ l de NaOH 1M y finalmente se completó el volumen de cada una de las muestras a 2.5 ml con agua destilada.

Los ensayos se hicieron por triplicado y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. La concentración total de flavonoides se calculó a partir de la curva de calibración.

2.3.9.2.2.1 Elaboración de la curva de calibración

A partir de la solución stock de quercetina se procedió a preparar los patrones de concentraciones conocidas: 47.2 μ g/ml, 94.5 μ g/ml, 189 μ g/ml, 378 μ g/ml y 756 μ g/ml. A cada uno de los patrones preparados se le adicionó los reactivos detallados en el apartado 2.3.9.2.2.

2.3.9.2.2.2 Aplicación del método para el extracto seco

Para las muestras, se pesaron 5 mg del extracto seco y se disolvieron en 1 ml de metanol. A cada una de las muestras preparadas se le agregaron los reactivos detallados en el apartado 2.3.9.2.2.

2.3.9.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de DPPH

2.3.9.2.3.1 Principio

Este método se basa en la reducción del radical 2,2 -difeníl -1- picrilhidrazilo (DPPH*) por los antioxidantes de la muestra. El compuesto DPPH se caracteriza por poseer un electrón desapareado que es un radical libre, estabilizado por



UNIVERSIDAD DE CUENCA

resonancia. Por esta propiedad el DPPH se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia por captura de radicales libres. Presenta una coloración violeta intensa que absorbe radiación a 520 nm, por lo que su concentración se puede determinar por métodos espectrofotométricos.

En el ensayo se determina la concentración inicial de DPPH y la concentración resultante una vez que se ha añadido el posible antioxidante, que se traduce en la disminución de la coloración violeta a amarillo de la solución debido a la cesión de electrones de la especie antioxidante (Venegas Casanova, 2012).

La capacidad antioxidante se expresó en miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 gramo de droga seca, para lo cual se utilizó la siguiente formula:

$$AAEAC = \frac{(As - Ac)(Fd)(V)}{K.m}$$

Dónde:

As: absorbancia de cada muestra

Ac: absorbancia del control

m: miligramos del extracto inicial de los viales

V: volumen del contenido en el vial

Fd: factor de dilución

K: pendiente de la curva de calibración de ácido ascórbico

AAEAC: miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 gramos de droga seca (mg/g). (Leong & Shui, 2002)

2.3.9.2.3.2. Preparación de la solución de DPPH

Pesar 0.0024g de DPPH en un vaso de precipitación, disolver con metanol analítico agitando constantemente y aforar a 100 ml. Medir la absorbancia a 520 nm (t=0).



2.3.9.2.3.3 Elaboración de la curva de calibración

El estándar de referencia usado fue el ácido ascórbico.

Para la elaboración de la curva de calibración se pesó 0.010 g de ácido ascórbico en un vaso de precipitación pequeño. Protegido de la luz. Se aforó a 100 ml en un balón de aforo con metanol analítico; la concentración de esta solución madre fue de 100 µg/ml.

A partir de esta solución se preparó los siguientes estándares de acuerdo al siguiente cuadro:

Volumen de la solución madre (µl)	Volumen de metanol (µl)	Concentración µg/ml
20	1980	1
40	1960	2
60	1940	3
80	1920	4
100	1900	5
120	1880	6
140	1860	7

Una vez preparado los diferentes estándares se tomó 1ml de cada uno de ellos y se colocaron en tubos de ensayo. A estos se les adicionó igual cantidad del reactivo de DPPH, se homogenizó bien y se dejó en reposo en la oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se procedió a determinar la absorbancia a 520 nm, frente a un blanco de metanol.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

2.3.9.2.3.4 Aplicación del método para el extracto seco

Se pesó 5 mg del extracto seco y se disolvió en 1 ml de metanol absoluto, se obtuvo una solución de 5 mg/ml. De esta solución se tomó 40 μ l y se adicionó 1960 μ l de metanol analítico para obtener una solución de 100 μ g/ml.

Una vez que obtuvimos el extracto en solución a la concentración de 100 μ g/ml, se midió la absorbancia de la clorofila para luego realizar la corrección (lectura de la muestra – lectura de la clorofila). Se lee a la misma longitud de onda (520 nm) frente a un blanco de metanol. Posteriormente se colocó en partes iguales el extracto en solución, y el reactivo DPPH, en tubos de ensayo. Se homogenizó bien y se dejó en la oscuridad durante 30 minutos.

Luego de este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 520 nm.

2.3.9.2.4 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de poder reductor férrico

2.3.9.2.4.1 Principio

El análisis se basa en el poder reductor de un antioxidante que reduce el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}); formando un complejo azul. Una absorción alta a una longitud de onda de 700nm indica un poder de reducción alto del fitoquímico, es decir, una actividad antioxidante alta.

El poder reductor se determina por el método de Oyaizu, empleando ferricianuro de potasio, que por acción del agente reductor, se transforma en ferrocianuro de potasio. Este compuesto reacciona con cloruro férrico, originándose ferrocianuro férrico, de color azul. La intensidad del color azul se lee a 700 nm. (Cajas, 2012).

El poder reductor se expresó en mg de ácido ascórbico equivalentes a 100g de droga seca (AAEAC). Para los cálculos se utilizó la fórmula descrita en el apartado 2.3.9.2.3.1.



2.3.9.2.4.2 Elaboración de la curva de calibración

Método espectrofotométrico del poder reductor férrico usando el ácido ascórbico como material de referencia.

Para evaluar la actividad antioxidante de la especie vegetal objeto de este estudio se realizó el siguiente procedimiento. Se elaboró una curva o gráfica de absorbancia contra concentración (0, 1, 5, 10, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g/ml}$), utilizando una solución patrón de ácido ascórbico de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Para la elaboración de la solución patrón se pesó 0.010 g de ácido ascórbico en un vaso de precipitación pequeño. Protegido de la luz. Se aforó a 100 ml en un balón de aforo con metanol analítico; la concentración de esta solución madre fue de 100 $\mu\text{g/ml}$.

A partir de esta solución se preparó los siguientes estándares de acuerdo al siguiente cuadro:

Volumen de la solución madre (μl)	Volumen de metanol (μl)	Concentración $\mu\text{g/ml}$
20	1980	1
100	1900	5
200	1800	10
600	1400	30
1000	1000	50
1400	600	70
2000	-----	100

2.3.9.2.4.3 Preparación del extracto seco



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Se pesó 5 mg del extracto seco y se disolvió en 1 ml de metanol absoluto, se obtuvo una solución de 5 mg/ml. De ésta solución se tomó 40 μ l y se adicionó 1960 μ l de metanol analítico para obtener una solución de 100 μ g/ml.

2.3.9.2.4.4 Método

A cada una de las muestras y patrones preparados se les agregó 2.5 ml de buffer de fosfatos de potasio (0.2 M, pH 6.6) (Anexo D) y 2.5 ml de $K_3 Fe (CN)_6$ al 1% P/V en agua, después se incubó a 50 °C por 20 min.

Una vez pasado el tiempo de incubación se le agregó 2.5 ml de ácido tricloroacético, al 10% P/V en agua y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. De ésta solución se tomaron 2.5 ml del sobrenadante y se mezclaron con 2.5 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 0.5 ml de $FeCl_3$ al 1% y se dejó reposar por 10 min, para finalmente medir la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro de UV/Vis, frente a un blanco de metanol. (Martínez, 2007)

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados generales se presentaron usando estadística descriptiva y gráficas de cajas y bigotes.

Para el análisis de resultados se realizaron comparaciones de las diferentes pruebas realizadas: determinación de fenoles totales, flavonoides y evaluación de la actividad antioxidante mediante las técnicas de DPPH y poder reductor a lo largo del tiempo (meses 0, 1, 2, 4 y 6) entre el proceso de conservación de secado en la estufa y secado por liofilización.

El análisis en función de los meses por proceso de secado se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Scheffe (post-hoc ANOVA) para identificar los meses que diferían entre sí. Además, se realizaron regresiones



UNIVERSIDAD DE CUENCA

lineales para estimar la influencia del tiempo de conservación en el valor de cada parámetro.

Por otro lado, se aplicaron pruebas t de Student de dos muestras pareadas de dos colas para evaluar la diferencia de cada uno de los parámetros entre los dos procesos de secado en función del tiempo de conservación.

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico STATA 10.0 utilizando un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$).

2.4.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza es una prueba de significación capaz de comparar más de dos variables. El problema ANOVA más simple se conoce indistintamente como unifactorial, de clasificación única o ANOVA unidireccional, e implica el análisis de datos muestreados de más de dos poblaciones (distribuciones) numéricas o de datos de experimentos en los cuales se utilizaron más de dos tratamientos. (Serrano Gallego, 2003) (Devore, 2008)

Esta prueba se aplica para contrastar la hipótesis nula de que K medias son iguales, es decir:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots$$

Frente a: H_1 = las medias son distintas.

El análisis de la varianza se basa en la comparación de la variabilidad que hay entre los grupos (intergrupo) con la que hay dentro de los grupos (intragrupo), proporcionando el estadístico F para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias en los grupos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cuanto mayor sea el valor del estadístico F , más diferenciados estarán los grupos. Si el p -valor asociado a F es igual o menor que α , se rechazará la hipótesis nula al nivel de significación α . (Sábado, 2009)

2.4.2 Prueba t de Student

La prueba t – student se deriva de las distribuciones t. Las distribuciones t son una familia de distribuciones simétricas con forma de campana (distribución normal). La forma de estas distribuciones cambia conforme cambia el diseño de la muestra.

Esta prueba se puede usar para comparar diferencias entre los promedios de dos grupos u observaciones (independientes), o para comparar los promedios de dos observaciones (pareadas o apareadas) realizadas a un mismo sujeto. (Moncada Jiménez, 2005).

Es una prueba de contraste de hipótesis sobre valores de diferentes medias:

H_0 = (Hipótesis nula o de igualdad): las medias de dos muestras son iguales.

H_1 = (Hipótesis alternativa o de diferencia): las medias de las muestras son significativamente distintas

Nivel alfa (α): es el porcentaje de error que estamos dispuestos a correr cuando se realice la prueba.

p - valor: es el nivel de significancia. (Serra, Ponce , López, González , & García , 2014)

✓ Prueba t de Student para dos muestras relacionadas

Esta prueba se efectúa para contrastar la hipótesis nula de no existencia de diferencias significativas entre las medias de dos variables, con distribución normal, medidas en los mismos sujetos, o bien la no existencia de diferencias



UNIVERSIDAD DE CUENCA

significativas entre la media de una misma variable medida en los mismos sujetos en situaciones diferentes. La aplicación de la prueba de T student exige el mismo número de sujetos en ambas situaciones. Si el p – valor asociado al estadístico de contraste es mayor que α ($>0,05$), se aceptará la hipótesis nula, por el contrario si el p – valor es menor que α ($<0,05$) se aceptará la hipótesis alternativa de diferencias significativas entre las medias de ambas variables, al nivel de significación α . (Sábado, 2009)

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DESECACIÓN

Para realizar la comparación de los dos métodos de secado (Estufa y Liofilización) se partió de un peso de droga fresca de 10g para ambos casos, obteniéndose luego del secado, los pesos detallados en la tabla 3.1

CÓDIGO	DROGA FRESCA(g)	DROGA SECA (g)	
		Secado por Estufa	Secado por liofilización
Criollo 1	10	3.11	3.00
Criollo 2	10	2.98	2.97
Criollo 3	10	4.21	4.44
Criollo 4	10	2.32	2.76
Criollo 5	10	3.50	3.62
Criollo 6	10	3.64	4.39

Tabla 3.1 Comparación de los pesos de las drogas secas obtenidas por los dos métodos de secado.



3.2 RENDIMIENTO DE EXTRACTO

Para calcular el rendimiento de los extractos secos se consideró el peso inicial de la droga vegetal empleado para la percolación y el peso del extracto obtenido luego del proceso de liofilización, expresando los resultados como el DER_{nativo} , que indica los gramos de droga requeridos para obtener un gramo de extracto, como se muestra en la tabla 3.2.

Código	Droga (g)	Tubo vacío (g)	Tubo + extracto (g)	Extracto seco(mg)	DER_{nativo}
Criollo 1E	3,11	45,1455	45,4962	350,7	9:1
Criollo 2E	2,98	65,2050	65,5418	336,8	9:1
Criollo 3E	4,21	63,4022	64,0229	620,7	7:1
Criollo 4E	2,32	65,7519	66,0828	330,9	7:1
Criollo 5E	3,50	63,4026	63,8559	453,3	8:1
Criollo 6E	3,64	62,7708	63,3070	536,2	7:1
Criollo 1L	3,00	64,8936	65,4177	524,1	6:1
Criollo 2L	2,97	65,1478	65,8762	728,4	4:1
Criollo 3L	4,44	62,7788	63,5797	800,9	6:1
Criollo 4L	2,76	65,1979	65,9640	766,1	4:1
Criollo 5L	3,62	63,1455	64,0721	926,6	4:1
Criollo 6L	4,39	64,8383	65,6481	809,8	5:1

Tabla 3.2 Rendimiento de extractos secos.

* Criollo 1E y Criollo 1L corresponden a la misma droga vegetal, sometida a proceso de secado por estufa y liofilización, respectivamente. Cumpliéndose lo mismo para los códigos 2, 3, 4, 5, 6.

Como se observa en la tabla 3.2 se obtiene un mayor rendimiento en las muestras sometidas al proceso de liofilización, ya que una de las ventajas del método de secado por liofilización es que los productos presentan una alta porosidad y una alta capacidad de rehidratación y por lo tanto al entrar en contacto con el solvente



UNIVERSIDAD DE CUENCA

adecuado, se logra una mayor extracción de sus componentes (Ayala A., Serna C., & Mosquera V., 2010).

3.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Siguiendo la metodología señalada en el apartado 2.3.8.1, se procedió a realizar el corrimiento de las diferentes muestras y patrones. Los metabolitos investigados fueron: compuestos fenólicos y flavonoides, para lo cual se emplearon fases móviles y reveladores específicos para cada metabolito (Anexo A).

Posteriormente las placas cromatográficas fueron observadas mediante UV 250, 366 nm y espectro visible, para de esta manera observar coloraciones características que ayuden en la identificación de los metabolitos secundarios de interés. Este procedimiento se llevó a cabo tanto en el $t=0$ como en el $t=6$.

3.3.1 Resultados de TLC en el $t=0$

Las figuras 3.1 (A y B) y 3.2 (A y B) muestran los resultados de TLC para las muestras analizadas a tiempo cero, como se puede observar, a pesar de ser una medición cualitativa las manchas cromatográficas son de mayor intensidad en los extractos sometidos al proceso de liofilización. Así mismo, el revelado de la placa mediante el rociado de DPPH muestra un mayor efecto en las muestras sometidas a este proceso.

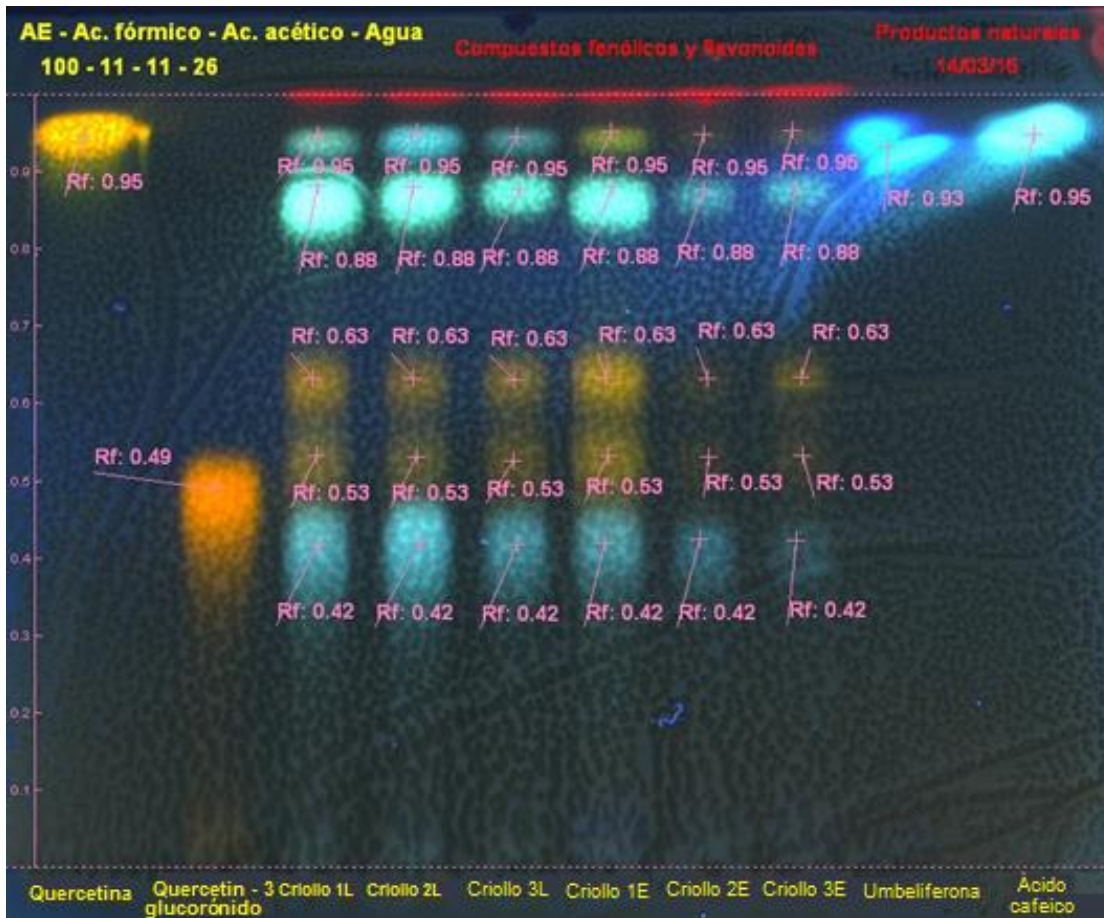


Figura 3.1 A Fotografía del cromatograma de la muestras Criollo 1, 2,3 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.

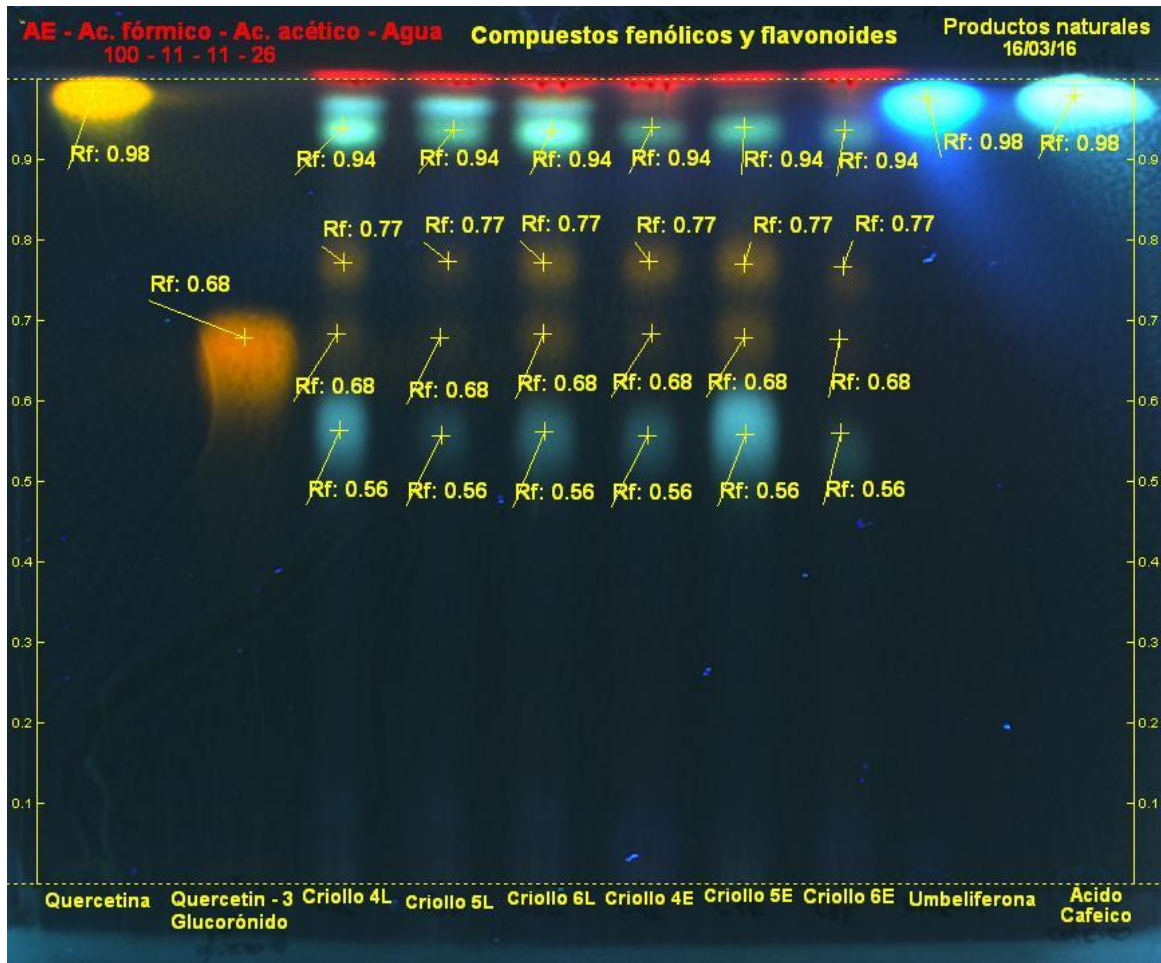


Figura 3.1 B Fotografía del cromatograma de la muestras Criollo 4, 5, 6 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.

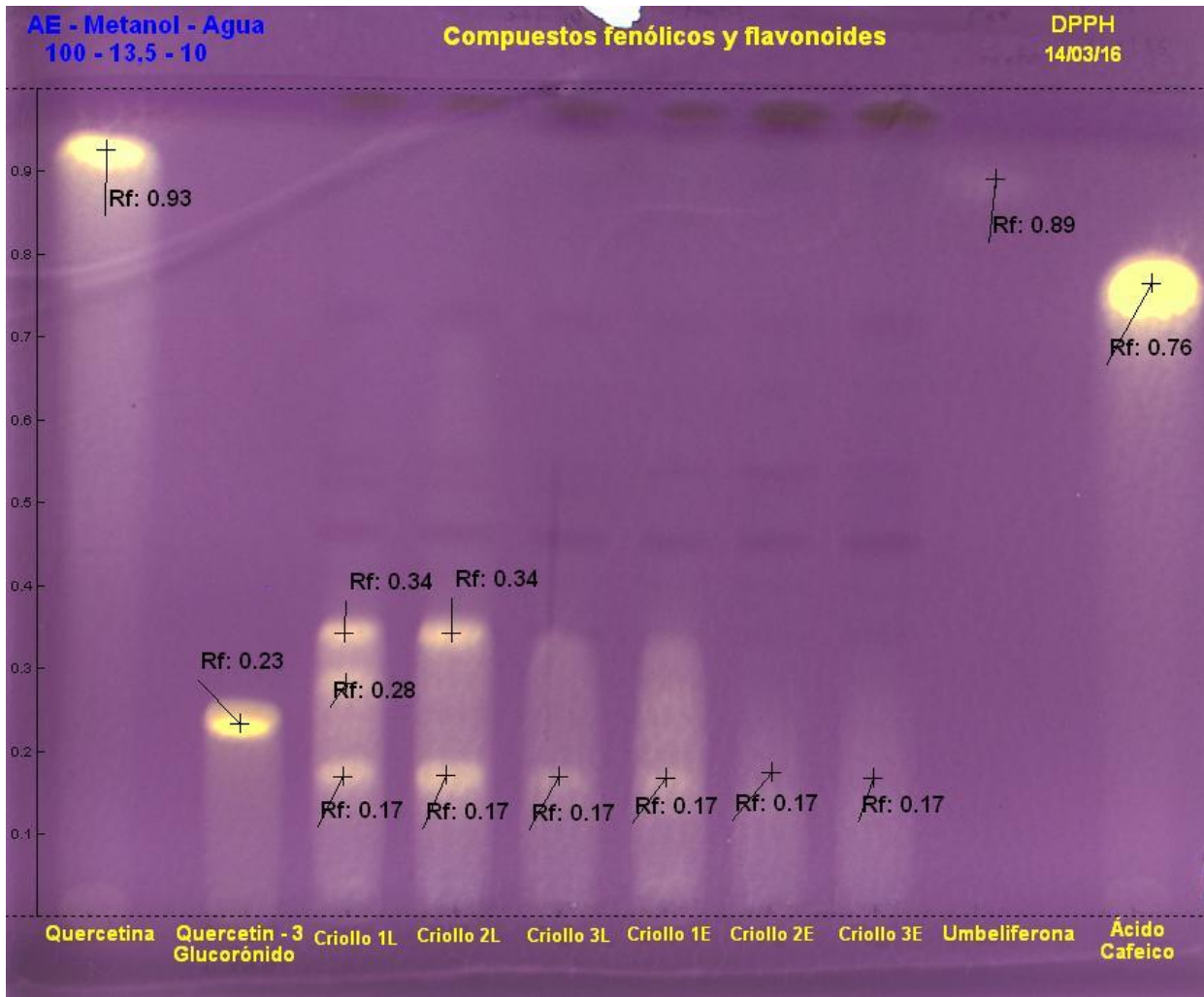


Figura 3.2 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y 3 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides.

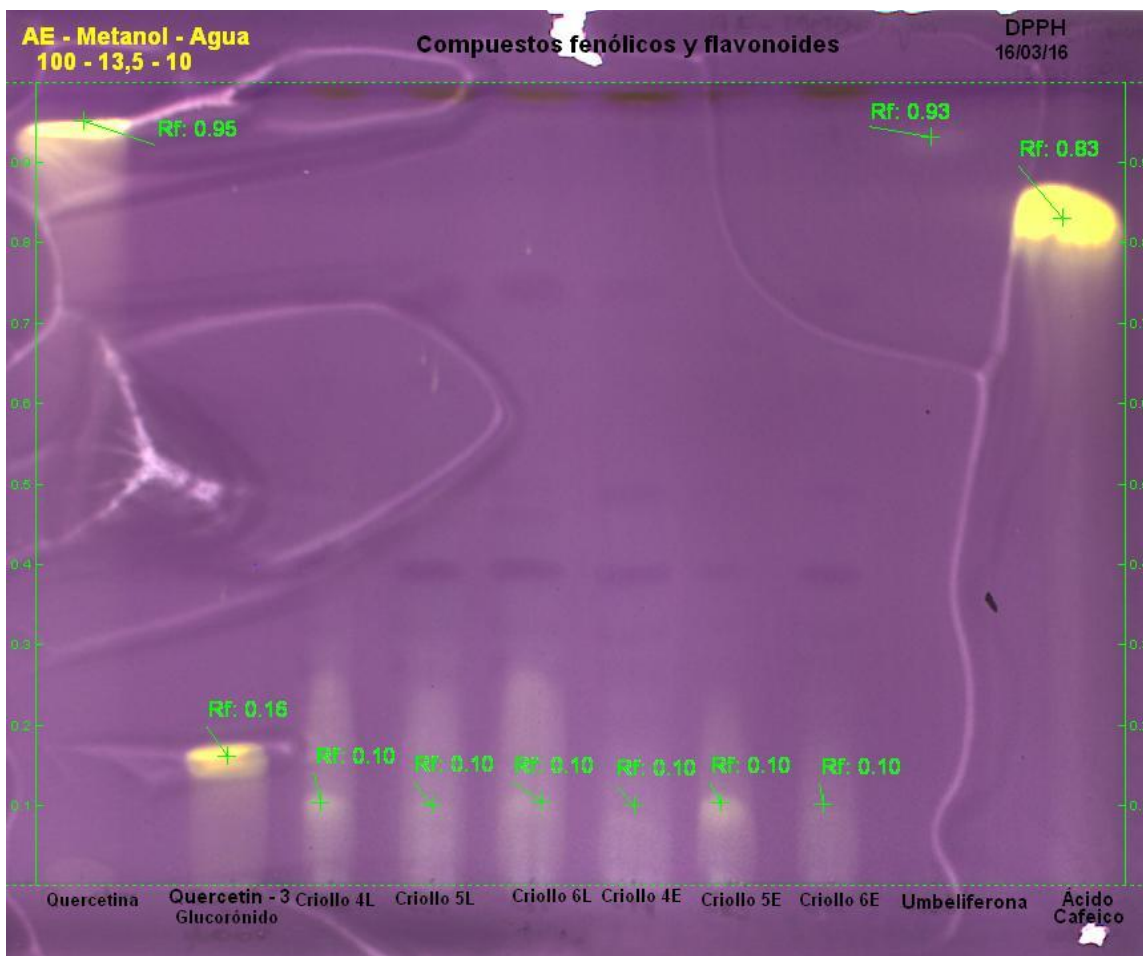


Figura 3.2 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4, 5, 6 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides.

3.3.2 Resultados de TLC en el t=6

En este caso se realizó una disminución en la concentración de dos patrones: Umbeliferona (0,1mg/ml) y Quercetin-3-glucorónido (0,5mg/ml) debido a que en el primer corrimiento obtuvimos una coloración muy intensa.

Las figuras 3.3 (A y B) y 3.4 (A y B), al igual que en el tiempo cero, presentan mayor intensidad en la fluorescencia en los extractos sometidos al proceso de secado por liofilización, así mismo el revelado con DPPH intensificó las manchas cromatográficas de estas muestras.

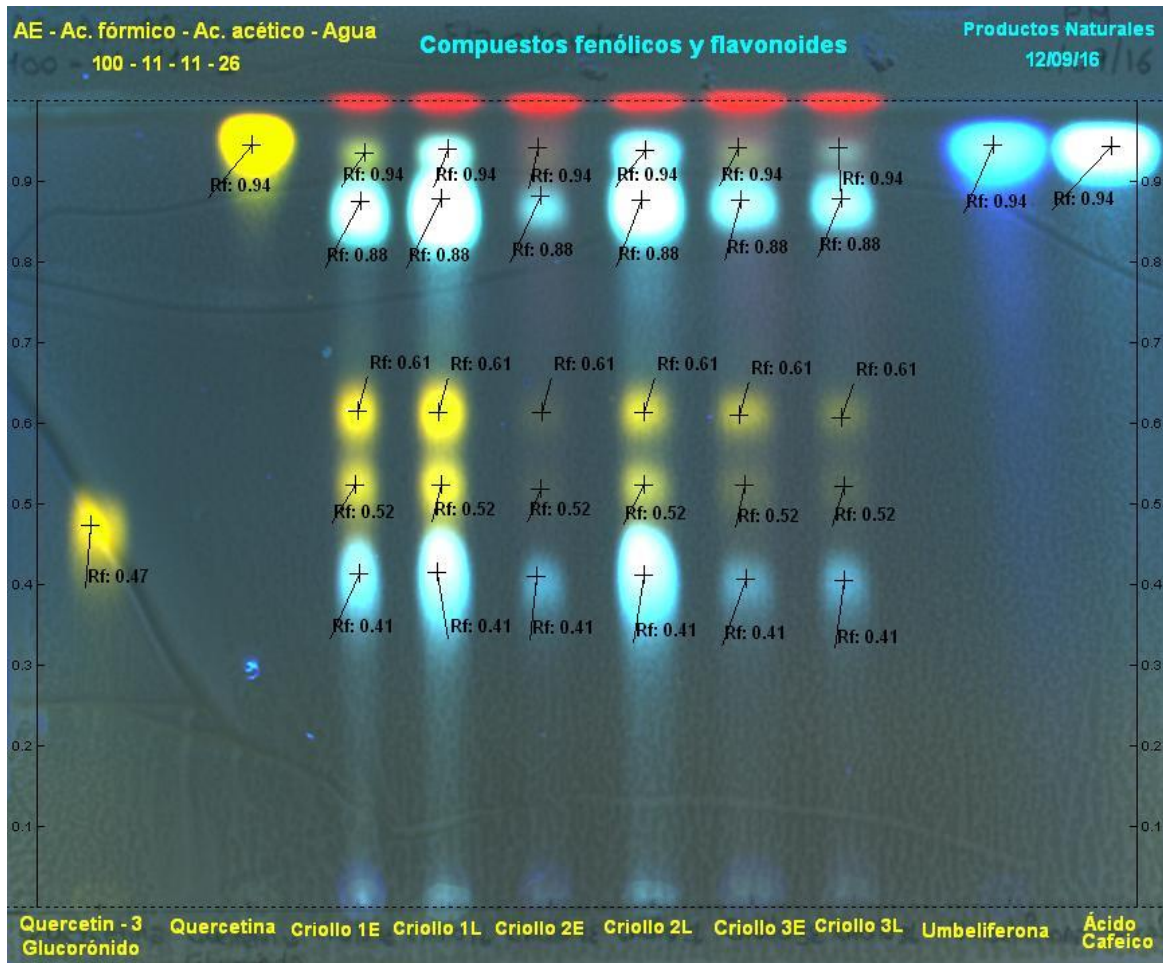


Figura 3.3 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y 3 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.

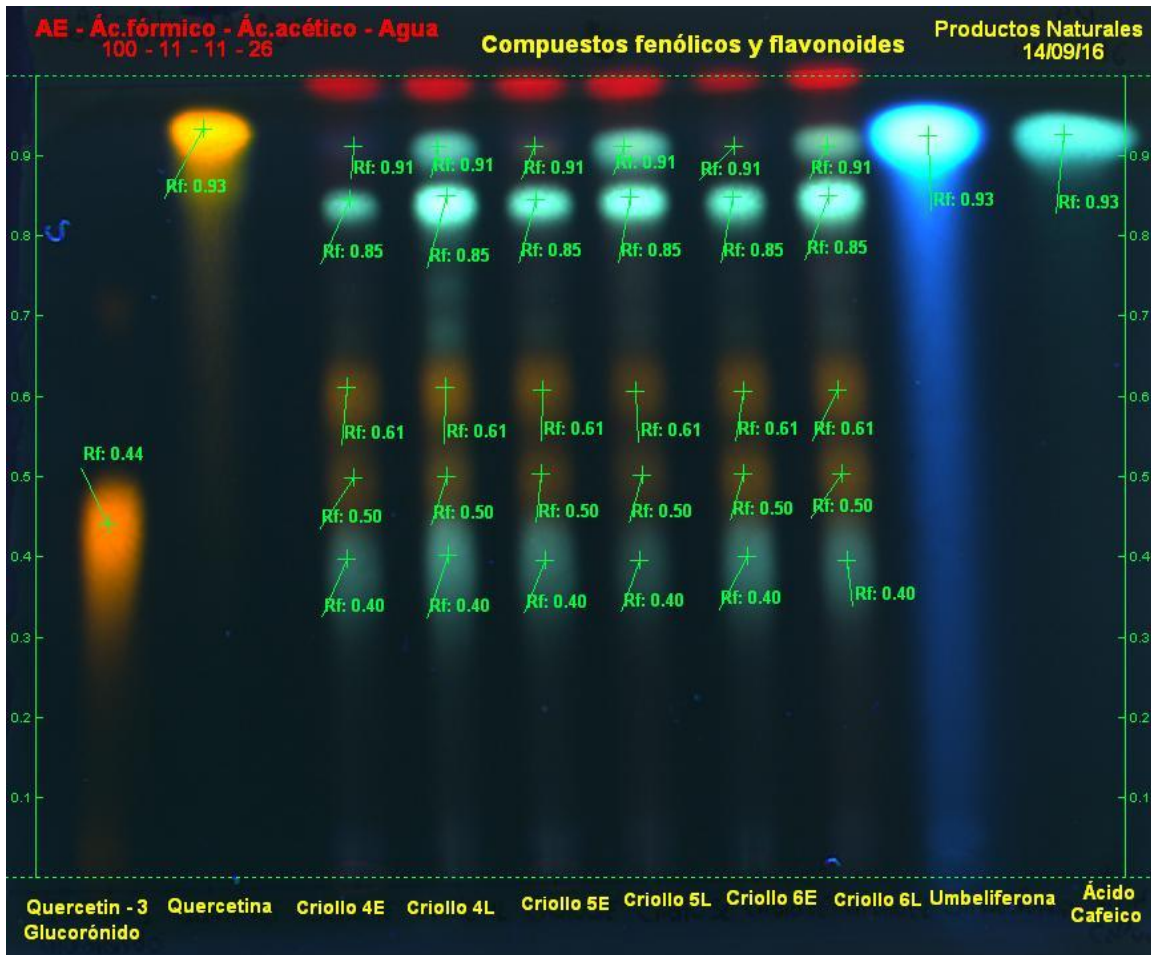


Figura 3.3 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4,5 y 6 bajo UV 366 nm usando como revelador productos naturales para compuestos fenólicos y flavonoides.

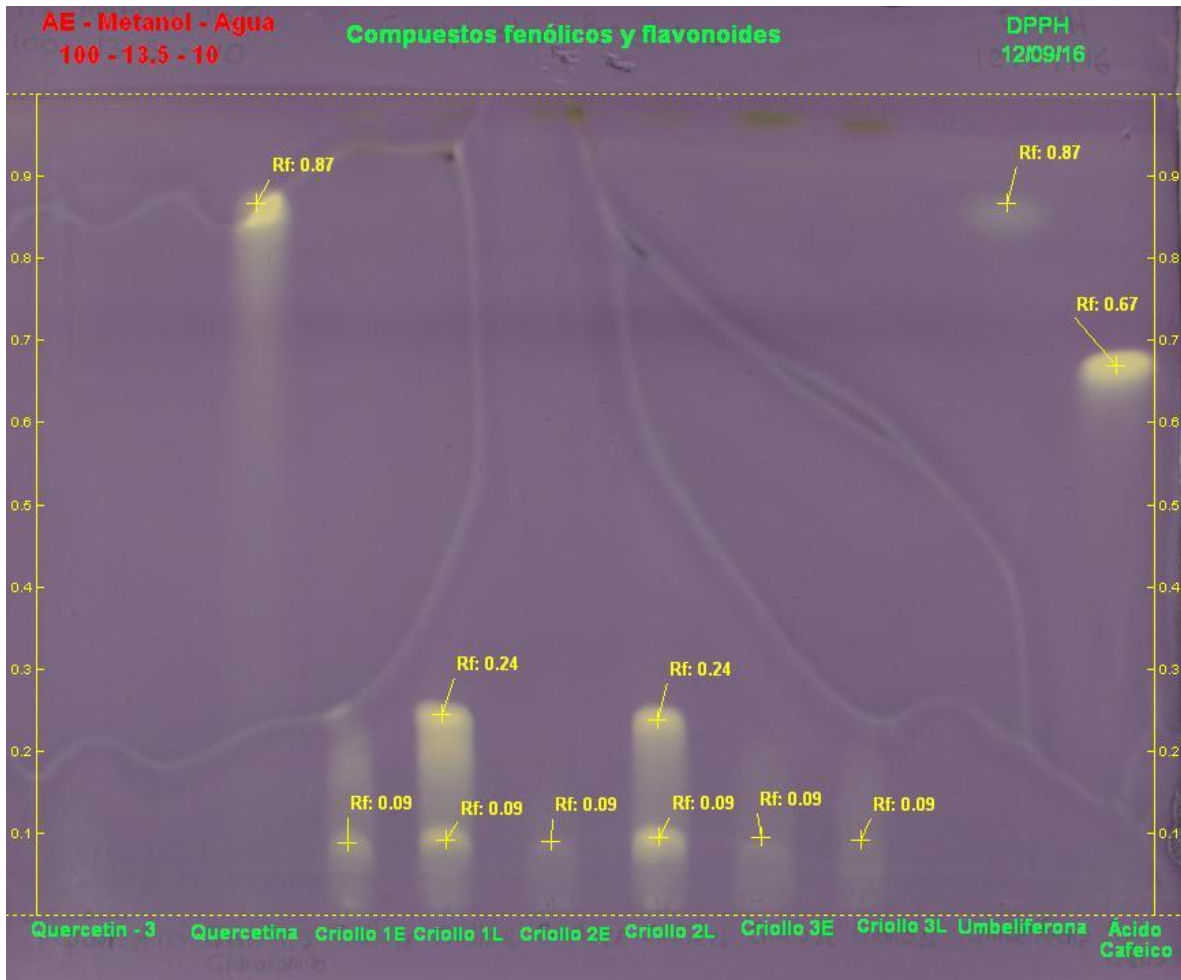


Figura 3.4 A Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 1, 2 y 3 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides.

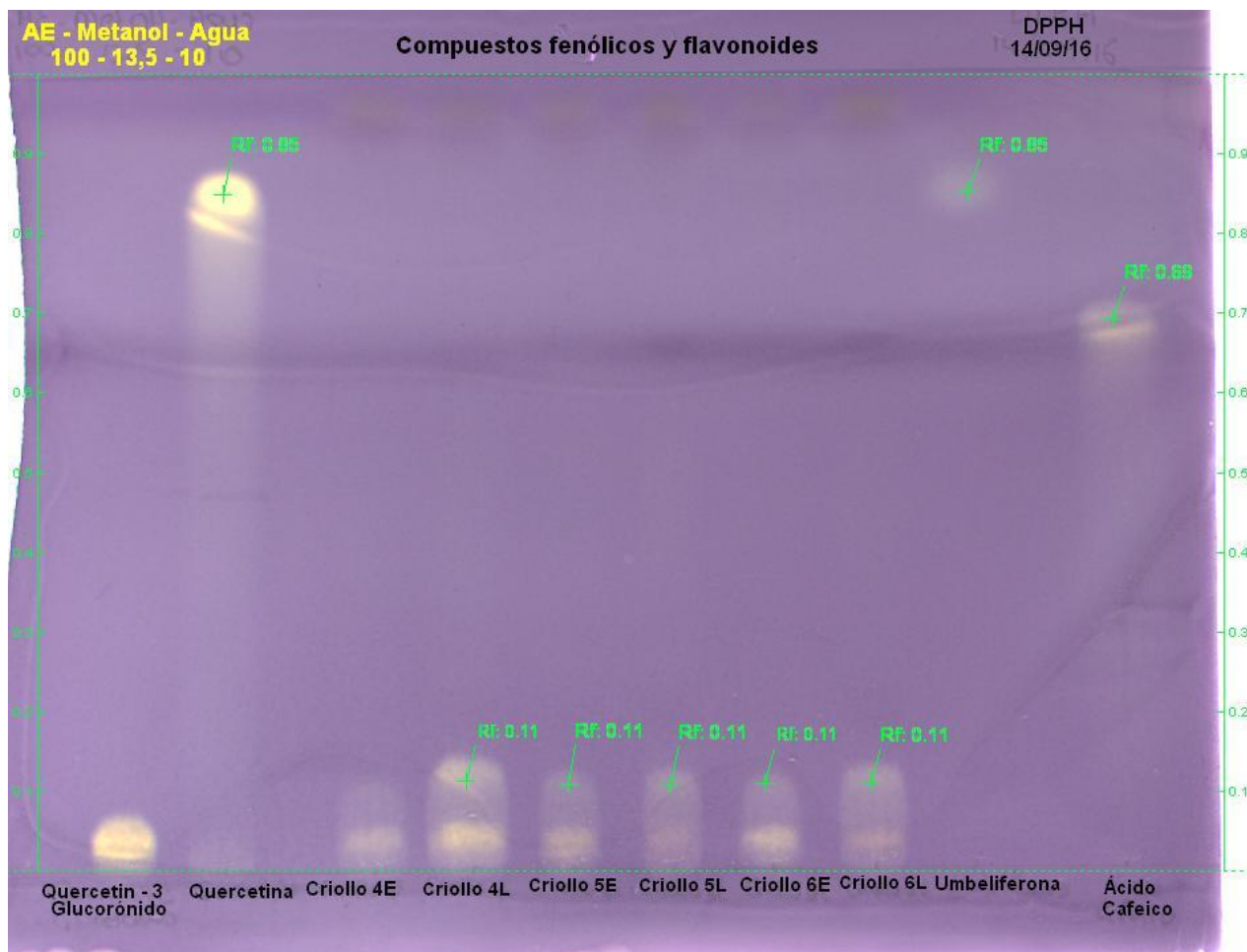


Figura 3.4 B Fotografía del cromatograma de las muestras Criollo 4, 5 y 6 en filtro visible usando como revelador DPPH para compuestos fenólicos y flavonoides.

Pudimos observar que en todos los corrimientos realizados, tanto en el $t=0$ como en el $t=6$, las muestras que fueron sometidas a secado por liofilización presentan mayor intensidad en la fluorescencia, sin embargo todas las muestras presentan un corrimiento similar, revelando esto que no existe diferencias significativas en cuanto a su composición de metabolitos, independientemente del lugar de recolección, es decir que todas ellas poseen los mismos metabolitos secundarios variando únicamente en su concentración.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

En las figuras 3.1 (A y B), 3.3 (A y B) las muestras presentaron intensas fluorescencias amarillas, lo cual nos indica la presencia de flavonoides y por su semejanza a la del patrón, podemos decir que se trata de flavonoles del tipo de la quercetina, además presentaron fluorescencias azules semejantes a la del patrón ácido cafeico, corroborando con esto la presencia de Compuestos fenólicos en las muestras de estudio.

En las figuras 3.2 (A y B), 3.4 (A y B) se observan fluorescencias amarillas semejantes a la del patrón, por lo que se podría decir, que en las muestras existe presencia de compuestos fenólicos.

3.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO

3.4.1 Cuantificación de Fenoles Totales

Para la cuantificación de fenoles totales en las diferentes muestras evaluadas en este estudio se procedió según el método de Folin – Ciocalteu descrito en el punto 2.3.9.2.1, para la cual se elaboró la curva de calibración tomando como referencia una solución madre de ácido cafeico, a partir de ésta se elaboraron los diferentes patrones de concentraciones conocidas y se obtuvieron lecturas por triplicado, obteniendo 12 lecturas en total, en las que se calculó la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación (Anexo E), este procedimiento se llevó a cabo durante los tiempos $t=0$, $t=1$, $t=2$, $t=4$ y $t=6$.

Para calcular la concentración de fenoles totales, se utilizó la ecuación de la recta, en la cual se calculó la pendiente “m” mediante una estimación lineal de todas las curvas realizadas, durante el tiempo que duró el estudio; y la constante “y” se reemplazó por cada lectura de absorbancia, los resultados se detallan en la tabla 3.3



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Código	Tiempo (meses)	Concentración expresada como Ácido Cafeico en ppm					Código	Tiempo (meses)	Concentración expresada como Ácido Cafeico en ppm				
		1	2	3	x	σ			1	2	3	x	σ
CRIOLLO 1E	0	0,6342	0,7400	0,6977	0,6906	0,0434	CRIOLLO 1L	0	0,8034	0,8457	0,8879	0,8457	0,0345
	1	0,5920	0,5920	0,5708	0,5849	0,0100		1	0,7611	0,7822	0,7822	0,7752	0,0100
	2	0,5497	0,5285	0,5285	0,5356	0,0100		2	0,7188	0,6977	0,7188	0,7118	0,0100
		0,5285	0,5285	0,5497	0,5356	0,0100			0,7188	0,6977	0,6977	0,7047	0,0100
	4	0,4440	0,4440	0,4228	0,4369	0,0100		4	0,6131	0,6131	0,5920	0,6061	0,0100
		0,4228	0,4228	0,4440	0,4299	0,0100			0,5920	0,5920	0,6131	0,5990	0,0100
6	0,3594	0,3594	0,3805	0,3665	0,0100	6	0,5074	0,5285	0,5285	0,5215	0,0100		
	0,3383	0,3594	0,3594	0,3524	0,0100		0,5285	0,5074	0,5074	0,5144	0,0100		
CRIOLLO 2E	0	0,6131	0,6765	0,5920	0,6272	0,0359	CRIOLLO 2L	0	0,7400	0,7822	0,8034	0,7752	0,0264
	1	0,5285	0,5497	0,5497	0,5426	0,0100		1	0,6554	0,6977	0,6554	0,6695	0,0199
	2	0,4863	0,4863	0,4863	0,4863	0,0000		2	0,5920	0,5708	0,5708	0,5779	0,0100
		0,5074	0,4863	0,5074	0,5004	0,0100			0,5708	0,5920	0,5920	0,5849	0,0100
	4	0,4228	0,4440	0,4228	0,4299	0,0100		4	0,4863	0,5074	0,5074	0,5004	0,0100
		0,4017	0,4017	0,4228	0,4087	0,0100			0,4863	0,5074	0,4863	0,4933	0,0100
6	0,3171	0,3383	0,3383	0,3312	0,0100	6	0,4228	0,4017	0,4017	0,4087	0,0100		
	0,2960	0,3383	0,3171	0,3171	0,0173		0,4017	0,4228	0,4017	0,4087	0,0100		
CRIOLLO 3E	0	0,8034	0,6765	0,7400	0,7400	0,0518	CRIOLLO 3L	0	0,8457	0,9514	0,8668	0,8879	0,0457
	1	0,5920	0,5920	0,6131	0,5990	0,0100		1	0,7611	0,7400	0,7611	0,7541	0,0100
	2	0,5285	0,5285	0,5074	0,5215	0,0100		2	0,5920	0,5920	0,5920	0,5920	0,0000
		0,5285	0,5074	0,5285	0,5215	0,0100			0,6131	0,5920	0,6131	0,6061	0,0100
	4	0,4228	0,4017	0,4017	0,4087	0,0100		4	0,5074	0,4863	0,4863	0,4933	0,0100
		0,4017	0,4017	0,4228	0,4087	0,0100			0,4863	0,5074	0,5074	0,5004	0,0100
6	0,3171	0,2960	0,2960	0,3030	0,0100	6	0,3805	0,3805	0,3594	0,3735	0,0100		
	0,2960	0,3171	0,2960	0,3030	0,0100		0,3594	0,3805	0,3805	0,3735	0,0100		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CRIOLLO 4E	0	0,5920	0,6342	0,5920	0,6061	0,0199	CRIOLLO 4L	0	0,7188	0,7400	0,7400	0,7329	0,0100
	1	0,5074	0,5074	0,5285	0,5144	0,0100		1	0,6131	0,6342	0,6131	0,6202	0,0100
	2	0,4228	0,4440	0,4440	0,4369	0,0100		2	0,5497	0,5497	0,5708	0,5567	0,0100
		0,4440	0,4651	0,4440	0,4510	0,0100			0,5497	0,5708	0,5497	0,5567	0,0100
	4	0,3594	0,3383	0,3383	0,3453	0,0100		4	0,4440	0,4440	0,4228	0,4369	0,0100
		0,3383	0,3594	0,3383	0,3453	0,0100			0,4228	0,4228	0,4440	0,4299	0,0100
6	0,2537	0,2537	0,2537	0,2537	0,0000	6	0,3383	0,3171	0,3171	0,3242	0,0100		
	0,2537	0,2326	0,2537	0,2467	0,0100		0,3383	0,3383	0,3383	0,3383	0,0000		
CRIOLLO 5E	0	0,6342	0,6342	0,6131	0,6272	0,0100	CRIOLLO 5L	0	0,6765	0,6977	0,6977	0,6906	0,0100
	1	0,5708	0,5920	0,5708	0,5779	0,0100		1	0,6342	0,6342	0,6554	0,6413	0,0100
	2	0,5074	0,4863	0,4863	0,4933	0,0100		2	0,5708	0,5708	0,5920	0,5779	0,0100
		0,4863	0,5074	0,5074	0,5004	0,0100			0,5708	0,5920	0,5708	0,5779	0,0100
	4	0,3594	0,3805	0,3805	0,3735	0,0100		4	0,4651	0,4651	0,4863	0,4722	0,0100
		0,3805	0,3594	0,3805	0,3735	0,0100			0,4017	0,4863	0,4863	0,4581	0,0399
6	0,2960	0,2748	0,2748	0,2819	0,0100	6	0,3171	0,3171	0,3171	0,3171	0,0000		
	0,2748	0,2960	0,2960	0,2889	0,0100		0,3171	0,3383	0,3383	0,3312	0,0100		
CRIOLLO 6E	0	0,6342	0,6342	0,6131	0,6272	2,6959	CRIOLLO 6L	0	0,7188	0,7188	0,6977	0,7118	0,0100
	1	0,5708	0,5497	0,5497	0,5567	0,0100		1	0,6131	0,6131	0,6342	0,6202	0,0100
	2	0,4863	0,4863	0,4863	0,4863	0,0000		2	0,5497	0,5497	0,5497	0,5497	0,0000
		0,5074	0,4863	0,4863	0,4933	0,0100			0,5708	0,5497	0,5708	0,5638	0,0100
	4	0,4228	0,4228	0,3805	0,4087	0,0199		4	0,4228	0,4651	0,4651	0,4510	0,0199
		0,3805	0,4228	0,3805	0,3946	0,0199			0,4440	0,4651	0,4440	0,4510	0,0100
6	0,2960	0,2960	0,2960	0,2960	0,0000	6	0,3383	0,3383	0,3171	0,3312	0,0100		
	0,3171	0,2748	0,3171	0,3030	0,0199		0,3383	0,3594	0,3383	0,3453	0,0100		

Tabla 3.3 Cuantificación de fenoles totales.
(Ver Anexo F)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

De acuerdo a la tabla 3.3 observamos que las muestras sometidas al proceso de secado por liofilización presentan una mayor concentración de fenoles totales con respecto a las muestras sometidas a secado por estufa, y en ambos casos obtuvimos una disminución en la concentración con respecto al tiempo. Los datos obtenidos son aceptables ya que en todos los casos la desviación estándar es menor al 0,05.

3.4.2 Cuantificación de flavonoides

La concentración de flavonoides en las diferentes drogas vegetales se obtuvo mediante la ecuación de la recta $y = mx$, en donde la pendiente "m" se obtuvo por estimación lineal de todas las curvas realizadas en las distintas determinaciones (Anexo G), y la constante "y" se reemplaza por cada lectura de absorbancia (Anexo H), los resultados se muestran en la tabla 3.4.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Código	Tiempo (meses)	Concentración expresada como Quercetina mg/ml					Código	Tiempo (meses)	Concentración expresada como Quercetina mg/ml				
		C1	C2	C3	x	σ			C1	C2	C3	x	σ
CRIOLLO 1E	0	0,5499	0,5601	0,5627	0,5576	0,0055	CRIOLLO 1L	0	0,7263	0,7494	0,7289	0,7349	0,0103
	1	0,5141	0,5192	0,5141	0,5158	0,0024		1	0,6931	0,6982	0,6982	0,6965	0,0024
	2	0,4859	0,4859	0,4859	0,4859	0,0000		2	0,6650	0,6701	0,6701	0,6684	0,0024
		0,4859	0,4834	0,4859	0,4851	0,0012			0,6675	0,6650	0,6675	0,6667	0,0012
	4	0,4629	0,4629	0,4655	0,4638	0,0012		4	0,6471	0,6471	0,6471	0,6471	0,0000
		0,4655	0,4655	0,4629	0,4646	0,0012			0,6471	0,6445	0,6445	0,6454	0,0012
6	0,4450	0,4476	0,4450	0,4459	0,0012	6	0,6138	0,6164	0,6164	0,6155	0,0012		
	0,4501	0,4450	0,4450	0,4467	0,0024		0,6189	0,6189	0,6164	0,6181	0,0012		
CRIOLLO 2E	0	0,4552	0,4501	0,4655	0,4569	0,0064	CRIOLLO 2L	0	0,7110	0,7161	0,7033	0,7101	0,0053
	1	0,4373	0,4373	0,4348	0,4365	0,0012		1	0,6522	0,6573	0,6573	0,6556	0,0024
	2	0,4220	0,4220	0,4194	0,4211	0,0012		2	0,6189	0,6215	0,6189	0,6198	0,0012
		0,4194	0,4220	0,4220	0,4211	0,0012			0,6215	0,6215	0,6189	0,6206	0,0012
	4	0,4015	0,4041	0,4041	0,4032	0,0012		4	0,5882	0,5908	0,5908	0,5899	0,0012
		0,4041	0,4015	0,4041	0,4032	0,0012			0,5857	0,5857	0,5882	0,5865	0,0012
6	0,3862	0,3836	0,3836	0,3845	0,0012	6	0,5575	0,5550	0,5524	0,5550	0,0021		
	0,3811	0,3836	0,3836	0,3828	0,0012		0,5575	0,5550	0,5550	0,5558	0,0012		
CRIOLLO 3E	0	0,4706	0,4604	0,4783	0,4698	0,0073	CRIOLLO 3L	0	0,5550	0,5652	0,5754	0,5652	0,0083
	1	0,4527	0,4501	0,4527	0,4518	0,0012		1	0,5345	0,5396	0,5345	0,5362	0,0024
	2	0,4373	0,4348	0,4348	0,4356	0,0012		2	0,509	0,5115	0,5115	0,5107	0,0012
		0,4348	0,4373	0,4373	0,4365	0,0012			0,5064	0,5064	0,5090	0,5073	0,0012
	4	0,4220	0,4194	0,4220	0,4211	0,0012		4	0,4629	0,4629	0,4604	0,4621	0,0012
		0,4194	0,4194	0,4220	0,4203	0,0012			0,4655	0,4604	0,4655	0,4638	0,0024
6	0,4066	0,4066	0,4041	0,4058	0,0012	6	0,4425	0,4450	0,4450	0,4442	0,0012		
	0,4041	0,4015	0,4041	0,4032	0,0012		0,4450	0,4476	0,4476	0,4467	0,0012		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CRIOLLO 4E	0	0,3734	0,3708	0,3734	0,3725	0,0012	CRIOLLO 4L	0	0,5652	0,5627	0,5652	0,5644	0,0012
	1	0,3453	0,3453	0,3427	0,3444	0,0012		1	0,5499	0,5473	0,5499	0,549	0,0012
	2	0,3274	0,3274	0,3248	0,3265	0,0012		2	0,5320	0,5345	0,5345	0,5337	0,0012
		0,3299	0,3274	0,3274	0,3282	0,0012			0,5320	0,5320	0,5371	0,5337	0,0024
	4	0,3018	0,3018	0,3043	0,3026	0,0012		4	0,5013	0,5013	0,5013	0,5013	0,0000
		0,3018	0,3043	0,3018	0,3026	0,0012			0,5013	0,4987	0,5013	0,5004	0,0012
6	0,2762	0,2788	0,2762	0,2771	0,0012	6	0,4808	0,4834	0,4808	0,4817	0,0012		
	0,2788	0,2762	0,2762	0,2771	0,0012		0,4783	0,4834	0,4834	0,4817	0,0024		
CRIOLLO 5E	0	0,4629	0,4604	0,4604	0,4612	0,0012	CRIOLLO 5L	0	0,6368	0,6368	0,6394	0,6377	0,0012
	1	0,4399	0,4425	0,4425	0,4416	0,0012		1	0,6138	0,6164	0,6138	0,6147	0,0012
	2	0,4092	0,4118	0,4092	0,4101	0,0012		2	0,5985	0,5985	0,5959	0,5976	0,0012
		0,4066	0,4118	0,4118	0,4101	0,0025			0,5959	0,5985	0,5985	0,5976	0,0012
	4	0,3913	0,3887	0,3913	0,3904	0,0012		4	0,5754	0,5754	0,5780	0,5763	0,0012
		0,3913	0,3887	0,3887	0,3896	0,0012			0,5754	0,5780	0,5754	0,5763	0,0012
6	0,3606	0,3657	0,3632	0,3632	0,0021	6	0,5575	0,5575	0,5575	0,5575	0,0000		
	0,3657	0,3632	0,3657	0,3649	0,0012		0,5550	0,5575	0,5550	0,5558	0,0012		
CRIOLLO 6E	0	0,4399	0,4373	0,4373	0,4382	0,0012	CRIOLLO 6L	0	0,5729	0,5729	0,5754	0,5737	0,0012
	1	0,4194	0,4220	0,4220	0,4211	0,0012		1	0,5448	0,5422	0,5422	0,5431	0,0012
	2	0,4041	0,4015	0,4041	0,4032	0,0012		2	0,5243	0,5217	0,5217	0,5226	0,0012
		0,4015	0,4015	0,4041	0,4024	0,0012			0,5243	0,5192	0,5243	0,5226	0,0024
	4	0,3785	0,3785	0,376	0,3777	0,0012		4	0,4910	0,4910	0,4936	0,4919	0,0012
		0,3760	0,3760	0,3785	0,3768	0,0012			0,4936	0,4936	0,4910	0,4927	0,0012
6	0,3555	0,3581	0,3581	0,3572	0,0012	6	0,4680	0,4680	0,4680	0,4680	0,0000		
	0,3555	0,3504	0,3555	0,3538	0,0024		0,4655	0,4655	0,4680	0,4663	0,0012		

Tabla 3.4 Cuantificación de flavonoides.
(Ver Anexo H)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Como se observa en la tabla 3.4 las muestras que fueron secadas en la estufa muestran una menor concentración de flavonoides con respecto a las muestras secadas por liofilización, y en ambos casos obtuvimos una disminución en la concentración con respecto al tiempo. Dado que la desviación estándar, en todos los casos, es menor al 5%, los resultados son aceptables

3.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante

3.4.3.1 Evaluación de la actividad antioxidante según la técnica de DPPH (2, 2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl)

La actividad antioxidante se evaluó mediante el método descrito en el punto 2.3.9.2.3, que se basa en la captación del radical libre estable DPPH. Se utilizó como parámetro de medición el AAEAC que indica los mg de ácido ascórbico equivalentes a 100g de droga seca. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 3.5

Código	Tiempo (meses)	AAEAC			Código	Tiempo (meses)	AAEAC				
		1	2	3			1	2	3		
CRIOLLO 1E	0	63,008	63,199	63,008	CRIOLLO 1L	0	64,157	63,774	63,966		
	1	62,625	62,433	62,433		1	63,199	63,008	63,199		
	2	61,667	61,858	61,858		2	62,625	62,625	62,625		
		61,858	61,475	61,667			62,625	62,625	62,433		
	4	60,517	60,517	60,709		4	61,667	61,858	61,858		
		60,709	60,709	60,517			61,667	61,475	61,667		
	6	60,134	59,943	59,943		6	61,092	61,092	61,284		
		60,134	59,943	59,559			61,284	61,284	61,284		
	CRIOLLO 2E	0	54,195	54,387		54,770	CRIOLLO 2L	0	63,582	63,391	63,199
		1	52,663	52,28		52,471		1	62,816	62,625	62,625
		2	51,705	51,897		52,088		2	61,858	62,050	62,050
			51,705	51,705		51,897			62,241	62,050	62,241
4		49,215	49,215	49,023	4	61,092		60,900	61,092		
		49,598	49,406	49,406		60,709		60,709	60,900		
6		46,916	46,916	46,533	6	59,751		59,751	59,751		
		46,724	46,916	47,107		59,943		59,943	59,751		
CRIOLLO		0	63,199	63,199	63,391	CRIOLLO		0	63,391	63,582	63,199



UNIVERSIDAD DE CUENCA

3E	1	62,241	62,241	62,433	3L	1	62,625	63,008	62,625
		61,475	61,284	61,092			2	61,858	61,858
	61,092	61,284	61,092	4		61,667		61,667	61,667
	60,517	60,134	60,326			6	60,9	60,709	60,709
	60,134	60,326	60,326	6			60,709	60,709	60,709
	59,559	59,559	59,559			6	60,134	59,751	59,751
59,559	59,368	59,368	59,751	59,751	60,134				
CRIOLLO 4E	0	61,475	61,475	61,284	CRIOLLO 4L	0	63,391	63,199	63,582
		59,751	59,943	59,943			1	62,241	62,433
	58,410	58,218	58,218	2		61,092		61,284	60,900
	58,218	58,218	58,602			4	61,284	61,092	61,092
	57,261	57,261	57,069	6			60,709	60,517	60,517
	57,644	57,069	56,877			6	60,326	60,517	60,517
55,728	55,92	56,111	6	59,368	59,368		59,559		
56,111	56,111	56,111		59,559	59,751	59,559			
CRIOLLO 5E	0	62,816	62,816	63,199	CRIOLLO 5L	0	64,540	64,349	64,157
		61,858	61,667	62,05			1	63,774	63,774
	60,709	60,709	60,709	2		63,008		62,625	62,625
	60,709	61,092	60,709			4	63,008	63,008	62,816
	59,559	59,751	59,559	6			62,05	61,858	61,858
	59,368	59,751	59,751			6	62,05	62,241	61,858
58,218	58,218	58,410	6	61,092	60,900		61,092		
58,218	58,218	58,027		60,709	60,900	60,709			
CRIOLLO 6E	0	62,050	62,050	62,050	CRIOLLO 6L	0	63,966	64,349	64,349
		61,092	61,475	61,092			1	63,774	63,774
	60,134	60,517	60,134	2		63,199		63,008	63,199
	60,134	60,326	60,134			4	63,008	63,199	63,008
	58,602	58,793	58,602	6			62,433	62,433	62,241
	58,602	58,793	58,793			6	62,433	62,433	62,241
58,027	57,644	58,027	6	61,475	61,475		61,475		
57,835	57,835	58,027		61,284	61,284	61,475			

Tabla 3.5 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH.
(Ver anexo I)



3.4.3.2 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor

La actividad antioxidante se evaluó según la técnica del poder reductor férrico, descrita anteriormente en el apartado 2.3.9.2.4. Las muestras se trabajaron a una concentración de 100 µg/ml y los valores de las absorbancias y el AAEAC de las distintas muestras se detallan en el Anexo J.

El parámetro de medición utilizado para identificar la actividad antioxidante de los distintos individuos de *Jungia rugosa* fue el AAEAC, el cual indica los miligramos de ácido ascórbico equivalentes a 100 gramos de droga seca, tal como se observa en la tabla 3.6.

Código	Tiempo (meses)	AAEAC (mg/g)			Código	Tiempo (meses)	AAEAC (mg/g)				
		1	2	3			1	2	3		
CRIOLLO 1E	0	109,653	108,264	108,264	CRIOLLO 1L	0	168,681	169,375	168,681		
	1	96,458	97,153	97,153		1	165,903	165,903	165,208		
	2	90,903	91,597	91,597		2	161,042	161,042	161,736		
		90,208	90,903	90,903			161,736	161,042	161,736		
	4	85,347	85,347	84,653		4	155,486	155,486	155,486		
		84,653	84,653	84,653			155,486	156,181	156,181		
	6	79,097	79,792	79,097		6	144,375	144,375	144,375		
		79,792	79,097	79,792			145,069	145,069	144,375		
	CRIOLLO 2E	0	87,431	89,514		87,431	CRIOLLO 2L	0	167,986	171,458	166,597
		1	77,014	78,403		78,403		1	160,347	161,736	161,736
		2	72,153	71,458		71,458		2	156,181	156,875	156,875
			71,458	70,069		70,764			156,181	155,486	156,181
4		65,208	64,514	64,514	4	149,931		149,931	149,236		
		64,514	63,819	64,514		149,236		148,542	149,236		
6		59,653	58,958	58,264	6	141,597		142,292	142,292		
		58,958	58,264	58,958		141,597		140,208	141,597		
CRIOLLO 3E		0	101,319	103,403	101,319	CRIOLLO 3L		0	153,403	158,958	157,569
		1	92,292	91,597	92,292			1	148,542	149,236	149,236
		2	86,736	87,431	87,431			2	144,375	145,069	145,069
			86,042	86,736	86,736				143,681	144,375	144,375
	4	81,875	80,486	80,486	4		138,819	138,819	139,514		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

		80,486	79,792	80,486			138,819	138,125	138,819
	6	74,236	74,236	74,931		6	133,264	133,958	133,958
		74,236	73,542	74,236			133,958	133,264	133,958
CRIOLLO 4E	0	65,903	66,597	65,903	CRIOLLO 4L	0	99,931	99,931	99,236
	1	61,042	60,347	60,347		1	95,764	95,069	95,764
	2	56,181	55,486	55,486		2	90,208	90,208	90,208
		55,486	54,792	55,486			89,514	89,514	90,208
	4	50,625	49,236	50,625		4	84,653	85,347	85,347
		49,931	48,542	49,931			83,958	84,653	84,653
6	41,597	41,597	40,208	6	78,403	79,097	79,097		
	40,208	40,208	40,903		77,708	78,403	78,403		
CRIOLLO 5E	0	74,931	74,236	74,236	CRIOLLO 5L	0	115,903	115,903	115,208
	1	68,681	68,681	67,986		1	110,347	111,042	110,347
	2	64,514	64,514	63,819		2	106,181	106,875	106,181
		63,819	64,514	63,819			105,486	105,486	106,181
	4	59,653	60,347	59,653		4	101,319	102,014	102,014
		59,653	59,653	59,653			100,625	101,319	101,319
6	52,708	52,014	52,708	6	93,681	93,681	94,375		
	52,708	52,708	52,014		93,681	92,986	93,681		
CRIOLLO 6E	0	61,042	61,736	61,736	CRIOLLO 6L	0	87,431	88,125	88,125
	1	55,486	56,181	56,181		1	81,875	83,264	81,875
	2	50,625	50,625	51,319		2	76,319	77,014	77,014
		49,931	50,625	49,931			75,625	74,931	75,625
	4	45,069	45,764	45,069		4	69,375	69,375	68,681
		44,375	45,069	45,069			69,375	68,681	69,375
6	39,514	38,819	38,819	6	64,514	64,514	65,208		
	38,819	38,125	38,125		64,514	63,819	63,819		

Tabla 3.6 Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor.

Como se puede observar en las tablas 3.5 y 3.6 los valores de AAEAC encontrados fueron mayores en las muestras sometidas al proceso de secado por liofilización, indicando por lo tanto una mayor actividad antioxidante lo que guarda estrecha relación con los resultados de fenoles totales y flavonoides, en los cuales también se evidenció una mayor concentración de estos metabolitos en las muestras liofilizadas.



3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1 Análisis de varianza

Para la realización de este estudio, se realizaron 144 observaciones por cada parámetro analizado, tanto para el método de secado en estufa como para el método de secado por liofilización.

En la tabla 3.7 se presenta un resumen general y por meses de cada método de secado. En donde observamos claramente que los valores de las medias son superiores en el método de secado por liofilización, justificándose esto porque en éste método se utiliza una baja temperatura de trabajo lo que impide la alteración de productos termolábiles (Bermejo, 1999), no así en el método de secado por estufa en el cual se utilizan temperaturas entre 30 y 40 °C por largos periodos de tiempo (Muñoz & Sarmiento, 2010). Además se evidenció que en ambos casos (Estufa y liofilización) hay una disminución en las medias de los parámetros analizados con el paso del tiempo, lo cual se corrobora con los resultados que expone Bravo, M. & Jiménez, G. en su tesis titulada “Estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos”, en la cual concluyen que existe una disminución en la concentración de los metabolitos conforme pasa el tiempo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Secado por Estufa

Variable	General		t0		t1		t2		t4		t6	
	$x \pm \sigma$	(Mín - Máx.)	$x \pm \sigma$	(Mín. - Máx.)	$x \pm \sigma$	(Mín - Máx)	$x \pm \sigma$	(Mín - Máx)	$x \pm \sigma$	(Mín - Máx)	$x \pm \sigma$	(Mín - Máx)
Fenoles totales	0,45 ± 0,12	0,23 - 0,80	0,65 ± 0,06	0,59 - 0,80	0,56 ± 0,03	0,51 - 0,61	0,50 ± 0,03	0,42 - 0,55	0,40 ± 0,03	0,34 - 0,44	0,30 ± 0,04	0,23 - 0,38
Flavonoides	0,41 ± 0,058	0,28 - 0,56	0,46 ± 0,06	0,37 - 0,56	0,44 ± 0,05	0,34 - 0,52	0,41 ± 0,05	0,32 - 0,49	0,39 ± 0,05	0,30 - 0,47	0,37 ± 0,05	0,28 - 0,45
DPPH	58,4 ± 4,2	46,5 - 63,4	61,20 ± 3,18	54,20 - 63,40	63,0 ± 3,60	52,3 - 62,6	59,0 ± 3,4	51,7 - 61,9	57,6 ± 4,0	48,0 - 60,7	56,5 ± 4,6	46,5 - 60,7
Poder reductor	67,7 ± 17,6	38,1 - 109,7	83,50 ± 18,17	61,04 - 109,70	75,3 ± 15,70	55,5 - 97,1	69,9 ± 15,2	49,9 - 91,6	64,1 ± 14,9	44,4 - 85,3	57,4 ± 15,6	38,1 - 79,8

Secado por Liofilización

Fenoles totales	0,55 ± 0,14	0,32 - 0,95	0,77 ± 0,08	0,68 - 0,95	0,68 ± 0,07	0,61 - 0,78	0,60 ± 0,05	0,55 - 0,72	0,49 ± 0,06	0,40 - 0,61	0,39 ± 0,07	0,32 - 0,53
Flavonoides	0,56 ± 0,07	0,44 - 0,75	0,63 ± 0,07	0,56 - 0,75	0,60 ± 0,06	0,53 - 0,70	0,58 ± 0,06	0,51 - 0,67	0,54 ± 0,06	0,46 - 0,65	0,52 ± 0,06	0,44 - 0,62
DPPH	61,9 ± 1,3	59,4 - 64,6	63,8 ± 0,45	63,2 - 64,5	63,1 ± 0,54	62,2 - 63,8	62,2 ± 0,71	60,9 - 63,2	61,5 ± 0,81	60,3 - 62,9	60,5 ± 0,76	59,4 - 61,5
Poder reductor	119,6 ± 33,8	63,8 - 171,5	132,9 ± 34,1	87,4 - 171,5	127,4 ± 33,6	81,9 - 165,9	122,4 ± 33,7	74,9 - 161,7	116,5 ± 33,6	68,7 - 156,2	109,4 ± 32,3	63,8 - 145,1

Tabla 3.7 Resumen general y por meses, por tipo de secado.

3.5.2 Gráficas de cajas y bigotes

En todos los gráficos observamos que existe una disminución de las medias en función del tiempo, corroborando lo detallado en la tabla 3.7.



Método de secado por estufa

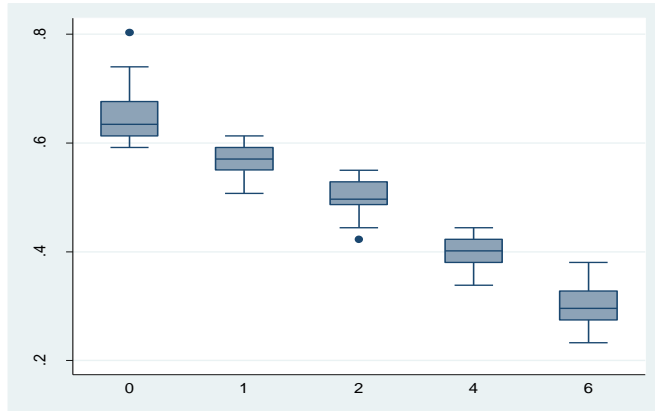


Figura 3.5 Disminución de la concentración de fenoles totales en función del tiempo.

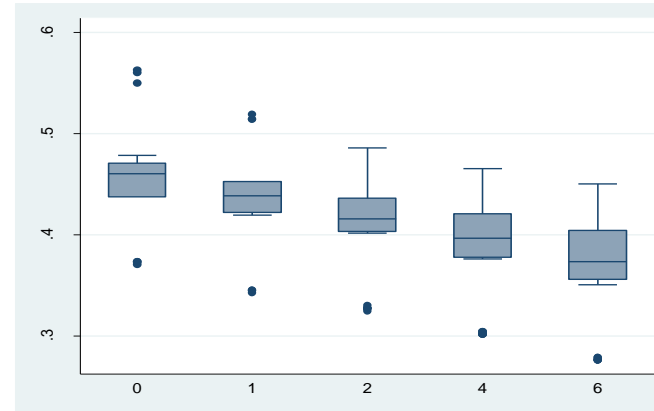


Figura 3.6 Disminución de la concentración de flavonoides en función del tiempo.

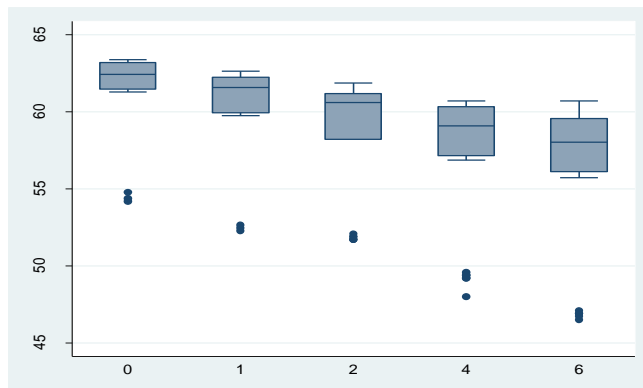


Figura 3.7 Disminución del valor del AAEAC para DPPH en función del tiempo.

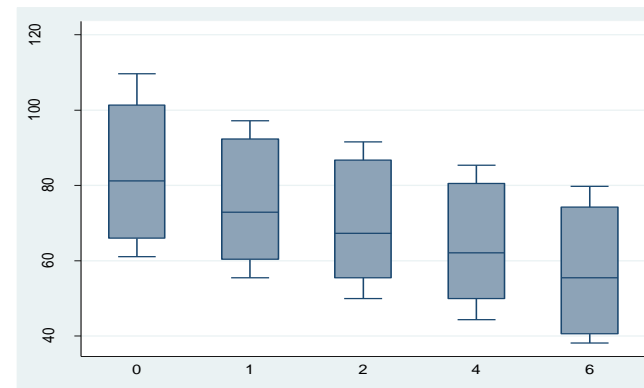


Figura 3.8 Disminución del valor del AAEAC para poder reductor en función del tiempo.



Método de secado por liofilización

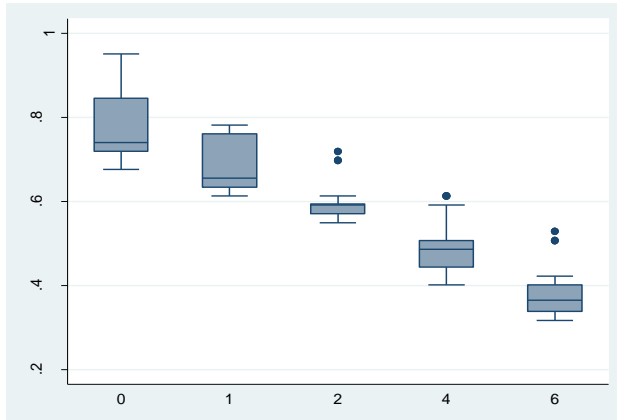


Figura 3.9 Disminución de la concentración de fenoles totales en función del tiempo.

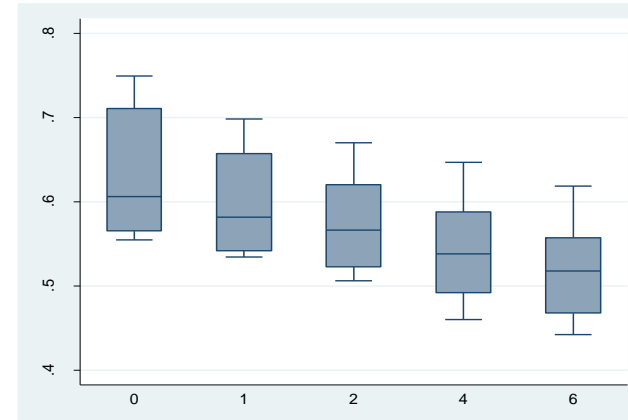


Figura 3.10 Disminución de la concentración de flavonoides en función del tiempo.

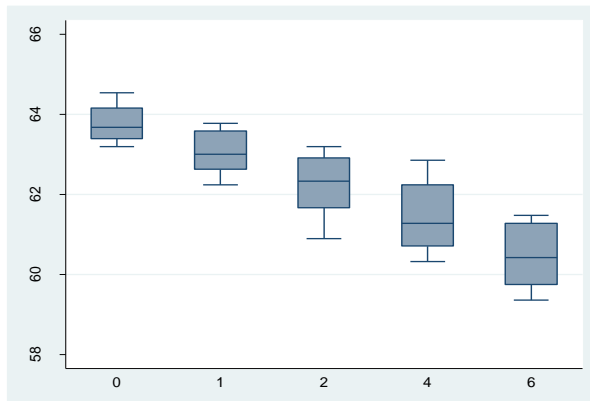


Figura 3.11 Disminución del valor del AAEAC para DPPH en función del tiempo.

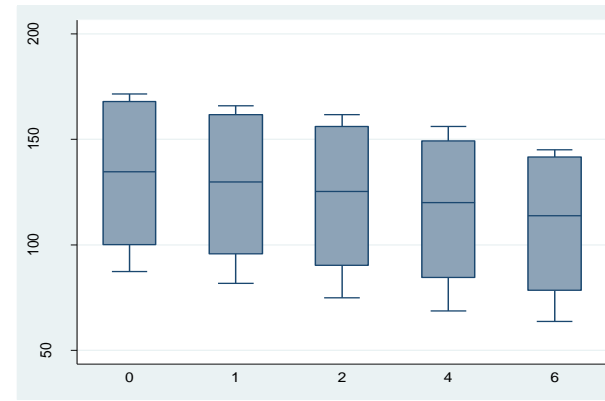


Figura 3.12 Disminución del valor del AAEAC para poder reductor en función del tiempo.



3.5.3 Regresión lineal

Con la regresión lineal realizada entre meses vs parámetro analizado, se determinó mediante el coeficiente, que todas presentan una relación negativa en función de los meses, es decir que, a medida que aumenta el tiempo los valores disminuyen y todos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$)

Secado por estufa

Parámetro	Coefficiente	95% IC	p
Fenoles totales	-0,05	(-0,058; -0,052)	< 0,001
Flavonoides	-0,01	(-0,017; -0,009)	< 0,001
DPPH	-0,74	(-1,046; -0,436)	< 0,001
Poder reductor	-3,9	(-5,128; -2,663)	< 0,001

Secado por liofilización

Fenoles totales	-0,06	(-0,066; -0,056)	< 0,001
Flavonoides	-0,02	(-0,022; -0,012)	< 0,001
DPPH	-0,52	(-0,578; -0,465)	< 0,001
Poder reductor	-3,7	(-6,286; -1,074)	0,006

Tabla 3.8 Regresión lineal para secado por estufa y liofilización.

3.5.4 Prueba de Scheffe (post-hoc ANOVA)

Con el fin de determinar que meses diferían de otros, se aplicó la prueba de Scheffe.

En el caso del método de secado por estufa, todos los parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas: fenoles totales ($p < 0,001$), flavonoides ($p < 0,001$), DPPH ($p < 0,002$) y poder reductor ($p < 0,001$). En el método de secado por liofilización, fenoles totales, flavonoides y DPPH presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), sin embargo en el caso de poder reductor no existió diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) por lo cual no se realizó la prueba de Scheffe.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Secado por estufa					Secado por liofilización				
Fenoles totales					Fenoles totales				
	0	1	2	4		0	1	2	4
1 mes	-0,904 0,001				1 mes	-0,094 0,001			
2 meses	-0,156 < 0,001	-0,066 0,001			2 meses	-0,172 < 0,001	-0,0784 0,001		
4 meses	-0,256 < 0,001	-0,166 < 0,001	-0,1 < 0,001		4 meses	-0,283 < 0,001	-0,189 < 0,001	-0,111 < 0,001	
6 meses	-0,349 < 0,001	-0,259 < 0,001	-0,193 < 0,001	-0,093 < 0,001	6 meses	-0,389 < 0,001	-0,295 < 0,001	-0,216 < 0,001	-0,106 < 0,001
Flavonoides					Flavonoides				
1 mes	-0,024 0,733				1 mes	-0,032 0,684			
2 meses	-0,046 0,054	-0,021 0,716			2 meses	-0,056 0,057	-0,024 0,782		
4 meses	-0,066 0,001	-0,042 0,09	-0,021 0,56		4 meses	-0,087 < 0,001	-0,055 0,067	-0,031 0,379	
6 meses	-0,088 < 0,001	-0,063 0,002	-0,042 0,019	-0,021 0,544	6 meses	-0,111 < 0,001	-0,079 0,001	-0,055 0,012	-0,024 0,632
DPPH					DPPH				
1 mes	-1,16 0,938				1 mes	-0,724 0,056			
2 meses	-2,182 0,443	-1,022 0,935			2 meses	-1,543 < 0,001	-0,819 0,004		
4 meses	-3,604 0,041	-2,444 0,323	-1,422 0,664		4 meses	-2,333 < 0,001	-1,609 < 0,001	-0,79 < 0,001	
6 meses	-4,683 0,002	-3,523 0,049	-2,501 0,122	-1,079 0,847	6 meses	-3,326 < 0,001	-2,602 < 0,001	-1,783 < 0,001	-0,993 < 0,001
Poder reductor					Poder reductor				
1 mes	-8,179 0,655								
2 meses	-13,619 0,066	-5,44 0,836							
4 meses	-19,387 0,002	-11,208 0,196	-5,768 0,657						
6 meses	-26,08 < 0,001	-17,901 0,005	-12,461 0,027	-6,694 0,515					

Tabla 3.9 Prueba de Scheffe.



3.5.5 Prueba t de Student de dos muestras pareadas de dos colas

La prueba t de student se realizó entre las dos poblaciones (secado por estufa y secado por liofilización) en los tiempos 0, 1, 2, 4 y 6 meses para los distintos parámetros analizados.

Para la realización de la prueba se planteó las siguientes hipótesis:

- **Hipótesis nula:** No existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos de secado
- **Hipótesis alternativa:** Existe diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos de secado.

Fenoles totales				
Tiempo	Grupo	$\bar{x} \pm \sigma$	95% IC	P
0	Estufa	0,65 ± 0,06	(0,624; 0,682)	< 0,001
	Liofilizado	0,77 ± 0,08	(0,735; 0,813)	
1	Estufa	0,56 ± 0,03	(0,547; 0,578)	< 0,001
	Liofilizado	0,68 ± 0,07	(0,648; 0,713)	
2	Estufa	0,50 ± 0,03	(0,486; 0,507)	< 0,001
	Liofilizado	0,60 ± 0,05	(0,584; 0,619)	
4	Estufa	0,40 ± 0,03	(0,386; 0,408)	< 0,001
	Liofilizado	0,49 ± 0,06	(0,471; 0,511)	
6	Estufa	0,30 ± 0,04	(0,291; 0,316)	< 0,001
	Liofilizado	0,39 ± 0,07	(0,363; 0,408)	
Flavonoides				
0	Estufa	0,46 ± 0,06	(0,431; 0,487)	< 0,001
	Liofilizado	0,63 ± 0,07	(0,595; 0,667)	
1	Estufa	0,44 ± 0,05	(0,409; 0,461)	< 0,001
	Liofilizado	0,60 ± 0,06	(0,568; 0,631)	
2	Estufa	0,41 ± 0,05	(0,398; 0,430)	< 0,001
	Liofilizado	0,58 ± 0,06	(0,555; 0,595)	
4	Estufa	0,39 ± 0,05	(0,376; 0,410)	< 0,001
	Liofilizado	0,54 ± 0,06	(0,523; 0,566)	
6	Estufa	0,37 ± 0,05	(0,354; 0,390)	< 0,001
	Liofilizado	0,52 ± 0,06	(0,450; 0,541)	



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DPPH				
0	Estufa	61,2 ± 3,2	(59,618; 62,779)	0,0017
	Liofilizado	63,8 ± 0,45	(63,559; 64,010)	
1	Estufa	60,0 ± 3,6	(58,250; 61,827)	0,0012
	Liofilizado	63,1 ± 0,54	(62,794; 63,328)	
2	Estufa	59,0 ± 3,4	(57,853; 60,180)	< 0,001
	Liofilizado	62,2 ± 0,71	(62,003; 62,480)	
4	Estufa	57,6 ± 4,0	(56,239; 59,951)	< 0,001
	Liofilizado	61,5 ± 0,81	(61,177; 61,727)	
6	Estufa	56,5 ± 4,6	(54,954; 58,077)	< 0,001
	Liofilizado	60,5 ± 0,76	(60,200; 60,717)	
Poder reductor				
0	Estufa	83,5 ± 18, 2	(74,461; 92,530)	< 0,001
	Liofilizado	132,9 ± 34,1	(115,977; 149,857)	
1	Estufa	75,3 ± 15,7	(67,516; 83,117)	< 0,001
	Liofilizado	127,4 ± 33,6	(110,675; 144,124)	
2	Estufa	69,9 ± 15,2	(64,723; 75,030)	< 0,001
	Liofilizado	122,4 ± 33,7	(110,985; 133,784)	
4	Estufa	64,1 ± 14,9	(59,075; 69,142)	< 0,001
	Liofilizado	116,5 ± 33,6	(105,164; 127,914)	
6	Estufa	57,4 ± 15,6	(52,131; 62,699)	< 0,001
	Liofilizado	109,4 ± 32,3	(98,484; 120, 358)	

Tabla 3.10 Resultados de la prueba t de Student de dos muestras pareadas de dos colas.

Dado que el valor de p es menor al nivel de significancia ($<0,05$), se rechaza la hipótesis nula, es decir que sí existen diferencias entre los dos métodos de secado, ya que en el método de secado por liofilización se obtuvo mayores valores que por el método de secado por estufa.

La disminución de los valores en el método de secado por estufa pudiera estar dado porque este método utiliza temperaturas moderadamente altas y tiempos prolongados de contacto por lo que deberían tenerse en cuenta la sensibilidad de los componentes de la planta que va a ser sometida al secado (Otazu Larrasoña, I. 2010), mientras que la liofilización presenta la ventaja de que no se utiliza altas temperaturas y es el método idóneo para secar compuestos termosensibles como es el caso de los polifenoles (Bermejo, 1999)



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Además se comprobó que la concentración de polifenoles está estrechamente relacionado con la capacidad antioxidante, ya que al evaluar la actividad antioxidante mediante las técnicas de DPPH y poder reductor se pudo observar una relación directa, es decir que cuando obteníamos mayores valores de polifenoles se obtenían también valores elevados de AAEC, parámetro utilizado como indicador de la capacidad antioxidante de los extractos evaluados. Estos resultados se relacionan con numerosos estudios en los cuales sus autores relacionan el contenido de polifenoles en diferentes plantas, con la actividad antioxidante que éstas llevan a cabo, es así que podemos destacar hallazgos importantes en estos estudios entre los que se encuentran:

Fuhrman et al (2001) sostienen que la capacidad antioxidante de los vinos blancos fue directamente proporcional a su contenido en polifenoles. Yen et al (2000) comprobaron que el poder reductor del anthrone y la alizarina (son polifenoles del tipo de las antraquinonas) aumentó con un aumento en la concentración de estos productos. Zheng y Wang (2001) comprobaron que los flavonoides, que contienen múltiples grupos hidroxilo, tienen mayor actividad antioxidante contra los grupos peroxilo, que los ácidos fenólicos. También establecieron una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de distintas hierbas culinarias y medicinales. Kähkönen et al (2001) determinaron la existencia de correlación estadísticamente significativa entre el contenido de flavonoles y la actividad antioxidante, así como entre el contenido de ácidos hidroxicinámicos y la actividad antioxidante.

Alma et al, 2003, trabajando sobre aceites esenciales de *Origanum syriacum*, determinaron que el poder reductor del aceite esencial de hojas de orégano aumentó a medida que la concentración de aceite empleada fue mayor. La actividad antioxidante, el poder reductor y la capacidad de capturar radicales dependieron de la concentración del aceite esencial, o sea del contenido de compuestos fenólicos presentes en el aceite esencial. Estos autores concluyeron



UNIVERSIDAD DE CUENCA

que el poder reductor y la capacidad de capturar radicales de una sustancia pueden ser indicadores de su actividad antioxidante.

Por ende podemos decir que el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador importante de su potencial actividad antioxidante, aunque otros autores sostienen que no siempre existe una correlación lineal entre la actividad antioxidante total y el poder reductor (Paladino, 2008) (Zavaleta , Muñoz, Blanco , Alvarado Ortiz, & Loja, 2005)

Las propiedades antiinflamatorias de la carne humana, planta que crece en la zona de los andes, fueron comprobadas científicamente por Edwin Enciso Roca, en su tesis "Actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides extraídos de las hojas de *Jungia rugosa*, "matico de puna". En mencionada investigación de aproximadamente dos años, su autor detectó la presencia de flavonoides en el extracto obtenido de las hojas de esta planta. El Dr. Edwin Enciso dijo: "Los flavonoides tienen por característica ser antimicrobianos, antivirales, anti ulcerosos, antioxidantes, anti hepatotóxicos y antihipertensivos". En su investigación se realizó un estudio en ratas a las que se les indujo una inflamación según los métodos de "Edema subplantar inducida por carragenina", el método de la "Bolsa de aire en ratas" y la determinación de interleucina 1, interleucina 6 y proteína C reactiva, pudo comprobar las propiedades antiinflamatorias de la planta.

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Enciso & Arroyo, 2011).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Nuestro estudio se basó en la valoración comparativa de dos métodos de secado de *Jungia rugosa*, en la cual se conservó las mismas condiciones de tratamiento post cosecha para la posterior cuantificación de fenoles totales y flavonoides y de la evaluación de su actividad antioxidante mediante las técnicas de DPPH y poder reductor. Los resultados encontrados en ambos métodos de secado fueron analizados y se concluyó que:

- El análisis estadístico confirma que los dos métodos de secado son diferentes y que el método de secado por liofilización ofrece mayores ventajas, debido a que la concentración de los metabolitos (fenoles totales y flavonoides) y la evaluación de la actividad antioxidante mediante el AAEAC, resultó ser mayor en las plantas secadas por liofilización, debido a que conserva mejor los compuestos termolábiles, lo cual no es posible en el secado por estufa.
- La diferencia de los valores en los extractos sometidos a estufa se debe a que los compuestos termolábiles como los flavonoides se vieron alterados debido al uso de altas temperaturas.
- El inconveniente del secado por liofilización es el alto costo de sus equipos e instalaciones, además de un elevado gasto energético, sin embargo resulta útil cuando se pretende secar drogas vegetales que contengan compuestos termolábiles de alto interés farmacológico.
- Además de los resultados obtenidos se concluye que a mayor tiempo de almacenamiento de los extractos, las concentraciones de los metabolitos disminuyen al igual que su capacidad antioxidante, por lo tanto la variación en la concentración de estos compuestos puede ser utilizada como indicador de la estabilidad de estos extractos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

- Evaluar parámetros que influyan en el método de secado por liofilización, como por ejemplo, tamaño de las partes de la droga vegetal a desecar, tiempo exacto para obtener una droga vegetal completamente seca.
- Evaluar cómo influye el tamaño de la droga vegetal a desecar en el rendimiento de extractos.



BIBLIOGRAFÍA

- Abril Novillo, A. S., & Calle López, J. P. (2012). *Validación de la metodología para el análisis de fracciones de extractos vegetales con actividad antibacteriana*. Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Abril, N., Bárcena, J. A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., . . . Túnéz, I. (2010). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Recuperado el 30 de Septiembre de 2016, de http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf
- Acosta de la Luz, L. L. (2006). *La producción agrícola de Plantas Medicinales en Cuba*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2016, de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-011.html>
- Anusic, N. (2011). Identificación y cuantificación de polifenoles en yerba mate y brebajes. Buenos Aires, Argentina.
- Astudillo Machuca, A. (2011). *Manual de prácticas Farmacognosia y Fitoquímica*. Cuenca.
- Ayala A., A., Serna C., L., & Mosquera V., E. (Mayo-Agosto de 2010). Liofilización de Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Vitae*, 17(2).
- Bagué, A., & Álvarez, N. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. España: Editorial Club Universitario.
- Banchero, L., Carballo, S., & Telesca, J. (2008). *Manual de secado solar de especies medicinales y aromáticas para predios familiares*. (U. d. INIA, Ed.) Montevideo, Uruguay: INIA - DIGEGRA - MGAP.
- Bermejo, M. (1999). *Liofilización*. Universidad de Valencia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Valencia.
- Bravo, M., & Jiménez, G. (2011). *Estimación del periodo de conservación de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de*



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- compuestos fenólicos*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca.
- Cajas, P. (2012). *Determinación de la concentración de antioxidantes en cinco genotipos de fréjol rojo crudo y procesado*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Campoverde L., J. L., & Verdugo P., M. (2008). *Determinación del efecto cicatrizante de las hojas de carne humana (Jungia cf. rugosa)*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca.
- Castro Restrepo, D., Díaz García, J. J., Serna Betancur, R., Martínez Tobón, M. D., Urrea, P. A., Muñoz Durango, K., & Osorio Durango, E. J. (2013). *Cultivo y producción de plantas aromáticas y medicinales* (2da. Edición ed.). Rionegro: Universidad Católica del Oriente.
- Corrales, L., & Muñoz, M. (Julio-Diciembre de 2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., & Cedrón, J. (Enero-Marzo de 2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, LXXIX(1).
- Cusco Vásquez, C. (2009). *Determinación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de la pulpa del fruto Mauritia flexuosa* L. "aguaje" procedente de Tarapoto San Martín y su efecto sobre el nivel de estradiol en ratas hembras jóvenes normales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima.
- De la Torre, L., Alarcón S., D., Kvist, L., & Salazar Lecaro, J. (2008). Usos Medicinales de las Plantas. En L. De la Torre, H. Navarrete, P. Muriel M, M. J. Macía, & H. Balslev, *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (págs. 105 - 114). Quito.
- Debenedetti, S. (2011). Componentes de las drogas vegetales. *Revista Dosis*(2).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Del Cid Vásquez, H. E. (2004). *Extracción, a nivel del laboratorio, de los pigmentos colorantes del tipo Flavonoides contenidos en la Flor del Subín (Acacia farnesiana L. willd) proveniente de un bosque silvestre guatemalteco*. Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. T. (Septiembre-Diciembre de 2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguas Calientes*(50), 10-15.
- Devore, J. L. (2008). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias* (Séptima ed.). Estados Unidos: Cengage Learning.
- Dorado Martínez, C., Rugerio Vargas, C., & Rivas Arancibia, S. (Noviembre-Diciembre de 2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 46(6), 229-235.
- Elejalde Guerra, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), 326-335.
- Enciso , E., & Arroyo, J. (2011). Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de Jungia rugosa Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(4), 231 - 237.
- Fauli i Trillo, C. (2000). *Tratado de farmacia galénica. Farmacia 2000*. Madrid: Luzán S.A. Ediciones.
- Fuentes Fiallo, V. R., Lemes Hernández, C. M., Rodríguez Ferradá, C. A., & Germosén Robineau, L. (2000). *Manual de Cultivo y Conservación de Plantas Medicinales* (Vol. II). Centenario. S.A.
- Gil, Á., & Ruiz, M. (2010). *Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos* (Segunda ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 23(6), 80 - 84.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- González Jiménez, F. E. (2010). *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia hispanica L.), mediante electroforesis capilar*. Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Departamento de graduados e Investigación en Alimentos, México.
- Gu, L., Wu, T., & Wang, Z. (2009). TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. *LWT - Food science and technology*, 42, 131 - 136 .
- Guarnizo, A., & Martínez, P. (2009). *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. Armenia, Quindío, Colombia: Ediciones Elizcom.
- Iglesias Neira, J. (2009). *Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca*. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, España.
- Leong, L., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, 69 -75.
- Martín , H., & Woodcock, D. (1983). *The Scientific Principles of Crop Protection* (7ma ed.). London.
- Martínez, J. (2007). *Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de Heliocarpus terebinthinaceus*. Huajuapán de León, Oaxaca: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Mercader Ros, M. T. (2010). *Encapsulación de flavonoles en ciclodextrinas. Efecto en su actividad antioxidante*. Universidad Católica San Antonio, Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Murcia.
- Moncada Jiménez, J. (2005). *Estadística para ciencias del movimiento humano*. San José, Costa Rica: de la Universidad de Costa Rica.
- Muñoz, J., & Sarmiento, D. (2010). *Valoración comparativa de dos métodos de secado de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y*



UNIVERSIDAD DE CUENCA

cumarinas. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca.

- Muñoz, O., Montes, M., & Wilkomirsky, T. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile. Química y farmacología*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- OMS. (2003). *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales*. Recuperado el 21 de Septiembre de 2016, de <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>
- Osorio, E. (2009). *Aspectos básicos de farmacognosia*. Antioquía: Universidad de Antioquía.
- Otazu Larrasoaña, I. (2010). *Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la calidad de las hojas de Cymbopogon Citratus*. Universidad Pública de Navarra, Universidad Federal de Viçosa, Departamento de Ingeniería Agrícola, Minas Gerais, Brasil.
- Paladino, S. C. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la Vid (Vitis vinifera L.)*. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis, Facultad de Ciencias Agrarias, Cuyo.
- Perales, C. (2008). Aproximación a la Fitoterapia. *Granada Farmacéutica*(15), 21 - 23.
- Porras Loaiza, A. P., & López Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121 - 134.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria (NUHOEQ)*, 27(1), 76 - 89.
- Rubio Taipe, P. (2013). *Diseño y elaboración de un lipogel antiinflamatorio de Baccharis teindalensis Kunt. (Chilca)*. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- Sábado, J. T. (2009). *Fundamentos de Bioestadística y Análisis de datos para enfermería* (Primera ed.). Barcelona, España: Servei de Publicacions.
- Serra, P., Ponce, M., López, L., González, L., & García, X. (2014). T de Student [Grabado por U. d. Valencia]. España. Obtenido de <https://www.youtube.com/watch?v=lyhtl2eoV-8>
- Serrano Gallego, R. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. España: Publicaciones de la Universidad de Jaume.
- Solís Bowen, S. (2014). *Determinación de la actividad antimicrobiana de Jungia rugosa Less en extractos de n - hexano y diclorometano*. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, Cuenca.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. I). España: Publicaciones de la Universidad de Jaume.
- Teolinda Carrillo, R., & Moreno, G. (2006). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 48(2), 21 - 28.
- Venegas Casanova, E. A. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV - Scientia*, 4(2), 161 - 175.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto"*, 31(2), 126-133.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis* (Second ed.). Munich, Alemania: Springer.
- Zavaleta, J., Muñoz, A. M., Blanco, T., Alvarado Ortiz, C., & Loja, B. (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revistas Académicas*, 5(2).



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ANEXOS

Anexo A: Marcha Fitoquímica para Cromatografía de Capa Fina.

Marcha fitoquímica por TLC						
Fase móvil	Metabolito a investigar	Patrones	Código del extracto (5mg/ml)	Revelador	Placas	Dimensiones de las placas (cm)
AE-MetOH-Agua (100:13,5:10)	Compuestos fenólicos	Quercetina 1mg/ml	Criollo 1E MetOH	DPPH	1 placa soporte vidrio	12x10
		Quercetin-3 glucorónido 1mg/ml	Criollo 2E MetOH			
		Umbeliferona 0,25mg/ml	Criollo 3E MetOH			
		Ácido cafeico 0,5mg/ml	Criollo 4E MetOH			
AE-Ác.fórmico- Ác.acético-Agua (100:11:11:26)	Flavonoides	Quercetina 1mg/ml	Criollo 5E MetOH	Productos Naturales: PN1 (difenilboryl oxietilamina) y PN2 (polietilenglicol)	1 placa soporte vidrio	12x10
		Quercetin-3 glucorónido 1mg/ml	Criollo 6E MetOH			
		Umbeliferona 0,25mg/ml	Criollo 1L MetOH			
		Ácido cafeico 0,5mg/ml	Criollo 2L MetOH			
			Criollo 3L MetOH			
			Criollo 4L MetOH			
			Criollo 5L MetOH			
			Criollo 6L MetOH			



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo B: Preparación de reveladores para TLC

1. Preparación de la solución reveladora productos naturales.

Este revelador está constituido por dos soluciones: A y B.

A. Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina.

Para preparar esta solución se procede a pesar 1g de difenilboriloxietilamina y se afora con metanol analítico en un balón de 100ml. Se homogeniza completamente y se transfiere a un frasco ámbar debidamente etiquetado.

B. Solución etanólica al 5% de polietilenglicol – 400 (PEG).

Esta solución se prepara pesando 5g de PEG y llevando a un volumen de 100ml con etanol absoluto en un balón de aforo, se homogeniza adecuadamente y para su almacenamiento se coloca en un frasco ámbar correctamente etiquetado.

Para el revelado se rocía primero la solución A y luego la B (Wagner & Blatt, 1996).

2. Preparación de la solución reveladora DPPH 2,5 milimolar (mM)

En este caso se realiza los cálculos para conocer la cantidad exacta a pesar para obtener 50ml de una solución 2,5 mM, entonces tenemos:

Peso molecular DPPH: 394.32g/mol 1M =
1000mM

394.32g	1M	1000ml
----------------	-----------	---------------

394.32g 1000mM 1000ml



UNIVERSIDAD DE CUENCA

$$\begin{array}{ccc} x = ? & 2.5\text{mM} & 1000\text{ml} \\ & X = 0.9858\text{g} & \end{array}$$

$$\begin{array}{ccc} \mathbf{0.9858\text{g}} & \mathbf{2.5\text{mM}} & \mathbf{1000\text{ml}} \\ x = ? & 2.5\text{mM} & 50\text{ml} \end{array}$$

$$\mathbf{x = 0.04929\text{g} = 49.29\text{mg}}$$

Pesar 49.29mg y aforar a 50 ml con metanol analítico, homogenizar y utilizar para el revelado (Gu, Wu, & Wang, 2009).

* Este revelador debe ser preparado en el mismo momento en el que se va a utilizar, no se puede guardar.



Anexo C: Preparación del reactivo de Folin Ciocalteau

Disolver 10g de tungstato de sodio y 2,5g de molibdato de sodio en 70 ml de agua. Añadir 5 ml de ácido fosfórico al 85% y 10 ml de HCl concentrado. Dejar en reflujo durante 10 horas. Transcurrido este tiempo, retirar, esperar que se enfríe y agregar 15g de sulfato de litio, 5 ml de agua y una gota de bromo. Colocar nuevamente en reflujo durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a 100mL con agua destilada. (Bravo & Jiménez, 2011)



Figura 3.13 Reactivo de Folin Ciocalteau en reflujo.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo D: Preparación de buffer de fosfatos 0.2 M pH 6.6

El buffer de fosfatos consta de dos soluciones.

Preparación de la solución A: solución de fosfato de sodio monobásico dihidratado 0.2 M

- En un vaso de precipitación se pesó 15.6 g del reactivo.
- Se disolvió con la ayuda de una varilla y la adición de pequeñas alícuotas de agua destilada.
- Se aforó en un balón de 500 ml homogenizando la solución con 20 – 30 movimientos de inversión.
- Se etiquetó correctamente y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Preparación de la solución B: solución de fosfato de sodio dibásico heptahidratado 0.2 M

- Se pesó 26.8 g del reactivo y se disolvió con agua destilada hasta disolución completa.
- Se aforó en un balón de 500 ml homogenizando la solución con 20 – 30 movimientos de inversión.
- Se etiquetó correctamente y se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Con la ayuda de una probeta se tomó 62.5 ml de la solución A y se mezcló con 37.5 ml de la solución B para obtener un pH de 6.6. Posteriormente se transfirió la solución final a un frasco ámbar correctamente etiquetado y protegido de la luz.



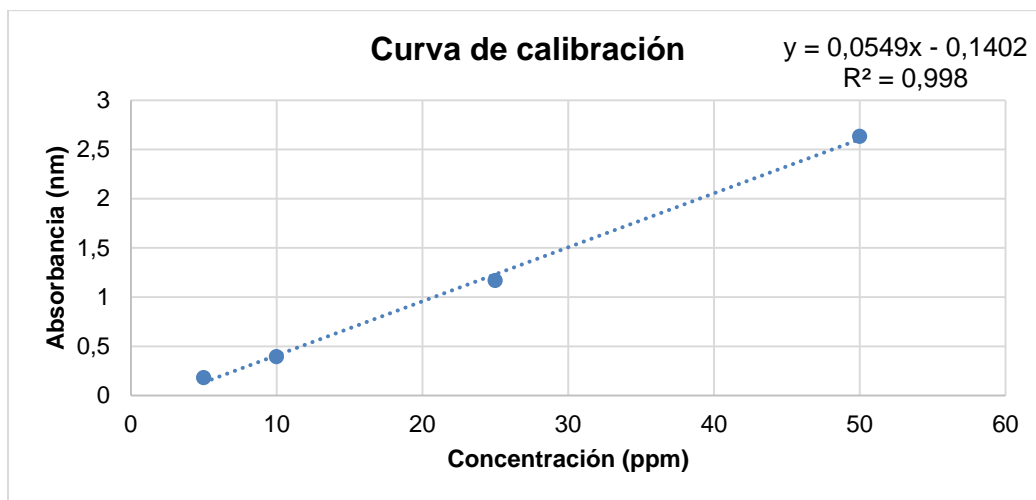
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo E: Curvas de calibración para fenoles totales

1. Determinación en el t=0

Curva A

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,186	0,402	1,180	2,647
Abs 2	0,182	0,394	1,168	2,667
Abs 3	0,179	0,385	1,158	2,585
Promedio	0,182	0,394	1,169	2,633
Desviación estándar	0,0029	0,0069	0,0090	0,0349
%CV	1,5726	1,7640	0,7696	1,3258



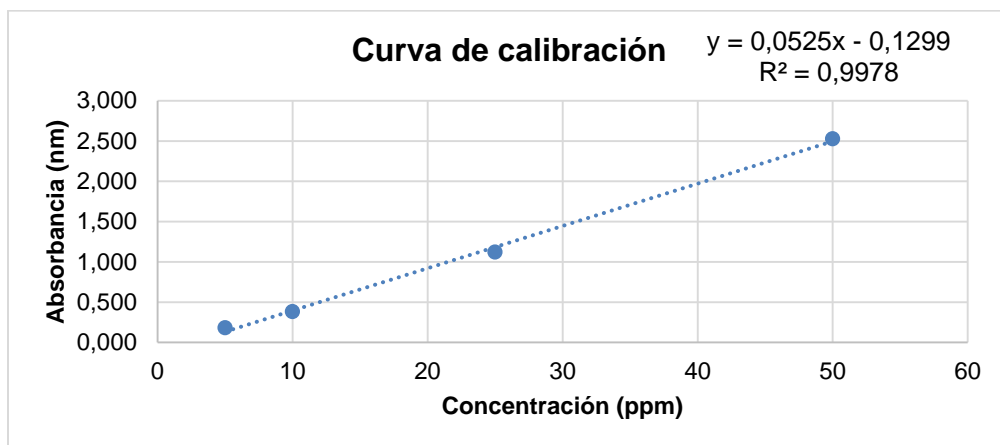
Curva B

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,182	0,382	1,121	2,528
Abs 2	0,180	0,381	1,120	2,526
Abs 3	0,180	0,380	1,120	2,526
Promedio	0,181	0,381	1,120	2,527



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Desviación estándar	0,0009	0,0008	0,0005	0,0009
%CV	0,5219	0,2143	0,0421	0,0373



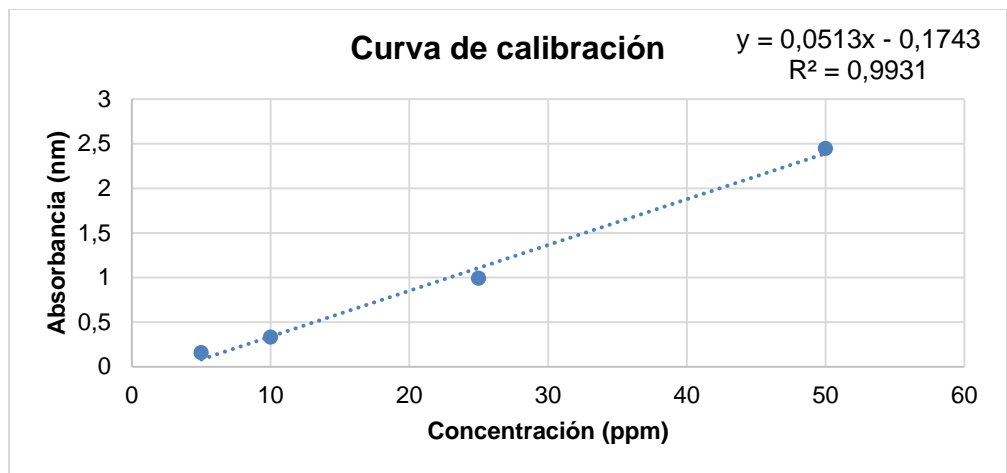
2. Determinación en el t=1

Curva A

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,156	0,330	0,990	2,446
Abs 2	0,156	0,329	0,990	2,443
Abs 3	0,157	0,330	0,990	2,446
Promedio	0,156	0,330	0,990	2,445
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0000	0,0014
%CV	0,3015	0,1430	0,0000	0,0578



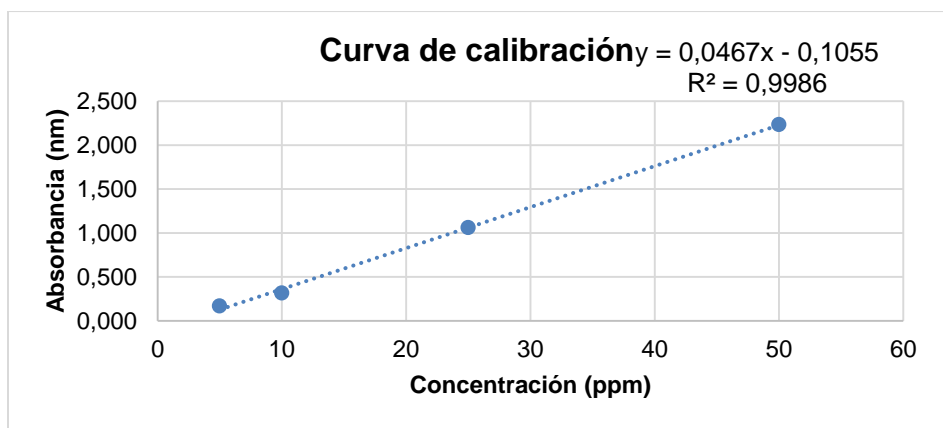
UNIVERSIDAD DE CUENCA



3. Determinación en el t=2

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,169	0,314	1,061	2,234
Abs 2	0,170	0,316	1,061	2,232
Abs 3	0,169	0,316	1,061	2,234
Promedio	0,169	0,315	1,061	2,233
Desviación estándar	0,0005	0,0009	0,0000	0,0009
%CV	0,2784	0,2990	0,0000	0,0422



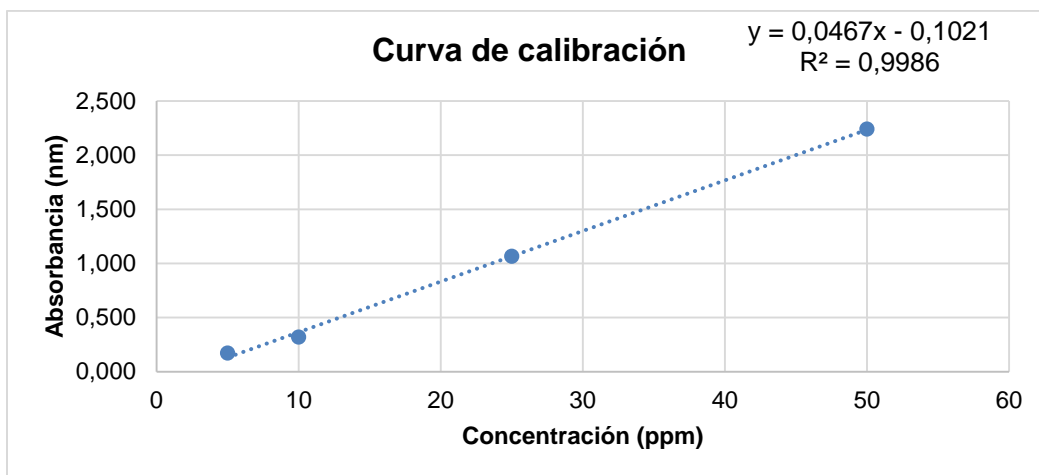
Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4
----------	----	----	----	----



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,173	0,320	1,065	2,239
Abs 2	0,172	0,320	1,066	2,240
Abs 3	0,172	0,321	1,066	2,240
Promedio	0,172	0,320	1,066	2,240
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
%CV	0,2735	0,1472	0,0442	0,0210



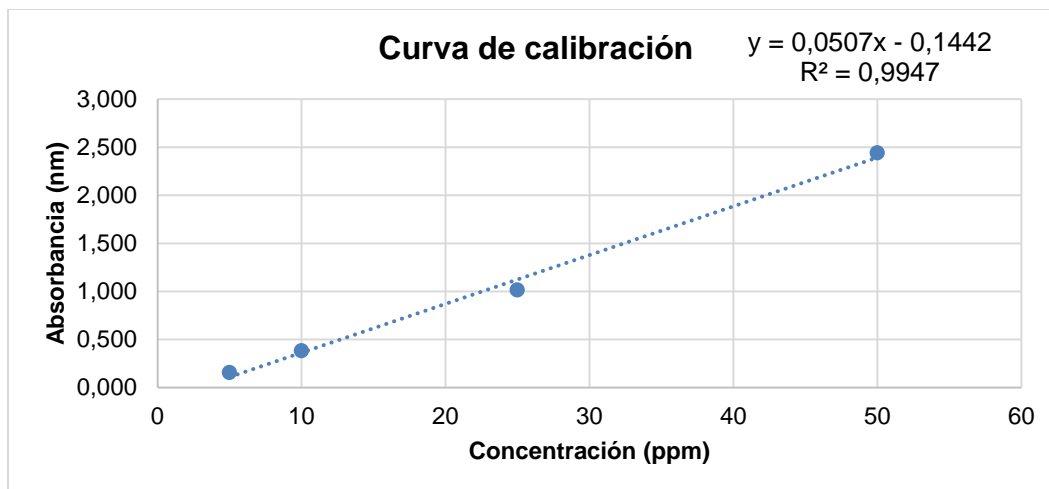
4. Determinación en el t=4

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,155	0,382	1,015	2,441
Abs 2	0,154	0,380	1,014	2,440
Abs 3	0,155	0,380	1,014	2,440
Promedio	0,155	0,381	1,014	2,440
Desviación estándar	0,0005	0,0009	0,0005	0,0005
%CV	0,3048	0,2477	0,0465	0,0193

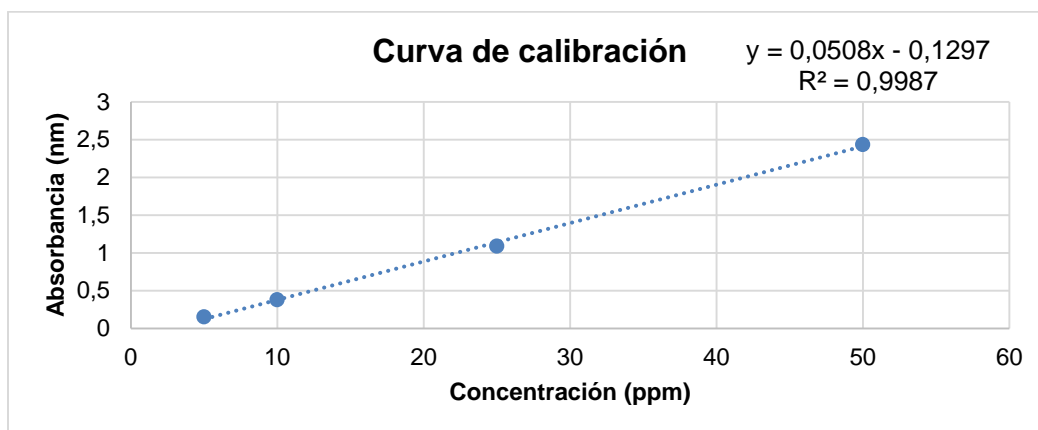


UNIVERSIDAD DE CUENCA



Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,151	0,378	1,090	2,436
Abs 2	0,154	0,379	1,088	2,434
Abs 3	0,155	0,379	1,090	2,434
Promedio	0,153	0,379	1,089	2,435
Desviación estándar	0,0017	0,0005	0,0009	0,0009
%CV	1,1085	0,1245	0,0865	0,0387



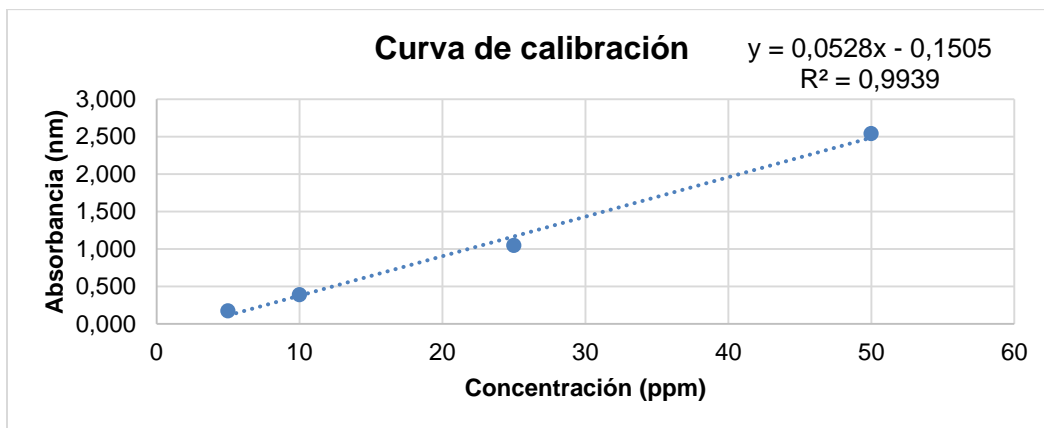
5. Determinación para el t=5



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,170	0,389	1,060	2,541
Abs 2	0,170	0,388	1,040	2,540
Abs 3	0,172	0,388	1,040	2,540
Promedio	0,171	0,388	1,047	2,540
Desviación estándar	0,0009	0,0005	0,0094	0,0005
%CV	0,5524	0,1214	0,9008	0,0186

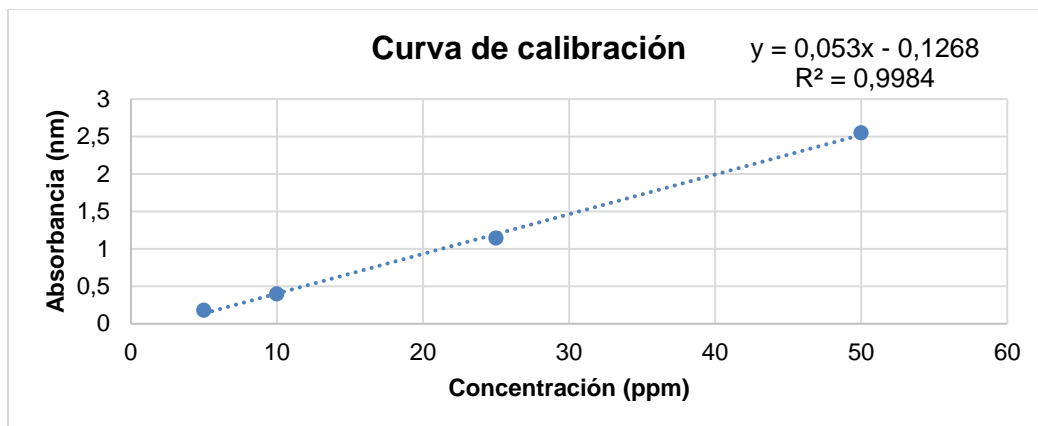


Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4
Concentración (ppm)	5	10	25	50
Abs 1	0,176	0,394	1,140	2,549
Abs 2	0,178	0,396	1,141	2,550
Abs 3	0,176	0,396	1,141	2,549
Promedio	0,177	0,395	1,141	2,549
Desviación estándar	0,0009	0,0009	0,0005	0,0005
%CV	0,5337	0,2385	0,0413	0,0185



UNIVERSIDAD DE CUENCA





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo F: Cuantificación de fenoles totales

Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			Concentración ppm			x	σ	Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			Concentración ppm			x	σ
		A1	A2	A3	1	2	3					A1	A2	A3	1	2	3		
CRIOLLO 1E	0	0,030	0,035	0,033	0,634	0,740	0,698	0,691	0,043	CRIOLLO 1L	0	0,038	0,040	0,042	0,803	0,846	0,888	0,846	0,035
	1	0,028	0,028	0,027	0,592	0,592	0,571	0,585	0,010		1	0,036	0,037	0,037	0,761	0,782	0,782	0,775	0,010
	2	0,026	0,025	0,025	0,550	0,529	0,529	0,536	0,010		2	0,034	0,033	0,034	0,719	0,698	0,719	0,712	0,010
		0,025	0,025	0,026	0,529	0,529	0,550	0,536	0,010			0,034	0,033	0,033	0,719	0,698	0,698	0,705	0,010
	4	0,021	0,021	0,020	0,444	0,444	0,423	0,437	0,010		4	0,029	0,029	0,028	0,613	0,613	0,592	0,606	0,010
		0,020	0,020	0,021	0,423	0,423	0,444	0,430	0,010			0,028	0,028	0,029	0,592	0,592	0,613	0,599	0,010
6	0,017	0,017	0,018	0,359	0,359	0,381	0,367	0,010	6	0,024	0,025	0,025	0,507	0,529	0,529	0,522	0,010		
	0,016	0,017	0,017	0,338	0,359	0,359	0,352	0,010		0,025	0,024	0,024	0,529	0,507	0,507	0,514	0,010		
CRIOLLO 2E	0	0,029	0,032	0,028	0,613	0,677	0,592	0,627	0,036	CRIOLLO 2L	0	0,035	0,037	0,038	0,740	0,782	0,803	0,775	0,026
	1	0,025	0,026	0,026	0,529	0,550	0,550	0,543	0,010		1	0,031	0,033	0,031	0,655	0,698	0,655	0,670	0,020
	2	0,023	0,023	0,023	0,486	0,486	0,486	0,486	0,000		2	0,028	0,027	0,027	0,592	0,571	0,571	0,578	0,010
		0,024	0,023	0,024	0,507	0,486	0,507	0,500	0,010			0,027	0,028	0,028	0,571	0,592	0,592	0,585	0,010
	4	0,020	0,021	0,020	0,423	0,444	0,423	0,430	0,010		4	0,023	0,024	0,024	0,486	0,507	0,507	0,500	0,010
		0,019	0,019	0,020	0,402	0,402	0,423	0,409	0,010			0,023	0,024	0,023	0,486	0,507	0,486	0,493	0,010
6	0,015	0,016	0,016	0,317	0,338	0,338	0,331	0,010	6	0,020	0,019	0,019	0,423	0,402	0,402	0,409	0,010		
	0,014	0,016	0,015	0,296	0,338	0,317	0,317	0,017		0,019	0,020	0,019	0,402	0,423	0,402	0,409	0,010		
CRIOLLO 3E	0	0,038	0,032	0,035	0,803	0,677	0,740	0,740	0,052	CRIOLLO 3L	0	0,040	0,045	0,041	0,846	0,951	0,867	0,888	0,046
	1	0,028	0,028	0,029	0,592	0,592	0,613	0,599	0,010		1	0,036	0,035	0,036	0,761	0,740	0,761	0,754	0,010
	2	0,025	0,025	0,024	0,529	0,529	0,507	0,522	0,010		2	0,028	0,028	0,028	0,592	0,592	0,592	0,592	0,000
		0,025	0,024	0,025	0,529	0,507	0,529	0,522	0,010			0,029	0,028	0,029	0,613	0,592	0,613	0,606	0,010
	4	0,020	0,019	0,019	0,423	0,402	0,402	0,409	0,010		4	0,024	0,023	0,023	0,507	0,486	0,486	0,493	0,010
		0,019	0,019	0,020	0,402	0,402	0,423	0,409	0,010			0,023	0,024	0,024	0,486	0,507	0,507	0,500	0,010
6	0,015	0,014	0,014	0,317	0,296	0,296	0,303	0,010	6	0,018	0,018	0,017	0,381	0,381	0,359	0,374	0,010		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

		0,014	0,015	0,014	0,296	0,317	0,296	0,303	0,010			0,017	0,018	0,018	0,359	0,381	0,381	0,374	0,010
CRIOLLO 4E	0	0,028	0,030	0,028	0,592	0,634	0,592	0,606	0,020	CRIOLLO 4L	0	0,034	0,035	0,035	0,719	0,740	0,740	0,733	0,010
	1	0,024	0,024	0,025	0,507	0,507	0,529	0,514	0,010		1	0,029	0,030	0,029	0,613	0,634	0,613	0,620	0,010
	2	0,020	0,021	0,021	0,423	0,444	0,444	0,437	0,010		2	0,026	0,026	0,027	0,550	0,550	0,571	0,557	0,010
		0,021	0,022	0,021	0,444	0,465	0,444	0,451	0,010			0,026	0,027	0,026	0,550	0,571	0,550	0,557	0,010
	4	0,017	0,016	0,016	0,359	0,338	0,338	0,345	0,010		4	0,021	0,021	0,020	0,444	0,444	0,423	0,437	0,010
		0,016	0,017	0,016	0,338	0,359	0,338	0,345	0,010			0,020	0,020	0,021	0,423	0,423	0,444	0,430	0,010
6	0,012	0,012	0,012	0,254	0,254	0,254	0,254	0,000	6	0,016	0,015	0,015	0,338	0,317	0,317	0,324	0,010		
	0,012	0,011	0,012	0,254	0,233	0,254	0,247	0,010		0,016	0,016	0,016	0,338	0,338	0,338	0,338	0,000		
CRIOLLO 5E	0	0,030	0,030	0,029	0,634	0,634	0,613	0,627	0,010	CRIOLLO 5L	0	0,032	0,033	0,033	0,677	0,698	0,698	0,691	0,010
	1	0,027	0,028	0,027	0,571	0,592	0,571	0,578	0,010		1	0,030	0,030	0,031	0,634	0,634	0,655	0,641	0,010
	2	0,024	0,023	0,023	0,507	0,486	0,486	0,493	0,010		2	0,027	0,027	0,028	0,571	0,571	0,592	0,578	0,010
		0,023	0,024	0,024	0,486	0,507	0,507	0,500	0,010			0,027	0,028	0,027	0,571	0,592	0,571	0,578	0,010
	4	0,017	0,018	0,018	0,359	0,381	0,381	0,374	0,010		4	0,022	0,022	0,023	0,465	0,465	0,486	0,472	0,010
		0,018	0,017	0,018	0,381	0,359	0,381	0,374	0,010			0,019	0,023	0,023	0,402	0,486	0,486	0,458	0,040
6	0,014	0,013	0,013	0,296	0,275	0,275	0,282	0,010	6	0,015	0,015	0,015	0,317	0,317	0,317	0,317	0,000		
	0,013	0,014	0,014	0,275	0,296	0,296	0,289	0,010		0,015	0,016	0,016	0,317	0,338	0,338	0,331	0,010		
CRIOLLO 6E	0	0,030	0,030	0,029	0,634	0,634	0,613	0,627	2,696	CRIOLLO 6L	0	0,034	0,034	0,033	0,719	0,719	0,698	0,712	0,010
	1	0,027	0,026	0,026	0,571	0,550	0,550	0,557	0,010		1	0,029	0,029	0,030	0,613	0,613	0,634	0,620	0,010
	2	0,023	0,023	0,023	0,486	0,486	0,486	0,486	0,000		2	0,026	0,026	0,026	0,550	0,550	0,550	0,550	0,000
		0,024	0,023	0,023	0,507	0,486	0,486	0,493	0,010			0,027	0,026	0,027	0,571	0,550	0,571	0,564	0,010
	4	0,020	0,020	0,018	0,423	0,423	0,381	0,409	0,020		4	0,020	0,022	0,022	0,423	0,465	0,465	0,451	0,020
		0,018	0,020	0,018	0,381	0,423	0,381	0,395	0,020			0,021	0,022	0,021	0,444	0,465	0,444	0,451	0,010
6	0,014	0,014	0,014	0,296	0,296	0,296	0,296	0,000	6	0,016	0,016	0,015	0,338	0,338	0,317	0,331	0,010		
	0,015	0,013	0,015	0,317	0,275	0,317	0,303	0,020		0,016	0,017	0,016	0,338	0,359	0,338	0,345	0,010		



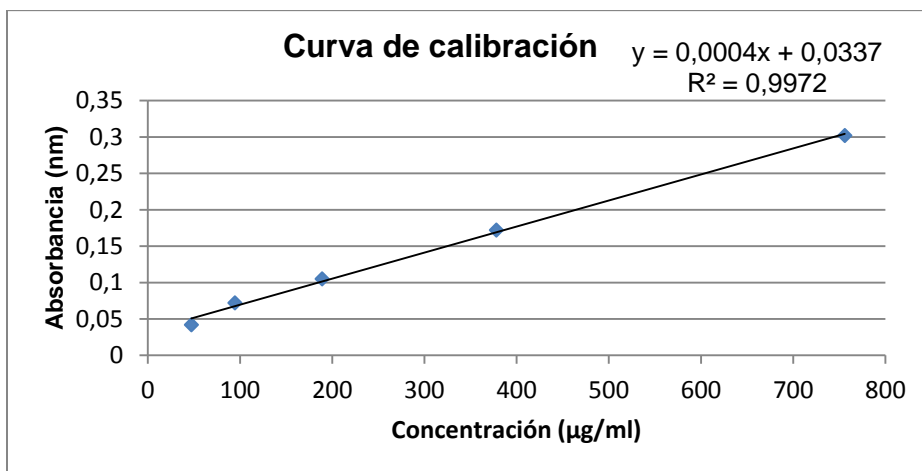
UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo G: Curva de calibración para la determinación de flavonoides

1. Determinación en el t=0

Curva A

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,042	0,070	0,105	0,169	0,301
Abs 2	0,040	0,074	0,101	0,172	0,305
Abs 3	0,045	0,072	0,108	0,175	0,299
Promedio	0,042	0,072	0,105	0,172	0,302
Desviación estándar	0,0021	0,0016	0,0029	0,0024	0,0025
%CV	4,8539	2,2680	2,7396	1,4241	0,8269

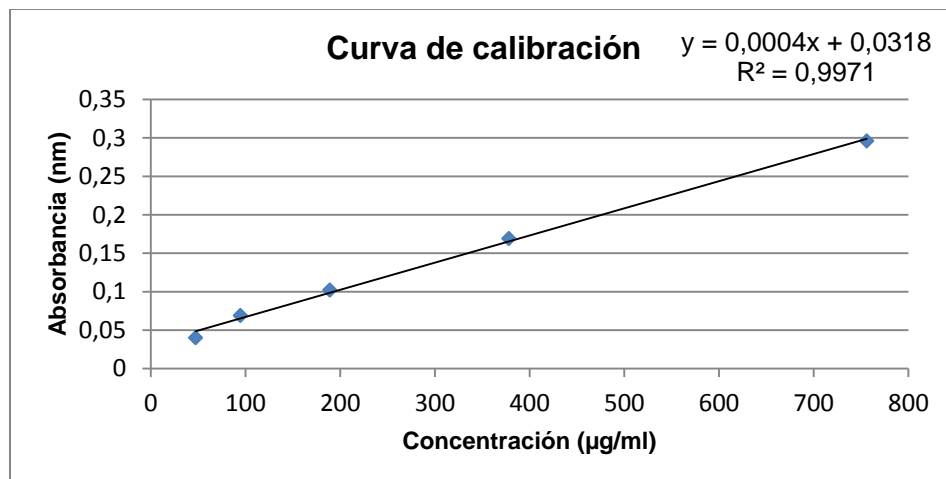


Curva B

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,039	0,068	0,102	0,168	0,296
Abs 2	0,041	0,069	0,103	0,169	0,297
Abs 3	0,041	0,069	0,102	0,169	0,296
Promedio	0,040	0,069	0,102	0,169	0,296
Desviación estándar	0,0009	0,0005	0,0005	0,0005	0,0005
%CV	2,3375	0,6865	0,4607	0,2795	0,1591

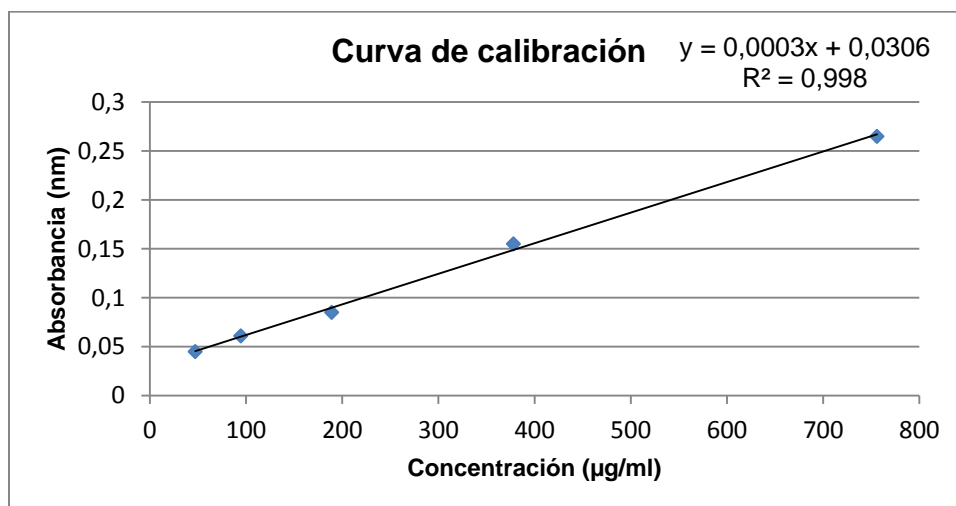


UNIVERSIDAD DE CUENCA



2. Determinación en el t=1

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,045	0,060	0,086	0,154	0,266
Abs 2	0,044	0,061	0,085	0,156	0,264
Abs 3	0,045	0,061	0,084	0,154	0,265
Promedio	0,045	0,061	0,085	0,155	0,265
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0008	0,0009	0,0008
%CV	1,0554	0,7770	0,9606	0,6096	0,3081



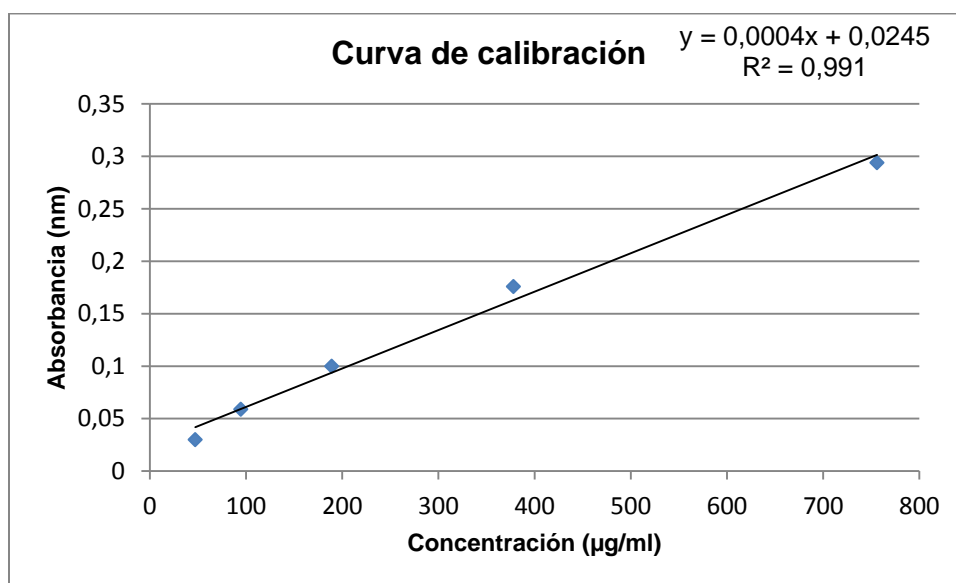


UNIVERSIDAD DE CUENCA

3. Determinación en el t=2

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,030	0,059	0,099	0,176	0,295
Abs 2	0,031	0,058	0,100	0,175	0,293
Abs 3	0,028	0,060	0,101	0,177	0,294
Promedio	0,030	0,059	0,100	0,176	0,294
Desviación estándar	0,0012	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008
%CV	4,2041	1,3839	0,8165	0,4639	0,2777

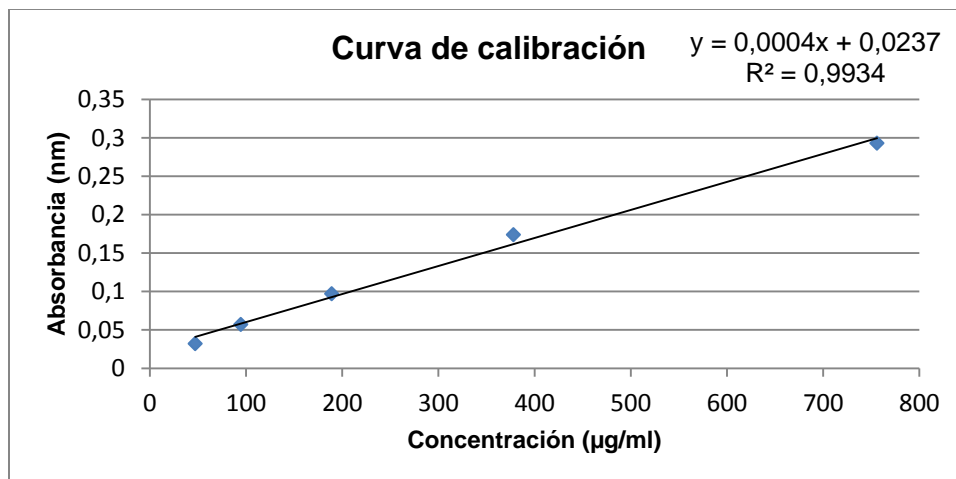


Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,032	0,057	0,096	0,174	0,293
Abs 2	0,032	0,057	0,098	0,175	0,293
Abs 3	0,033	0,058	0,098	0,174	0,292
Promedio	0,032	0,057	0,097	0,174	0,293
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0009	0,0005	0,0005
%CV	1,4580	0,8222	0,9686	0,2704	0,1611



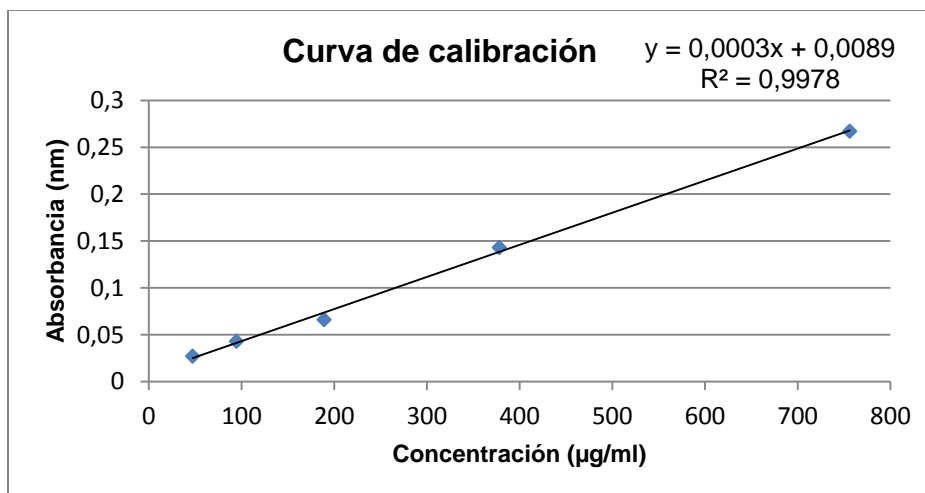
UNIVERSIDAD DE CUENCA



4. Determinación en el t=4

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,027	0,042	0,065	0,141	0,269
Abs 2	0,028	0,045	0,067	0,143	0,266
Abs 3	0,027	0,041	0,066	0,144	0,267
Promedio	0,027	0,043	0,066	0,143	0,267
Desviación estándar	0,0005	0,0017	0,0008	0,0012	0,0012
%CV	1,7247	3,9836	1,2371	0,8742	0,4665

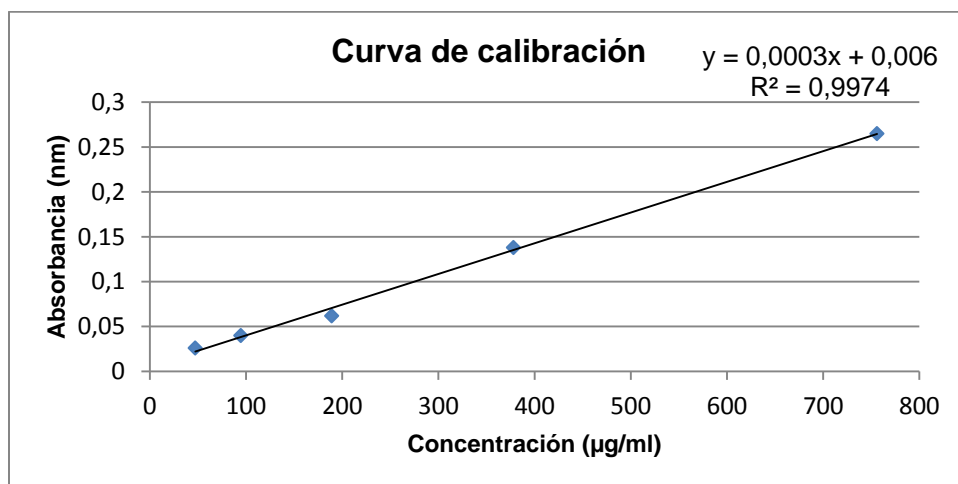




UNIVERSIDAD DE CUENCA

Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,026	0,040	0,063	0,138	0,264
Abs 2	0,027	0,039	0,061	0,137	0,265
Abs 3	0,026	0,040	0,063	0,138	0,265
Promedio	0,026	0,040	0,062	0,138	0,265
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0009	0,0005	0,0005
%CV	1,7901	1,1884	1,5125	0,3424	0,1781



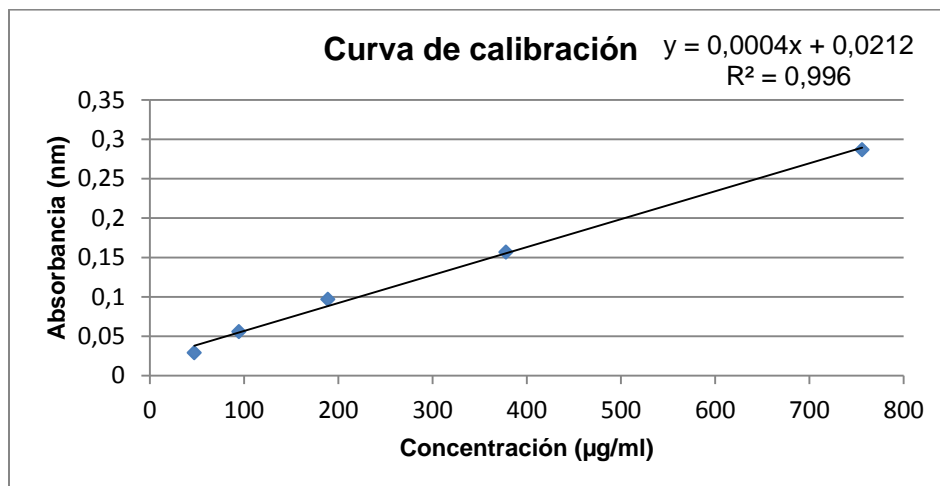
5. Determinación en el t=6

Día 1

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,029	0,057	0,096	0,155	0,287
Abs 2	0,029	0,055	0,097	0,158	0,287
Abs 3	0,028	0,057	0,098	0,157	0,286
Promedio	0,029	0,056	0,097	0,157	0,287
Desviación estándar	0,0005	0,0009	0,0008	0,0012	0,0005
%CV	1,6444	1,6736	0,8417	0,7961	0,1644



UNIVERSIDAD DE CUENCA

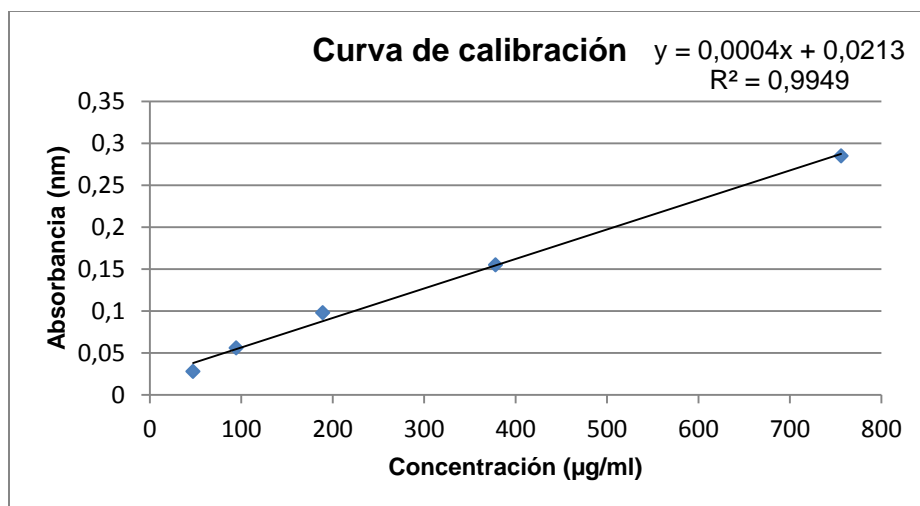


Día 2

Patrones	P1	P2	P3	P4	P5
Concentración (µg/ml)	47,2	94,5	189	378	756
Abs 1	0,028	0,056	0,097	0,155	0,285
Abs 2	0,028	0,056	0,097	0,156	0,286
Abs 3	0,029	0,055	0,099	0,155	0,284
Promedio	0,028	0,056	0,098	0,155	0,285
Desviación estándar	0,0005	0,0005	0,0009	0,0005	0,0008
%CV	1,6638	0,8468	0,9653	0,3035	0,2865



UNIVERSIDAD DE CUENCA





UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo H: Cuantificación de flavonoides

Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			Concentración expresada como Quercetina mg/ml					Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			Concentración expresada como Quercetina mg/ml				
		A1	A2	A3	C1	C2	C3	x	σ			A1	A2	A3	C1	C2	C3	x	σ
CRIOLLO 1E	0	0,215	0,219	0,220	0,550	0,560	0,563	0,558	0,006	CRIOLLO 1L	0	0,284	0,293	0,285	0,726	0,749	0,729	0,735	0,010
	1	0,201	0,203	0,201	0,514	0,519	0,514	0,516	0,002		1	0,271	0,273	0,273	0,693	0,698	0,698	0,697	0,002
	2	0,190	0,190	0,190	0,486	0,486	0,486	0,486	0,000		2	0,260	0,262	0,262	0,665	0,670	0,670	0,668	0,002
		0,190	0,189	0,190	0,486	0,483	0,486	0,485	0,001			0,261	0,260	0,261	0,668	0,665	0,668	0,667	0,001
	4	0,181	0,181	0,182	0,463	0,463	0,466	0,464	0,001		4	0,253	0,253	0,253	0,647	0,647	0,647	0,647	0,000
		0,182	0,182	0,181	0,466	0,466	0,463	0,465	0,001			0,253	0,252	0,252	0,647	0,645	0,645	0,645	0,001
	6	0,174	0,175	0,174	0,445	0,448	0,445	0,446	0,001		6	0,240	0,241	0,241	0,614	0,616	0,616	0,616	0,001
		0,176	0,174	0,174	0,450	0,445	0,445	0,447	0,002			0,242	0,242	0,241	0,619	0,619	0,616	0,618	0,001
CRIOLLO 2E	0	0,178	0,176	0,182	0,455	0,450	0,466	0,457	0,006	CRIOLLO 2L	0	0,278	0,280	0,275	0,711	0,716	0,703	0,710	0,005
	1	0,171	0,171	0,170	0,437	0,437	0,435	0,437	0,001		1	0,255	0,257	0,257	0,652	0,657	0,657	0,656	0,002
	2	0,165	0,165	0,164	0,422	0,422	0,419	0,421	0,001		2	0,242	0,243	0,242	0,619	0,622	0,619	0,620	0,001
		0,164	0,165	0,165	0,419	0,422	0,422	0,421	0,001			0,243	0,243	0,242	0,622	0,622	0,619	0,621	0,001
	4	0,157	0,158	0,158	0,402	0,404	0,404	0,403	0,001		4	0,230	0,231	0,231	0,588	0,591	0,591	0,590	0,001
		0,158	0,157	0,158	0,404	0,402	0,404	0,403	0,001			0,229	0,229	0,230	0,586	0,586	0,588	0,587	0,001
	6	0,151	0,150	0,150	0,386	0,384	0,384	0,385	0,001		6	0,218	0,217	0,216	0,558	0,555	0,552	0,555	0,002
		0,149	0,150	0,150	0,381	0,384	0,384	0,383	0,001			0,218	0,217	0,217	0,558	0,555	0,555	0,556	0,001
CRIOLLO 3E	0	0,184	0,180	0,187	0,471	0,460	0,478	0,470	0,007	CRIOLLO 3L	0	0,217	0,221	0,225	0,555	0,565	0,575	0,565	0,008
	1	0,177	0,176	0,177	0,453	0,450	0,453	0,452	0,001		1	0,209	0,211	0,209	0,535	0,540	0,535	0,536	0,002
	2	0,171	0,170	0,170	0,437	0,435	0,435	0,436	0,001		2	0,199	0,200	0,200	0,509	0,512	0,512	0,511	0,001
		0,170	0,171	0,171	0,435	0,437	0,437	0,437	0,001			0,198	0,198	0,199	0,506	0,506	0,509	0,507	0,001
	4	0,165	0,164	0,165	0,422	0,419	0,422	0,421	0,001		4	0,181	0,181	0,180	0,463	0,463	0,460	0,462	0,001
		0,164	0,164	0,165	0,419	0,419	0,422	0,420	0,001			0,182	0,180	0,182	0,466	0,460	0,466	0,464	0,002
	6	0,159	0,159	0,158	0,407	0,407	0,404	0,406	0,001		6	0,173	0,174	0,174	0,443	0,445	0,445	0,444	0,001
		0,158	0,157	0,158	0,404	0,402	0,404	0,403	0,001			0,174	0,175	0,175	0,445	0,448	0,448	0,447	0,001



UNIVERSIDAD DE CUENCA

CRIOLLO 4E	0	0,146	0,145	0,146	0,373	0,371	0,373	0,373	0,001	CRIOLLO 4L	0	0,221	0,220	0,221	0,565	0,563	0,565	0,564	0,001
	1	0,135	0,135	0,134	0,345	0,345	0,343	0,344	0,001		1	0,215	0,214	0,215	0,550	0,547	0,550	0,549	0,001
	2	0,128	0,128	0,127	0,327	0,327	0,325	0,327	0,001		2	0,208	0,209	0,209	0,532	0,535	0,535	0,534	0,001
		0,129	0,128	0,128	0,330	0,327	0,327	0,328	0,001			0,208	0,208	0,210	0,532	0,532	0,537	0,534	0,002
	4	0,118	0,118	0,119	0,302	0,302	0,304	0,303	0,001		4	0,196	0,196	0,196	0,501	0,501	0,501	0,501	0,000
		0,118	0,119	0,118	0,302	0,304	0,302	0,303	0,001			0,196	0,195	0,196	0,501	0,499	0,501	0,500	0,001
6	0,108	0,109	0,108	0,276	0,279	0,276	0,277	0,001	6	0,188	0,189	0,188	0,481	0,483	0,481	0,482	0,001		
	0,109	0,108	0,108	0,279	0,276	0,276	0,277	0,001		0,187	0,189	0,189	0,478	0,483	0,483	0,482	0,002		
CRIOLLO 5E	0	0,181	0,180	0,180	0,463	0,460	0,460	0,461	0,001	CRIOLLO 5L	0	0,249	0,249	0,250	0,637	0,637	0,639	0,638	0,001
	1	0,172	0,173	0,173	0,440	0,443	0,443	0,442	0,001		1	0,240	0,241	0,240	0,614	0,616	0,614	0,615	0,001
	2	0,160	0,161	0,160	0,409	0,412	0,409	0,410	0,001		2	0,234	0,234	0,233	0,599	0,599	0,596	0,598	0,001
		0,159	0,161	0,161	0,407	0,412	0,412	0,410	0,003			0,233	0,234	0,234	0,596	0,599	0,599	0,598	0,001
	4	0,153	0,152	0,153	0,391	0,389	0,391	0,390	0,001		4	0,225	0,225	0,226	0,575	0,575	0,578	0,576	0,001
		0,153	0,152	0,152	0,391	0,389	0,389	0,390	0,001			0,225	0,226	0,225	0,575	0,578	0,575	0,576	0,001
6	0,141	0,143	0,142	0,361	0,366	0,363	0,363	0,002	6	0,218	0,218	0,218	0,558	0,558	0,558	0,558	0,000		
	0,143	0,142	0,143	0,366	0,363	0,366	0,365	0,001		0,217	0,218	0,217	0,555	0,558	0,555	0,556	0,001		
CRIOLLO 6E	0	0,172	0,171	0,171	0,440	0,437	0,437	0,438	0,001	CRIOLLO 6L	0	0,224	0,224	0,225	0,573	0,573	0,575	0,574	0,001
	1	0,164	0,165	0,165	0,419	0,422	0,422	0,421	0,001		1	0,213	0,212	0,212	0,545	0,542	0,542	0,543	0,001
	2	0,158	0,157	0,158	0,404	0,402	0,404	0,403	0,001		2	0,205	0,204	0,204	0,524	0,522	0,522	0,523	0,001
		0,157	0,157	0,158	0,402	0,402	0,404	0,402	0,001			0,205	0,203	0,205	0,524	0,519	0,524	0,523	0,002
	4	0,148	0,148	0,147	0,379	0,379	0,376	0,378	0,001		4	0,192	0,192	0,193	0,491	0,491	0,494	0,492	0,001
		0,147	0,147	0,148	0,376	0,376	0,379	0,377	0,001			0,193	0,193	0,192	0,494	0,494	0,491	0,493	0,001
6	0,139	0,140	0,140	0,356	0,358	0,358	0,357	0,001	6	0,183	0,183	0,183	0,468	0,468	0,468	0,468	0,000		
	0,139	0,137	0,139	0,356	0,350	0,356	0,354	0,002		0,182	0,182	0,183	0,466	0,466	0,468	0,466	0,001		



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo I: Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica de DPPH

Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			AAEAC			Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			AAEAC		
		A1	A2	A3	1	2	3			A1	A2	A3	1	2	3
CRIOLLO 1E	0	0,012	0,011	0,012	63,008	63,199	63,008	CRIOLLO 1L	0	0,006	0,008	0,007	64,157	63,774	63,966
	1	0,014	0,015	0,015	62,625	62,433	62,433		1	0,011	0,012	0,011	63,199	63,008	63,199
	2	0,019	0,018	0,018	61,667	61,858	61,858		2	0,014	0,014	0,014	62,625	62,625	62,625
		0,018	0,020	0,019	61,858	61,475	61,667			0,014	0,014	0,015	62,625	62,625	62,433
	4	0,025	0,025	0,024	60,517	60,517	60,709		4	0,019	0,018	0,018	61,667	61,858	61,858
		0,024	0,024	0,025	60,709	60,709	60,517			0,019	0,020	0,019	61,667	61,475	61,667
	6	0,027	0,028	0,028	60,134	59,943	59,943		6	0,022	0,022	0,021	61,092	61,092	61,284
		0,027	0,028	0,030	60,134	59,943	59,559			0,021	0,021	0,021	61,284	61,284	61,284
CRIOLLO 2E	0	0,058	0,057	0,055	54,195	54,387	54,770	CRIOLLO 2L	0	0,009	0,010	0,011	63,582	63,391	63,199
	1	0,066	0,068	0,067	52,663	52,280	52,471		1	0,013	0,014	0,014	62,816	62,625	62,625
	2	0,071	0,070	0,069	51,705	51,897	52,088		2	0,018	0,017	0,017	61,858	62,050	62,050
		0,071	0,071	0,070	51,705	51,705	51,897			0,016	0,017	0,016	62,241	62,050	62,241
	4	0,084	0,084	0,085	49,215	49,215	49,023		4	0,022	0,023	0,022	61,092	60,900	61,092
		0,082	0,083	0,083	49,598	49,406	49,406			0,024	0,024	0,023	60,709	60,709	60,900
	6	0,096	0,096	0,098	46,916	46,916	46,533		6	0,029	0,029	0,029	59,751	59,751	59,751
		0,097	0,096	0,095	46,724	46,916	47,107			0,028	0,028	0,029	59,943	59,943	59,751
CRIOLLO 3E	0	0,011	0,011	0,010	63,199	63,199	63,391	CRIOLLO 3L	0	0,010	0,009	0,011	63,391	63,582	63,199
	1	0,016	0,016	0,015	62,241	62,241	62,433		1	0,014	0,012	0,014	62,625	63,008	62,625
	2	0,020	0,021	0,022	61,475	61,284	61,092		2	0,018	0,018	0,020	61,858	61,858	61,475
		0,022	0,021	0,022	61,092	61,284	61,092			0,019	0,019	0,019	61,667	61,667	61,667
	4	0,025	0,027	0,026	60,517	60,134	60,326		4	0,023	0,024	0,024	60,900	60,709	60,709
		0,027	0,026	0,026	60,134	60,326	60,326			0,024	0,024	0,024	60,709	60,709	60,709
	6	0,030	0,030	0,030	59,559	59,559	59,559		6	0,027	0,029	0,029	60,134	59,751	59,751



UNIVERSIDAD DE CUENCA

		0,030	0,031	0,031	59,559	59,368	59,368			0,029	0,029	0,027	59,751	59,751	60,134
CRIOLLO 4E	0	0,020	0,020	0,021	61,475	61,475	61,284	CRIOLLO 4L	0	0,010	0,011	0,009	63,391	63,199	63,582
	1	0,029	0,028	0,028	59,751	59,943	59,943		1	0,016	0,015	0,015	62,241	62,433	62,433
	2	0,036	0,037	0,037	58,410	58,218	58,218		2	0,022	0,021	0,023	61,092	61,284	60,900
		0,037	0,037	0,035	58,218	58,218	58,602			0,021	0,022	0,022	61,284	61,092	61,092
	4	0,042	0,042	0,043	57,261	57,261	57,069		4	0,024	0,025	0,025	60,709	60,517	60,517
		0,040	0,043	0,044	57,644	57,069	56,877			0,026	0,025	0,025	60,326	60,517	60,517
	6	0,050	0,049	0,048	55,728	55,920	56,111		6	0,031	0,031	0,030	59,368	59,368	59,559
		0,048	0,048	0,048	56,111	56,111	56,111			0,030	0,029	0,030	59,559	59,751	59,559
CRIOLLO 5E	0	0,013	0,013	0,011	62,816	62,816	63,199	CRIOLLO 5L	0	0,004	0,005	0,006	64,540	64,349	64,157
	1	0,018	0,019	0,017	61,858	61,667	62,050		1	0,008	0,008	0,009	63,774	63,774	63,582
	2	0,024	0,024	0,024	60,709	60,709	60,709		2	0,012	0,014	0,014	63,008	62,625	62,625
		0,024	0,022	0,024	60,709	61,092	60,709			0,012	0,012	0,013	63,008	63,008	62,816
	4	0,030	0,029	0,030	59,559	59,751	59,559		4	0,017	0,018	0,018	62,050	61,858	61,858
		0,031	0,029	0,029	59,368	59,751	59,751			0,017	0,016	0,018	62,050	62,241	61,858
	6	0,037	0,037	0,036	58,218	58,218	58,410		6	0,022	0,023	0,022	61,092	60,900	61,092
		0,037	0,037	0,038	58,218	58,218	58,027			0,024	0,023	0,024	60,709	60,900	60,709
CRIOLLO 6E	0	0,017	0,017	0,017	62,050	62,050	62,050	CRIOLLO 6L	0	0,007	0,005	0,005	63,966	64,349	64,349
	1	0,022	0,020	0,022	61,092	61,475	61,092		1	0,008	0,008	0,009	63,774	63,774	63,582
	2	0,027	0,025	0,027	60,134	60,517	60,134		2	0,011	0,012	0,011	63,199	63,008	63,199
		0,027	0,026	0,027	60,134	60,326	60,134			0,012	0,011	0,012	63,008	63,199	63,008
	4	0,035	0,034	0,035	58,602	58,793	58,602		4	0,015	0,015	0,016	62,433	62,433	62,241
		0,035	0,034	0,034	58,602	58,793	58,793			0,015	0,015	0,016	62,433	62,433	62,241
	6	0,038	0,040	0,038	58,027	57,644	58,027		6	0,020	0,020	0,020	61,475	61,475	61,475
		0,039	0,039	0,038	57,835	57,835	58,027			0,021	0,021	0,020	61,284	61,284	61,475



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Anexo J: Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor

Evaluación de la actividad antioxidante mediante la técnica del poder reductor															
Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			AAEAC (mg/g)			Código	Tiempo (meses)	Absorbancia (nm)			AAEAC (mg/g)		
		A1	A2	A3	1	2	3			A1	A2	A3	1	2	3
Criollo 1E	0	0,2	0,198	0,198	109,653	108,264	108,264	Criollo 1L	0	0,285	0,286	0,285	168,681	169,375	168,681
	1	0,181	0,182	0,182	96,458	97,153	97,153		1	0,281	0,281	0,28	165,903	165,903	165,208
	2	0,173	0,174	0,174	90,903	91,597	91,597		2	0,274	0,274	0,275	161,042	161,042	161,736
		0,172	0,173	0,173	90,208	90,903	90,903			0,275	0,274	0,275	161,736	161,042	161,736
	4	0,165	0,165	0,164	85,347	85,347	84,653		4	0,266	0,266	0,266	155,486	155,486	155,486
		0,164	0,164	0,164	84,653	84,653	84,653			0,266	0,267	0,267	155,486	156,181	156,181
	6	0,156	0,157	0,156	79,097	79,792	79,097		6	0,25	0,25	0,25	144,375	144,375	144,375
		0,157	0,156	0,157	79,792	79,097	79,792			0,251	0,251	0,25	145,069	145,069	144,375
Criollo 2E	0	0,168	0,171	0,168	87,431	89,514	87,431	Criollo 2L	0	0,284	0,289	0,282	167,986	171,458	166,597
	1	0,153	0,155	0,155	77,014	78,403	78,403		1	0,273	0,275	0,275	160,347	161,736	161,736
	2	0,146	0,145	0,145	72,153	71,458	71,458		2	0,267	0,268	0,268	156,181	156,875	156,875
		0,145	0,143	0,144	71,458	70,069	70,764			0,267	0,266	0,267	156,181	155,486	156,181
	4	0,136	0,135	0,135	65,208	64,514	64,514		4	0,258	0,258	0,257	149,931	149,931	149,236
		0,135	0,134	0,135	64,514	63,819	64,514			0,257	0,256	0,257	149,236	148,542	149,236
	6	0,128	0,127	0,126	59,653	58,958	58,264		6	0,246	0,247	0,247	141,597	142,292	142,292
		0,127	0,126	0,127	58,958	58,264	58,958			0,246	0,244	0,246	141,597	140,208	141,597
Criollo 3E	0	0,188	0,191	0,188	101,319	103,403	101,319	Criollo 3L	0	0,263	0,271	0,269	153,403	158,958	157,569
	1	0,175	0,174	0,175	92,292	91,597	92,292		1	0,256	0,257	0,257	148,542	149,236	149,236
	2	0,167	0,168	0,168	86,736	87,431	87,431		2	0,25	0,251	0,251	144,375	145,069	145,069
		0,166	0,167	0,167	86,042	86,736	86,736			0,249	0,25	0,25	143,681	144,375	144,375
	4	0,16	0,158	0,158	81,875	80,486	80,486		4	0,242	0,242	0,243	138,819	138,819	139,514
		0,158	0,157	0,158	80,486	79,792	80,486			0,242	0,241	0,242	138,819	138,125	138,819



UNIVERSIDAD DE CUENCA

	6	0,149	0,149	0,15	74,236	74,236	74,931		6	0,234	0,235	0,235	133,264	133,958	133,958
		0,149	0,148	0,149	74,236	73,542	74,236			0,235	0,234	0,235	133,958	133,264	133,958
Criollo 4E	0	0,137	0,138	0,137	65,903	66,597	65,903	Criollo 4L	0	0,186	0,186	0,185	99,931	99,931	99,236
	1	0,13	0,129	0,129	61,042	60,347	60,347		1	0,18	0,179	0,18	95,764	95,069	95,764
	2	0,123	0,122	0,122	56,181	55,486	55,486		2	0,172	0,172	0,172	90,208	90,208	90,208
		0,122	0,121	0,122	55,486	54,792	55,486			0,171	0,171	0,172	89,514	89,514	90,208
	4	0,115	0,113	0,115	50,625	49,236	50,625		4	0,164	0,165	0,165	84,653	85,347	85,347
		0,114	0,112	0,114	49,931	48,542	49,931			0,163	0,164	0,164	83,958	84,653	84,653
	6	0,102	0,102	0,1	41,597	41,597	40,208		6	0,155	0,156	0,156	78,403	79,097	79,097
		0,1	0,1	0,101	40,208	40,208	40,903			0,154	0,155	0,155	77,708	78,403	78,403
Criollo 5E	0	0,15	0,149	0,149	74,931	74,236	74,236	Criollo 5L	0	0,209	0,209	0,208	115,903	115,903	115,208
	1	0,141	0,141	0,14	68,681	68,681	67,986		1	0,201	0,202	0,201	110,347	111,042	110,347
	2	0,135	0,135	0,134	64,514	64,514	63,819		2	0,195	0,196	0,195	106,181	106,875	106,181
		0,134	0,135	0,134	63,819	64,514	63,819			0,194	0,194	0,195	105,486	105,486	106,181
	4	0,128	0,129	0,128	59,653	60,347	59,653		4	0,188	0,189	0,189	101,319	102,014	102,014
		0,128	0,128	0,128	59,653	59,653	59,653			0,187	0,188	0,188	100,625	101,319	101,319
	6	0,118	0,117	0,118	52,708	52,014	52,708		6	0,177	0,177	0,178	93,681	93,681	94,375
		0,118	0,118	0,117	52,708	52,708	52,014			0,177	0,176	0,177	93,681	92,986	93,681
Criollo 6E	0	0,13	0,131	0,131	61,042	61,736	61,736	Criollo 6L	0	0,168	0,169	0,169	87,431	88,125	88,125
	1	0,122	0,123	0,123	55,486	56,181	56,181		1	0,16	0,162	0,16	81,875	83,264	81,875
	2	0,115	0,115	0,116	50,625	50,625	51,319		2	0,152	0,153	0,153	76,319	77,014	77,014
		0,114	0,115	0,114	49,931	50,625	49,931			0,151	0,15	0,151	75,625	74,931	75,625
	4	0,107	0,108	0,107	45,069	45,764	45,069		4	0,142	0,142	0,141	69,375	69,375	68,681
		0,106	0,107	0,107	44,375	45,069	45,069			0,142	0,141	0,142	69,375	68,681	69,375
	6	0,099	0,098	0,098	39,514	38,819	38,819		6	0,135	0,135	0,136	64,514	64,514	65,208
		0,098	0,097	0,097	38,819	38,125	38,125			0,135	0,134	0,134	64,514	63,819	63,819