

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CARRERA QUÍMICA FARMACÉUTICA
MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA



TÍTULO:

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS EN HOJAS SECAS Y VERDES DE *CECROPIA PELTATA* (GUARUMO) EN ÁRBOLES SILVESTRES DE 10, 15 Y 20 M DE ALTURA EN LA RESERVA NATURAL LAGUNA DE APOYO, MASAYA MARZO- JUNIO 2013.

Autoras: Bra. Iris Carolina López Méndez.

Bra. Rosa de Sarón Gallegos Ríos.

Tutor: Msc. Iván Marín Arguello.

Asesor Metodológico: Msc. Gerardo Mendoza J.

Managua, Febrero de 2014.

OPINIÓN DEL TUTOR

Existe una diferencia marcada entre un trabajo monográfico basado en la experimentación instrumental y cualquier otra forma de culminación de estudios. En el proceso formativo del trabajo de tesis, el cual es el objetivo del presente documento, exigió el desarrollo de habilidades y destrezas por parte de las autoras que solo por medio de un proceso de análisis instrumental se pueden desarrollar.

En esta afirmación, las bachilleras autoras del presente estudio, desplegaron un sin número de responsabilidades académicas que incluyó desde la búsqueda y caracterización de un químico estándar hasta el dominio de aplicaciones informáticas de programas espectrofotométrico, claro está que también pasando por los requerimientos académicos de un muestreo y el procesamiento químico de las mismas.

Ni las limitantes tecnológicas y presupuestarias lograron amilantar los esfuerzos mostrados por Iris y Rosa. En este aspecto ellas buscaron el apoyo de instituciones académicas que les brindaron el soporte técnico y completaron el trabajo con recursos propios en la adquisición de químicos estándares.

Es debido a este conglomerado de aptitudes y esfuerzo desplegado por las autoras que con beneplácito y regocijo manifiesto mi total respaldo al trabajo de tesis presentado por las bachilleras.

Para concluir, sugiero que en el mediano plazo la universidad despliegue esfuerzos en la apropiación tecnológica adecuada para que los estudiantes de la UNAN puedan realizar este tipo de estudio en nuestra casa mater y no exponer a los estudiantes al vaivén de las voluntades de instituciones exógenas.

A nuestras bachilleras, Iris y Rosa, oportunamente abrieron el camino para entender las propiedades medicinales de la hoja verde o seca del Guarumo, este es el tipo de conocimiento que demanda nuestra sociedad. Continúen por esta senda.

DEDICATORIA

Éste documento lo dedicamos a Dios nuestro Señor que nos ha dado la vida y fuerza para alcanzar nuestros sueños, a nuestros padres quienes han hecho todo el sacrificio de apoyarnos en nuestras decisiones, y a quienes debemos el culminar nuestros estudios.

No menos importante para nosotras, los maestros quienes son un gran aporte de nuestra sabiduría y conocimientos adquiridos, ellos fueron el camino que nos guiaba hacia lo correcto al brindarnos el conocimiento adecuado a través de esa labor tan importante y tan difícil que más que una labor es un arte, a esos artistas se lo dedicamos de corazón.

A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera aportaron para que nosotras saliéramos triunfadoras les dedicamos éste trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos infinitos al Señor nuestro Dios, quien nos dio la oportunidad de vivir cada día y la sabiduría suficiente para realizar éste trabajo y a quien le pedimos nos siga iluminando grandemente en lo que resta de nuestras vidas.

A nuestros padres que siempre han estado presentes en nuestros logros y frustraciones, les agradecemos y los homenajeamos intentándoles demostrar con éste documento que tanto sacrificio no ha sido en vano.

A nuestros maestros por haber estado latentes y pendientes del aprendizaje y a todas aquellas personas que aportaron para enriquecerlo aún más.

Un agradecimiento muy especial al Laboratorio de Ministerio Agropecuario y Forestal (MAGFOR), quienes nos apoyaron grandemente en la elaboración de nuestro estudio monográfico, facilitándonos su laboratorio y a quienes felicitamos por tener las mejores y más nuevas instalaciones del país, además de tener un personal altamente calificado como el Ing. Hubert Avilés, a quien le agradecemos su amable colaboración.

A Laboratorio ISNAYA en Estelí por su enorme colaboración en nuestra investigación al ser un laboratorio que sirve como área educativa para la transferencia de conocimientos a estudiantes de Farmacia y es de referencia a nivel nacional para el control de la calidad de productos medicinales y por su hospitalidad en la finca El Cortijo, le felicitamos por su enorme labor en la Medicina Tradicional de Nicaragua.

Agradecemos muy especialmente a la Lic. Aura Mendoza Directora de Laboratorio Nacional de Residuos químicos y biológicos del MAGFOR, al Licenciado Marvin Palma Aráuz Gerente de Laboratorio ISNAYA en Estelí, al Lic. Álvaro Gutiérrez Coordinador Ejecutivo AMICTLAN, a la Lic. Rosa María Gonzáles, Directora del Departamento de Química de UNAN Managua, al Lic. Róger Manzanares y PhD Jorge Pitty, Docentes de dicha Universidad por habernos apoyado siempre en la realización de éste estudio, a todos ellos, Gracias.

RESÚMEN

Palabras claves: Ácido Clorogénico, Cecropia Peltata, Cromatografía de Capa Fina, Espectrofotometría UV-Vis.

La especie *Cecropia Peltata* (Guarumo) se utiliza como planta medicinal para el tratamiento de diversas enfermedades, el ácido clorogénico e isoorientina son los principales constituyentes activos de las hojas. En éste estudio se determinó el contenido de ácido clorogénico en hojas secas y verdes de tres árboles de 10, 15 y 20 m de altura de la especie *Cecropia Peltata* que crecen de manera silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo en Masaya, para ello se realizaron ensayos preliminares en hojas secas (extractos hidroalcohólico y alcohólico) desarrollando varias placas cromatográficas donde no se observaron manchas que demostraran la presencia del ácido clorogénico.

Se prepararon infusiones de hojas secas y verdes de Guarumo y se desarrollaron placas para cromatografía de capa fina con el fin de identificar el compuesto, resultando que en hojas verdes hay manchas que demuestran la presencia de ácido clorogénico no así en hojas secas.

Se determinó el contenido de ácido clorogénico por espectrofotometría Uv – Vis en infusiones de hojas secas y verdes, resultando en hojas secas un espectro diferente al del estándar con longitud de onda de máxima absorción diferente por lo que no fue posible determinar el contenido de ácido clorogénico y en hojas verdes se determinó que en el árbol de 20 m mayor cantidad de ácido clorogénico. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico estándar en agua destilada entre 30- 110 ppm, donde la pendiente y su intercepto se ajustan a la linealidad.

De ésta manera fue identificado el ácido clorogénico por cromatografía de capa fina y espectroscopía uv / vis en hojas verdes de la especie *Cecropia Peltata*, sin embargo en hojas secas no pudo ser determinado.

TABLA DE CONTENIDO

OPINIÓN DEL TUTOR.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESÚMEN.....	IV
APARTADO I: ASPECTOS GENERALES.....	0
1.1- INTRODUCCIÓN.....	1
1.2- OBJETIVOS.....	2
1.3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.4- JUSTIFICACIÓN.....	4
1.5- ANTECEDENTES.....	5
APARTADO II: MARCO TEÓRICO.....	10
2.1- USO DE PLANTAS MEDICINALES.....	11
2.2- FAMILIA DE LOS GUARUMOS.....	15
2.2.1. <i>Cecropiaceae</i>	15
2.2.2- Especies presentes en Nicaragua.....	15
2.3- DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>CECROPIA PELTATA</i>	20
2.3.1.- Clasificación Taxonómica.....	20
2.3.2- Características.....	20
2.3.3- Ecología.....	21
2.3.4- Distribución Geográfica.....	21
2.3.5- Componentes Químicos.....	22
2.3.6- Propiedades Terapéuticas.....	23

2.3.7- Usos en Nicaragua.....	25
2.3.8- Recetas populares.....	25
2.3.9- Toxicidad.....	26
2.4- ÁCIDOS CLOROGÉNICOS	26
2.4.1- Biosíntesis de compuestos fenólicos	26
2.4.2- Ácido clorogénico (AC).....	28
2.5- BREVE DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS UTILIZADOS	29
APARTADO III: HIPÓTESIS	33
APARTADO IV: DISEÑO METODOLÓGICO	35
4.1- TIPO DE ESTUDIO.....	36
4.2- ÁMBITO DE ESTUDIO.....	36
4.3- UNIVERSO.....	36
4.4- MUESTRA.....	36
4.5. CRITERIOS DE SELECCIÓN	36
4.6. VARIABLES DE ESTUDIO	37
4.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	37
4.8- MEDIOS.....	38
4.9- MATERIALES Y EQUIPOS.....	38
4.10- REACTIVOS.....	41
4.11- FUENTES PARA OBTENER LA INFORMACIÓN.....	41
4.12- MATERIALES PARA PROCESAR INFORMACIÓN	41
4.13- DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.....	42
4.13.1- Selección y recolección del material vegetal.....	42
4.13.2- Pérdida por secado (Método gravimétrico)	43
4.13.3- Ensayos Preliminares.....	44

4.14 -PREPARACIÓN DE LAS INFUSIONES	45
4.15- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE FENOLES	45
4.16- IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO POR CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA	45
4.17- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	47
PARTADO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1- DETERMINACIÓN DE PÉRDIDA POR SECADO EN LAS MUESTRAS	53
5.2. RESULTADOS DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE FENOLES.....	55
5.3- RESULTADOS OBTENIDOS EN CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA.....	57
5.4- RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	63
APARTADO VI: CONCLUSIONES.....	71
APARTADO VII: RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFÍA.....	.75
ANEXOS	- 0 -

Lista de Figuras

Ilustración 2.1: Ruta de formación de fenoles _____	27
Ilustración 2.2: Fórmula estructural del ácido clorogénico _____	28
Ilustración 2.3: Sistema óptico del espectrofotómetro Agilent 8453 _____	32
Ilustración 5. 1: Resultados de prueba de identificación de fenoles en las infusiones obtenidas	56
Ilustración 5. 2: Reacción de acomplejación usada en la prueba de identificación de fenoles	56
Ilustración 5. 3: Desarrollo de banda coloreada del estándar ácido clorogénico (banda 1 y 2)	57
Ilustración 5. 4: Comparación de banda de ácido clorogénico estándar con referencias bibliográficas	58
Ilustración 5. 5: Visualización en luz Uv de placa con infusión de hojas secas diluida 10 veces (1 g de hoja / 100 mL agua tetradestilada).....	59
Ilustración 5. 6: Visualización en luz Uv de placa con infusión de hojas secas concentrada (5g de hoja/ 100 mL de agua tetradestilada) (Placa 1)	59
Ilustración 5. 7: Visualización de placa en luz Uv de muestras de infusión de hojas verdes usando extracto diluido 10 veces (1g de hoja / 100 mL agua tetradestilada).	61
Ilustración 5. 8: Visualización de placa en luz Uv de muestras de infusión de hojas verdes usando extracto acuoso más concentrado (5 g hoja / 100 mL de agua tetradestilada) (placa 2)	61

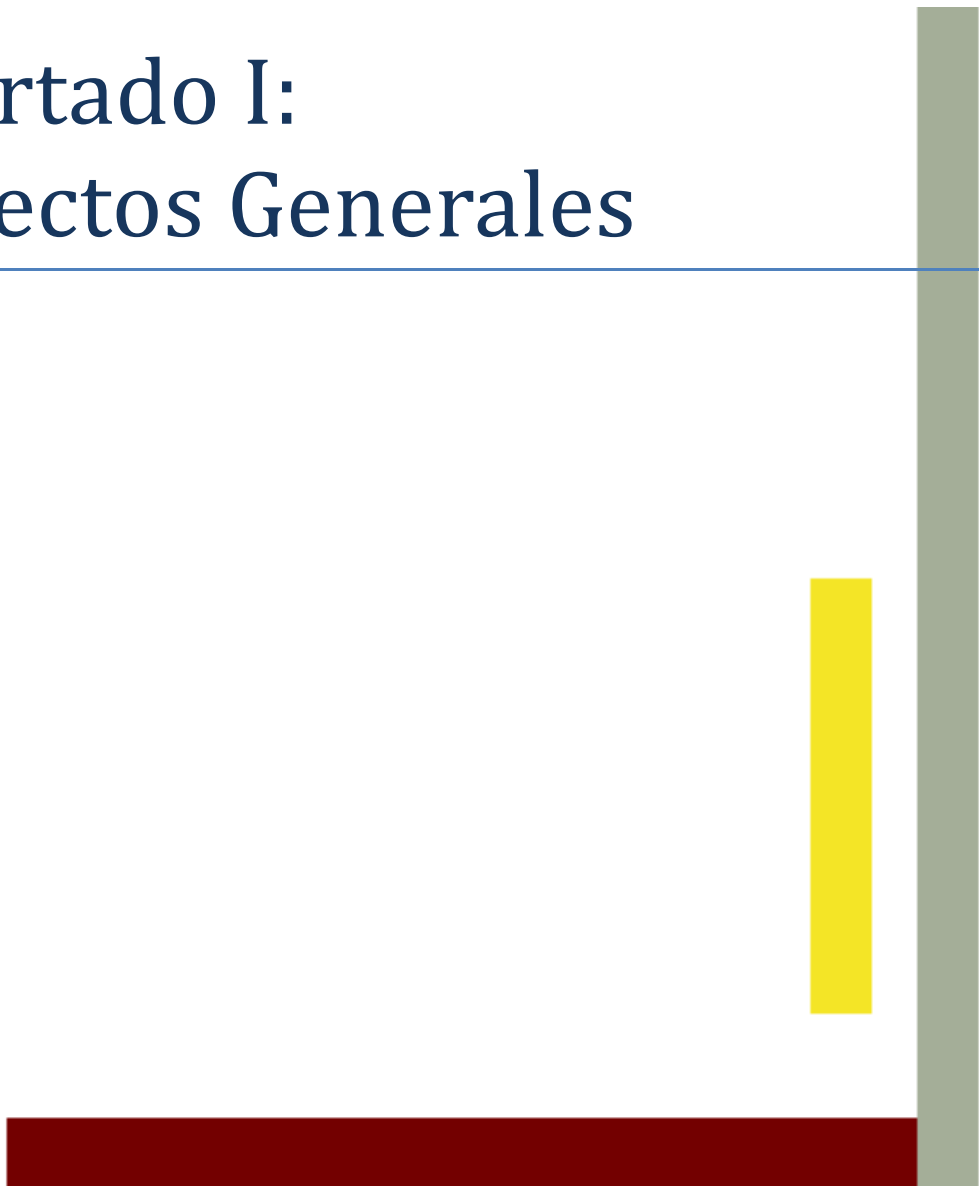
Lista de Tablas

Tabla 2.1: Clasificación taxonómica de la especie <i>Cecropia Peltata</i>	20
Tabla 4. 1: Lista de materiales y equipos utilizados en la fase experimental	38
Tabla 4. 2: Lista de reactivos a utilizar en la fase experimental	41
Tabla 5. 1: Datos de % de pérdida por secado de hojas secas*	54
Tabla 5. 2: Datos de % de pérdida por secado de hojas verdes	54
Tabla 5.3: Valores de Rf de Muestras (M) y Estándar (ST) de ácido clorogénico en infusiones de hojas secas y verdes.	62
Tabla 5. 4: Contenido de ácido clorogénico en infusiones de hojas verdes	69

Lista de Gráficos

Gráfico 5. 1: Comparación de los espectros de absorción Uv/Vis de ácido clorogénico en agua con referencia bibliográfica.....	63
Gráfico 5. 2: Espectro de absorción de las infusiones de hojas secas a 324 nm.....	64
Gráfico 5. 3: Espectro de absorción obtenida de las muestras de hojas verdes a 324 nm	64
Gráfico 5. 4: Espectro de absorción superpuesto de hojas verdes y estándar AC en agua tetradestilada CAM	65
Gráfico 5. 5: Espectros de absorción superpuestos de estándar, infusiones de hojas secas y verdes.	66
Gráfico 5. 6: Curva de calibración del estándar ácido clorogénico (AC) en agua tetradestilada	67

Apartado I: Aspectos Generales



1.1- INTRODUCCIÓN

En el presente estudio se realiza la determinación del contenido de ácido clorogénico en infusiones de hojas secas y verdes en la especie *Cecropia Peltata* de crecimiento silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo en Masaya, Nicaragua durante el período Marzo a Junio 2013.

Se considera de gran importancia ésta investigación porque constituye una alternativa en la medicina tradicional para el procesamiento de éste principio activo ya que los altos costos de la síntesis química de compuestos novedosos presenta una barrera entre pacientes e industria farmacéutica porque obliga al incremento en los precios y por tanto menor accesibilidad a los mismos.

Primeramente en el apartado I se describen los aspectos generales, objetivos propuestos, planteamiento del problema, justificación y antecedentes principales. En el apartado II se describen las especies de *Cecropia* en Nicaragua, las características de *Cecropia Peltata* y su uso popular.

En el apartado III se describe la hipótesis del estudio, en la que se plantea que la especie *Cecropia Peltata* de crecimiento silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo contiene ácido clorogénico en hojas verdes y secas, el cual varía su concentración dependiendo de la altura del árbol.

Posteriormente en apartado IV se describe el procedimiento de recolección de las muestras, identificación y cuantificación de ácido clorogénico en hojas secas y verdes de *Cecropia Peltata* por cromatografía de capa fina y espectrofotometría Uv/Visible a 324 nm, en la cual se realizó una curva de calibración con el estándar de referencia frente al agua.

En el apartado V se discuten los resultados obtenidos, donde las infusiones de hojas verdes contienen el compuesto de interés no así en hojas secas; por lo que se concluye que en las hojas verdes se determina el ácido clorogénico por los métodos mencionados y en el apartado VI se mencionan algunas recomendaciones para respaldar y aportar nuevos conocimientos sobre el contenido de ácido clorogénico en *Cecropia Peltata* y su uso en la medicina tradicional.

1.2- OBJETIVOS

1.2.1- Objetivo General

Determinar el contenido de ácido clorogénico por espectrofotometría Uv-Vis en hojas secas y verdes de la especie *Cecropia Peltata* (Guarumo) en árbol silvestre de 10, 15 y 20 m de altura de la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya durante el período Marzo-Junio, 2013.

1.2.2- Objetivos Específicos

- 1- Realizar la prueba de identificación de fenoles a partir de las infusiones de hojas secas y verdes de *Cecropia Peltata* silvestres de 10, 15 y 20 m de altura recolectados la Reserva.
- 2- Identificar la presencia de ácido clorogénico en las infusiones obtenidas de hojas secas y verdes usando cromatografía de capa fina (CCF).
- 3- Cuantificar el contenido de ácido clorogénico en las infusiones de hojas secas y verdes de *Cecropia Peltata* mediante espectrofotometría Uv/Visible.

1.3- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la búsqueda de nuevos Agentes Terapéuticos, la industria Farmacéutica y la comunidad científica consideran a las plantas medicinales como una de las alternativas naturales a explorar que cubran las expectativas del sector salud. Éste proceso ha propiciado el desarrollo de numerosas investigaciones sobre las propiedades farmacológicas y químicas de las plantas.

La Flora de Nicaragua es muy variada y cuenta con numerosas especies de plantas que pueden ayudar al control de enfermedades. Tal es el caso del Guarumo, cuyo principio activo, ácido clorogénico, posee propiedad hipoglucemiante la cual ha sido confirmada mediante numerosas investigaciones en Universidades de México, Guatemala, Colombia, entre otros países. En Nicaragua aún no se cuentan con registros de investigación. También se mencionan otros usos en la medicina tradicional como tratamiento para asma, afecciones renales, afecciones nerviosas, dolor de estómago, afección bronquial, entre otros.

En Nicaragua se encuentran ocho (8) especies de la familia de los Guarumos, de ellas la especie *Cecropia Peltata*, es la única que ha sido identificada en la Reserva Natural Laguna de Apoyo. En ciertos sitios de ésta reserva ha sido cortada la vegetación para leña o para la siembra de cultivos en pendiente, lo cual es un atentado no sólo contra el bosque sino contra la Laguna misma, al exponer sus aguas al arrastre y erosión de los suelos que la rodean. El interés respecto a los beneficios de las plantas en la terapéutica actual ha suscitado la búsqueda de estrategias para proteger y preservar aquellas especies en riesgo de sobreexplotación o de extinción.

Por ésta razón se plantea: ¿Varía la concentración de ácido clorogénico en la especie *Cecropia Peltata* (Guarumo), en relación al secado de las hojas y a la altura en árboles silvestres antes de su floración en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya?

1.4- JUSTIFICACIÓN

La Medicina Tradicional desempeña un papel esencial en la asistencia sanitaria, especialmente en el ámbito de la atención primaria de salud. Se calcula que los medicamentos tradicionales son utilizados por el 60% de la población Mundial y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema público de salud. Según las encuestas realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2003, el 60% de la población Nicaragüense hace uso de la Medicina Tradicional, el cual se ha incrementado debido a los bajos costos que representa.

El Guarumo ha sido estudiado en múltiples investigaciones en varios países debido a las diversas propiedades terapéuticas del ácido clorogénico (AC). Dado que la altura del árbol influye en el contenido de principios activos, la presente investigación está dirigida a la determinación del contenido de ácido clorogénico en infusiones de hojas adultas secas y verdes de la planta Guarumo en la especie *Cecropia Peltata* de crecimiento silvestre en árboles de 10, 15 y 20 m de alto en la Reserva Natural Laguna de Apoyo en Nicaragua durante el período Marzo-Junio 2013.

Se considera de gran importancia ésta investigación porque constituye una alternativa en la Medicina Tradicional para el procesamiento de éste principio activo ya que los altos costos de la síntesis química de compuestos novedosos presenta una barrera entre pacientes e industrias farmacéuticas porque obliga al incremento en los precios y por tanto menor accesibilidad a los mismos. Además los métodos aquí utilizados son sencillos, rápidos, de bajo costo y accesibles para laboratorios nacionales dedicados a la producción de fitofármacos.

Los resultados de ésta investigación podrán ser utilizados para futuras investigaciones de estudiantes y profesionales de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, con el fin de fortalecer los conocimientos y utilización adecuada de los Recursos Naturales que presenta Nicaragua en la Terapéutica Nacional.

1.5- ANTECEDENTES

Diferentes estudios de la composición química el género *Cecropia* han reportado la presencia de ácido clorogénico en *C. Peltata*, *C. Obtusifolia*, *C. Pachystachya*, y *C. Glaziovii*, tal como Hernández Carvajal en el 2012 en Colombia. La especie *Cecropia Peltata* ha sido reportada en México como una de las plantas principales usadas en la medicina tradicional con actividad hipoglucémica según Cetto A. & Heinrich, 2005 al igual que la especie *Cecropia Obtusifolia*.

Entre los estudios realizados a ésta especie se encuentra el publicado por Cetto A. & Cárdenas en el 2010, donde estudiaron la composición fitoquímica e inhibición de la gluconeogénesis en la especie *Cecropia Peltata* y *Cecropia Obtusifolia*. En éste estudio se encontró el mecanismo por el cual producen efecto hipoglucemiante en modelos animales, examinando sus efectos *in vivo* y la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato translocasa *in vitro*. Para ello se analizaron los extractos butanólico y acuoso de las dos especies por HPLC-DAD para comprobar su composición fitoquímica, confirmándose que los principales componentes de ambas especies son el ácido clorogénico e isoorientina.

Los resultados *in vivo* sugieren que la administración de ambas plantas puede mejorar el control glicémico mediante el bloqueo de la producción de glucosa hepática, especialmente en estados de ayuno. Estos datos apoyan el uso tradicional de la planta como “agua de uso”, usando 15 g de hojas secas y hervidas en 500 mL de agua, la infusión resultante se enfría antes de ser filtrada y se consume en el transcurso de un día.

Cetto, Cárdenas y Ramirez en el 2007 evaluaron el efecto hipoglucémico de los extractos acuoso y butanólico de hojas secas de *Cecropia Peltata* en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ-N5), el extracto acuoso mostró un efecto hipoglucemiante más bajo que el observado previamente con *Cecropia Obtusifolia* incluso cuando se utilizaron extractos más concentrados, conteniendo concentraciones más bajas de ácido clorogénico (AC) y comparando el perfil fitoquímico de ambas especies. Los autores de éste estudio

suponen que el efecto hipoglucémico de las dos especies está relacionado con la cantidad de ácido clorogénico e isoorientina presente en los extractos, además que el extracto acuoso tiene la misma composición fitoquímica que el butanólico pero los compuestos activos son más concentrados en el primero.

Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con los presentados por Nicasio P. en el 2005 en México donde se evaluó el efecto hipoglucemiante de extractos metanólicos de hojas a partir de *Cecropia Obtusifolia* y *Cecropia Peltata* en ratones sanos.

Los resultados muestran una reducción significativa en los niveles de glucosa en plasma. Éste efecto se correlacionó con el contenido de ácido clorogénico en ambas especies, *C. Peltata*, que contiene 19.84 ± 1.64 mg de ácido clorogénico/g de hojas secas produciendo una disminución superior de los niveles de glucosa en plasma (52,8%). Los extractos de *C. Obtusifolia*, mostraron efectos hipoglucémicos similares (33,3% y 35,7%, respectivamente) y el contenido de ácidos clorogénicos ($13,3 \pm 3,2$ mg / g y $13,1 \pm 1,6$ mg / g, respectivamente). Estos resultados sugieren que *C. Peltata* es un mejor agente hipoglucemiante de *C. Obtusifolia*, y que podrían ser considerados para el desarrollo de un producto fitomedicinal para llevar a cabo los ensayos clínicos.

En otro estudio en el que también participa (Erazo C. Aguilar Santamaría L. Aranda E. & Nicasio) se estudió el contenido de ácido clorogénico (AC) e isoorientina (ISO) en extractos metanólicos en hojas de árboles silvestres y micropropagados, fue determinado por HPLC utilizando una columna RP-18. El efecto hipoglucemiante de los extractos se evaluó en ratones hembra Balb-C sanos (22 y 24 g) a los que se administró v.o. una dosis única de 0.5 g/kg de peso, utilizando glibenclamida como control positivo, la glucemia se evaluó cada 2 h tomando muestras de sangre.

Las plantas micropropagadas de *C. Obtusifolia* y *C. Peltata* conservaron la capacidad de producir los 2 compuestos hipoglucemiantes (AC e ISO), en concentraciones semejantes a las poblaciones silvestres (mg/g de hoja): *C. Obtusifolia* (micropropagada 6 meses: AC- 1.6 ± 0.8 e ISO- 1.3 ± 0.6), (Silvestre AC: 2.2 ± 0.1 , ISO: 1.1 ± 0.1) y *C. Peltata* (6 meses: AC- $0.7 \pm$

0.04 e ISO- 1.6 ± 0.2), (Silvestre AC: 1.9 ± 0.2 , ISO: 0.9 ± 0.2). Además, las plantas generadas conservaron el efecto hipoglucemiante al verificarse la reducción de la glucemia: *C. Obtusifolia* (micropropagada 6 meses: 13.2 y 0 %), (Silvestre: 27.6 y 24.1 %) y *C. Peltata* (6 meses: 7.1 y 19.7 %), (Silvestre 25.0 y 37.9 %) a las 2 y 4 h de su administración. La metodología generada es una alternativa viable para la producción continua y controlada de ambas especies vegetales.

En el año 2007 se realizó la cuantificación de ácido clorogénico en hojas secas de *Cecropia Obtusifolia*, en extractos acuosos preparados usando 13.5 g de hojas en 1L de agua y cuantificado por HPLC, obteniendo 2.91 mg de ácido clorogénico. Se administró los extractos en pacientes diabéticos tipo II recientemente diagnosticados (2 ± 0.8 años) con una edad media de 48 ± 4 semanas por 32 semanas a 12 pacientes controlados solo con dieta y ejercicio, detectándose una reducción significativa de glucosa después de 4 semanas, la reducción fue significativa y sostenida después de 18 semanas de administración, no se observaron efectos colaterales (Revilla Monsalve Ma C Cetto A. Palomino M. A Wiedenfeld H. & Islas Andrade, 2007).

El efecto de las diferentes fracciones por ensayos biodirigidos de los extractos acuoso y metanólico de *Cecropia Obtusifolia* en ratones fue evaluado por Aguilar Santamaría en el 2004, caracterizaron los constituyentes químicos más abundantes de las fracciones con actividad biológica por HPLC. Se utilizaron hojas secas y extraídas por maceración en n-hexano durante 48 horas a Temperatura ambiente por 2 ocasiones. El material remanente fue secado para ser extraído nuevamente por percolación en n- metanol 3 veces, concentrado a presión reducida mediante un rotaevaporador.

En dicho estudio se administró oralmente AC puro, no disminuyendo la hiperglucemia en ratas pretratados con alozana o estreptozotocina (STZ), en dosis de 10 o 20 mg/Kg de acuerdo por lo reportado por Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001). Este hecho refuerza que a menor complejidad en las fracciones, es menor la actividad hipoglucemiante inducida. (Aguilar Santamaría, 2004).

Se demostró que los extracto metanólico y acuoso poseen actividad hipoglucemiante en ratones sanos, se formuló un fitofármaco a partir del extracto acuoso de ésta especie y se estandarizó en ácido clorogénico disminuyendo significativamente la hiperglucemia en ayuno en pacientes con DM, después de su administración por 21 días, quien además presentó efecto hipolipemiante en pacientes diabético con pobre control metabólico.

Sin embargo, el ácido clorogénico ha sido evaluado en muestras diferentes a la de la especie que es de interés en este estudio, tal es el caso del estudio realizado por Solís y Herrera en Costa Rica en el año 2005, quienes desarrollaron y validaron un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos por espectroscopia ultravioleta de segunda derivada en café, mediante la extracción acuosa del ácido clorogénico siguiendo la metodología de extracción de cafeína. Utilizaron soluciones estándares de ácido clorogénico en concentraciones comprendidas de 10-70 ppm. Se evaluó los efectos de diferentes variables en el análisis: temperatura de extracción, tiempo de extracción, estabilidad del ácido clorogénico en solución acuosa con el tiempo, cambio de pH, y efecto de interferencias en el análisis.

La extracción de ácido clorogénico es más efectiva a temperaturas altas (mayor a 78 °C), ésta no ejerce efecto sobre la estabilidad del ácido en disolución acuosa; a 60 minutos la extracción del ácido clorogénico es completa. Respecto a la estabilidad de las disoluciones acuosas con el tiempo debe determinarse el espectro de segunda derivada como máximo a 24 h después de realizada la extracción; pH mayores y menores que 5.5-6 afecta el análisis. Las sustancias presentes en el café tostado y crudo como sacarosa, ácido tánico, cafeína y albumina no presentan efectos interferentes en el análisis a diferentes longitudes de onda.

En café también se ha realizado la caracterización óptica y determinación de ácidos clorogénicos en granos verdes y tostados por espectroscopía Uv/Vis (Belay A. & Gholap, 2009), donde eliminan la interferencia de la cafeína usando diclorometano. Se comparó el método de espectroscopía Uv/Vis con HPLC, las muestras fueron preparadas con agua destilada y se midió frente al agua. Los resultados obtenidos a partir de ambos métodos

estaban en excelente acuerdo evaluadas por la T student al 95% de confianza, no mostrando diferencias significativas ($p < 0.02$) entre los resultados de ambos métodos.

El análisis de ácidos cafeolquínicos también ha sido evaluado en especies de *Baccharis* por HPLC en 1999 por S. Palacios P. G. Wilson E. L. & Debenedetti, 1999 en Argentina en extractos hidroalcohólicos de la droga seca con metanol 70 %, secado en rotaevaporador y redisuelto en el metanol, lavado con éter de petróleo: éter etílico y vuelto a secar en rotavapor, analizaron además del ácido clorogénico (ácido 3 cafeolquínico), los ácidos cafeico, isoclorogénico (ácido 4, 5 dicafeolquínico, 3,5- dicafeolquínico y 3, 4- dicafeolquínico), cuyo alto contenido justifican el uso de éstas especies como digestivas, hepatoprotectoras y antirreumáticas

La determinación espectrofotométrica de ácidos cafeolquínicos fué realizada en 1989 por Martino V.S Ferraro G. E Debenedetti S.L & Coussio, quienes valoraron infusiones y extractos de 11 plantas de la familia de las Compuestas, las que se sometieron a cromatografía en papel Whatman N°1 usando como solvente de corrida HCl 0.1 N y detectándose la presencia de ácido clorogénico. Las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas en un aparato *Shimadzu UV 240*, la curva de calibración se hizo con soluciones estándar de ácido clorogénico entre 0.33-5 μ g, a 322 nm. Encontrándose que el extracto alcohólico de *Pterocaulon Virgatum* tiene un contenido superior en ácidos cafeolquínicos al de la alcachofa.

Apartado II: Marco Teórico



2.1- USO DE PLANTAS MEDICINALES

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Medicina Tradicional desempeña un papel esencial en la asistencia sanitaria, especialmente en el ámbito de la atención primaria de salud. Se calcula que los medicamentos tradicionales son utilizados por el 60% de la población mundial y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema público de salud (Mayorga S.V Gutiérrez M.C & Rueda Pereira, 2007) (OMS-OPS, 1999)

El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la Medicina Tradicional y la Medicina Complementaria en todo el mundo. Éstas se obtienen mediante la recolección de variedades silvestres o el cultivo de variedades domesticadas. Muchas comunidades dependen de los productos naturales recolectados en los ecosistemas para fines medicinales y culturales, además de alimentarios.

La OMS define la Medicina Tradicional como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades (OMS- Ginebra, 2002).

La Medicina Tradicional (MT) tiene como fundamento el saber médico ancestral de la población, ésta es transmitida por la tradición familiar o comunitaria, que tienen sus propios agentes de salud y sus ideas específicas sobre la enfermedad y la curación. Es muy extendido en los países en vías de Desarrollo, mientras que el uso de la Medicina Complementaria y Alternativa (MCA) está aumentando rápidamente en los países desarrollados. En muchos lugares del mundo, los responsables de las políticas, profesionales sanitarios y el público se debate con preguntas sobre la seguridad, biodisponibilidad, preservación y el desarrollo de éste tipo de atención sanitaria.

Aunque se cuenta con medicamentos sintéticos para los fines más diversos, persisten la necesidad y la demanda mundial de productos naturales para usarlos como medicamentos y

para investigaciones biomédicas que dependen de las plantas, los animales y los microbios para conocer la fisiología humana, entender y tratar las enfermedades humanas.

Las plantas han jugado un papel importante en el desarrollo de medicamentos de la farmacéutica moderna. Aún en la actualidad, se retorna con interés a éste recurso como una alternativa para el descubrimiento de moléculas prototipos novedosos que sirvan de modelo en la producción de agentes terapéuticos.

Los metabolitos secundarios tienen gran importancia farmacéutica al ser aislados directamente del vegetal y constituyen investigaciones más económicas en comparación a la síntesis química que representa un costo alto no deseable, debido a que se trata de moléculas complejas.

En Nicaragua los medicamentos de origen vegetal, animal y mineral forman parte del arsenal terapéutico del país. Según encuestas realizadas por la Organización Mundial de la Salud en el 2003, el 60% de la población nicaragüense hace uso de la Medicina Tradicional, cuyo uso se ha incrementado debido a los bajos costos que representa (Mayorga S.V Gutiérrez M.C & Rueda Pereira, 2007).

Nicaragua cuenta con instituciones de apoyo e investigación que promueve el desarrollo de la Medicina Tradicional tales como:

- a)- Centro Nacional de Medicina Popular Tradicional, Estelí (CNMPT), promueve acciones de producción, servicios, docencia e investigación con la medicina indígena o tradicional.
- b)- Cecalli- Estelí: Contribuye a la aplicación de la medicina natural a través de capacitaciones, fabricación de medicamentos.
- c)- Red Nacional de Terapias Alternativas.
- d)- TRAMIL-Enda-Caribe, es un programa de investigación científica aplicada y usos populares de plantas medicinales en el Caribe, enlazada con UNAN León.
- e)-UPONIC, Carrera de Medicina Natural.

- g)-Centro de Información y Servicios de Asesoría en Salud (CISAS): adopta metodología de educación popular con énfasis en la comunicación social para la salud como estrategia de atención primaria en salud.
- h)-Instituto de Medicina Tradicional (Universidad de las Regiones Autónoma de la Costa Caribe Nicaragüense, URACCAN), Costa Atlántica, cuyo objetivo es la promoción, prevención, tratamiento y rehabilitación de las enfermedades crónicas no transmisibles en la medicina natural y tradicional.
- i)-UNAN León, divulgan formas alternativas de terapias y creación del primer jardín de plantas medicinales de la Ciudad de León.
- j)-Red nicaragüense de Sistema Tradicional, León.
- k)- Centro de Desarrollo de la Medicina Tradicional Natural (CEDEMETRA)
- l)- Ministerio de Salud (MINSa) de carácter público
- m)- Renacer (OMS-OPS, 1999)

Con respecto a las plantas medicinales en Nicaragua, existe un registro de plantas y medicamentos de Medicina Tradicional, el cual está organizado por instituciones ubicadas en Estelí. En Nicaragua no existe control en la venta y recolección, ni existen remedios de Medicina Tradicional en la lista esencial de medicamentos de las instituciones oficiales de salud (OMS-OPS, 1999).

En el aspecto etnobotánico, el Centro Nacional de Medicina Popular Tradicional (CNMPT) en Estelí, ha realizado una enorme labor de rescate de reconocimiento popular que la población local posee sobre la diversidad genética de las plantas.

Actualmente cuenta con una colección de cerca de 800 especies de las cuales 300 han sido identificadas taxonómicamente (Estrategia Nacional de Biodiversidad, 2002).

El Centro Nacional de la Medicina Popular, mejor conocido por la marca de sus productos ISNAYA que significa en el idioma Nahuatl “Árbol Alegre”, cuenta con tres unidades dentro de su estructura: laboratorios, producción, compra y venta de productos, (Eke, 2000) que apoyan las investigaciones, protección, control y cultivo de plantas medicinales así como el rescate, conservación y divulgación de la práctica y capacitación en la Medicina Tradicional.

Las estimaciones efectuadas por el Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales de Nicaragua (MARENA) plantea que pueden existir en el país un aproximado de 9,000 especies de plantas, de ellas 73 son endémicas. En Nicaragua se encuentran reportadas con material de respaldo en herbarios unas 5,796 especies de plantas vasculares, agrupadas en 1,699 géneros, que incluyen helechos, gimnospermas y angiospermas distribuidas en 225 familias (Rueda Pereira, 2007).

La familia de plantas existentes agrupa 5,354 especies que son definitivamente conocidas, mientras que la presencia de las restantes es considerable probable o esperada por los autores. Sin embargo a la fecha, no se conocen datos exactos del número de plantas útiles en Nicaragua, pero se sabe que son muchas las especies utilizadas por la población para satisfacer sus necesidades básicas. Tampoco se cuenta con un registro exacto de cuáles y cuántas especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, pero es conocido que hay situaciones y procesos que están poniendo en riesgo nuestro patrimonio vegetal (Rueda Pereira, 2007).

Cecropia Peltata (Guarumo) se menciona como una de las especies arbóreas más investigadas en el Sistema Agroforestal de Nicaragua, además de otras especies como el *Gliricidia Sepium* (Madero Negro), *Leucaena Leucocephala* (Leucaena), *Mangifera indica* (Mango), *Persea Americana* (Aguacate), *Switenia Humilis* (Caoba), *Inga spp* (Guaba) y *Guazuma Ulmifolia* (Guácimo) (Mendieta López M. & Rocha Molina, 2007).

El Guarumo es utilizado en la Medicina Tradicional para diversos usos, se utiliza la cocción de las hojas como antiasmática, antirreumática y contra enfermedades de la piel que producen insoportable escozor.

2.2- FAMILIA DE LOS GUARUMOS

Son arbustos o árboles con savia acuosa oxidándose a negra, hojas simples enteras o lobuladas, alternas u opuestas, con estípulas. Inflorescencia en espiga, cabezuelas o cimbras. Frutos en aquenios (Grijalva Pineda, 2006).

2.2.1. *Cecropiaceae*

Árboles o trepadoras leñosas, plantas dioicas. Hojas alternas, simples, enteras o profundamente lobadas, nervios terciarios más o menos paralelos; pecioladas, estípulas largas, completamente connadas, rodeando los tallos y envolviendo los ápices, dejando en ellos cicatrices circulares evidentes.

La familia Cecropiaceae está formada por 6 géneros: *Cecropia*, *Musanga*, *Myrianthus*, *Pourouma*, *Coussapoa* y *Poikilospermum*; y cerca de 180 especies, todas tropicales.

En Nicaragua se conocen 3 géneros (*Coussapoa*, *Pourouma* y *Cecropia*) y 8 especies (*Coussapoa Villosa*, *Coussapoa Glaberrima*, *Pourouma Bicolor*, *Pourouma Minor*, *Cecropia Insignis*, *Cecropia Peltata*, *Cecropia Obtusifolia*, *Cecropia Sylvicola* y se espera encontrar la especie *Coussapoa Nymphaeifolia* en Río San Juan) de la familia Cecropiaceae (familia de los Guarumos), siendo el género más común *Cecropia* con 4 especies: *Sylvicola*, *Obtusifolia*, *Peltata*, *Insignis* (Berg, 1978) (Grijalva Pineda, 2006).

2.2.2- Especies presentes en Nicaragua

Coussapoa Villosa

Son árboles de hasta 25 m de alto cuando crecen independientemente, tallos a veces vellosos. Hojas ovadas de 10–30 cm de largo y 7–20 cm de ancho, agudas a obtusas o redondeadas en el ápice, truncadas o levemente cordadas en la base, con 10–17 pares de nervios secundarios rectos, glabras y lisas en la haz, extremadamente variable en el tamaño de

las hojas y en la presencia de tricomas vellosos; pecíolo 3–9 cm de largo, a veces veloso. Pedúnculos estaminados 1–2.7 cm de largo. Extremadamente variable en el tamaño de las hojas. (Poepping, 2009).

Ésta especie se extiende desde el sur de México hasta Sudamérica. En Nicaragua es común en bosques siempreverdes, zona Atlántica y Rivas, Granada, ausente en Volcán Mombacho (dado que es considerado un sitio de alto endemismo de especies vegetales) (Poepping, 2009).

Coussapoa Glaberrima

Son árboles de hasta 30 m de alto cuando crecen independientemente, esencialmente glabros pero diminutamente seríceos en las estípulas. Hojas elípticas a obovadas, 7–14 cm de largo y 2.3–6 cm de ancho, abrupta y cortamente acuminadas a redondeadas en el ápice, agudas en la base, con 2–3 pares de nervios secundarios arqueados, lisas en el haz, glabras; pecíolos 0.6–1.5 mm de largo, glabros. Pedúnculos estaminados de 2.5–4 cm de largo; pedúnculos pistilados de 1.5–4 cm de largo.

Se extiende desde Nicaragua hasta Panamá. En Nicaragua se encuentra principalmente en Río San Juan y en el Atlántico Sur (Burger, 1973).

Cecropia Obtusifolia

Habita en climas tropicales, cálidos, semicálidos y templados, desde el nivel del mar hasta los 1500 m.

Es un árbol de 5-20 m de altura. Hojas profundamente lobadas, de 10-13 lóbulos, escabrosas a casi glabras y ásperas en el haz, aplicado-tomentosas en el envés, con 28-43 pares de nervios secundarios partiendo de los nervios primarios más largos, pecíolos de 7 dm de largo, uncinado-puberulentos. Pedúnculos estaminados 9-12 cm de largo, espatas 14-17 cm de largo y 1.5-2 cm de ancho antes de abrirse. Se reconoce por sus hojas con haz áspero y por tener mayor número de lóbulos que las otras especies (Bertoloni, 1840).

Se usa en Nicaragua como planta potencialmente alimenticia, especie de importancia ecológica, fibra, y uso en medicinal popular como remedio antidiabético, para lo cual se

realiza una infusión de las hojas, ramas, cortezas y raíz como “agua de uso”. Aunque también puede ser utilizado para: afecciones renales, destrucción de verrugas, asma, afecciones nerviosas, dolor de estómago, tosferina (Bolt, 2010).

Se encuentra desde México hasta el norte de Sudamérica. En Nicaragua se encuentra en las zonas altas y montañosas, común en bosques siempreverdes, conocido como “Guarumo de Altura”. Se encuentra en general en todo el territorio, pero más en las zonas intervenidas o con cierto proceso de recuperación (Bolt, 2010). Ha sido encontrado en zona Atlántica y Norcentral (Bertoloni, 1840).

Cecropia Insignis

Es un árbol de hasta 10-30 m, las hojas presentan de 7-8 lóbulos, glabrescentes y lisas en el haz, aplicado-aracnoides en el envés, con 18-22 pares de nervios secundarios partiendo de los nervios primarios más largos; pecíolos de hasta 9 dm de largo, persistentemente aplicado-lanosos. Pedúnculos estaminados cerca de 10 cm de largo, espatas 10-15 cm de largo y 2-4 cm de ancho antes de abrirse ,espigas 5-7, 6-16 cm de largo y 6-15 mm de grueso (Liebmann, 1851).

Se extiende de Honduras al Ecuador. En Nicaragua se encuentra ubicada en Río San Juan, Atlántico Norte y Jinotega (Zona Atlántica y Norcentral) (Liebmann, 1851).

Cecropia Peltata

Caracterizada por hojas peltadas, redondeadas, coriáceas, de 30-40 cm de diámetro, divididas en 7-11 lóbulos unidos cerca de la base (cerca de ½ de la distancia entre el borde y la base), enteros o algo sinuosos; tienen el haz áspero al tacto, y el envés blanco-tomentoso, con la nervadura sobresaliente en el envés. Pecíolo de 30-50 cm de longitud, tomentoso. Pedúnculos estaminados 4- 12 cm de largo, espatas 2.5-6.5 cm de largo y 1.5- 3.5 mm de ancho antes de abrirse, espigas de 20- 40, 1.5- 4.5 cm de largo y 2-3 mm de grueso; Pedúnculos pistilados 1.7- 9.5 cm de largo, espata de 1.5-4 cm de largo y 5- 15 mm de ancho antes de abrirse, espigas 4- 5, 4- 7 cm de largo y de 3-10 mm de grueso (Linnaeus, 1759).

Se encuentra ampliamente distribuida en América tropical desde el Sur de México, de donde es nativa hasta el Norte de Suramérica incluida Las Antillas. En Nicaragua es común en bosques secos en la zona pacífica y ocasional en las zonas Norcentral y Atlántica (Linnaeus, 1759).

Cecropia Sylvicola

Árboles del dosel de 8–15 m de alto. Sus hojas presentan 11–12 lóbulos, glabras pero ásperas en la haz, pilosas y aplicado-aracnoides en el envés, con 30–40 pares de nervios secundarios en el nervio primario más largo; pecíolos hasta 6 dm de largo, pilosos. Pedúnculos pistilados 0.7–2 cm de largo, espatas 3–6 cm de largo y 12–30 mm de ancho antes de abrirse, espigas 4–5, 6–7 cm de largo y 8– 10 mm de grueso.

Se localiza en nebliselvas de Jinotega y Matagalpa en Nicaragua y en Guatemala 1200–1400 m; de las especies que se encuentran en Nicaragua, es la única que no es habitada por hormigas. Una especie rara vez colectada cuya distribución probablemente refleja la dificultad de colectarla en vez de la verdadera abundancia o distribución. Está probablemente relacionada con *Cecropia Polyphlebia* de Costa Rica y Panamá y con *Cecropia Angustifolia* Trécul de Sudamérica (Standley, 1963).

Pourouma Bicolor

Árbol de hasta 30 m de altura, hojas palmatilobadas de 12-50 cm de largo y 10-40 cm de ancho, con 16-24 pares de nervios secundarios en el nervio primario más largo, escabrosas en la haz, aplicado-aracnoides en el envés; pecíolos de 12-32 cm de largo, levemente acostillados, aplicado-pilosos. Flores pistiladas en panículas de glomérulos, pedicelo cupuliforme en el ápice. Antacarpos 1.2-1.5 cm de largo (Martius Karl, 1843)

Llamada popularmente “Pasica”, se extiende de México hasta Perú. En Nicaragua se encuentra en bosques de la zona Atlántica Norte y Sur, Jinotega, Nueva Guinea y Río San Juan (Martius Karl, 1843).

Pourouma Minor

Son árboles hasta 25 m de alto. Hojas enteras, angostamente elípticas, 10–30 cm de largo y 4–12 cm de ancho, con 15–25 pares de nervios secundarios, aplicado-aracnoides en el envés; pecíolos 2–8 cm de largo, acostillados, aplicado-pubescentes. Flores pistiladas en umbelas, pedicelo no cupuliforme en el ápice. Antocarpos 1.5–2.2 cm de largo.

Se encuentra en Nicaragua, Perú, Amazonia Brasileña y las Guayanas. En Nicaragua se encuentran en Jinotega y Río San Juan (Benoist, 1924).

Coussapoa Nymphaeifolia

Generalmente epífitas o a veces árboles de hasta 20 m de alto, tallos pubérulos, estípulas densamente seríceas. Hojas oblongas o a veces obovadas u ovadas, 20–37 cm de largo y 15–29 cm de ancho, redondeadas a redondeado-apiculadas en el ápice, cordadas, subcordadas o a veces redondeadas en la base, con 7–10 pares de nervios secundarios rectos, glabras y lisas en la haz, adpreso-aracnoides en el envés; pecíolo 3.5–15 cm de largo, pubérulo a glabro. Pedúnculos estaminados 2.5–4 cm de largo, capítulos numerosos (15 a más de 50) por inflorescencia, 4–7 mm de diámetro cuando están en flor; pedúnculos pistilados hasta 0.5 cm de largo, 1–2 cm de diámetro cuando está en flor, 1.5–2 cm de largo y 2.5–3 cm de ancho en fruto.

Se espera encontrar en Río San Juan ya que se conoce al otro lado de la frontera en las provincias de Heredia y Alajuela, Costa Rica; endémica de Costa Rica (Standley, 1963).

2.3- DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *CECROPIA PELTATA*

2.3.1.- Clasificación Taxonómica

Tabla 2.1: Clasificación taxonómica de la especie *Cecropia Peltata*

Reino	Plantae
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Urticales
Familia	Cecropiaceae
Género	<i>Cecropia Peltata L</i>
Nombre común en Nicaragua	Guarumo blanco, Pasica
Sinonimia	C. amphiclora

Fuente: (www.una.edu.ni)

2.3.2- Características

Tallo: árbol dioico de rápido crecimiento de 5-10 m de altura, en sus zonas de origen puede alcanzar más de 20 m, tronco derecho, hueco, produce con el tiempo raíces zancudas, corteza lisa, gris clara, con grandes cicatrices circulares de las estípulas caídas y abundantes lenticelas. Ramas gruesas, horizontales. Ramillas huecas, tabicadas, con numerosas cicatrices anulares y lenticelas. Yemas cubiertas por una estípula, pubescente, caediza.

Los tallos tienen huecos llenos de hormigas donde viven protegiendo al árbol del ataque de animales y de ciertas especies de plantas, tales como lianas (Mutualismo).

Frutos: Infrutescencia formada por numerosos aquenios muy pequeños junto con el perianto persistente. Desarrolla flores y frutos durante todo el año, especialmente durante Junio- Octubre.

Flores: Flores masculinas dispuestas en espigas y éstas en grupos de 15-40, sobre pedúnculos de 4-12 cm de largo, con espigas de flores femeninas dispuestas en espigas, sobre pedúnculos, con espigas (www.una.edu.ni)

Hojas: Peltadas, redondeadas, coriáceas de 30-40 cm de diámetro, divididas en 7-11 lóbulos unidos cerca de la base, enteros o algo sinuosos; tienen el haz áspero al tacto, y el envés blanco-tomentoso, con la nervadura sobresaliente en el envés. Pecíolo de 30-50 cm de longitud, tomentoso. Las estípulas envuelven las hojas; caedizas (www.una.edu.ni).

2.3.3- Ecología

Es una especie de crecimiento rápido. Requiere climas suaves, con humedad ambiental y suelos medianamente fértiles y que drenen bien. Sus raíces son superficiales y su vida es corta. Su látex al parecer es algo tóxico y en sus ambientes nativos forman alianzas con las hormigas (mirmecofilia). Es un árbol típico de la vegetación pionera, crece en los rastrojos, por lo que es ideal para proyectos de reforestación. Pueden crecer en cualquier parte, incluyendo las paredes y pilares de cemento de los puentes y otras construcciones (www.una.edu.ni).

2.3.4- Distribución Geográfica

Es un árbol representativo de la zona intertropical Americana y se extiende desde México a través de América Central y las Antillas hasta Venezuela y Colombia. Es común en tierra caliente, aunque puede llegar a alcanzar más de 2000m de altura en las laderas montañosas formando parte de lo que se conoce como selva nublada. Las pocas colecciones de ésta especie que se han realizado en ambientes más húmedos, presentan hojas más grandes y profundamente lobadas, las cuales son apenas discoloras; puede ser confundida con *Cecropia Obtusifolia* (Linnaeus, 1759).

En Nicaragua es común en bosques secos en la zona pacífica, ocasional en las zonas Norcentral y Atlántica (www.una.edu.ni). Se encuentra en Bluefields, Bilwi, Juigalpa, Río San Juan de Nicaragua, Rivas, Granada, Laguna de Masaya (Seymour, 1970), Managua, León, Chinandega, Estelí, Madriz, Reserva Natural Bosawás (Bolt, 2010), Jinotega, Boaco, Nueva Segovia, Chontales y Matagalpa y en general en todo el territorio, pero más en las zonas intervenidas y con cierto proceso de recuperación (Linnaeus, 1759).

2.3.5- Componentes Químicos

Están presentes en las hojas los alcaloides, cecropina y ambaína; policarpol, kylopina y sitosterol; ácidos fumárico, cafeico, miricífico, mirístico, clorogénico; beta sitostenona, glucosa, celobiosa, leucocianidina, isoorientina (Haiek Gerard, 2010). Sus hojas además contiene amabaina, camphol, gerantol, limoneno, linalool, 2-pineno, compuestos fenólicos, ácido ursólico, ácido hambálico, lupeol (Bolt, 2010)

Se han evidenciado leucocianidinas en la hoja, ácido ursólico en la corteza y alcaloides en la savia (Cabrera, 2005). Algunos estudios fitoquímicos sugieren la presencia de aminas, lípidos, saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, triterpenos y esteroides. En un estudio previo realizado con el grupo de control “Principios Bioactivos de Plantas Medicinales” empleando hojas con pecíolo, se detectaron esteroides y triperpenos, antraquinonas, flavonoides, taninos y se evidenció la ausencia de alcaloides, saponinas y cumarinas (Hernández Carvajal, 2012).

En otro estudio se realizó el análisis fitoquímico y actividad antimalárica de dos especies de *Cecropia* por Hernández Carvajal en el 2012, en el cual se elaboraron extractos etanólicos a partir de los cuales se obtuvieron fracciones en éter de petróleo, acetato de etilo, butanol y agua, estos fueron caracterizados fitoquímicamente y se determinó su actividad *in vitro* frente a plasmodium falciparum cepa FCB-2 (cloroquina resistente). Se detectó la presencia de flavonoides, taninos, esteroides y terpenos, ausencia de alcaloides, saponinas, quinonas, derivados antracénicos, cumarinas y lactonas terpénicas. Los perfiles cromatográficos por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (FR-CLAE) de los extractos, mostraron compuestos de alta, mediana y baja polaridad.

En las sub-fracciones en éter de petróleo de *Cecropia Metensis* (*C. Peltata*) y de *Cecropia Membranaceae* se identificaron: β sitosterol y γ - sitosterol y estigmasterol. En las sub fracciones obtenidas por cromatografía de columna (CC) a partir de las fracciones butanólicas de las dos especies, se identificaron por CLAE (Cromatografía Liquida de alta eficacia) los ácidos protocatéuico y clorogénico, además de los flavonoides rutina y vitexina.

Según Cetto A. & Cárdenas, 2010 contiene ácido clorogénico, un inhibidor de la glucosa-6- fosfatotranslocasa.

2.3.6- Propiedades Terapéuticas

El primer estudio científico realizado sobre las propiedades medicinales del Guarumo se debe al médico Venezolano Dr Michelena, quien en 1862 lo recetaba con magníficos resultados contra las enfermedades bronquiales. Años más tarde el Dr. Antonio Rodríguez, Profesor de la Universidad de Caracas, comprobó ésta acción (Cabrera, 2005).

Las leucocianidinas son factor vitamínico P, es antihemorrágico. La decocción de la hoja tiene actividad diurética en ratas al administrarla por intubación orogástrica en dosis de 1g/Kg. Los extractos de hoja y rama, entre ellos el extracto acuoso a dosis de 0.33mL/L, mostraron actividad espasmogénico sobre íleon aislado de cobayo (Cabrera, 2005).

En 1889 el Botánico de Campanema, como fruto de sus investigaciones realizadas en Brasil, preparó un jarabe al cual dio nombre de Cecropina, muy eficaz contra el asma.

El Guarumo como medicamento mereció el estudio de los doctores P. Carnot y Gilbret quienes le encontraron propiedades muy parecidas a las del digital (sin ser acumulable). Actúa principalmente aumentando la energía de las contracciones del músculo cardíaco y como diurético, puede triplicar o cuadruplicar la cantidad de orina.

Según investigaciones realizadas por el Dr. Langen está plenamente comprobada su acción terapéutica sobre las afecciones pulmonares, cardiohepáticas y cardiorrenales. También el Dr. Hossel ha comprobado su acción en las enfermedades del corazón, en donde puede remplazar al digital con muchas ventajas (Cabrera, 2005).

Las hojas y corteza son astringentes y antiblenorrágicas; las hojas se han empleado en cocimiento para combatir convulsiones y movilidad nerviosa. El extracto acuoso en dosis de 1 g/Kg i.p, determinaron al cabo de un corto tiempo una disminución de la actividad locomotriz y una discreta prolongación del sueño inducido por barbital.

También se mencionan actividad analgésica, actividad antimicótica *in vitro* del extracto etanólico preparado a una concentración del 50 % contra *Neurospora crassa*. Sin embargo, los extractos acuosos y cetónico se mostraron inefectivos. La tintura de la hoja de *Cecropia Peltata* ha demostrado su ineficacia *in vitro* frente a *Neisseria Gonorrhoeae* resistentes a la penicilina y contra enterobacterias del género *Salmonella*. Los extractos acuosos y etanólicos de corteza y hojas mostraron actividad contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Ensayos farmacológicos demuestran actividad depresora del Sistema nervioso central (Gil Contreras, 2005).

Los extractos acuoso, alcohólico y cetónico de la planta exhibieron actividad citostática *in vitro*, pero ésta actividad no fue corroborada posteriormente sobre el modelo experimental de carcinoma de colon humano con diferentes extractos de hojas incluido el acuoso (Cabrera, 2005).

Su efecto hipoglucémico ha sido demostrado por Cetto A. & Cárdenas en el 2010, indicaron que el posible mecanismo de la actividad de la planta es por la reducción hepática de glucosa en la inhibición de glucosa-6-fosfatasa por el ácido clorogénico simultáneamente con la gluconeogénesis y glucogenólisis.

Se utiliza la cocción de las hojas como antiasmática, antirreumática y contra enfermedades de la piel que producen insoportable escozor. Las hojas se usan como alcaloides, como sustancias tóxicas y en la medicina popular. Se menciona entre las especies más investigadas en el Sistema Agroforestal de Nicaragua.

Se han indicado diferentes actividades farmacológicas: actividad cicatrizante del extracto etanólico de las hojas, efecto hipoglucemiante del extracto acuoso y fracción butanólica de las hojas, correlacionando ésta actividad con la presencia de ácido clorogénico. El cocimiento del fruto administrado por ingestión oral, genera un efecto laxante (Hernández Carvajal, 2012).

2.3.7- Usos en Nicaragua

Se usa como leña, sombra de café. Algunos campesinos lo usan para envolver alimentos, para expulsar placenta con sal, en cocción buena para el asma, y las cáscaras en remojo por 2 días, es usada para el tratamiento de los riñones. Los tallos huecos son utilizados por los campesinos para hacer cañería para transportar agua, las hojas son utilizadas para empaque de cuajadas, el carbón de la madera se dice que es excelente para la fabricación de pólvora (Grijalva Pineda, 2006).

2.3.8- Recetas populares

- Las hojas con sal son aceptadas por las vacas y comidas con avidez. Si las vacas después del parto no han podido expulsar la placenta, se les da hojas de guarumo con sal y son expulsadas muy fácilmente (4 onzas de hojas frescas trituradas en 1 L de agua, 3 veces al día).
- Para el tratamiento de infecciones en los riñones, se utilizan unos 8 pedazos de cáscaras, de 10 cm cada uno, en remojo por 2 días en un litro de agua, 3 veces al día.
- El líquido lechoso y cáustico que produce el tallo lo usan para destruir verrugas.
- El cocimiento de las hojas (1 hoja /L de agua) opera bien en el asma y otras afecciones nerviosas, 3 tazas al día de ésta infusión.
- Para tratar el dolor de estómago y para calmar los nervios se hace horchata de las hojas y se bebe cuando hace falta.
- Para tratar afecciones urinarias y tos ferina se usa decocción de la raíz. Como en todas las infecciones, se requiere un tratamiento sistemático de al menos 5 días, 3-4 veces al día. Se utiliza un pedazo de la raíz de unos 20 cm, bien picados, por litro de agua (Bolt, 2010).
- La tintura en proporción de una parte de hojas frescas de Guarumo y tres partes de alcohol de 40° se prescribe a dosis de 5 gotas cada 2 horas contra las siguientes enfermedades: bronquiales y pulmonares, asma, hidropesía, tosferina y afecciones nerviosas; facilitar la menstruación y regularizar funciones del corazón (Cabrera, 2005)

2.3.9- Toxicidad

La DL₅₀ del extracto acuoso de hoja y rama administrada intraperitoneal en cobayos es de 0.1mL/animal (Cabrera, 2005).

Los estudios de toxicidad aguda a partir del suministro a ratones de la infusión de corteza de ésta especie resultaron negativos en dosis de 1-5 g/Kg. Únicamente los extractos acuoso y etanólico de las hojas y corteza demostraron ser altamente toxicas para peces del género *Millinesia sp* a las 24 horas de la administración (Alonso, 2004).

2.4- ÁCIDOS CLOROGÉNICOS

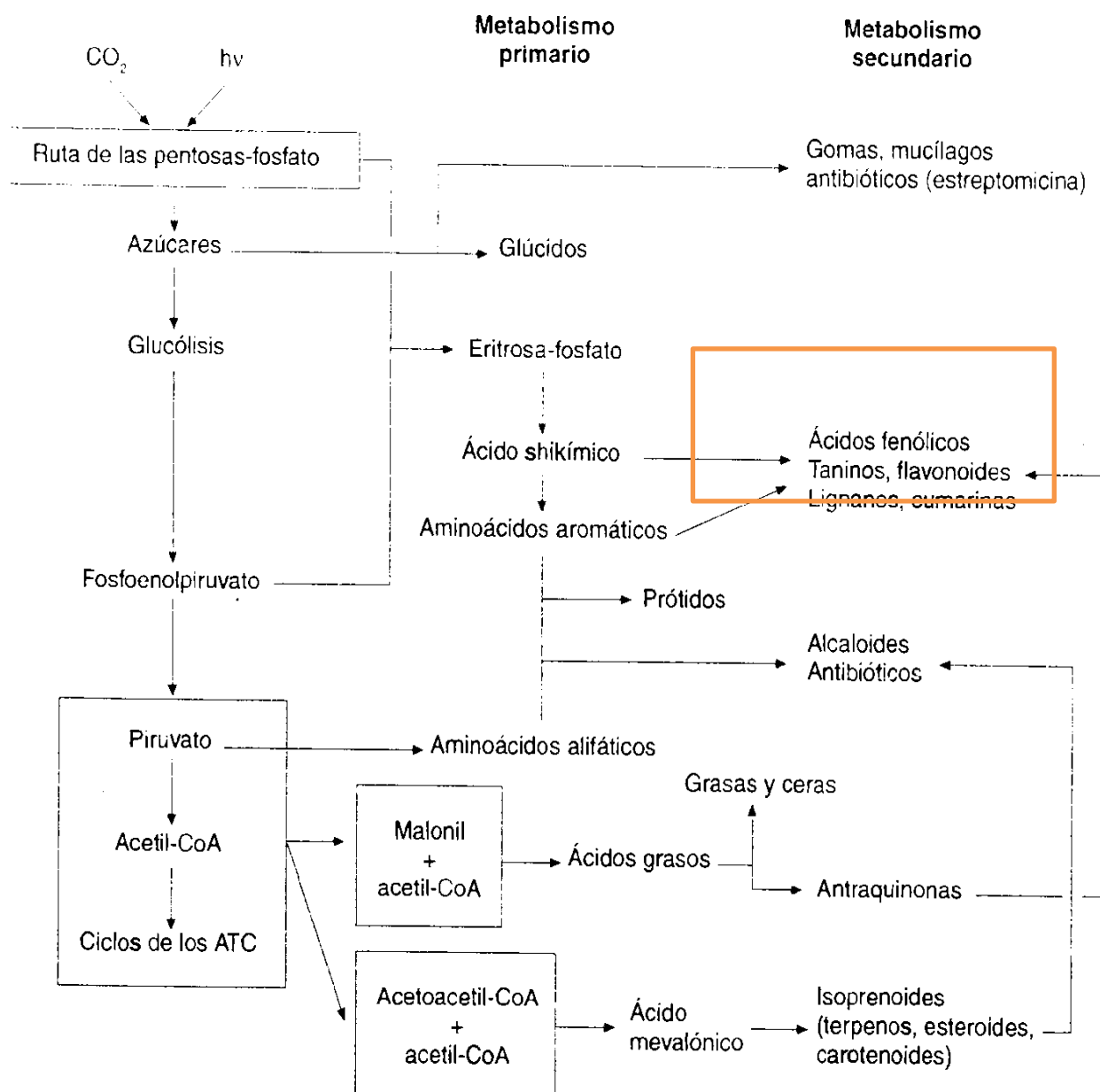
Son ésteres del ácido quínico, no se debe confundir el ácido clorogénico con el término "ácidos clorogénicos" que se refieren a ácidos derivados del ácido cinámico por esterificación con ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico o quínico. Éste último - ácido cafeoilquínico- es el ácido clorogénico como tal (IQB, 2010).

2.4.1- Biosíntesis de compuestos fenólicos

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato.

La ruta de shiquimato es la mayor fuente de formación de compuestos aromáticos tales como fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos (Kuklinski, 2000).

Ilustración 2.1: Ruta de formación de fenoles

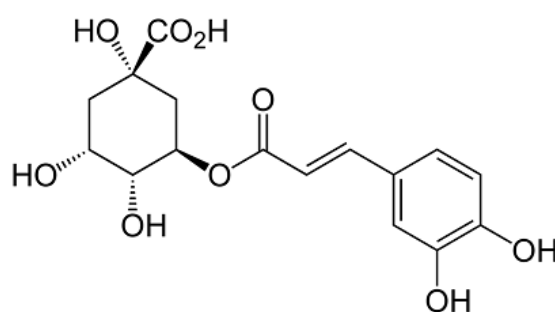


Fuente: (Kuklinski, 2000)

2.4.2- Ácido clorogénico (AC)

El ácido clorogénico pertenece a los ácidos fenólicos derivado del ácido cinámico, el cual se encuentra formando éster con el ácido quínico.

Ilustración 2.2: Fórmula estructural del ácido clorogénico



Fuente: (<http://www.lineaysalud.com>, 2013)

El ácido clorogénico es derivado de un éster fenólico entre el ácido cafeico y el ácido quínico, nombres alternativos: ácido 3- O- cafeolquínico ácido 1, 4, 5, trihidroxiciclohexanocarboxílico 3- (3, 4- Dihidroxicinamato), 3[[3-(3, 4-Dihidroxifenil)-1-oxo- 2-profenil] oxo]; Su fórmula química es $C_{16}H_{18}O_9$, de peso molecular = 354.3 g/mol (Acros Organics, 2009).

Se han atribuido al ácido clorogénico numerosas propiedades farmacológicas, tales como antioxidantes, analgésicas, antipiréticas y actividad quimioprotectora (Enzo Life Sciences, 2013).

Se han dirigido estudios metabólicos para establecer la correlación entre el consumo de café, que presenta un alto contenido en éste componente y la diabetes, demostrando que los polifenoles existentes y principalmente el ácido clorogénico que se encuentra en concentraciones elevadas en ésta bebida, tiene gran poder antioxidante. Así mismo se ha

postulado que éste actúa protegiendo a las células beta del páncreas y además, disminuye la absorción intestinal de glucosa aumentando los niveles del péptido tipo glucagón-1(GLP-1) y disminuyendo los del polipéptido insulínico dependiente (GIP), fenómenos que se traducen en disminución de la glucosa plasmática (Nicasio Torres, 2009).

El ácido clorogénico es un inhibidor específico de la glucosa-6-fosfatasa en los cromosomas de los hígados de las ratas. Simultáneamente está focalizado en la gluconeogénesis y glucogenólisis resultando una reducción de la producción de la glucosa hepática. El efecto hipoglucémico observado en ratas después de 5 h puede ser debido a una producción de glucosa hepática resulta un estado hipoglucémico (Cetto A. & Heinrich, 2005).

2.5- BREVE DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS UTILIZADOS

2.5.1- Cromatografía de capa fina

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicaciones en todas las ramas de la ciencia. Su nombre se deriva del griego chroma que significa “color” y graphein que significa “escribir” (Skoog, 2001).

La cromatografía se define como un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la que sustancias individuales presenta diferentes movibilidades a causas de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias individuales así separadas se pueden identificar o de terminar mediante procedimientos analíticos.

En la cromatografía en capa delgada, el adsorbente es una capa relativamente delgada y uniforme de material seco, reducido a polvo fino, que se aplica sobre una lámina o placa de vidrio, plástico o metal, las que se utilizan más comúnmente son las de vidrio (United States Pharmacopeia, 2007).

La cromatografía en capa delgada de capas de intercambio iónico puede emplearse para separar compuestos polares. La identificación presuntiva se puede efectuar mediante la observación de las manchas o zonas con valores de Rf idénticos y de magnitud aproximadamente igual, obtenidos respectivamente cromatografiando una muestra desconocida y una muestra de referencia en la misma placa.

Una comparación visual del tamaño o intensidad de las manchas o zonas puede servir para una estimación semicuantitativa. Las mediciones cuantitativas se pueden efectuar mediante densitometría (mediciones de absorbancia o de fluorescencia) o bien pueden retirarse cuidadosamente las manchas de la placa, luego eluirse con un disolvente adecuado y medirse espectrofotométricamente. (United States Pharmacopeia, 2007)

2.5.2- Espectrofotometría de absorción

La espectrofotometría de absorción es la medición de una interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas o átomos de una sustancia química. Las técnicas que se emplean frecuentemente en el análisis farmacéutico incluyen la espectroscopía de absorción atómica, en el espectro Uv, en el Visible y en el Infrarrojo (United States Pharmacopeia, Espectrofotometría y dispersión de luz, 2007).

La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia (T) o de la absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b (en cm). Normalmente la concentración de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como representa la ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc$$

Donde ϵ representa la absortividad molar o coeficiente de extinción molecular.

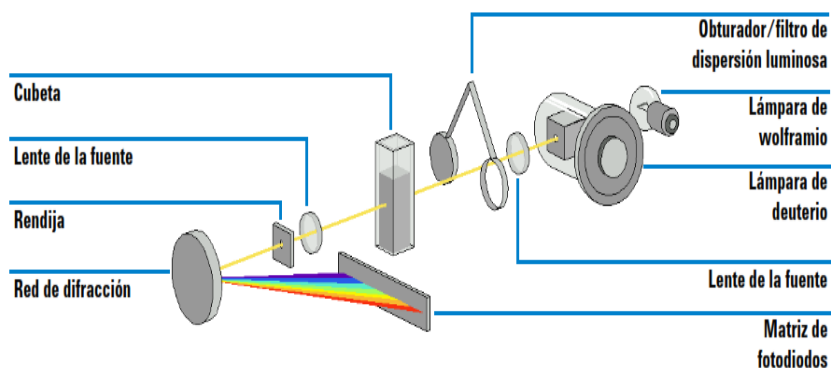
Instrumento de haz sencillo: Consta de una fuente de radiación, un filtro o un monocromador para la selección de la longitud de onda, cubetas contrastadas que pueden interponerse alternativamente en el haz de radiación, detector, amplificador y un dispositivo de lectura. Normalmente, un instrumento de haz sencillo necesita una fuente de alimentación estabilizada para evitar errores como resultados de los cambios en la intensidad del haz durante el tiempo requerido para ajustar el 100 por 100 T y determinar el porcentaje T del analito (Skoog, 2001).

El equipo utilizado en éste estudio consta de un sistema óptico mostrado en la ilustración 2.3, su fuente de radiación consiste en una combinación de una lámpara de descarga de deuterio para el rango de longitudes de onda ultravioleta (Uv) y una lámpara de walframio para el rango de longitudes de onda visible y de onda corta de infrarrojo cercano (SWNIR). (Agilent Technologies, 2003).

La ventaja de una matriz de diodos en éste equipo junto con una potente evaluación de datos basada en *Agilent ChemStation*, ofrece numerosas ventajas en comparación con los sistemas tradicionales de espectrofotometría. Tales como:

- ▶ Número prácticamente ilimitado de patrones: gracias a esto, los patrones se pueden medir antes o después de las muestras y además del número de patrones necesarios, es posible utilizar tantos patrones como se desee en la calibración.
- ▶ Sencilla optimización: la disponibilidad de los datos sin procesar (muestras y patrones) permite optimizar fácilmente los valores del método eligiendo una longitud de onda de calibración diferente y volviendo a calibrar el sistema.
- ▶ Métodos de calibrado: cuando se guarda el método, los estándares que se encuentran en ese momento en la memoria siempre se guardan con el método.
- ▶ Optimización para una muestra concreta: Se pueden optimizar los valores de longitud de onda para una muestra situada fuera del rango lineal de la calibración real.

Ilustración 2.3: Sistema óptico del espectrofotómetro *Agilent 8453*



Fuente: Agilent Technologies, 2003

El espectrofotómetro dispone de un compartimiento de muestra abierto para facilitar el acceso a las celdas de muestra, por su diseño óptico no necesita una cubierta para la zona de la muestra (Agilent Technologies, 2003)

Apartado III: Hipótesis



HIPÓTESIS

La especie *Cecropia Peltata* de crecimiento silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya contiene ácido clorogénico en hojas secas y verdes, el cual varía su concentración dependiendo de la altura del árbol y puede ser determinado por el método de cromatografía de capa fina y espectroscopía Uv/Vis.

Apartado IV: Diseño Metodológico



4- DISEÑO METODOLÓGICO

4.1- TIPO DE ESTUDIO

Estudio Experimental cuantitativo ya que se basa en un estudio en el cual se manipulan una o más variables independientes como altura del árbol y el secado de las hojas para analizar sus consecuencias en el contenido de ácido clorogénico en las hojas de Guarumo *Cecropia Peltata* (H. Sampiere, 1997).

4.2- ÁMBITO DE ESTUDIO

Reserva Natural Laguna de Apoyo Masaya, Nicaragua, ubicada a aproximadamente 42 Km de la ciudad de Managua y a 8 km al sureste de la ciudad de Masaya, entre las coordenadas 86° 05' 10.5" longitud Oeste y 11° 50' 27.6"-11°58'45.4" latitud Norte.

4.3- UNIVERSO

Todas las especies de Guarumo de crecimiento silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo de Masaya, Nicaragua.

4.4- MUESTRA

Se seleccionaron de manera intencional hojas adultas verdes, sanas y en buen estado físico de tres árboles vigorosos con aproximadamente 10, 15 y 20 m de altura respectivamente, de la especie *Cecropia Peltata* de crecimiento silvestre en el Sector La Pila de San Juan de la Reserva Natural Laguna de Apoyo en Masaya, Nicaragua durante el período Marzo-Junio 2013.

4.5. CRITERIOS DE SELECCIÓN

4.5.1 Criterios de inclusión

- ✓ Hojas adultas en buen estado físico de *Cecropia Peltata*
- ✓ Hojas de árboles vigorosos con aproximadamente 10, 15 y 20 m de alto,
- ✓ Árboles de crecimiento silvestre en la Reserva Natural Laguna de Apoyo Masaya Nicaragua.
- ✓ Hojas recolectadas en el período de Mayo-Junio 2013.

4.5.2 Criterios de exclusión

- ✓ Hojas con diámetros menores a 40 cm,
- ✓ Hojas en mal estado físico (hojas con manchas o signos de enfermedades)
- ✓ Hojas secas caídas del árbol
- ✓ Árboles fuera de la Reserva Natural Laguna de Apoyo y recolectadas fuera del periodo Mayo-Junio, 2013.

4.6. VARIABLES DE ESTUDIO

4.6.1- Variable independiente

Altura de árbol

4.6.2- Variable dependiente

Concentración de ácido clorogénico, Absorbancia

4.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES			
Variable independiente	Concepto	Indicador	Valor
Altura	Distancia que mide un árbol desde su raíz hasta la parte más elevada de un árbol	Cualitativo y cuantitativo	10, 15 y 20 m de alto

Variable independiente	Concepto	Indicador	Valor
Ácido clorogénico	Compuesto químico formado por un éster del ácido cafeico y ácido quínico, también conocido como ácido -3-O-cafeolquínico.	Cualitativo y Cuantitativo	1.9 ± 0.2, mg AC /g hoja
Absorbancia	Medida de la absorción de luz por una sustancia.	Cuantitativo	324 nm

4.8- MEDIOS

4.8.1-Recursos Institucionales:

- Asociación de Municipios Integrados por la Cuenca y Territorios de la Laguna de Apoyo de Nicaragua, AMICTLAN Masaya.
- Laboratorio ISNAYA, Estelí.
- Laboratorio de Química, UNAN- Managua.
- Laboratorio Nacional de Residuos Químicos y Biológicos LNRQB, MAGFOR. Managua.

4.9- MATERIALES Y EQUIPOS

Tabla 4. 1: Lista de materiales y equipos utilizados en la fase experimental

Materiales utilizados para la toma de muestra	Cantidad
GPS Navegador <i>Etrex Venture HC</i>	1
Tijeras de jardín	1
Papel Kraft	10

Materiales utilizados en Pérdida por secado	
Balanza Analítica Marca <i>Mettler AE100</i>	1
Cápsulas de vidrio de poca profundidad con tapón de cristal	9
Desecador	1
Espátula	1
Guantes	2
Horno eléctrico Marca <i>Memmert UM 500 Serie 910798</i>	1
Pinzas	1

Materiales y equipos utilizados en extracción	Cantidad
Balanza Analítica <i>OHAUS Adventurer AR0640</i>	1
Baño María <i>JPSelecta</i>	1
Beaker 50 mL Pyrex	10
Beaker 500 mL Pyrex	1
Espátula	1
Embudo de filtración	3
Malla de asbesto	1
Matraz aforado de 100 mL Clase A	1
Matraz aforado de 50 mL Clase A	9
Mechero Bunsen	1
Papel Filtro de celulosa CFP40 de velocidad de filtración media, <i>Thomas Scientific</i>	28
Probeta 50 mL	2
Soporte universal	2
Termómetro de mercurio	1
Trípode	1
Varilla de vidrio	3

Materiales utilizados para identificación de fenoles	Cantidad
Beaker de 50 mL	6
Pipeta 10 mL	1

Materiales y equipos utilizados para cromatografía de capa fina	Cantidad
Balanza Analítica <i>OHAUS Adventurer AR0640</i>	1
Cámara cromatográfica de fondo plano con tapa de cierre hermético	1
Capilares desechables calibrados 10 μ L <i>Fisherbrand</i>	1
Guantes de látex	2
Micropipeta automática 500 μ L	
Placa para cromatografía en capa fina preparada en gel sílica 60 F ₂₅₄ 20 x 20 cm sobre un soporte de Aluminio <i>Merck</i>	6
Secadora de aire caliente	1
Probeta 50 mL	3
Regla milimetrada en cm	1
Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet <i>Spectroline</i>	1

Espectrofotometría UV/vis	Cantidad
Balanza Analítica <i>Mettler AE 200</i> serie 1113230494	1
Beaker de 50 mL	1
Beaker 1000 mL	1
Bureta Clase A de 25 mL \pm 0.03mL	1
Cubetas de cuarzo longitud de paso 1 cm	2
Espátula	1
Espectrofotómetro Uv/Vis <i>Agilent 8453</i> Serie N° <i>CN 22806643</i>	1
Frasco lavador o piseta	1
Guantes de Látex	
Matraz aforado 250 mL \pm 0.12 mL Clase A	1
Matraz aforado 50 mL \pm 0.05 mL Clase A	10
Papel de Aluminio	
Papel kleenex	

4.10- REACTIVOS

Tabla 4. 2: Lista de reactivos a utilizar en la fase experimental

Reactivos	Fórmula	Especificaciones
Agua Destilada	H ₂ O	Agua tetradestilada CAM, WB-4EA
Ácido Acético Glacial	CH ₃ COOH	MERCK, 1099440009
Ácido Clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	ACROS Organics, AC109240010-EA
Amoníaco	NH ₃	MERCK, 1054325000
1-Butanol	CH ₃ (CH ₂) ₃ OH	MERCK para análisis, 1019901000
Cloruro Férrico	FeCl ₃	MERCK, 8039450500
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	MERCK, 1009211000
Éter de petróleo	Mezcla de compuestos	J.T BAKER, 8116.1000
Metanol	CH ₃ OH	MERCK Grado HPLC, 106018400

4.11- FUENTES PARA OBTENER LA INFORMACIÓN

Fuentes bibliográficas:

- Primarias: libros, revistas científicas.
- Secundarias: Sitios web

4.12- MATERIALES PARA OBTENER INFORMACIÓN

- Tablas
- Tarjetas de control

4.13- MATERIALES PARA PROCESAR INFORMACIÓN

- Gráficos
- Esquemas
- Figuras

4.13- DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El método analítico aplicado para la determinación de ácido clorogénico en hojas de *Cecropia Peltata* se basa en el utilizado por Solís L. D & Herrera, 2005 y Belay A. & Gholap, 2009, los cuales fueron aplicados en una matriz de café, por lo cual se adaptó a las condiciones disponibles.

4.13.1- Selección y recolección del material vegetal

Las muestras se tomaron a partir de tres árboles de la especie *Cecropia Peltata* de aproximadamente 10, 15 y 20 m de alto, respectivamente (Anexo I: Figura 1), en el sector de La Pila de San Juan, en la Reserva Natural Laguna de Apoyo en Masaya (Anexo I, Figura 2).

Se seleccionaron 20 hojas adultas completas, no dañadas y sanas de cada árbol, de manera representativa, cortadas con tijera de jardín desinfectada. Se eliminó manualmente cualquier tipo de impurezas o material ajeno al de interés y se llenaron las fichas de recolección de muestras (Anexo II: Fichas). Las hojas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 5 minutos y enjuagadas con agua potable (Lérida, 2002), luego fueron secadas con papel toalla, sin dañarlas.

Las hojas destinadas al secado, se colocaron en tres pliegues de papel Kraft dobles debidamente rotulados, esparciéndolas y procurando que unas quedaran por el haz y otras por el envés y no sobresalieran por fuera del papel (Anexo I: Figura 3). Se armó un arreglo en forma de “T”, en donde se acomodaron los duplicados del material vegetal, orientado de tal manera que la menor longitud de la hoja quedara en la abertura del paquete. Se cerraron y amarraron los papeles. Éste proceso se repitió con las tres muestras. A continuación se realizó el montaje de todas las muestras colectadas, armando bloques de material alineados. Se rotuló adecuadamente y colocaron los arreglos dentro de una bolsa de nylon (Herbario Virtual UDBC, 2006) fueron envueltas en papel Kraft durante ocho días, mientras que las hojas verdes se utilizaron inmediatamente después de su recolección.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y protegido de la luz directa del sol. Las hojas secas se transportaron a las instalaciones del Laboratorio ISNAYA en Estelí para realizar ensayos preliminares y se redujeron de tamaño a través de un tamiz (Anexo I, Figura 4).

Las hojas verdes fueron cortadas en trozos pequeños con ayuda de una tijera desinfectada, se utilizaron inmediatamente después de su recolección y se analizaron en el Laboratorio del Departamento de Química en la UNAN Managua y posteriormente en el Laboratorio MAGFOR.

4.13.2- Pérdida por secado (Método gravimétrico)

Se pesó con exactitud 1 g de muestra de hojas secas trituradas en una cápsula vidrio con tapón de cristal de poca profundidad, tarada en una balanza analítica *Mettler AE 100* (previamente secada durante 30 min a 105 °C), se tapó y pesó con exactitud la cápsula y su contenido. Se distribuyó la muestra de manera uniforme y se colocó la cápsula en el horno eléctrico *Memmert UM500*, retirando el tapón y dejándolo en el horno.

Transcurrido el tiempo se abrió el horno cerrando rápidamente la cápsula, permitiendo que llegue a temperatura ambiente en un desecador con ayuda de pinzas y paño seco, dejándose enfriar durante 20 minutos antes de pesarlo. Se realizó el mismo procedimiento en hojas verdes. La operación fué realizada por triplicado para cada muestra, expresándose los resultados como porcentaje m/m (Anexo I, Figura 5) (United States Pharmacopeia, Artículos de Origen Botánico, 2007) (Marchantes C. Pilar, 2004).

4.13.3- Ensayos Preliminares

Utilizando hojas secas se realizó extracción hidroalcohólica por reflujo, según lo indicado por S. Palacios P. G. Wilson E. L. & Debenedetti (1999), en el Laboratorio ISNAYA en Estelí; sin embargo no se obtuvieron resultados satisfactorios en la identificación por cromatografía de capa fina aún usando amoníaco como revelador, aunque la mancha del estándar (AC) podía verse a simple vista (Anexo V: Resultados de Ensayos Preliminares, Esquema D).

También se realizó extracción alcohólica de acuerdo a Hildebert Wagner, 1996 (Anexo V, Esquema E), la cual sigue la metodología general de extracción de flavonoides para análisis por cromatografía de capa fina, dado que está estructuralmente relacionado a los mismos, pero al igual que la solución hidroalcohólica, resultó negativa la presencia de ácido clorogénico en su identificación a través de éste método.

Así mismo se realizó en ambas extracciones la prueba de identificación de fenoles con FeCl_3 metanólico, dando negativa ésta prueba.

En la Figura D y E en Anexo V se observan las placas en luz Uv de longitud de onda larga (365 nm) de extractos hidroalcohólico y metanólicos de hojas secas, respectivamente, donde no se observa ninguna mancha de las muestras más que solo la del estándar (AC).

Otro ensayo de interés que se realizó fue determinar la concentración adecuada del estándar ácido clorogénico para aplicar en las placas de CCF, diluyendo varias veces la solución estándar (preparada inicialmente de 100 mg/ 0.5 mL, hasta llegar a una concentración de 0.033 mg/ mL). Para evitar la pérdida de placas se realizaron algunas pruebas en placas de 10 cm de largo por 5 cm de ancho y otras en placas tamaño normal de 20 x 20 cm.

Finalmente se realizó el mismo procedimiento de identificación en infusiones de hojas verdes en una placa 10 x 5 cm dando positiva la presencia del ácido clorogénico, el cual sirvió como punto de partida para el análisis de ácido clorogénico en hojas verdes y secas de *Cecropia Peltata* (Figura F, Anexo 5).

4.14 -PREPARACIÓN DE LAS INFUSIONES

Se tomó 1 g del material vegetal seco y otra muestra de material vegetal verde, pesado con exactitud en una balanza analítica *OHAUS Adventurer AR0640* (Anexo III, Tabla G) se transfirió a un beaker de 50 mL, al cual se le agregó 50 mL de agua hirviendo y se colocó en un baño María a 78 °C por 60 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se llevó a volumen en un matraz aforado de 100 mL con agua tetradestilada *CAM* y posteriormente se filtró usando papel filtro de celulosa *Thomas Scientific*, en un embudo de filtración, trasvasando con ayuda de una varilla de vidrio. La solución resultante se diluyó 10 veces, tomando 5 mL del mismo y se llevó a volumen en un matraz aforado de 50 mL clase A con agua tetradestilada para posterior análisis (Anexo I: Figura 6).

4.15- PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE FENOLES

Se añadió 0.5 mL de solución de Cloruro Férrico *MERCK* (FeCl_3) metanólico al 5% a 1 mL de los extracto obtenidos. Se evidenció la presencia de compuestos fenólicos por la aparición de color azul verdoso resultante (Anexo I: Figura 7) (Modificada de J. Dueñas, 2011).

4.16- IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Se preparó la solución del estándar ácido clorogénico *ACROS Organics* de 99% de pureza predominantemente trans, disolviendo 40 mg del mismo en 3 mL de fase móvil usando una micropipeta.

La fase móvil fué constituida por una mezcla de alcohol butílico *MERCK*, agua tetradestilada *CAM*, ácido acético *MERCK* (60:25:15), (United States Pharmacopeia, 2007;

“Especificaciones de Reactivos”), mezclándose 72 mL butanol, 30 mL de agua tetradesilada y 18 mL de ácido acético glacial para obtener 120 mL de fase móvil necesarios para que la misma cubra 5 mm de la superficie de la placa en la cámara cromatográfica. Se saturó la cámara cromatográfica con la fase móvil y dejó que se equilibrara el sistema con los vapores del disolvente durante 1 hora 30 min aproximadamente.

Se marcaron las placas para cromatografía en capa delgada preparada en sílica gel 60F₂₅₄ sobre un soporte de Aluminio *MERCK* 20 x 20 cm, delineando suavemente, con un lápiz de grafito, una línea recta a 1.5 cm del borde inferior de la placa y se señaló ligeramente el punto de aplicación de la muestra y del estándar dejando 1.5 cm de distancia entre cada punto de aplicación. En el caso de las placas de 10 x 5 cm, se cortó con una cuchilla por el lado del soporte para no dañar el adsorbente.

Se aplicó un aproximado de 10 µL de las infusiones obtenidas usando microcapilares *Fisherbrand* calibrados para cada muestra y de la solución de ácido clorogénico estándar para obtener manchas circulares de 2- 5 mm de diámetro. Se realizó 3 aplicaciones en cada punto dejando secarse antes de la siguiente aplicación, y acelerando el proceso de secado con la ayuda de una secadora manual (United States Pharmacopeia, 2007; "Cromatografía").

Se colocó la placa en la cámara de manera que estuviera tan vertical como fuera posible y que las manchas de las aplicaciones estuvieran por encima de la superficie de la fase móvil, se cerró la cámara y se dejó que el sistema se equilibrara. Se desarrolló el cromatograma a temperatura ambiente permitiendo que la fase móvil ascendiera a una distancia de corrida de 7-10 cm, luego se retiró la placa, se marcó la posición del frente del disolvente y se secó utilizando una secadora de aire caliente (United States Pharmacopeia, 2007; "Cromatografía") (Anexo I: Figura 8).

Se observaron las placas secas bajo luz UV de longitud de onda larga (365 nm) en Ultraviolet Fluorescence Analysis Cabinet *Spectroline*. Se observó una sola mancha fluorescente de color verde con trazas de impurezas. No se usó revelador.

Se comparó el cromatograma de los extractos con el del estándar (AC), documentándose los resultados de la placa después de cada observación, midiendo y

registrando la distancia hasta cada mancha desde el punto de origen. Se determinaron los valores de Rf para las manchas principales usando la fórmula mostrada en el Anexo III, Cálculo 3.2 (World Health Organization, 1998).

4.17- CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

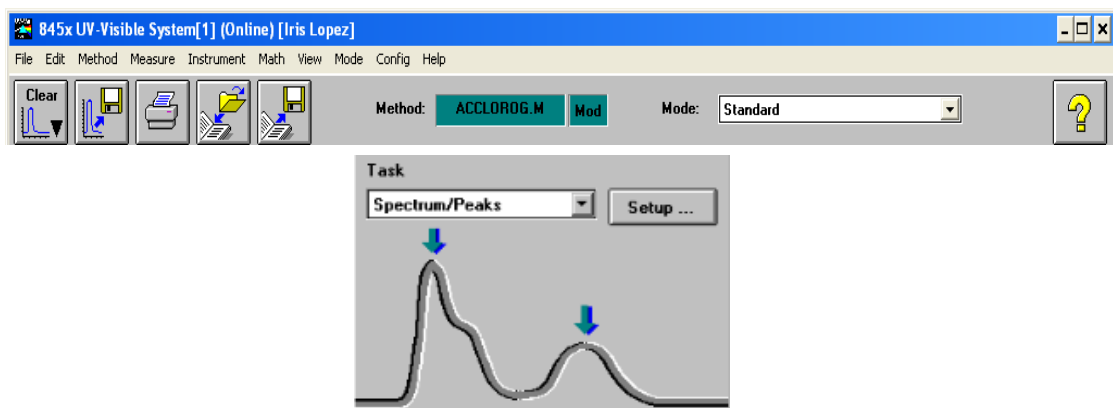
Previo al análisis se verificó que las cubetas estuvieran limpias, luego fueron lavadas con agua destilada y secada bien por fuera con papel kleenex y endulzadas con la solución a medir.

Se construyó una curva de calibración con el estándar ácido clorogénico (AC) en agua tetradestilada, para ello se preparó una solución madre inicial a 80 ppm pesando con exactitud 20 mg del mismo, se disolvió y llevó a volumen en un balón aforado de 250 mL. Se rotularon adecuadamente y se envolvieron los balones con papel aluminio (Anexo I, Figura 9).

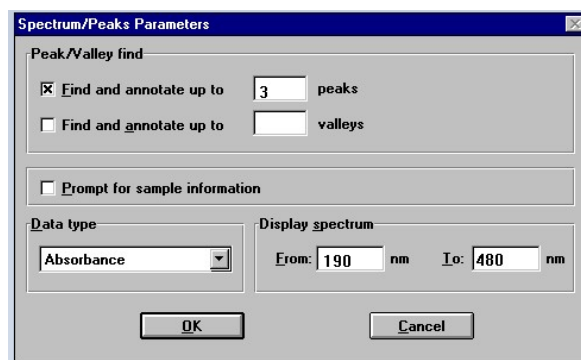
Medición en el espectrofotómetro *Agilent 8453*

1. Procesamiento Espectral

En la modalidad STANDARD (estándar) de la barra de herramientas se seleccionó la tarea SPECTRUM/ PEAKS (espectros/ picos) en el cuadro de selección del panel de análisis y SETUP (configuración) para abrir el cuadro de diálogo de parámetros.



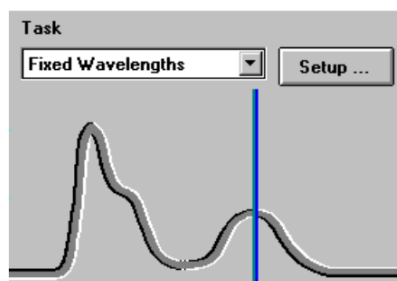
Se escribió 3 para el número de picos y valles a localizar y el tipo de datos de Absorbancia, se ajustó la presentación espectral a un rango de longitud de onda entre 190-480 nm en la sección DISPLAY SPECTRUM (mostrar espectro) del cuadro de diálogo. Seleccionar OK.



Se llenó con agua tetradestilada la celda de cuarzo con una longitud de ruta de 1 cm, y se insertó adecuadamente moviendo la palanca de bloqueo hacia arriba, comprobando que quedara orientada correctamente y se inmovilizó la celda de muestra empujando la palanca de bloqueo hacia abajo. Se dio clic en la opción BLANK del panel del instrumento para iniciar la medida.

Llenamos la celda con el estándar ácido clorogénico y pulsamos SAMPLE (muestra). Se presentó el espectro del estándar con los tres picos marcados y anotaron con la longitud de onda (λ de máxima absorción =324 nm).

2. Longitud de Onda fija



Se introdujo la longitud de onda de interés (324 nm) en WAVELENGTHS (longitudes de onda) del cuadro de diálogo FIXED WAVELENGTH (S) PARAMETERS (parámetros de longitudes de onda fijas). Se ajustó la presentación espectral a un rango de longitudes de onda

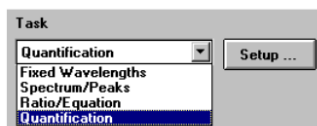
de 190- 480 nm en la sección DISPLAY SPECTRUM (mostrar espectro). Se dió clic en ACEPTAR para definir los parámetros.

Se llenó con agua tetradestilada la celda de cuarzo con una longitud de ruta de 1 cm y se pulsó BLANK (en blanco) situado en la parte frontal del equipo.

Retiramos la celda y se endulzó tres veces con la solución estándar de ácido clorogénico. Se cerró la palanca del soporte de celda y se pulsó SAMPLE (muestra) situado en la parte frontal del espectrofotómetro. Se presentó el espectro del estándar ácido clorogénico con una línea vertical que indica la longitud de onda de interés. Debajo del espectro aparece SAMPLE/ RESULT TABLE (muestra/ tabla de resultados).

Configuración para calibrar con patrones

En la modalidad STANDARD (estándar) seleccionamos la tarea QUANTIFICATION (cuantificación) en el cuadro de selección del panel de análisis.



Se abrió automáticamente el cuadro de diálogo QUANTIFICATION PARAMETERS (parámetros de cuantificación). Se seleccionó SETUP (configuración) del panel de análisis para abrir el cuadro de diálogo de parámetros.

Configuramos la longitud de onda del análisis a 324nm en USE WAVELENGTH (utilizar longitud de onda), se escribió ACCLOR como ANALYTE NAME (nombre del analito), se definió el tipo de curva de calibración como LINEAR (lineal), se seleccionó la entrada CONCENTRATION (concentración) y mg/L como UNIT (unidad). Se seleccionó ABSORBANCE (absorbancia) como tipo de datos y se seleccionó DISPLAY SPECTRUM (mostrar espectro) desde 190- 480 nm, clic en ACEPTAR (Agilent Technologies, 2003).

Calibración

Inicialmente se preparó una solución madre (SM) a 80 ppm del estándar ácido clorogénico *ACROS*. A partir de ésta solución se prepararon 9 diluciones (4- 40 ppm) tomándose el volumen adecuado de SM y se transfirió a un matraz aforado de 50 mL, se llevó a volumen con agua tetradestilada y se envolvió en papel de aluminio rotulando adecuadamente (Anexo III, Inciso 3.3.2).

Se construyó la curva de calibración con las diluciones del estándar. Llenamos con agua tetradestilada *CAM* la celda de cuarzo y se colocó en su posición asegurando el soporte. Pulsamos el botón BLANK (en blanco), retiramos la celda, y se llenó nuevamente con el blanco, retiramos la celda y endulzamos 3 veces con la solución estándar y se llenó con la misma, pulsamos el botón STANDARD (patrón). Se realizó el mismo procedimiento con las diluciones restantes, cada lectura de absorbancia se realizó por triplicado (Agilent Technologies, 2003).

Se llenó la información requerida del cuadro STANDARD INFORMATION (Información del patrón) y se seleccionó OK. La curva de calibración apareció en verde en el panel de tarea.

Se guardó el método eligiendo SAVE METHOD AS... (Guardar método como...) en el menú FILE (archivo), se escribió el nombre del método (ACCLOROG) en el campo FILE NAME (nombre del archivo) y se pulsó OK (Agilent Technologies, 2003).

Análisis de muestras

Se colocó en la celda la muestra a analizar, se pulsó el botón SAMPLE (muestra), y se escribió la información de la muestra en el cuadro de diálogo SAMPLE INFORMATION (información de la muestra) y ACEPTAR. Se realizó el mismo procedimiento con las 9 muestras obtenidas.

Se guardó los datos de la muestra seleccionando SAVE (guardar), SAMPLE AS... (muestras como...) en el menú FILE (archivo), se escribió el nombre del archivo en el cuadro de edición FILE NAME. Seleccionar OK (Agilent Technologies, 2003).

Dado que las concentraciones de las muestras no cubrían el rango de concentración preparada de estándar, se construyó otra curva de calibración preparando otra solución madre a 100 ppm y diluciones de 10-70 ppm (Anexo III: Inciso 3.3.3). Se trató de ajustar nuevamente seleccionando la opción calibrate, sin embargo las diluciones preparadas no cubrían el rango de las muestras y se volvió a preparar otra solución madre de 200 ppm y diluciones de 30-110 ppm, ajustándose las muestras a la curva (Anexo III: Inciso 3.3.4).

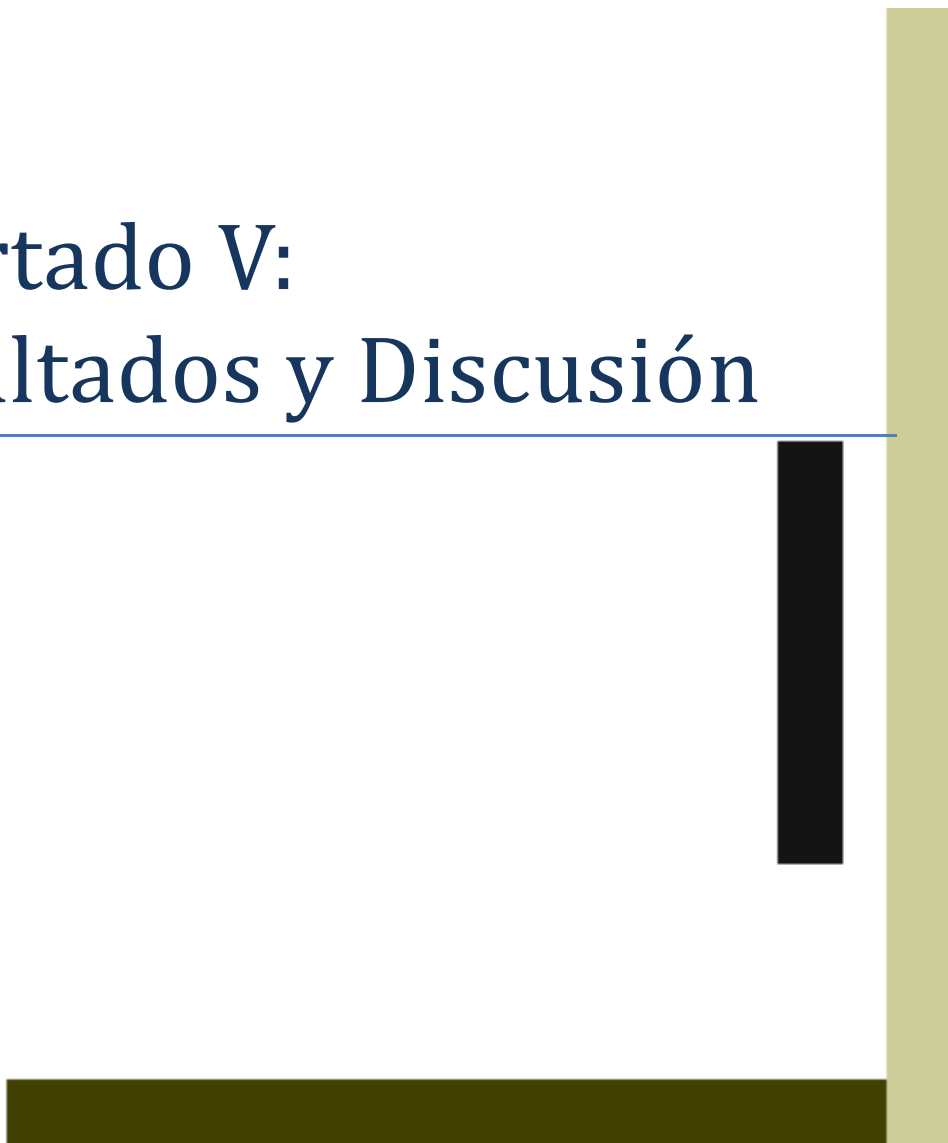
Método de mínimos cuadrados

Se encontró la ecuación de la recta de calibrado y las incertidumbres relacionados a cada uno de los valores obtenidos usando el programa Microsoft Excel 2010 (Resultados y Discusión).

$$A(\pm S_a) = [m(\pm S_m)]X + [b(\pm S_b)]$$

$$\text{Concentración de ácido clorogénico[AC]} = \frac{A - b}{m}$$

Apartado V: Resultados y Discusión



V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis y discusión de resultados se fundamenta en los objetivos planteados y variables del estudio.

5.1- DETERMINACIÓN DE PÉRDIDA POR SECADO EN LAS MUESTRAS

Las hojas se secaron a la sombra protegida de la luz directa del sol para que las muestras conserven su color original, ya que según Maiocchi M.G & Avanza, 2003, la degradación de los ácidos clorogénicos va acompañada de cambios en la coloración de la hoja, por ser sustrato de las enzimas polifenoloxidasas, quienes catalizan una reacción que transforma o- difenoles en o-quinonas, éstas quinonas son muy reactivas y atacan a una gran variedad de componentes celulares favoreciendo la formación de polímeros negro- marrón responsables del oscurecimiento de los tejidos vegetales cuando se dañan. (www.rua.ua.es).

Como regla general las hojas se recolectan cuando la fotosíntesis es más activa, es decir, cuando están verdes, principalmente antes de la floración, durante y antes de la maduración de los frutos (Kuklinski, 2000), por tal razón las hojas se recolectaron en el mes de Mayo, inicio del período húmedo en nuestro país en que los Guarumos se encuentran vigorosos y antes de su floración que inicia especialmente durante Junio a Octubre, (www.una.edu.ni)(antes de éste período los árboles presentaban hojas caducas).

Hay que tener en cuenta también que los vegetales, al ser arrancados de su medio natural ven alterado su equilibrio metabólico y proliferan reacciones y fenómenos que degradan la droga vegetal recolectada; la reacción enzimática es una causa de alteración interna en el que las enzimas propias de las plantas catalizan reacciones que conllevan a su degradación (hidrólisis de glúcidos, ésteres, oxidaciones, condensaciones, isomerizaciones, etc.) la cual es especialmente activa cuando la droga recolectada posee cantidades de agua superiores al 10%, (Kuklinski, 2000). La Tabla 5.1 muestra los resultados obtenidos de porcentaje de pérdida por secado (compuestos volátiles) en hojas secas se encuentran dentro del rango, por lo cual se evita dicha alteración.

Tabla 5. 1: Datos de % de pérdida por secado de hojas secas*

Código de Muestra	% Pérdida por secado	Pérdida por secado promedio
1.1S	5.6489	$5.6462 \pm **$ $2.8746e^{-3}$
1.2S	5.6467	
1.3S	5.6432	
2.1S	5.0484	$5.0483 \pm 3.6055e^{-3}$
2.2S	5.0486	
2.3S	5.0479	
3.1S	5.2293	$5.2269 \pm 2.6764e^{-3}$
3.2S	5.2273	
3.3S	5.2240	

* En el Anexo III, Tabla A y B se muestran los datos necesarios para el cálculo de pérdida por secado y en el inciso 3. 1 se resuelve un ejemplo.

** Representa la desviación estándar (s) (Ecuación 6, Anexo III).

Así mismo se determinó pérdida por secado en hojas verdes (Tabla 5.2) que al igual de las secas están dentro del rango (Hojas: 20-75 %) (Sharapin, 2000).

Tabla 5. 2: Datos de % de pérdida por secado de hojas verdes

Código de Muestra	% Pérdida por secado	Pérdida por secado promedio
1.1V	72.1490	$72.1540 \pm *5.7510e^{-2}$
1.2V	72.2139	
1.3V	72.0992	
2.1V	61.8285	$61.8262 \pm 2.1851e^{-3}$
2.2V	61.8257	
2.3V	61.8242	
3.1V	67.2943	$67.2990 \pm 4.0496e^{-3}$
3.2V	67.3015	
3.3V	67.3011	

* Representa la desviación estándar (s).

La pérdida por secado se utiliza para determinar la cantidad de materia volátil que se elimina en las condiciones referidas (30 min 105° C) (United States Pharmacopeia, Artículos de Origen Botánico, 2007). Fue necesario utilizar hojas verdes por ser éstas utilizadas por la mayoría de la población y dado que no obtuvimos resultados satisfactorios con hojas secas en los ensayos preliminares (Anexo V).

Para la extracción se redujo el tamaño de la muestra, esto facilita la difusión celular y mejorar el proceso de extracción, al facilitar la disolución de los constituyentes celulares en el líquido extractor (Sharapin, 2000). Los datos de los pesos de hojas secas y verdes tomados para éste proceso se muestran en el Anexo III: Tabla G, los cuales serán tomados en cuenta en el análisis de espectrofotometría Uv/ Vis.

Respecto a la preparación de las infusiones, la desventaja que presenta éste método (extracción acuosa) es que el disolvente es poco selectivo y la estabilidad de los extractos es poco duradera (como máximo 24 h después de realizada la extracción del analito) (Solís L. D & Herrera, 2005) (Enzo Life Sciences, 2013); por lo cual se realizó el análisis inmediatamente después de realizada la extracción. Sin embargo, en la población resulta muy útil porque el agua es el solvente más accesible y de uso universal, y las personas acostumbran a preparar las infusiones y tomarlas inmediatamente o a lo largo del día como “agua de uso” (Cetto A. & Cárdenas, 2010).

5.2. RESULTADOS DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN DE FENOLES

A las infusiones obtenidas de hojas secas y verdes se les realizó la prueba de identificación de fenoles, dado que el ácido clorogénico es derivado de un éster fenólico (Acros Organics, 2009); Sin embargo no necesariamente indica la presencia del compuesto (AC). Ésta prueba consistió en agregar cloruro férrico al 5% en metanol, observándose un viraje de color de amarillo claro a azul verdoso en ambas infusiones, resultando positiva dicha prueba (Modificada de J. Dueñas, 2011) (Ilustración 5.1).

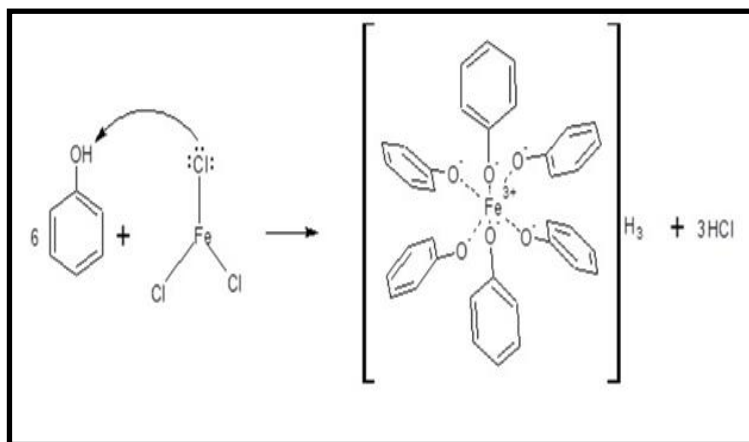
Ilustración 5. 1: Resultados de prueba de identificación de fenoles en las infusiones obtenidas



Fuente: Fotografía tomada por autoras

En ésta reacción el Fe^{+3} se une al grupo fenólico, más reactivo que los fenoles hacia la sustitución aromática electrofílica, al tener carga negativa reaccionan con electrófilos (Fe^{+3}) para formar complejos (Ilustración 5.2). Ésta respuesta se debe al ataque producido por el ión cloruro al hidrógeno del grupo OH^- provocando la ruptura del enlace y la unión del grupo fenólico (formación de complejo).

Ilustración 5. 2: Reacción de acomplejación usada en la prueba de identificación de fenoles



Fuente: (<https://docs.google.com/document/preview?hgd=1&id=12e-geU0zthW86VjRx7zMGOLDv447Sy-twlpQ8L5Yn9A&pli=1>)

5.3- RESULTADOS OBTENIDOS EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

En el estudio cromatográfico para identificar ácido clorogénico en las infusiones de hojas secas y verdes de *Cecropia Peltata*, se obtuvieron los siguientes resultados:

Se desarrolló una banda de color verde del estándar ácido clorogénico en las placas observadas bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga (365 nm) sin necesidad de aplicar revelador (Ilustración 5.3).

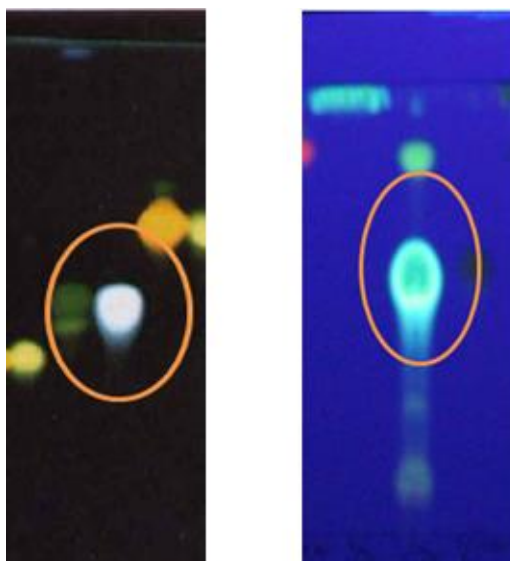
Ilustración 5. 3: Desarrollo de banda coloreada del estándar ácido clorogénico (banda 1 y 2)



Fuente: Fotografía tomada por autoras

La forma de las manchas de los estándares (Ilustración 5.3) fue comparada con Hildebert Wagner, 1996 y Aldana Cerna, 2007 (AC encerrado en el círculo, Ilustración 5.4) observándose que son muy parecidas entre sí, por lo que no cabe duda de la identidad del compuesto.

Ilustración 5. 4: Comparación de banda de ácido clorogénico estándar con referencias bibliográficas



Fuente: (Hildebert Wagner, 1996)

(Aldana Cerna, 2007)

En los extractos acuosos de muestras de hojas secas se observa la presencia del compuesto ácido clorogénico en la posición del estándar (ST) mostrado en la Ilustración 5.5. Sin embargo, no se observan manchas en la posición de la muestra (enumeradas en la parte inferior de la ilustración), indicando la ausencia del compuesto en estudio, aún utilizando extractos más concentrados (5 g de hojas en 100 mL de agua destilada, Ilustración 5.6).

Ilustración 5. 5: Visualización en luz Uv de placa con infusión de hojas secas diluido (1 g de hoja / 100 mL agua tetradestilada)

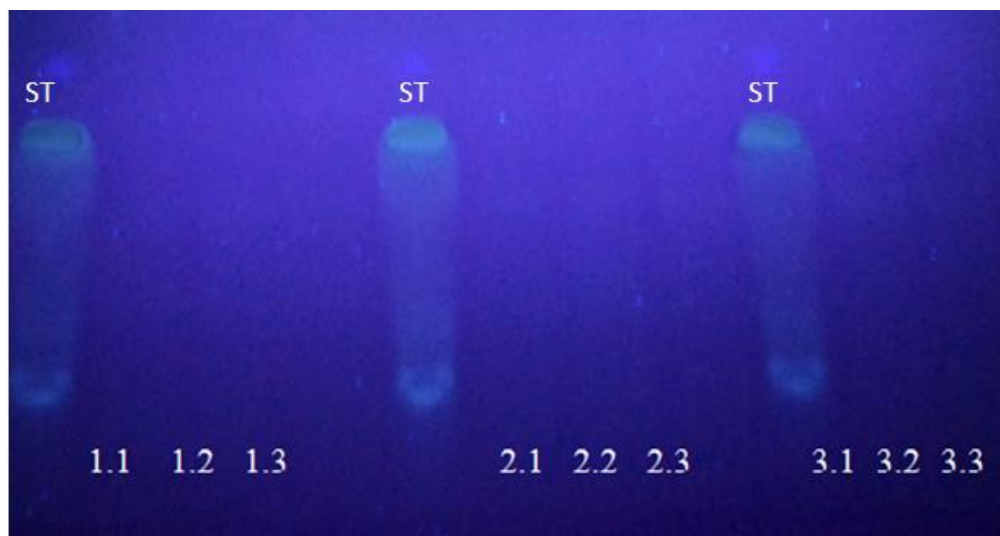
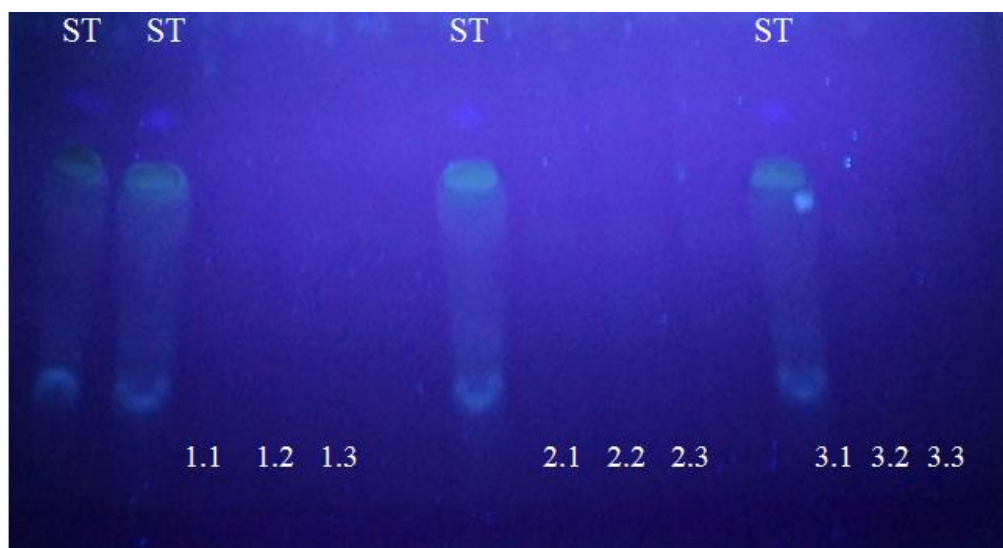


Ilustración 5. 6: Visualización en luz Uv de placa con infusión de hojas secas concentrada (5g de hoja/ 100 mL de agua tetradestilada) (Placa 1)



Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Nota: Los números indicados en la parte inferior de cada placa corresponden a las muestras y las abreviacion en la parte superior (ST) al estándar.

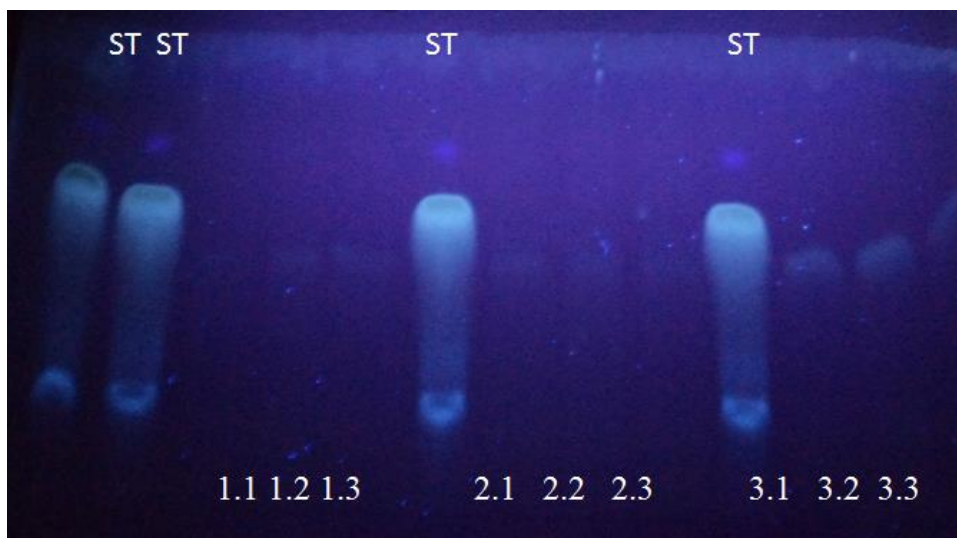
En las infusiones de hojas secas (Ilustración 5.5 y 5.6) no se observan manchas en la posición de la muestra indicando la ausencia de ácido clorogénico, solamente en la posición del estándar (ST) es observado.

Por lo que se deduce que pudieron haber estado implicados algunos errores en estos resultados como:

- ▶ Aplicación de cromatografía de capa fina. No se uso otros metodos como densitometría, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) dado que estos métodos son más sensibles y de mejor resolución para la detección de cantidades pequeñas y el ácido clorogénico en estas muestras debió estar en cantidades muy mínimas incapaces de detectar con este método.
- ▶ El secado de las hojas empleando un método artesanal: A pesar de realizar el método de secado respaldado bibliográficamente, provocó cambios en la coloración de la hoja pudiendo ocasionar alteración del compuesto de interés dado que los ácidos fenólicos son inestables, se hidrolizan con facilidad en medio básico o por acción enzimática (S. Palacios P. G. Wilson E. L. & Debenedetti, 1999).

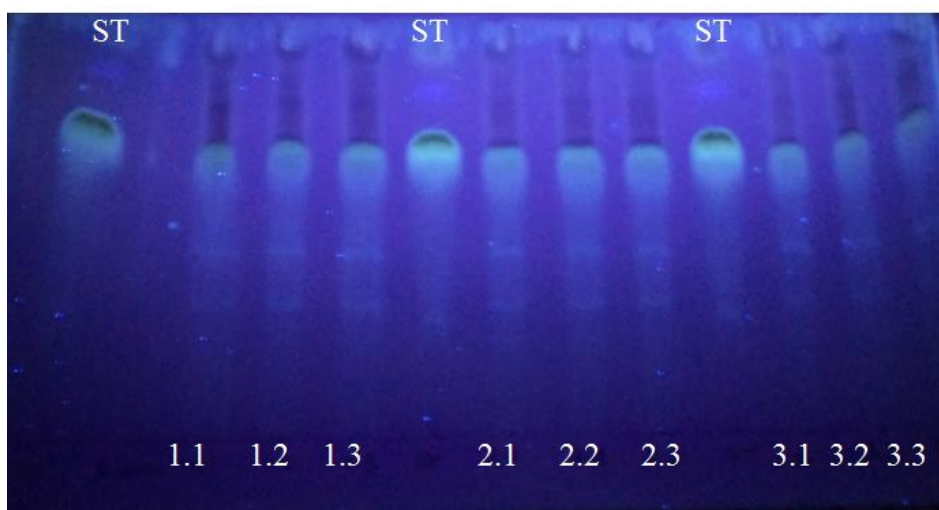
En los extractos acuosos de hojas verdes se muestran manchas de color verde con Rf de 0.6388 al igual que el estándar, indicando la presencia del ácido clorogénico en las muestras. Primeramente se realizó cromatografía de capa fina (CCF) a los extractos a usar para espectrofotometría Uv /Vis (extracto diluido 10 veces) observándose manchas tenues (en las muestras N° 3 se observa manchas con mayor intensidad mostrados en la Ilustración 5.7, indicando de manera predictiva mayor concentración en el árbol 3). Debido a esto se decidió concentrar la muestra desarrollando otra cromatoplaaca (placa 2) usando mayor cantidad de hojas verdes, observándose manchas más definidas (Ilustración 5.8).

Ilustración 5. 7: Visualización de placa en luz Uv de muestras de infusión de hojas verdes usando extracto diluido (1g de hoja / 100 mL agua tetradestilada).



Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Ilustración 5. 8: Visualización de placa en luz Uv de muestras de infusión de hojas verdes usando extracto acuoso más concentrado (5 g hoja / 100 mL de agua tetradestilada) (placa 2)



Fuente: Fotografías tomadas por autoras

En éstas placas se observa un arrastre de componentes en la muestra desde su punto de aplicación hasta la mancha formada, debido a que la muestra no fue purificada.

En la Tabla 5.3 se muestran los valores de Factor de Retención (Rf) del estándar y muestras, los cuales varían un poco con cada experimento en función de las condiciones de saturación en la cámara cromatográfica, la actividad de la capa de adsorbente, composición de la fase móvil, variaciones de temperatura del medio ambiente, y/ o variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina, por ello la importancia de utilizar siempre el estándar de referencia (Kuklinski, 2000), (World Health Organization, 1998).

Tabla 5.3: Valores de Rf de Muestras (M) y Estándar (ST) de ácido clorogénico en infusiones de hojas secas y verdes.

Muestras	Extractos	Distancia recorrida desde el punto de Aplicación	Distancia recorrida hasta el frente del eluyente	Rf*
Hojas secas (placa 1)	Acuoso (ST)	6.2 cm	9.7 cm	0.6391
	Acuoso (M)	-	-	-
Hojas verdes (placa 2)	Acuoso (ST)	4.6 cm	7.2 cm	0.6388
	Acuoso (M)	4.6 cm	7.2 cm	0.6388

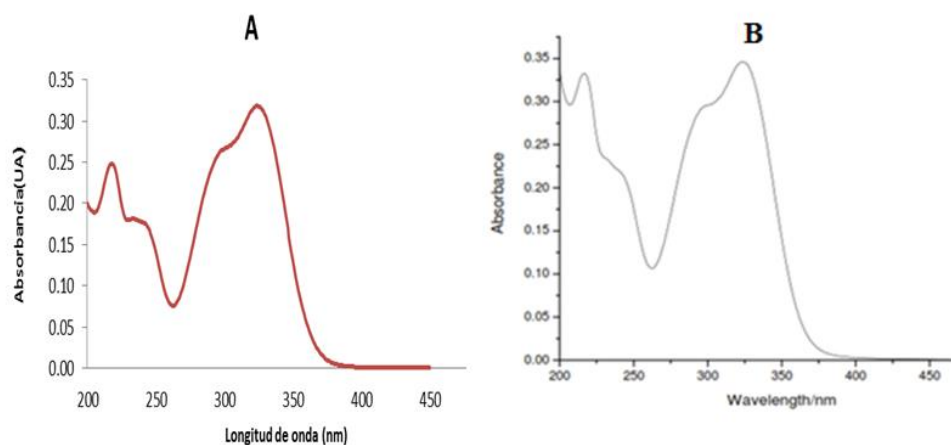
*Los cálculos para obtener estos valores se muestran en el Anexo III (Inciso 3.2). No se reflejan los Rf de las muestras (M) en hojas secas debido a que no se observan manchas en ésta posición. Solamente se muestra un valor de Rf en las muestras dado que todas recorrieron la misma distancia (Se realizó a las 9 muestras obtenidas).

5.4- RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

El ácido clorogénico presenta una gran cantidad de enlaces conjugados, los cuales son responsables de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y de la absorción en la región ultravioleta de este compuesto (Solís L. D & Herrera, 2005). Esto fundamenta el uso de este método en el presente estudio.

La cuantificación se realiza a 324 nm, longitud de onda de máxima absorción del ácido clorogénico en disolución acuosa. El gráfico 5.1 muestra que el espectro de absorción del ácido clorogénico obtenido experimentalmente (A) y el espectro mostrado por Belay A. & Gholap, 2009 (B) tienen la misma resolución.

Gráfico 5. 1: Comparación de los espectros de absorción Uv/Vis de ácido clorogénico en agua con referencia bibliográfica

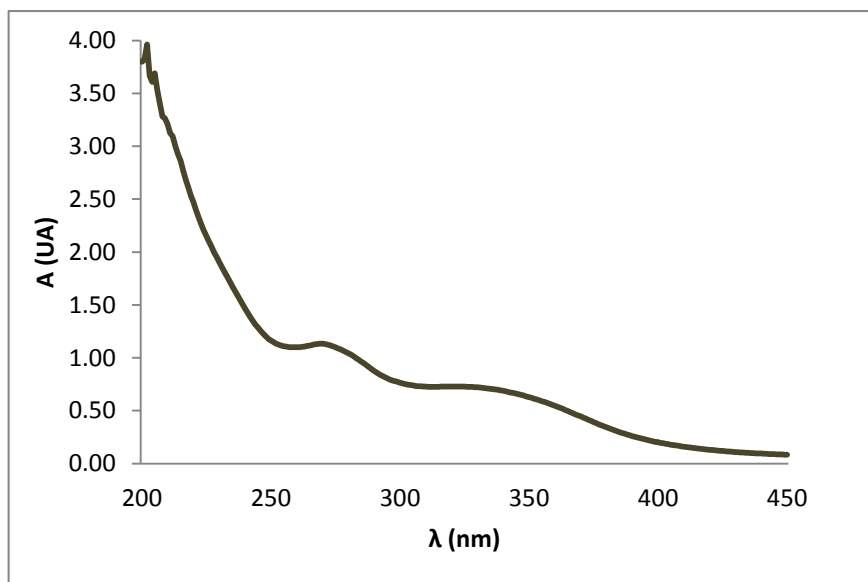


Fuente: Elaborado por autoras

Belay A. & Gholap, 2009

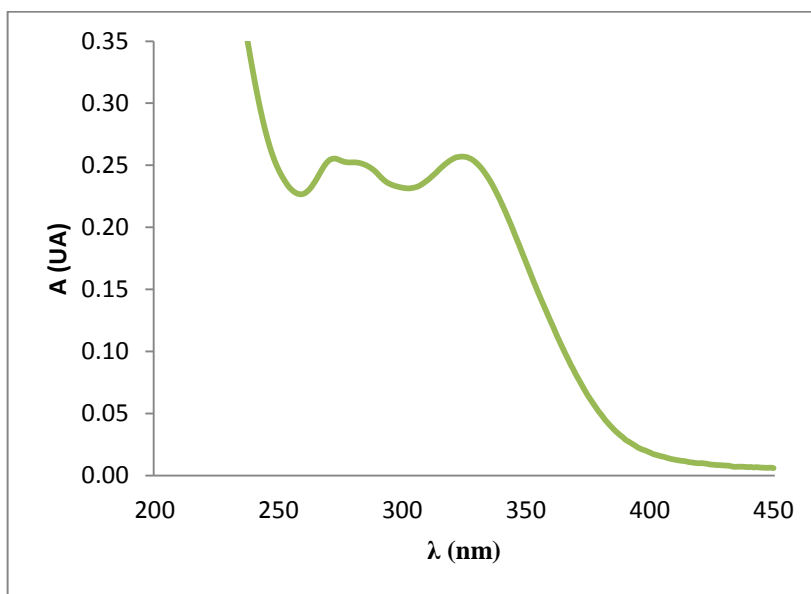
En base a los datos mostrados por el espectrofotómetro *Agilent 8453* se construyeron los espectros de absorción de las muestras y estándar, los cuales se observan en los gráficos 5.2 y 5.3:

Gráfico 5. 2: Espectro de absorción de las infusiones de hojas secas a 324 nm



Fuente: Elaborado por autoras

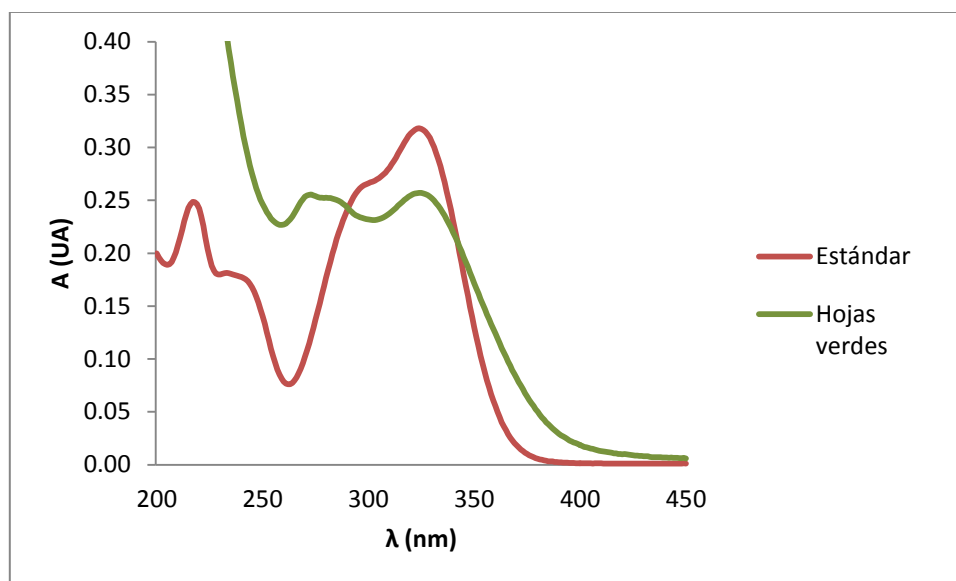
Gráfico 5. 3: Espectro de absorción obtenida de las muestras de hojas verdes a 324 nm



Fuente: Elaborado por autoras

Para verificar la presencia de ácido clorogénico en hojas verdes se superpone su espectro de absorción con el estándar en agua tetradestilada, gráfico 5.4, en el cual se logra observar el pico de máxima absorción en hojas verdes a 324 nm. El otro pico mostrado en el rango 250-300 nm, se forma posiblemente por interferencias en la matriz.

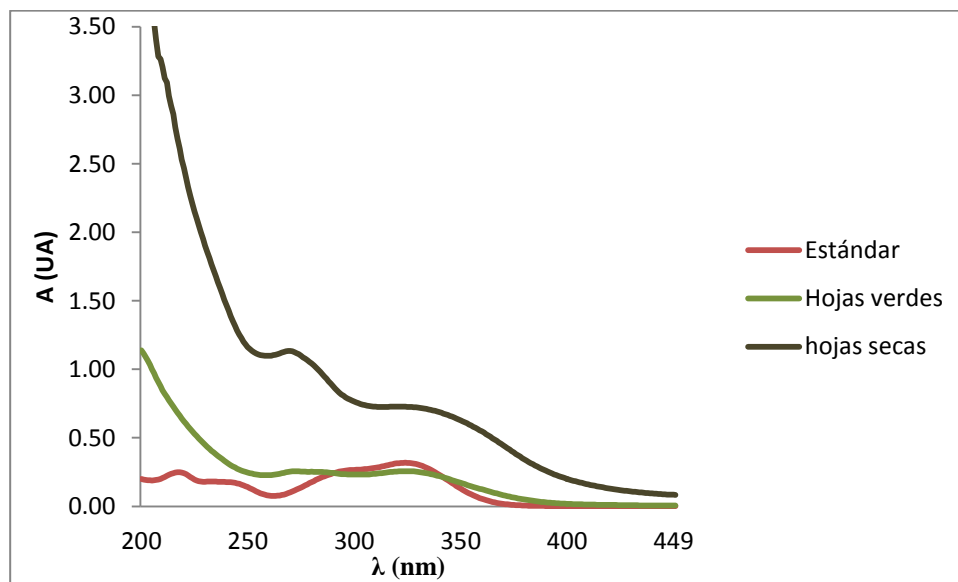
Gráfico 5. 4: Espectro de absorción superpuesto de hojas verdes y estándar AC en agua tetradestilada CAM



Fuente: Elaborado por autoras

La presencia del ácido clorogénico en las muestras de hojas secas y verdes se comparó mediante la superposición de sus espectros de absorción en la región Uv con el espectro de absorción del estándar, mostrado en el Gráfico 5.5:

Gráfico 5. 5: Espectros de absorción superpuestos de estándar, infusiones de hojas secas y verdes.



Fuente: Elaborado por autoras

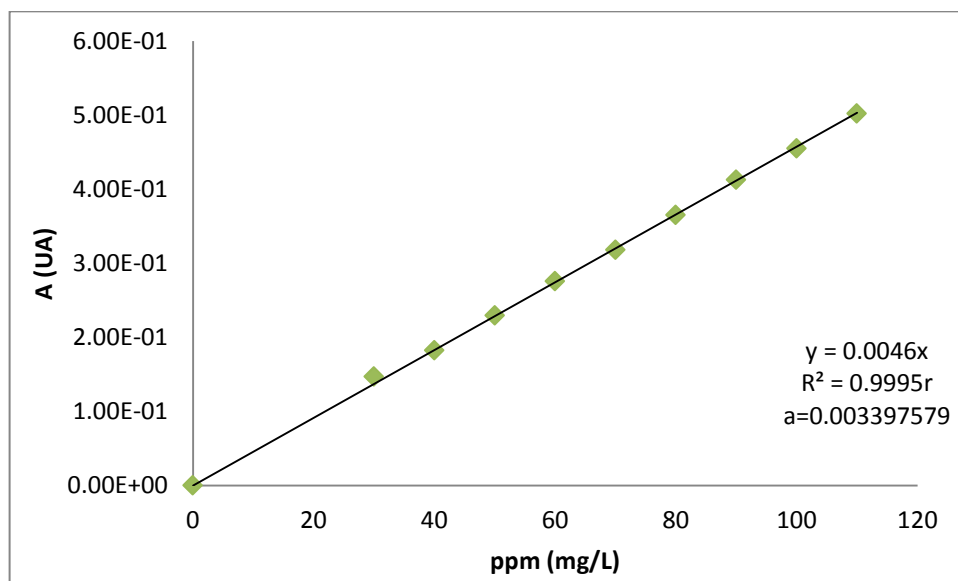
La muestra de hojas secas forma un espectro diferente al del estándar y su máxima absorción corresponde a una longitud de onda a 322 nm, por lo que se deduce que:

- por el método de secado de las hojas el ácido clorogénico se haya unido a otro compuesto presente en la hoja provocando interferencias.
- al secar las hojas el ácido clorogénico se haya degradado en ácido cafeico y ácido quínico (IQB, 2010).
- El método utilizado no permite separar los componentes en la muestra.

No se puede concluir que el ácido clorogénico no esté presente en las infusiones de hojas secas debido a que los antecedentes (Cetto A. & Cárdenas en el 2010),(Cetto, Cárdenas y Ramirez en el 2007) y otros muestra resultados positivos de ácido clorogénico por HPLC.

Dado que el espectro de absorción de la infusión de hojas verdes corresponde al del estándar, se trazó una curva de calibración de ácido clorogénico (ACROS Organics) en agua tetradestilada CAM, mostradas en el gráfico 5.6 a partir de una solución madre de 200 ppm usando 9 diluciones comprendida entre 30-110 ppm (Anexo 3.3.4), los datos fueron procesados en Microsoft Excel 2010 para encontrar los errores y límites de confianza de la pendiente y ordenada en el origen.

Gráfico 5. 6: Curva de calibración del estándar ácido clorogénico (AC) en agua tetradestilada



Fuente: Elaborado por autoras

Para estimar el ajuste de los puntos experimentales a la línea recta, se calcula el coeficiente de correlación (r), obteniendo un valor de 0.99980 lo que describe una correlación significativa es decir, que los puntos experimentales están sobre una recta de pendiente positiva y que los puntos se ajustan linealmente.

La ecuación de la recta de calibración se calcula utilizando los datos de la Tabla E y las ecuaciones 8 -20 del Anexo III, obteniendo los siguientes resultados:

$$r = 0.99980$$

$$r^2 = (0.99980)^2 = 0.99960$$

$$[AC] = \frac{A - 3.39355 \times 10^{-3}}{4.52915 \times 10^{-3}}$$

Los errores de la recta que pasa por los puntos experimentales fueron calculados usando las ecuaciones mostradas en Anexo III, inciso 3.5:

$$S_{y/x} = 3.620069 \times 10^{-3}$$

$$S_b = 3.19525 \times 10^{-5}$$

$$S_a = 2.26163 \times 10^{-3}$$

Los límites de confianza de la recta de calibrado

$$b = 4.52915 \times 10^{-3} \pm 3.19525 \times 10^{-5}$$

$$a = 3.39355 \times 10^{-3} \pm 2.26163 \times 10^{-3}$$

Los errores de la concentración:

$$S_{x_0} = 0.65312$$

La menor señal de analito que puede detectarse al 95 % de confianza se calcula de la siguiente manera:

$$LOD = y_b + 3S_b = 2.51306 \times 10^{-4}$$

Y la menor concentración que puede ser calculada a partir de la recta de calibrado:

$$LOQ = y_b + 10S_b = 4.74974 \times 10^{-4}$$

Los resultados del análisis espectrofotométrico cuantitativo de las infusiones de hojas verdes son mostrados en la Tabla 5.4, donde se muestra que el árbol de mayor tamaño (árbol 3) contiene mayor cantidad de ácido clorogénico en hojas verdes, calculadas a partir de la ecuación de la recta encontrada.

Tabla 5. 4: Contenido de ácido clorogénico en infusiones de hojas verdes

Nombre de muestra	Concentración (ppm)	mg AC/g hoja	mg AC/g promedio
Acidguaru 1.1	59.63293	2.97272	2.77686 ± 0.38253
Acidguaru 1.2	60.55142	3.02182	
Acidguaru 1.3	46.99700	2.33606	
Acidguaru 2.1	56.00090	2.78279	2.66492 ± 0.20507
Acidguaru 2.2	48.75672	2.42812	
Acidguaru 2.3	56.08922	2.78386	
Acidguaru 3.1	81.79824	4.07037	4.58244 ± 0.45575
Acidguaru 3.2	94.84704	4.73335	
Acidguaru 3.3	99.13924	4.94361	

Anexo III, Cálculo 3.6.

Anexo IV: Tabla t student.

Esto se explica debido a que los árboles de mayor tamaño (20 m) están más expuestos a la luz solar que los demás árboles de su entorno, donde hay competencia por la cantidad de luz que llega a sus hojas con poblaciones de plantas de la misma especie o comunidades de especies con necesidades de luz similares (Gliessman, 2002) y por tanto la intensidad fotosintética de la mayoría de las hojas aumenta con la intensidad de la luz (Elías Castillo, 2001)

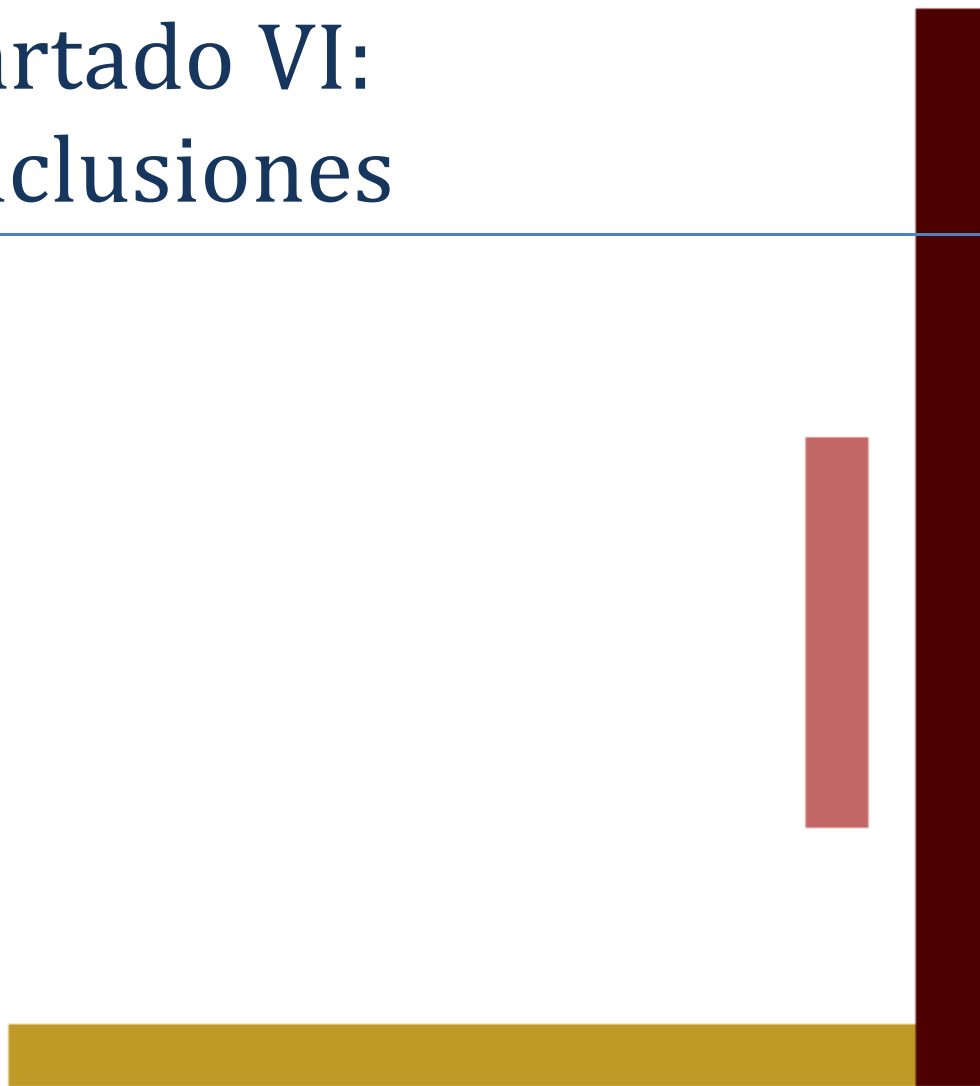
El proceso fotosintético tiene lugar únicamente en las células que contienen clorofila, donde la energía solar es utilizada por éstas células, la cual se concentra en los cloroplastos.

Los productos inmediatos de la absorción de energía lumínica son ATP y el reductor NADPH, compuestos que más tarde se utilizan en el proceso de fijación de carbono con la formación de enlaces carbono- carbono y la reducción del CO₂ para formar carbohidratos, grasas y proteínas (metabolitos primarios) (Arango, 2010) y almacenan estos compuestos para utilizarlos cuando el crecimiento les obliga a consumir grandes cantidades de energía.

El ácido clorogénico es un fenol (producto del metabolismo secundario) que procede de la ruta de ácido shikímico, el cual es el precursor de la mayoría de los constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos. El ácido shikímico da lugar a la fenilalanina donde interviene la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que cataliza una reacción que convierte a la fenilalanina en amoníaco y ácido cinámico, éste último sintetiza fenoles sencillos y ácidos fenólicos. La fenilalanina amonio liasa está implicado en la biosíntesis de los compuestos polifenólicos tales como los flavonoides, fenil propanoides y la lignina en las plantas.

Al comparar los resultados obtenidos con los mostrados por (Erazo C. Aguilar Santamaría L. Aranda E. & Nicasio) en hojas secas de *Cecropia Peltata* tanto silvestre como micropropagada usando HPLC, la cantidad de AC obtenida (Silvestre AC: 1.9 ± 0.2 , micropropagada: 0.7 ± 0.04 mg AC /g hoja) y los resultados de éste estudio por espectrofotometría Uv/Vis (2.77686 ± 0.38253 , 2.66492 ± 0.20507 , 4.58244 ± 0.45575 , mg AC/g hoja verde, en árboles de 10, 15 y 20 m de alto, respectivamente), nos muestra un mayor contenido del componente en las muestras analizadas. Mientras que en hojas secas se presume una degradación del compuesto durante el secado, o a la existencia de contaminantes que pudieran interferir en la absorción de radiación, y/o cantidades pequeñas en éstas muestras que no pueden ser detectadas por éste método por lo cual no fue determinado

Apartado VI: Conclusiones



VI- CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de fenoles en infusiones de hojas secas y verdes de *Cecropia Peltata* que motivaron la búsqueda del ácido clorogénico en dichas infusiones por cromatografía de capa fina y espectroscopía Uv.

El ácido clorogénico fue identificado por cromatografía de capa fina (CCF) en extractos acuosos de hojas verdes de la especie *Cecropia Peltata*, mientras que en las hojas secas no se demuestra la presencia del compuesto, ni en extractos más concentrados.

La determinación del contenido de ácido clorogénico en infusiones de hojas secas y verdes fue realizada por espectrofotometría Uv/Vis, encontrando mayor contenido en el árbol más alto (4.58244 ± 0.45575 mg AC /g hoja), mientras que en las hojas secas no se afirma con precisión la presencia del compuesto, debido a que el espectro de absorción difiere del estándar y longitud onda de máxima absorción varía.

Apartado VII: Recomendaciones



VII- RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en muestras de hojas secas y verdes se sugiere continuar ésta investigación realizando estudios más específicos para respaldar, analizar los factores ambientales que influyen en el contenido de ácido clorogénico y aportar nuevos conocimientos sobre su contenido en *Cecropia Peltata*.

En cuanto a los resultados obtenidos en infusiones de hojas secas hay que tomar en cuenta que la industria Farmacéutica utiliza plantas secas, lo cual facilita su conservación por períodos de tiempos prolongados ya que interrumpe los procesos de degradación por enzimas, impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis, por tanto se sugiere involucrar diferentes variables:

- Lavar las hojas con hipoclorito de sodio 0.5 % en diferentes intervalos de tiempos.
- Variaciones en el período de secado en las muestras.
- Diferentes grados de división de las muestras.
- Utilizar otra metodología más sensible y capaz de separar las sustancias como HPLC debido a que algunos antecedentes de *Cecropia Peltata* de interés se basan en éste método. Sin embargo, el método aquí utilizado ha sido aplicado a muestras de café orientado a la cuantificación de ácido clorogénico.

Para determinar su influencia sobre el contenido de ácido clorogénico en las muestras.

Bibliografía



Bibliografía

1. Acros Organics. (2009). *Material Safety Data Sheet: Chlorogenic Acid*. Belgium: MSDS.
2. Agilent Technologies. (2003). *Guía de Usuario: Agilent 8453 Sistema de Espectroscopía UV-visible*. Alemania.
3. Aguilar Santamaría, L. (2004). *Evaluación de la capacidad hipoglucemiante de los extractos de Cecropia Obtusifolia Bertol.* Tesis para obtener el grado de doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
4. Aldana Cerna, F. D. (2007). *Detección y cuantificación de flavonoides en Polypodium triseriale Swartz, Phlebodium decumanum (Willd) J. Sm y Phebodium pseudoaureum (cav) Lellingier; tres especies de calahuala nativas de Guatemala.* Tesis para optar al título de maestría Multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
5. Alonso, J. R. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Corpus Libros.
6. Arango, A. G. (2010). *Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido shikimico*. Universidad de Antioquía, Medellín.
7. Belay A. & Gholap, A. V. (2009). Characterization and determination of chlorogenic acid (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3(11), 234-340.
8. Cabrera, I. R. (2005). *Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina* (1ra ed.). Cali, Colombia: Programa Editorial Universidad del Valle.
9. Cetto A. & Cárdenas, R. (2010). Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two Cecropia species. *ELSEVIER, Journal of Ethnopharmacology*, 130(2010), 93-97.

10. Cetto A. & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *ELSEVIER, Journal of ethnopharmacology*, 99(2005), 325-348.
11. Cetto A. Cárdenas R & Ramírez, B. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia Peltata* L. on N5-STZ type 2 Diabetic rats. *Pharmacologyonline*, 3, 203-210.
12. Eke, J. (2000). *Contactos de mercado para el producto de plantas medicinales Nicaraguense en el mercado Alemán*. Chemonics International Inc., Managua, Nicaragua.
13. Elías Castillo, F. (2001). *Agrometeorología* (2da ed.). Madrid, España.
14. Erazo C. Aguilar Santamaría L. Aranda E. & Nicasio, P. (s.f.). *Micropropagacion de las especies hipoglucemiantes Cecropia Obtusifolia y Cecropia Peltata*. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Laboratorio de control biológico, Mexico.
15. Estrategia Nacional de Biodiversidad. (2002). *Recursos genéticos y biotecnología en Nicaragua*. MARENA, Dirección General de Biodiversidad y Recursos Naturales. Managua: Edición electrónica.
16. Gil Contreras, J. K. (2005). *Validación Farmacológica de la actividad diurética de infusiones acuosas de Cecropia Obtusifolia Bertoloni, Cecropia Peltata(guarumo), Solanum nigrescens Mart & Gal(Quilete), Zebrina Pendula Schnizl (hierba de pollo), popularmente utilizadas en Guatemala*. Informe Final de Tesis para Lic. Química Farmacéutica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
17. Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología. Procesos Ecológicos en Agricultura Sostenible*. Costa Rica.
18. Grijalva Pineda, A. (2006). *Flora Útil Etnobotánica de Nicaragua* (1 ed.). Managua, Nicaragua: MARENA-ARAUCARIA-AECI.
19. H. Sampiere, R. F. (1997). *Metodología de la investigación*. Colombia: McGraw- Hill Interamericana de Mexico.

20. Haiek Gerard, T. S. (2010). Palo de Arco, El Sen, Yagrumo y zarzaparrilla. *Revista Facultad de Farmacia El jardín medicinal de La Revista “*, 73(2), pág. 46-47.
21. Herbario Virtual UDBC. (2006). *Guía para la Recolección y preservación de muestras botánicas en campo*. Universidad Distrital Francisco Jose De Caldas , Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Bogotá.
22. Hernández Carvajal, J. E. (2012). *Análisis Fitoquímico y de actividad antimalarica de dos especies del género Cecropia*. Tesis para el grado de master en ciencias farmaceuticas, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Bogotá.
23. Hildebert Wagner, S. B. (1996). *Plant Drug Analysis* (2da ed.). Munich , United States : Springer .
24. J. Dueñas, B. N. (2011). *Extracción y Caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos del procesamiento de alcachofas*. Escuela Politécnica del Ejército, Ciencias de la Vida, Ecuador.
25. Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: OMEGA.
26. Marchantes C. Pilar, Z. F. (2004). *Análisis Químico Farmacéutico: Métodos Clásicos Cuantitativos*. La Habana, Cuba : Universitaria.
27. Martino V. S Ferraro G. E Debenedetti S.L & Coussio, J. (1989). Determinación Espectrofotométrica del contenido de ácidos cafeolquínicos en Especies Argentinas de Compuestas usadas en Medicina Popular. *Acta Farm. Bonaerense*, 8(1), 3-9.
28. Mayorga S.V Gutiérrez M.C & Rueda P, R. (2007). Plantas Medicinales utilizadas por la población de la ciudad de León. *Universitas*, 1(1), 24-26.
29. Mendieta López M. & Rocha Molina, L. R. (Abril de 2007). *Sistemas Agroforestales*. Universidad Nacional Agraria, Managua.

30. Miller J. N. & Miller, J. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* (4ta ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
31. Nicasio P, A. S. (2005). Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* Species. *Phytotherapy Research NCBI*, 19(8), 661-664.
32. Nicasio Torres, M. (2009). *Producción de compuestos hipoglucemiantes en cultivos de células en suspensión de Cecropia Obtusifolia (betol)" guarumbo"*. Tesis para optar al grado de Doctora en Biotecnología, UNAM, Mexico.
33. OMS- Ginebra. (2002). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Ginebra.
34. OMS-OPS. (1999). *Sistema de Salud Tradicionales en América Latina y el Caribe: Información de base*. Informe Técnico del Proyecto, OPS, OMS, Washington, D.C.
35. Revilla Monsalve Ma C Cetto A. Palomino M. A Wiedenfeld H. & Islas Andrade, S. (2007). Hypoglycemic effect of *Cecropia Obtusifolia* Bertol aqueous extractos on type 2 diabetic patients. *ELSEVIER, Journal of Ethnopharmacology*, 111, 636-640.
36. Rueda Pereira, R. (2007). *Recopilación de la información sobre Biodiversidad en Nicaragua*. UNAN-León, Norwegian Ministry of foreign affairs, InBio Costa Rica.
37. S. Palacios P. G. Wilson E. L. & Debenedetti, S. (24 de Agosto de 1999). Análisis por HPLC de Ácidos Cafeolquínicos presentes en tres especies de *Baccharis*. *Dominguezia*, 15(1), 39-46.
38. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* (I ed.). (R. P. S., Ed.) Colombia: CYTED.
39. Skoog, H. N. (2001). Principios de Análisis instrumental. En F. J. Douglas A. Skoog. Madrid, España: Mc Graw Hill.

40. Solís L. D & Herrera, C. (2005). Desarrollo de un método de análisis para la cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Revista Agronomía Costarricense*, 29(2), 99-107.
41. United States Pharmacopeia. (2007). *Articulos de Origen Botánico* (NF 25 ed., Vol. I). Estados Unidos de America: Port City Press, Baltimore.
42. United States Pharmacopeia. (2007). *Cromatografía* (NF 25 ed., Vol. I). Estados Unidos de América: Port City Press, Baltimore.
43. United States Pharmacopeia. (2007). *Espectrofotometría y dispersión de luz* (NF 25 ed., Vol. I). Estados Unidos de América: Port City Press, Baltimore.
44. United States Pharmacopeia, U. (2007). *Articulos de Origen Botánico* (NF 25 ed., Vol. I). Estados Unidos de America: Port City Press, Baltimore.
45. World Health Organization. (1998). *Quality Control Methods for Herbal Materials*. Malta.

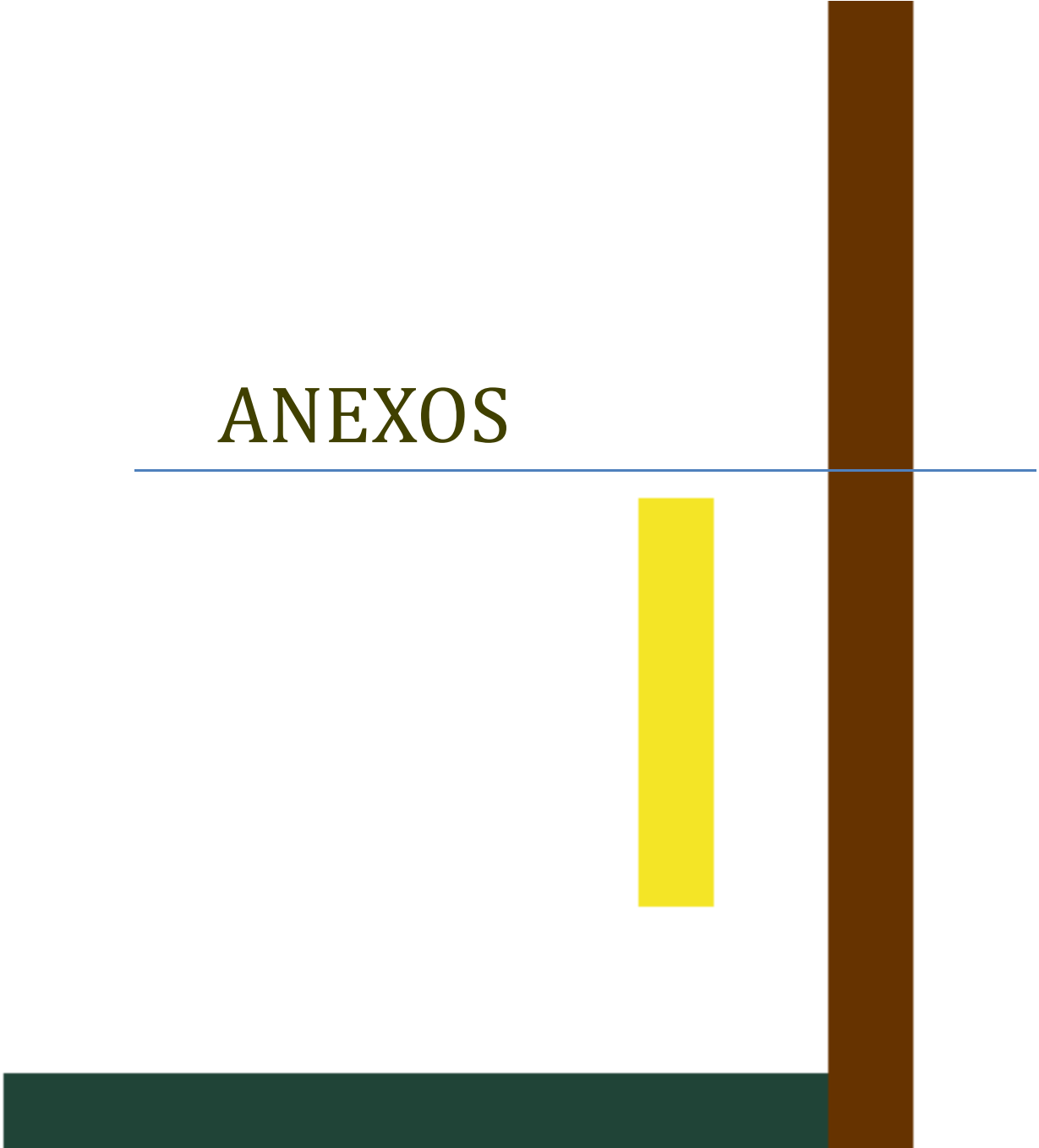
Web grafía

1. Benoist, R. (1924). *www.tropicos.org*. Recuperado el 12 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300376?projectid=7>
2. Berg, C. (. (23 de Marzo de 1978). *www.tropicos.org*. Recuperado el 2 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/42000053?projectid=7>
3. Bertoloni, A. (1840). *www.tropicos.org*. Recuperado el 2 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300586>

4. Bolt, A. (2010). *Plantas Medicinales, Macizo de Peñas Blancas*. Recuperado el 4 de Agosto de 2012, de Centro de Entendimiento con la naturaleza: <http://www.cenaturaleza.org>
5. Burger, W. C. (1973). *www.tropicos.org*. Recuperado el 2 de enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300592?projectid=7&langid=66>
6. Enzo Life Sciences. (2013). *www.enzolifesciences.com*. Recuperado el 03 de Marzo de 2013, de <http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-353/chlorogenic-acid/>
7. <https://docs.google.com/document/preview?hgd=1&id=12e-gcU0zthW86VjRx7zMGOLDv447Sy-twlpQ8L5Yn9A&pli=1>. (s.f.). Recuperado el 03 de 2013, de <https://docs.google.com/document/preview?hgd=1&id=12e-gcU0zthW86VjRx7zMGOLDv447Sy-twlpQ8L5Yn9A&pli=1>
8. IQB. (17 de Marzo de 2010). *IQB, Medciclopedia*. Recuperado el 25 de Enero de 2013, de www.iqb.es: <http://www.iqb.es/monografia/fichas/ficha108.htm>
9. Lériida, A. (2002). *www.herbociencia.com.ar*. Recuperado el 2 de Enero de 2013, de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-004.html>
10. Liebmann, F. M. (1851). *www.tropicos.org*. Recuperado el 4 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300583?projectid=7>
11. Linnaeus, C. V. (1759). *www.tropicos.org*. Recuperado el 10 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300477?projectid=7>
12. Maiocchi M.G & Avanza, J. R. (2003). *Variaciones en el contenido de ácidos clorogénicos entre cosechas y procesamiento de Illex Dumosa*. Recuperado el 22 de Octubre de 2012, de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/08-Exactas/E-065.pdf>
13. Martius Karl, F. P. (1843). *www.tropicos.org*. Recuperado el 12 de Enero de 2012, de <http://www.tropicos.org/Name/21301041?projectid=7>

14. Poepping, E. F. (6 de marzo de 2009). *www.tropicos.org*. Recuperado el 2 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21300148?projectid=7>
15. Seymour, F. C. (11 de Enero de 1970). *TROPICOS*. Recuperado el 12 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Specimen/1776204?projectid=7&langid=66>
16. Standley, P. C. (1963). *www.tropicos.org*. Recuperado el 10 de Enero de 2013, de <http://www.tropicos.org/Name/21301131?projectid=7>
17. <http://www.lineaysalud.com>. (2013). Hämtat från <http://www.lineaysalud.com/ique-es/546-acido-clorogenico.html> den 1 12 2013.
18. [www.rua.ua.es](http://rua.ua.es). (s.f.). *Purificación y caracterización cinética de polifenol oxidasa de tomate*. Recuperado el 23 de 04 de 2013, de Vela, J. Casado: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9919/4/Casado%20Vela,%20Juan_3.pdf.
19. www.una.edu.ni. (s.f.). *www.una.edu.ni*. Recuperado el 20 de Enero de 2013, de <http://redbio.una.edu.ni/arboretum/fichas.php?cod=10>

ANEXOS



LISTA DE ANEXOS

ANEXO I: FIGURAS.....	1
Figura 1: Fotografías de los árboles de Guarumo muestreados en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya.	1
Figura 2: Ubicación geográfica de las muestras de Guarumo tomadas en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya.	4
Figura 3: Etiquetado y secado de las hojas del árbol Guarumo.....	5
Figura 4: Tamizaje de hojas secas de Guarumo.....	5
Figura 5: Equipo utilizado en la determinación de pérdida por secado en hojas de Guarumo	6
Figura 6: Equipo utilizado en la preparación de infusiones de Guarumo.....	7
Figura 8: Prueba de identificación de fenoles.....	8
Figura 9: Equipo utilizado en cuantificación espectrofotométrica	10
ANEXO II FICHAS	11
ANEXO III: DATOS Y CÁLCULOS.....	15
3.1- Cálculo de pérdida por secado.....	15
Tabla A: Datos de pérdida por secado de hojas secas	16
Tabla B: Datos de pérdida por secado de hojas verdes.....	16
3.2- Datos y cálculos en cromatografía de capa fina (CCF).....	17
3.3- Datos y cálculos en cuantificación espectrofotométrica	18
3.3.1- Preparación de curva de calibración de estándar ácido clorogénico ACROS	18
Esquema A: Representación esquemática de diluciones realizadas para la construcción de primera curva de calibración de ácido clorogénico en agua tetradestilada comprendida entre 4- 40 ppm.....	19

Figura 10: Fotografía de diluciones realizadas en la primera curva de calibración con estándar ácido clorogénico.....	19
Gráfico A: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua ttradestilada comprendida entre 4- 40 ppm.....	20
3.3.3. Segunda curva de calibración	20
Esquema B: Representación esquemática de diluciones realizadas para construcción de segunda curva de calibración de ácido clorogénico en agua ttradestilada entre 10-70 ppm.	21
Figura 11: Fotografía de diluciones realizadas en la segunda curva de calibración con estándar ácido clorogénico.....	21
Gráfico B: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua ttradestilada comprendida entre 10- 70 ppm.....	22
3.3.4. Tercera curva de calibración (curva final)	22
Esquema C: Representación esquemática de diluciones realizadas para la construcción de tercera curva de calibración de ácido clorogénico en agua ttradestilada entre 30-110 ppm	23
Figura 12: Fotografía de diluciones realizadas en la tercera curva de calibración con estándar ácido clorogénico.....	23
Tabla C: Datos espectroscópicos usados para construir tercera curva de calibración con solución estándar de ácido clorogénico en agua ttradestilada.	24
Gráfico C: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua ttradestilada comprendida entre 30-110 ppm.....	25
Tabla D: Valores de “y ajustados”	25
Tabla E: Datos estadísticos usados para la determinación de las incertidumbres asociadas a la ecuación de la recta de calibración con ácido clorogénico estándar a 324 nm.....	26
3.4- Fórmulas estadísticas para tratamiento de datos	27
3.5- Métodos de Mínimos Cuadrados	27

Tabla F: Concentración de AC en hojas verdes de Guarumo a partir de la ecuación de calibrado encontrada.	31
3.6. Cálculo de mg ácido clorogénico/ g hoja.....	31
Tabla G: Pesos de muestras de hojas de Guarumo tomados en la preparación de infusiones	31
Tabla H: Contenido de ácido clorogénico en mg AC / g de hojas verdes de <i>Cecropia Peltata</i>	32
ANEXO IV: TABLA T STUDENT	33
ANEXO V: RESULTADOS DE ENSAYOS PRELIMINARES	34
Esquema D: Procedimiento de extracción hidroalcohólica	34
Esquema E: Procedimiento de extracción alcohólica.....	34
Figura D: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con extracto hidroalcohólico de hojas secas (Placa 20 x 20 cm), usando estándar (AC) concentrado.	35
Figura E: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con extracto alcohólico de hojas secas (Placa 20 x 20 cm), usando estándar (AC) concentrado.....	35
Figura F: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con infusión de hojas verdes (Placa 5 x10 cm), usando estándar (AC) diluido.	36
Tabla G: Valores de Rf encontrados en cada uno de los extractos obtenidos en Ensayos Preliminares.	36
ANEXO VI: GLOSARIO.....	37
ANEXO VII : HOJA DE SEGURIDAD DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO ESTÁNDAR	42
ANEXO VIII: CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE EQUIPOS.....	46

ANEXO I: FIGURAS

Figura 1: Fotografías de los árboles de Guarumo muestreados en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya.

Figura 1.1



Fotografía de árbol de Guarumo # 1

Fuente: Fotografía tomadas por autoras

Figura 1.2



Fotografía de árbol de Guarumo # 2

Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Figura 1.3



Fotografía del árbol de Guarumo # 3

Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Figura 2

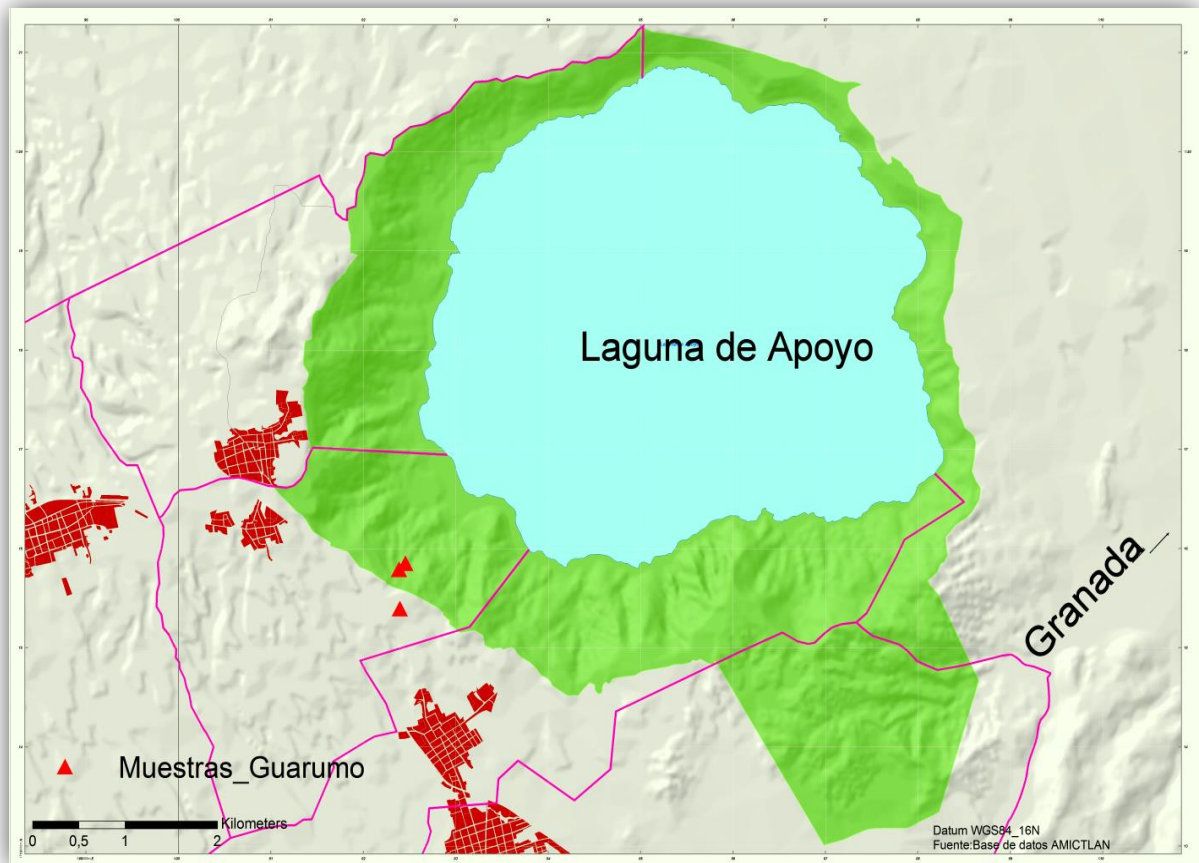


Figura 2: Ubicación geográfica de las muestras de Guarumo tomadas en la Reserva Natural Laguna de Apoyo, Masaya.

Nota: Los triángulos rojos indican la ubicación de las muestras.

Fuente: Base de datos AMICTLAN

Figura 3



Figura 3: Etiquetado y secado de las hojas del árbol Guarumo

Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Figura 4



Figura 4: Tamizaje de hojas secas de Guarumo

Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Figura 5



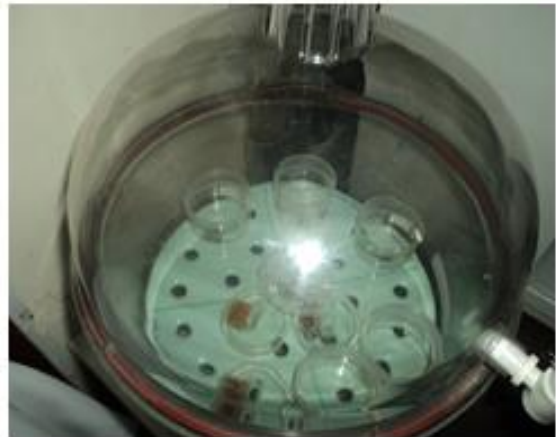
Balanza Analítica Mettler AE100



Balanza Analítica Mettler AE100



Horno eléctrico Memmert UM 50



Desecador

Figura 5: Equipo utilizado en la determinación de pérdida por secado en hojas de Guarumo

Fuente: Fotografías tomadas por autoras

Figura 6



Balanza analítica *Ohaus Adventurer*



embudo de filtración



Baño María *JP Selecta*



matraces aforados de 50 y 250 mL

Figura 6: Equipo utilizado en la preparación de infusiones de Guarumo

Fuente: Fotografías tomadas por autoras.

Figura 7

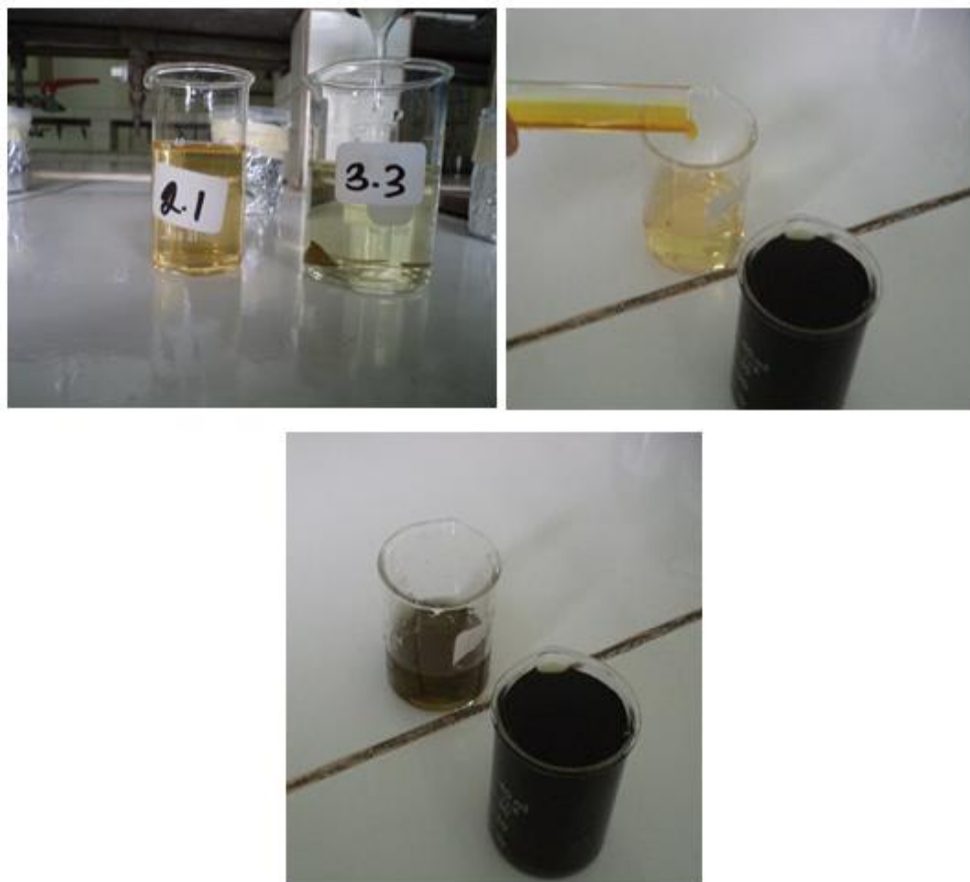


Figura 7: Prueba de identificación de fenoles

Fuente: Fotografías tomadas por autoras.

Figura 8



Saturación de cámara cromatográfica



Gabinete de luz uv *Spectroline*



Capilares desechables *Fisherbrand*



Placas para CCF *Merck*

Figura 8: Equipo utilizado en cromatografía de capa fina (CCF)

Fuente: Fotografías tomadas por autoras.

Figura 9



Balanza analítica *Mettler AE200*



Espectro fotómetro Uv/vis *Agilent 8453*



Celda de cuarzo longitud de paso 1 cm



Matraces a forados de 50 y 250 mL

Figura 9: Equipo utilizado en cuantificación espectrofotométrica

Fuente: Fotografías tomadas por autoras.

2.1- Ficha informativa de la muestra

Ficha 1: Datos Generales

Nº de muestra: 1 Código de la muestra: 1S
Fecha de recolección: 13/05/13
Lugar de recolección: Sector La Pila, RNLA, Nic.
Hora recolección: 06:15 am
Lugar exacto de recolección (GPS) posición 16 P 0602396
UTM 1315814
Altura 370 m. desde el puntero SW 1m

Característica del árbol

Altura (m): 10 m
Grosor (cm): 32cm
Vigor: 1 2 3 4 5
1 —>5 mayor vigor
Flores y frutos: Presencia Ausencia

Características de la hoja

Número de lóbulos: 9-11
Estado de las hojas: B/E
Diámetro 42cm

Condiciones ambientales

Período de recolección Seco Húmedo

Topografía de la zona de recolección de la muestra

Plana Ondulada Accidentada
Destino: Usadas para secar (s) Usadas verdes (v)

ANEXOS

Ficha 2: Datos Generales

N° de muestra: 2 Código de la muestra: 2S
Fecha de recolección: 13/05/13
Lugar de recolección: Sector La Pila, RNLA, Nic.
Hora recolección: 6:40 am
Lugar exacto de recolección (GPS) posición 16 P 0602387
UTM 1315792
Altura 376 m. desde el puntero N1m

Característica del árbol

Altura (m): 15 m
Grosor (cm): 53 cm
Vigor: 1 2 3 4 5
1 —→ 5 mayor vigor
Flores y frutos: Presencia Ausencia

Características de la hoja

Número de lóbulos: 9-11
Estado de las hojas: B/E
Diámetro 45 cm

Condiciones ambientales

Período de recolección Seco Húmedo

Topografía de la zona de recolección de la muestra

Plana Ondulada Accidentada
Destino: Usadas para secar (s) Usadas verdes (v)

ANEXOS

Ficha 3: Datos Generales

N° de muestra: 3 Código de la muestra: 3S

Fecha de recolección: 13/05/13

Lugar de recolección: Sector La Pila, RNLA, Nic.

Hora recolección: 07:10 am

Lugar exacto de recolección (GPS) posición 16 P 0601637
UTM 1316077
Altura 476 m, desde el puntero S 2m

Característica del árbol

Altura (m): 20 m

Grosor (cm): 82 cm

Vigor: 1 2 3 4 5

1 —→ 5 mayor vigor

Flores y frutos: Presencia Ausencia

Características de la hoja

Número de lóbulos: 9-11

Estado de las hojas: B/E

Diámetro 46 cm

Condiciones ambientales

Período de recolección Seco Húmedo

Topografía de la zona de recolección de la muestra

Plana Ondulada Accidentada

Destino: Usadas para secar (s) Usadas verdes (v)

Nota: Para hojas verdes la información es la misma, solamente varía el destino (usadas verdes) y la fecha a 27 de Mayo de 2013.

2.2- Etiquetas de las muestras

Ficha informativa de la muestra	
Código	1.1 S
Fecha recolección	
Hora	
Lugar	
Vigor del árbol	
Altura del árbol	
Diámetro del árbol	
Estado de las hojas	
Topografía de zona de recolección	
Georeferencia	

ANEXO III: DATOS Y CÁLCULOS

3.1- Cálculo de pérdida por secado

$$\% \text{ Pérdida por secado} = \frac{\text{materia volatilizada}}{\text{masa de la muestra tomada para analisis}} \times 100$$

De la que se deduce que:

$$\% \text{ Pérdida por secado} = \frac{\text{Peso inicial de muestra inicial} - \text{Peso final residuo seco}}{\text{Peso muestra inicial}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1}$$

P. Ej.:

$$\% \text{ Pérdida por Secado} = \frac{1.0179g - 0.9604g}{1.0179g} \times 100\% = 5.6489\%$$

Nota: En todo el documento se realiza un ejemplo de cada cálculo

ANEXOS

Tabla A: Datos de pérdida por secado de hojas secas

Código de Muestra	Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula + muestra (g)	Peso cápsula + material seco (g)	Peso muestra (g)	Peso muestra seca (g)	% Pérdida por secado	% Promedio
1.1S	52.5606	53.5785	53.5210	1.0179	0.9604	5.6489	5.6462± 0.002874 %*
1.2S	58.9935	59.9994	59.9426	1.0059	0.9491	5.6467	
1.3S	51.8487	52.9013	52.8419	1.0526	0.9932	5.6432	
2.1S	60.0440	61.0562	61.0051	1.0122	0.9611	5.0484	5.0483± 0.00036055%
2.2S	50.6025	51.5909	51.5410	0.9884	0.9385	5.0485	
2.3S	48.4639	49.4762	49.4251	1.0123	0.9612	5.0479	
3.1S	49.3490	50.3587	50.3059	1.0097	0.9569	5.2293	5.2269± 0.0026764 %
3.2S	58.0841	59.0827	59.0305	0.9986	0.9464	5.2273	
3.3S	57.2213	58.2014	58.1502	0.9801	0.9289	5.2240	

Tabla B: Datos de pérdida por secado de hojas verdes

Código de Muestra	Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula + muestra (g)	Peso cápsula + material seco (g)	Peso muestra (g)	Peso muestra seca (g)	% Pérdida por secado	% Promedio
1.1V	57.2213	58.0184	57.4433	0.7971	0.2220	72.1490	72.1540± 0.05751%
1.2V	58.0841	59.0846	58.3621	1.0005	0.2780	72.2139	
1.3V	49.3490	50.3522	49.6269	1.0032	0.2799	72.0992	
2.1V	48.4639	49.4636	48.8455	0.9997	0.3816	61.8285	61.8261 ± 0.002182%
2.2V	50.6025	51.5906	50.9797	0.9881	0.3772	61.8257	
2.3V	60.0440	61.0428	60.4253	0.9988	0.3813	61.8242	
3.1V	51.8487	52.8366	52.1718	0.9879	0.3231	67.2942	67.2989± 0.004014%
3.2V	58.9935	59.9911	59.3197	0.9976	0.3262	67.3015	
3.3V	52.5606	53.5588	52.8870	0.9982	0.3264	67.3011	

Nota: Los pesos mostrados equivalen al promedio de tres pesadas

*Representa la desviación estándar (s)

3.2- Datos y cálculos en cromatografía de capa fina (CCF)

3.2.1- Factor de Retención (Rf) en cromatografía de capa fina

(World Health Organization, 1998)

$$Rf = \frac{(a)}{(b)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

Rf: Relación de la distancia recorrida en el adsorbente por un determinado compuesto a la recorrida por el borde de ataque del disolvente.

a: Distancia entre el punto de aplicación y el centro de la mancha del material que está siendo examinado.

b: Distancia entre el punto de aplicación y el frente del disolvente.

Placa 1: Infusiones de hojas secas

$$Rf_{\text{Estándar}} = \frac{(a)}{(b)} = \frac{6.2 \text{ cm}}{9.7 \text{ cm}} = 0.6391$$

No se calcula Rf en las muestras de hojas secas debido a que no se formó ninguna mancha.

Placa 2: Infusiones de hojas verdes con extracto concentrado

$$Rf_{\text{Estándar}} = \frac{(a)}{(b)} = \frac{4.6 \text{ cm}}{9.4 \text{ cm}} = 0.6388$$

$$Rf_{\text{Muestra}} = \frac{(a)}{(b)} = \frac{4.6 \text{ cm}}{9.4 \text{ cm}} = 0.6388$$

3.3- Datos y cálculos en cuantificación espectrofotométrica

3.3.1- Preparación de curva de calibración de estándar ácido clorogénico ACROS

Cálculo de preparación de estándar (Solución Madre)

$$ppm = \frac{mg \text{ soluto}}{L \text{ Solución}} \quad \text{Ecuación 3}$$

El espectrofotómetro *Agilent 8453* ofrece numerosas ventajas en comparación con los sistemas tradicionales de espectrofotometría como: número prácticamente ilimitado de patrones y gracias al concepto de análisis de datos, los patrones se pueden medir antes o después de las muestras por lo cual se realizaron tres curvas de calibración de ácido clorogénico en agua tetradesilada para interpolar las muestras con la curva que mejor se ajustaba. A continuación se describen los cálculos de una dilución para cada curva (cuadro en rojo en cada esquema) y los resultados de dicha calibración.

3.3.2- Primera curva de calibración

Todas las soluciones madres (SM) de ácido clorogénico estándar se prepararon a un volumen de 250 mL (± 0.12 mL) y las diluciones a 50 mL (± 0.05 mL). La concentración 0 ppm equivale al blanco (agua tetradesilada CAM).

► Solución Madre (SM) a 80 ppm

Usando la ecuación 3 se obtiene:

$$80 \text{ ppm} \left(\frac{mg}{L} \right) AC = \frac{mg}{0.250 L} \rightarrow mg \text{ AC} = 0.250 L \times 80 \frac{mg}{L} = 20 \text{ mg AC}$$

► Preparación de diluciones

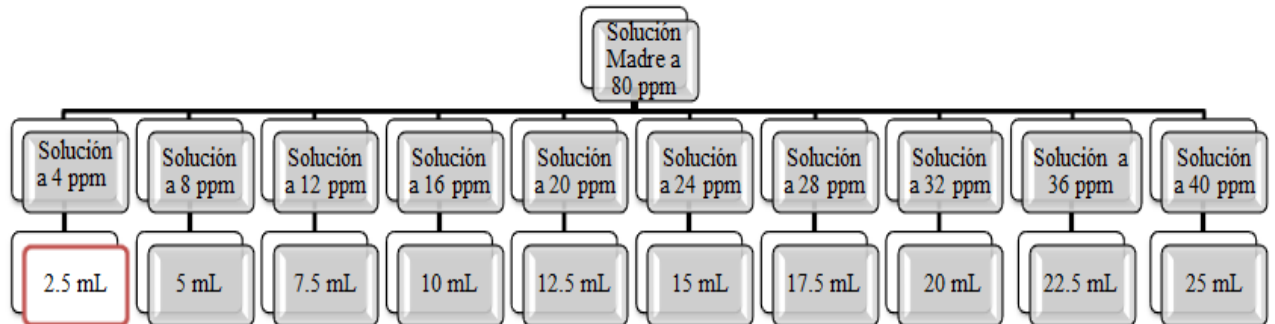
$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad \text{Ecuación 4}$$

Dilución a 4 ppm partir de SM de 80 ppm, usando la ecuación 4:

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1} = \frac{50 \text{ mL} \times 4 \text{ ppm}}{80 \text{ ppm}} = 2.5 \text{ mL de SM}$$

ANEXOS

Esquema A: Representación esquemática de diluciones realizadas para la construcción de primera curva de calibración de ácido clorogénico en agua tetradestilada comprendida entre 4-40 ppm.



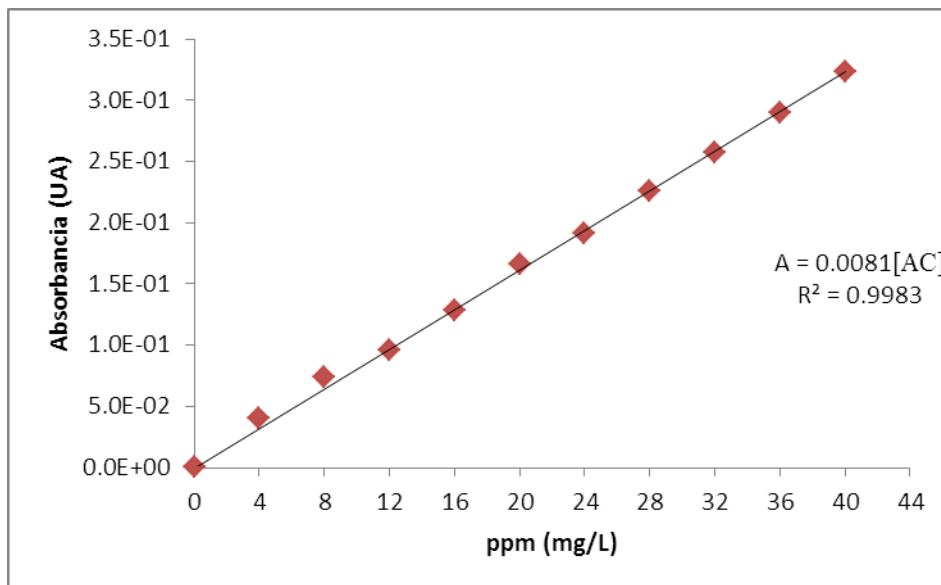
Fuente: Elaborado por autoras

Figura 10: Fotografía de diluciones realizadas en la primera curva de calibración con estándar ácido clorogénico.



Fuente:Fotografía tomada por autoras

Gráfico A: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua tetradestilada comprendida entre 4- 40 ppm.



Nota: Los valores de absorbancia (A) referidos en todo el documento equivale al promedio de 3 mediciones.

Fuente: Elaborado por autoras

3.3.3. Segunda curva de calibración

► **Solución Madre 100 ppm**

$$100 \text{ ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \text{ AC} = \frac{\text{mg}}{0.250 \text{ L}} \rightarrow \text{mg AC} = 0.250 \text{ L} \times 100 \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 25 \text{ mg AC}$$

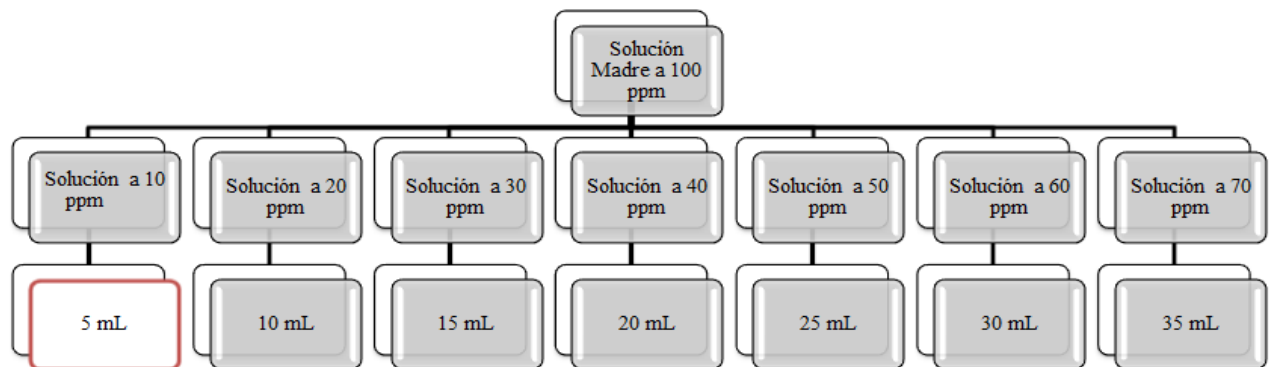
► **Preparación de diluciones**

Dilución a 10 ppm a partir de SM de 100 ppm

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1} = \frac{50 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 5 \text{ mL de SM}$$

ANEXOS

Esquema B: Representación esquemática de diluciones realizadas para construcción de segunda curva de calibración de ácido clorogénico en agua tetradestilada entre 10-70 ppm.



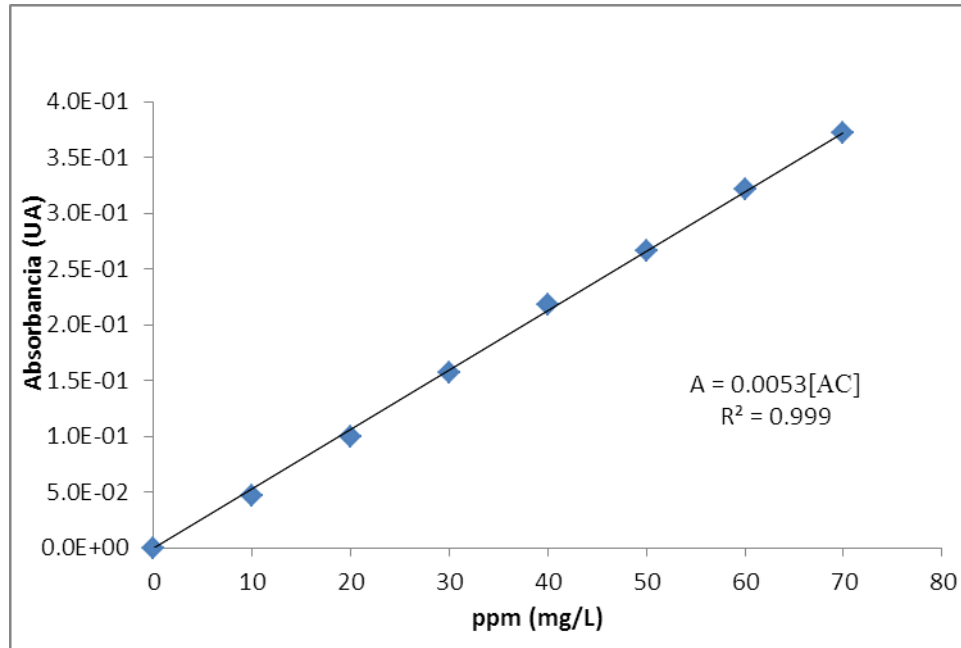
Fuente: Elaborado por autoras.

Figura 11: Fotografía de diluciones realizadas en la segunda curva de calibración con estándar ácido clorogénico.



Fuente: Fotografía tomada por autoras

Gráfico B: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua tetradestilada comprendida entre 10- 70 ppm



Fuente: Elaborado por autoras

3.3.4. Tercera curva de calibración (curva final)

► **Solución Madre a 200 ppm**

$$200 \text{ ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \text{AC} = \frac{\text{mg}}{0.250 \text{ L}} \rightarrow \text{mg AC} = 0.250 \text{ L} \times 200 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 50 \text{ mg AC}$$

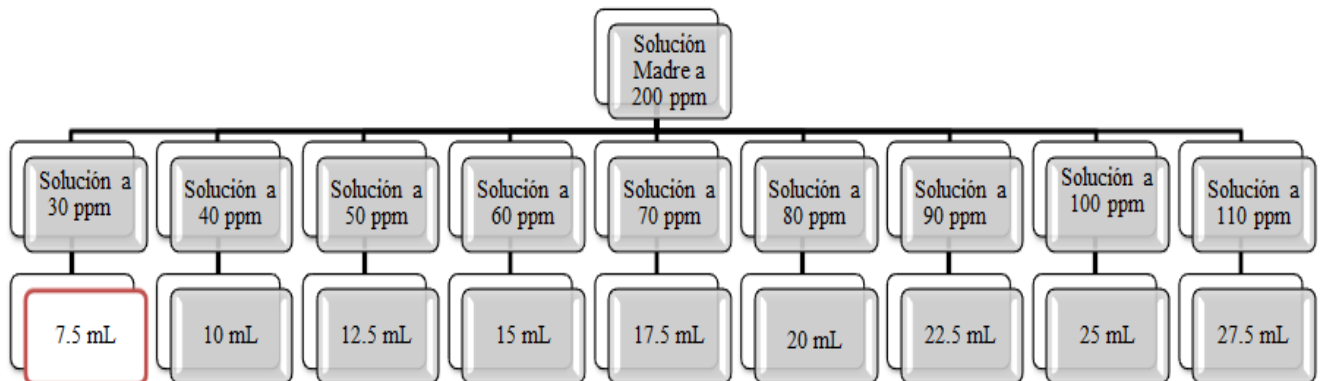
► **Preparación de las diluciones**

Dilución a 30 ppm a partir de SM de 200 ppm

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1} = \frac{50 \text{ mL} \times 30 \text{ ppm}}{200 \text{ ppm}} = 7.5 \text{ mL}$$

ANEXOS

Esquema C: Representación esquemática de diluciones realizadas para la construcción de tercera curva de calibración de ácido clorogénico en agua tetradestilada entre 30-110 ppm



Fuente: Elaborado por autoras

Figura 12: Fotografía de diluciones realizadas en la tercera curva de calibración con estándar ácido clorogénico.



Fuente: Fotografía tomada por autoras

Tabla C: Datos espectroscópicos usados para construir tercera curva de calibración con solución estándar de ácido clorogénico en agua tetradestilada.

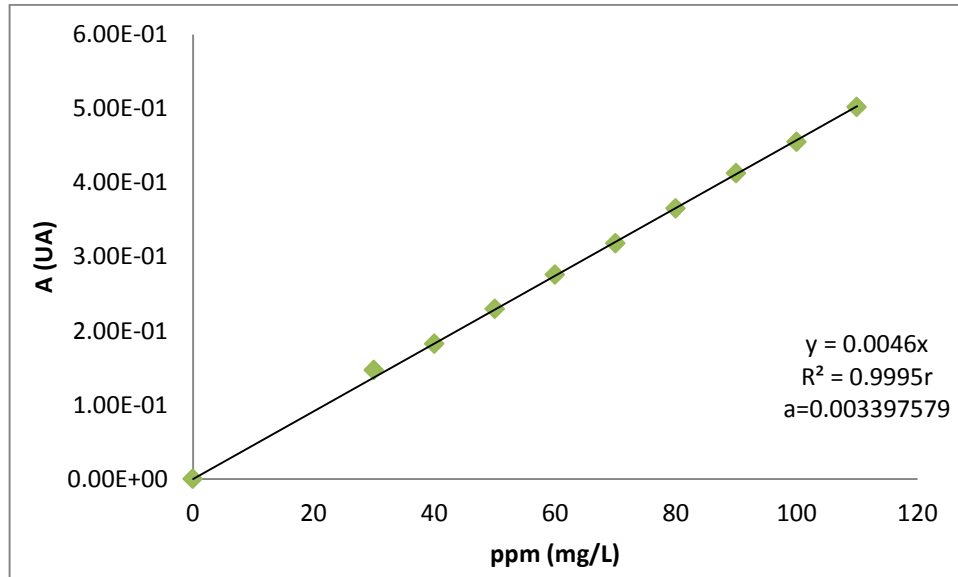
[AC] mg/L	Absorbancias			\bar{A}
	1	2	3	
0	1.55E-04	1.55E-04	1.55E-04	1.55449E-04
30.0000	1.47E-01	1.47E-01	1.47E-01	1.46890E-01
40.0000	1.82E-01	1.82E-01	1.82E-01	1.82390E-01
50.0000	2.29E-01	2.29E-01	2.29E-01	2.29430E-01
60.0000	2.76E-01	2.76E-01	2.76E-01	2.75570E-01
70.0000	3.18E-01	3.18E-01	3.18E-01	3.18010E-01
80.0000	3.65E-01	3.65E-01	3.65E-01	3.65110E-01
90.0000	4.13E-01	4.13E-01	4.13E-01	4.12700E-01
100.0000	4.55E-01	4.55E-01	4.55E-01	4.54910E-01
110.0000	5.02E-01	5.02E-01	5.02E-01	5.02180E-01

Nota: La lectura de A de cada estándar se realizó por triplicado.

Los datos de absorbancias mostrados por el espectrofotómetro *Agilent 8453* corresponden a la referencia medida (agua tetradestilada), es decir, el equipo muestra las absorbancias corregidas.

ANEXOS

Gráfico C: Curva de calibración de ácido clorogénico estándar en agua tetradestilada comprendida entre 30-110 ppm



Fuente: Elaborado por autoras

Para realizar los cálculos de errores asociados a la curva, es necesario tomar en cuenta la tabla a continuación.

Tabla D: Valores de “y ajustados”

ST [AC] mg/L	$A_{\text{corregida}}$	\hat{y}	$yi - \hat{y}$	$(yi - \hat{y})^2$
0	1.55449E-04	0.0033936	-3.23810E-03	1.04853E-05
30	0.14689	0.13927	7.62195E-03	5.80941E-05
40	0.18239	0.18456	-2.16955E-03	4.70695E-06
50	0.22943	0.22985	-4.21050E-04	1.77283E-07
60	0.27557	0.27514	4.27450E-04	1.82714E-07
70	0.31801	0.32043	-2.42405E-03	5.87602E-06
80	0.36511	0.36573	-6.15550E-04	3.78902E-07
90	0.4127	0.41102	1.68295E-03	2.83232E-06
100	0.45491	0.45631	-1.39855E-03	1.95594E-06
110	0.50218	0.50160	5.79950E-04	3.36342E-07
			SUMA	8.50259E-05

ANEXOS

Tabla E: Datos estadísticos usados para la determinación de las incertidumbres asociadas a la ecuación de la recta de calibración con ácido clorogénico estándar a 324 nm

x_i	y_i	$x_i y_i$	x_i^2	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
0	1.55449E-04	0.0000	0.0000	-63.0000	3969.0000	-0.28858	0.08328	18.18048
30	0.14689	4.4067	900.0000	-33.0000	1089.0000	-0.14184	0.02012	4.68087
40	0.18239	7.2956	1600.0000	-23.0000	529.0000	-0.10634	0.01131	2.44592
50	0.22943	11.4715	2500.0000	-13.0000	169.0000	-0.05930	0.00352	0.77096
60	0.27557	16.5342	3600.0000	-3.0000	9.0000	-0.01316	0.00017	0.03949
70	0.31801	22.2607	4900.0000	7.0000	49.0000	0.02928	0.00086	0.20493
80	0.36511	29.2088	6400.0000	17.0000	289.0000	0.07638	0.00583	1.29838
90	0.41270	37.1430	8100.0000	27.0000	729.0000	0.12397	0.01537	3.34707
100	0.45491	45.4910	10000.0000	37.0000	1369.0000	0.16618	0.02761	6.14849
110	0.50218	55.2398	12100.0000	47.0000	2209.0000	0.21345	0.04556	10.03194
$\sum 630$	2.88735	229.0513	50100	0	10410	0.00000	0.21363	47.14854
$\bar{x} 63$	0.28873	22.90513	5010	0	1041	0.00000	0.02136	4.71485

3.4- Fórmulas estadísticas para tratamiento de datos

(Miller J. N.& Miller, 2002)

Media aritmética	$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$	Ecuación 5
------------------	--------------------------------	------------

Desviación estándar	$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	Ecuación 6
---------------------	---	------------

Límite de confianza de la media	$LC_{\bar{x}} = \bar{x} \pm \frac{t_{n-1} s}{\sqrt{n}}$	Ecuación 7
---------------------------------	---	------------

*Anexo IV: Tabla de t student, usados al 95% de confianza

3.5- Métodos de Mínimos Cuadrados

(Miller J. N.& Miller, 2002).

Ecuación de la recta:	$y = a + bx$	Ecuación 8
-----------------------	--------------	------------

Pendiente de la recta:	$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$	Ecuación 9
------------------------	--	------------

Ordenada en el origen:	$a = \bar{y} - b\bar{x}$	Ecuación 10
------------------------	--------------------------	-------------

Coeficiente de correlación:	$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 [\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}}$	Ecuación 11
-----------------------------	---	-------------

Errores aleatorios en y:	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$	Ecuación 12
--------------------------	---	-------------

Desviación estándar de la pendiente:	$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	Ecuación 13
--------------------------------------	---	-------------

Desviación estándar del intercepto	$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	Ecuación 14
------------------------------------	--	-------------

Desviación estándar de X	$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	Ecuación 15
--------------------------	---	-------------

Límite de confianza de la pendiente:	$\pm LC_{b(95\%)} = t_{(n-2)} S_b$	Ecuación 16
--------------------------------------	------------------------------------	-------------

Límite de confianza de ordenada en el origen:	$\pm LC_{a(95\%)} = t_{(n-2)} S_a$	Ecuación 17
---	------------------------------------	-------------

ANEXOS

Límite de confianza para un valor X_0 18	$\pm LC_{x_0(95\%)} = t_{(n-2)} S_{x_0}$	Ecuación
Límite de Detección	$LOD = y_b + 3S_b$	Ecuación 19
Límite de cuantificación	$LOQ = y_b + 10S_b$	Ecuación 20

Donde:

a: Intercepto

b: Pendiente de la recta

x: Concentración de la muestra

\hat{y} : Puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores individuales de x, es decir los valores de y «ajustados».

$S_{y/x}$: Desviación de la absorbancia

S_b : Desviación de la pendiente

S_a : Desviación del intercepto

r: Coeficiente de regresión

t: se obtiene para un nivel de confianza deseado y (n-2) grados de libertad

n: Número de muestras

m: Análisis replicados

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

CÁLCULOS

► Ecuación de la recta de calibrado

$$r = \frac{\sum_i \{(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (xi - \bar{x})^2][\sum_i (yi - \bar{y})^2]\}^{\frac{1}{2}}} = \frac{47.14854}{(10410)(0.21363)^{\frac{1}{2}}} = 0.99980$$

$$r^2 = (0.9998015)^2 = 0.99960$$

$$b = \frac{\sum_i \{(xi - \bar{x})(yi - \bar{y})\}}{\sum_i (xi - \bar{x})^2} = \frac{47.14854}{10410} = 4.52915 \times 10^{-3}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = 0.28873 - 4.52915 \times 10^{-3}(63) = 3.39355 \times 10^{-3}$$

$$y = a + bx$$

$$y = 3.39355 \times 10^{-3} + 4.52915 \times 10^{-3}(x)$$

$$x = 3.39355 \times 10^{-3}$$

$$[AC] = \frac{A - 3.39355 \times 10^{-3}}{4.52915 \times 10^{-3}}$$

Ecuación 21

► Errores asociados a la recta de calibrado

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (yi - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{8.50259 \times 10^{-5}}{8}} = 3.26009 \times 10^{-3}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (xi - \bar{x})^2}} = \frac{3.26009 \times 10^{-3}}{\sqrt{10410}} = 3.19525 \times 10^{-5}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i xi^2}{n \sum_i (xi - \bar{x})^2}} = 3.26009 \times 10^{-3} \sqrt{\frac{50100}{10 \times 10410}} = 2.26163 \times 10^{-3}$$

► Límites de confianza de la recta de calibrado

$$\pm LC_{b \ 95\%} = t_{(n-2)} S_b = \pm(2.31 \times 3.19525 \times 10^{-5}) = \pm 7.38102 \times 10^{-5}$$

ANEXOS

$$b = 4.52915x10^{-3} \pm 3.19525x10^{-5}$$

$$\pm LC_{a\ 95\%} = \pm t_{(n-2)} S_a = \pm (2.31 \times 2.26163x10^{-3}) = \pm 5.22436x10^{-3}$$

$$a = 3.39355x10^{-3} \pm 2.26163x10^{-3}$$

- Errores y límites de confianza de la concentración:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} =$$
$$= \frac{3.26009x10^{-3}}{4.52915x10^{-3}} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{10} + \frac{(1.55449x10^{-4} - 0.28873)^2}{(4.52915x10^{-3})^2 (10410)}} = 0.65312$$

- Límite de detección (LOD)

$$LOD = y_b + 3S_b = 1.55449x10^{-4} + 3(3.19525x10^{-5}) = 2.51306x10^{-4}$$

- Límite de cuantificación (LOQ)

$$LOQ = y_b + 10S_b = 1.55449x10^{-4} + 10(3.19525x10^{-5}) = 4.74974x10^{-4}$$

Para calcular la concentración de ácido clorogénico presente en las muestras de hojas verdes, se sustituye la Absorbancia (A) medida en la ecuación 21:

$$\text{Ej: } [AC] = \frac{A - 3.3935x10^{-3}}{4.52915x10^{-3}}$$

Sustituyendo A:

$$[AC] = \frac{A - 3.3935x10^{-3}}{4.52915x10^{-3}} = \frac{0.27348 - 3.3935x10^{-3}}{4.52915x10^{-3}} = 59.63293$$

Tabla F: Concentración de AC en hojas verdes de Guarumo a partir de la ecuación de calibrado encontrada.

Absorbancia	Concentración (mg/L)
0.27348	59.63293
0.27764	60.55142
0.21635	47.01908
0.25703	56.00090
0.22420	48.75230
0.25743	56.08922
0.37387	81.79824
0.43297	94.84704
0.45241	99.13924

Dado que las diluciones de las muestras están en relación 1: 1, la concentración mostrada por el espectrofotómetro es la que corresponde a cada muestra.

3.6. Cálculo de mg ácido clorogénico/ g hoja

Para éste cálculo se toma en cuenta los pesos de muestras de hojas secas y verdes tomados para la preparación de las infusiones, los cuales se muestran a continuación (Tabla G):

Tabla G: Pesos de muestras de hojas de Guarumo tomados en la preparación de infusiones

# Muestra	Peso (g) hojas secas	Peso (g) hojas verdes
1.1	1.0039	1.0030
1.2	1.0030	1.0019
1.3	1.0020	1.0059
2.1	1.0086	1.0062
2.2	1.0081	1.0040
2.3	1.0035	1.0074
3.1	1.0056	1.0048
3.2	1.0052	1.0019
3.3	1.0012	1.0027

Dado que no se encontró AC en hojas secas solamente se utilizan los datos de hojas verdes de la tabla G

$$[AC] \frac{mg}{g} = \frac{[AC] \frac{mg}{L} \times V(L)}{m(g)} \quad \text{Ecuación 22}$$

Ej:

$$[AC] \frac{mg}{g} = \frac{[AC] \frac{mg}{L} \times V(L)}{m(g)} = \frac{59.63293 \frac{mg}{L} \times 0.050L}{1.0030 g} = 2.97272 \frac{mg AC}{g \text{ hoja}}$$

Tabla H: Contenido de ácido clorogénico en mg AC / g de hojas verdes de *Cecropia Peltata*

Nombre de muestra	Concentración (ppm)	mg AC/g hoja	mg AC/g promedio
Acidguaru 1.1	59.63293	2.97272	2.77686 ± 0.38253
Acidguaru 1.2	60.55142	3.02182	
Acidguaru 1.3	46.99700	2.33606	
Acidguaru 2.1	56.00090	2.78279	2.66492 ± 0.20507
Acidguaru 2.2	48.75672	2.42812	
Acidguaru 2.3	56.08922	2.78386	
Acidguaru 3.1	81.79824	4.07037	4.58244 ± 0.45575
Acidguaru 3.2	94.84704	4.73335	
Acidguaru 3.3	99.13924	4.94361	

Utilizando la ecuación 6, se obtiene la desviación estándar (s) de la concentración de AC en hojas verdes expresadas en mg/g AC.

ANEXO IV: TABLA T STUDENT

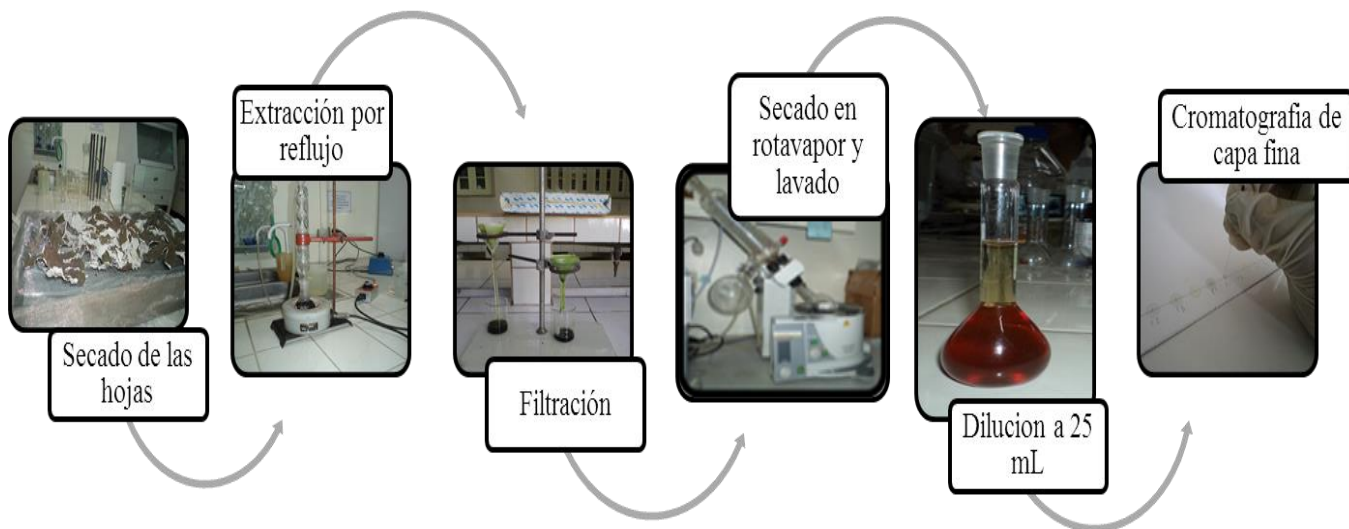
Tabla A.2. La distribución t .

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de t para valores de P de número de grados de libertad</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99%</i>
	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Fuente: Miller J. N. & Miller, 2002

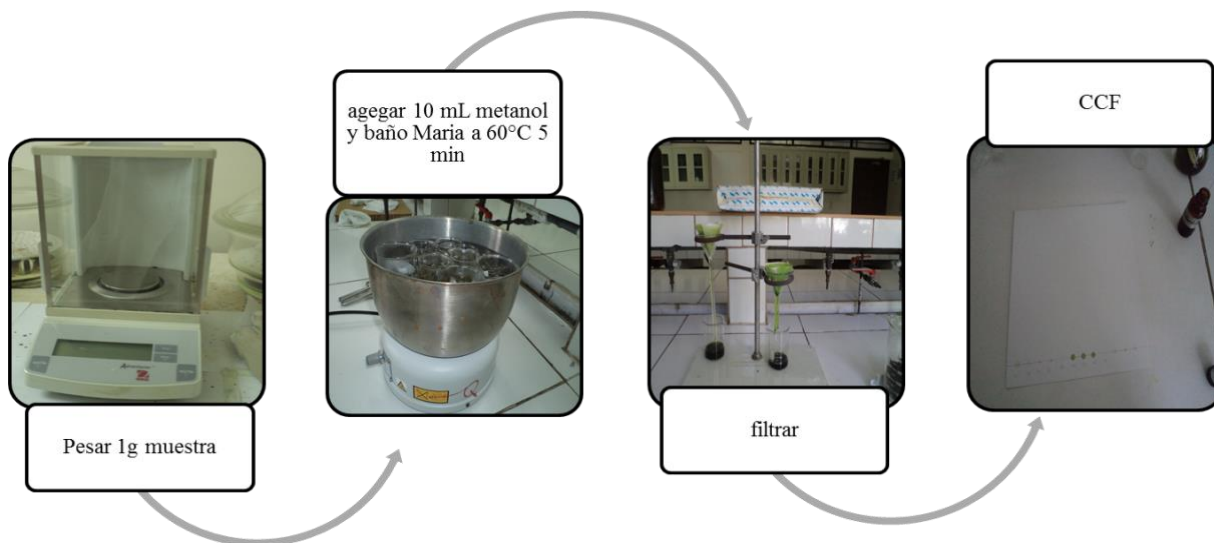
ANEXO V: RESULTADOS DE ENSAYOS PRELIMINARES

Esquema D: Procedimiento de extracción hidroalcohólica



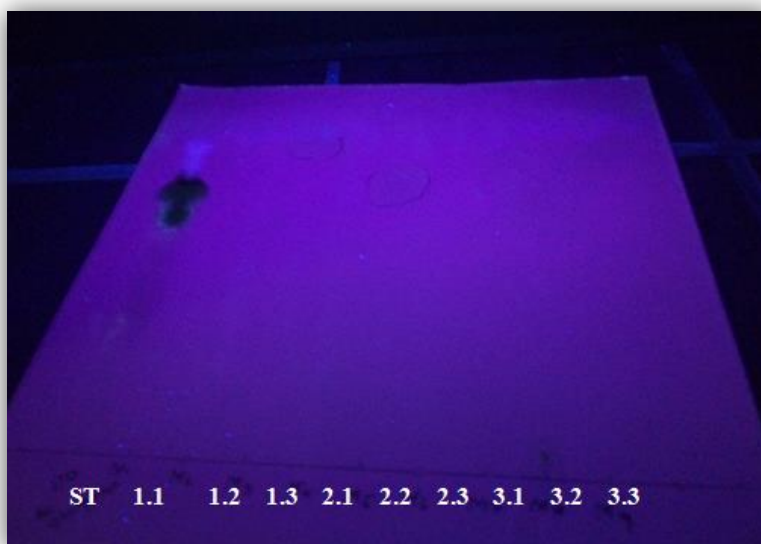
Fuente: Elaborado por autoras

Esquema E: Procedimiento de extracción alcohólica



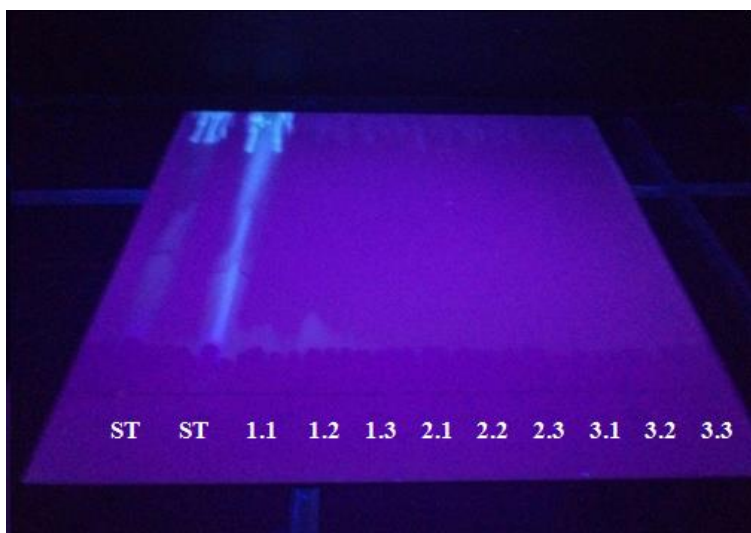
Fuente: Elaborado por autoras

Figura D: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con extracto hidroalcohólico de hojas secas (Placa 20 x 20 cm), usando estándar (AC) concentrado.



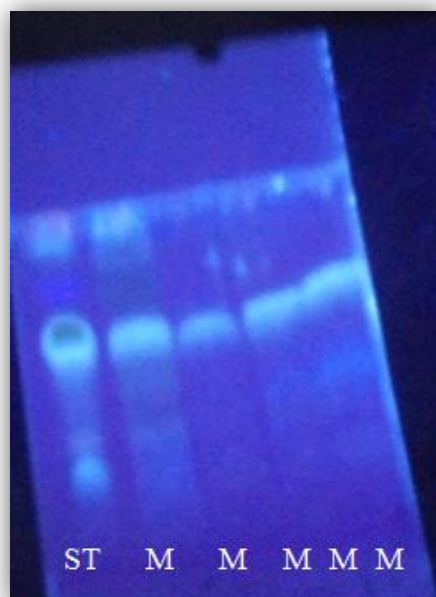
Fuente: Fotografía tomada por autoras

Figura E: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con extracto alcohólico de hojas secas (Placa 20 x 20 cm), usando estándar (AC) concentrado.



Fuente: Fotografía tomada por autoras

Figura F: Visualización en luz uv a 365 nm de placa con infusión de hojas verdes (Placa 5 x10 cm), usando estándar (AC) diluido.



Fuente: Fotografía tomada por autoras

Tabla I: Valores de Rf encontrados en cada uno de los extractos obtenidos en Ensayos Preliminares.

Extractos	Distancia recorrida desde el punto de Aplicación	Distancia recorrida hasta el frente del eluyente	Rf
Hidroalcohólico (hojas secas)	9 cm (ST)	14 cm	0.6428
	- (M)	-	-
Alcohólico (hojas secas)	6 cm (ST)	9.5 cm	0.6315
	- (M)	-	-
Acuoso (hojas verdes)	4 cm (ST)	6.3 cm	0.6349
	4 cm (M)	6.3 cm	0.6349

ANEXO VI: GLOSARIO

Absorbancia: Medida de la absorción de luz por una sustancia. Medida del número de fotones que pasa a través de una muestra.

Ácido clorogénico: Compuesto químico formado por un éster del ácido cinámico y ácido quínico, también conocido como ácido -3-O-cafeoilquínico.

Ácidos shikímico: Intermediario bioquímico importante en las plantas y microorganismos.

Acuminada: Aguzado, puntiagudo

Analito: Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

Antihipertensivo: Sustancia o procedimiento que reduce la presión arterial

Antioxidante: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Ápices: Extremo superior o punta de la hoja.

Aquenios: Tipo de fruto seco producido por numerosas especies de plantas. Indehiscente (que no se abre espontáneamente) que contiene una sola semilla.

Caducas: Hoja o planta (bot): temporal que pierde las partes verdes generalmente en otoño.

Diabetes: Conjunto de trastornos metabólicos que afecta a diferentes órganos y tejidos, caracterizado por un aumento de los niveles de glucosa en sangre.

Dosel: coronamiento de un tronco.

Envés: Cara inferior, posterior o cara abaxial de la lámina o limbo de la hoja de una planta.

Epífita: Dícese de una planta fijada sobre otra, sin ser parásita.

Escabrosas: Áspero, duro.

Espatas: Bráctea generalmente amplia y a veces coloreada que envuelve una inflorescencia.

Espigas: Tipo de inflorescencia racemosa en el cual el eje o raquis es alargado y las flores son sésiles

Estaminados: Cualquier flor que se caracteriza por tener los estambres muy largos, delgados y llamativos.

Estipulas: Estructura usualmente laminar que se forma a cada lado de la base de la hoja

Factor de retención (Rf): Relación de la distancia recorrida en el adsorbente por un compuesto dado a la recorrida por el disolvente.

Fenilalanina: Aminoácido esencial precursor de la tirosina e interviene en la producción de neurohormonas y algunas sustancias químicas.

Fenoles: Metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato, poseen un grupo hidroxilo unido al anillo bencénico

Fitoquímica: Disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales.

Flavonoides: Metabolitos secundarios de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos

Glabro (a): Denominación dado a organismos o sus partes, que no presentan pelos, tricomas o estructuras similares en su superficie externa.

Gluconeogénesis: Ruta anabólica que permite la síntesis de glucosa y glucógeno a partir de precursores no glucídicos.

Glucogenólisis: Proceso catabólico llevado en el citosol que consiste en la remoción de glucosa de una molécula de glucógeno mediante fosforilación para producir glucosa 1-fosfato

Hipocolesterolémica: Sustancia capaz de provocar disminución de colesterol en la sangre, propiedad de producir hipocolesterolemia.

Hipoglucemiante: Sustancia que reduce los niveles de glucosa en sangre.

Inflorescencia: Disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo. Su límite está determinado por una hoja normal.

Infrutescencia: Conjunto de frutos que remplazan a las flores de una inflorescencia.

Límite de detección: En términos generales, el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del “blanco” o “ruido de fondo” (Miller J. N.& Miller, 2002)

Obovado: De forma inversamente ovada, con la parte ancha en el ápice, de forma semejante a la de un huevo.

Panicula: Inflorescencia compuesta formado por racimos cuya longitud disminuye, de aspecto piramidal.

Pedúnculo o pedicelo: Rama que sostiene una flor o inflorescencia.

Perdida por secado: Procedimiento que determina la cantidad de materia volátil en las condiciones especificadas.

Perianto: Conjunto de envolturas florales, cáliz y corola que rodean los estambres y pistilo.

Medicina tradicional: Tiene como fundamento el saber médico ancestral de la población, ésta es transmitida por la tradición familiar o comunitaria, que tienen sus propios agentes de salud y sus ideas específicas sobre la enfermedad y la curación.

Metabolitos primarios: Se producen en el curso de reacciones metabólicas anabólicas o catabólicas que tiene lugar durante las fases de crecimiento y contribuyen a la producción de biomasa o energía por las células

Metabolitos secundarios: Compuesto orgánicos sintetizados por los organismos que no tienen el rol directo de crecimiento o reproducción del mismo.

Muestra: Porción del material a evaluar

Palmatilobada: Hoja palmeada en la que las divisiones llegan a la mitad del limbo o parte membranosa de la hoja

Pecíolo: Órgano de la hoja que la une a la ramita que la sostiene.

Pedicelos: Pedúnculo; es la ramita que sostiene una inflorescencia o un fruto tras su fecundación.

Peltada: Peltata; lamina redondeada y con el pecíolo inserto en el centro.

Pistilados: Dícese de flores femeninas o flores hembras. Son las que tienen un pistilo funcional capaz de producir semillas, pero o no tiene estambres o tienen estambres con anteras que son incapaces de producir polen.

Polifenoloxidasas: Enzimas que catalizan una reacción que transforma o- difenoles en o- quinonas, que son muy reactivas y atacan a una gran variedad de componentes celulares favoreciendo la formación de polímeros negro- marrón, responsables del oscurecimiento de los tejidos vegetales cuando se dañan físicamente.

Planta medicinal: Cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis farmacéutica (Kuklinski, 2000)

Planta silvestre: Planta que crece espontáneamente (Kuklinski, 2000)

Principio activo: Sustancia química con actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga. (Kuklinski, 2000)

Puberulentos: Estado de una superficie cubierta de vello, pelo fino, suave.

Savia: Líquido que circula por las diversas partes de los vegetales.

Sinuosos: Se aplica al trayecto que tiene curvas, ondulaciones o recodos.

Taxonomía: Ciencia de la clasificación, es la ciencia de ordenar la diversidad biológica en taxones anidados unos dentro de otros, ordenados de forma jerárquica, formando un sistema de clasificación.

Tomentoso: Término utilizado para describir los pelos de plantas que se doblan y son enmarañados, formando capas de lana.

Truncado: Incompleto

Umbelas: Inflorescencia cuyos pedicelos parten todos de un mismo punto para elevarse al mismo nivel.

ANEXO VII: HOJA DE SEGURIDAD DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO ESTÁNDAR



Material Safety Data Sheet

Chlorogenic Acid, 99% Predominantly Trans (Ex Coffee Seeds)

MSDS# 09255

Section 1 - Chemical Product and Company Identification

MSDS Name: Chlorogenic Acid, 99% Predominantly Trans (Ex Coffee Seeds)

Catalog Numbers: AC109240000, AC109240010, AC109240050

Synonyms: 3-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-Oxo-2-Propenyl]Oxy]; 1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid.

Company Identification: Acros Organics BVBA
Janssen Pharmaceuticaaan 3a
2440 Geel, Belgium

Company Identification: (USA) Acros Organics One
Reagent Lane Fair
Lawn, NJ 07410

For information in the US, call: 800-ACROS-01

For information in Europe, call: +32 14 57 52 11

Emergency Number, Europe: +32 14 57 52 99

Emergency Number US: 201-796-7100

CHEMTREC Phone Number, US: 800-424-9300

CHEMTREC Phone Number, Europe: 703-527-3887

Section 2 - Composition, Information on Ingredients

CAS#: 327-97-9
Chemical Name: Chlorogenic Acid
%: 99%
EINECS#: 206-325-6

Hazard Symbols: None listed

Risk Phrases: None listed

Section 3 - Hazards Identification

EMERGENCY OVERVIEW

Caution! The toxicological properties of this material have not been fully investigated. May cause eye and skin irritation.
May cause respiratory and digestive tract irritation. Target Organs: None known.

Potential Health Effects

Eye: May cause eye irritation.

Skin: May cause skin irritation.

Ingestion: May cause irritation of the digestive tract. The toxicological properties of this substance have not been fully investigated.

Inhalation: May cause respiratory tract irritation. The toxicological properties of this substance have not been fully investigated.

Chronic: No information found.

Section 4 - First Aid Measures

Eyes: Flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes, occasionally lifting the upper and lower eyelids. Get medical aid.

Skin: Get medical aid. Flush skin with plenty of water for at least 15 minutes while removing contaminated clothing and shoes. Wash clothing before reuse.
Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical aid. Do NOT induce vomiting. If

ANEXOS

Ingestion: conscious and alert, rinse mouth and drink 2-4 cupfuls of milk or water.
Inhalation: Remove from exposure and move to fresh air immediately. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen. Get medical aid.

Notes to Physician:

Section 5 - Fire Fighting Measures

General Information: As in any fire, wear a self-contained breathing apparatus in pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent), and full protective gear. During a fire, irritating and highly toxic gases may be generated by thermal decomposition or combustion. Runoff from fire control or dilution water may cause pollution.

Extinguishing Media: Use agent most appropriate to extinguish fire. Use water spray, dry chemical, carbon dioxide, or appropriate foam.

Autoignition Temperature: Not applicable.

Flash Point: Not applicable.

Explosion Limits: Lower: Not available

Explosion Limits: Upper: Not available

NFPA Rating: health: 1; flammability: 0; instability: 0;

Section 6 - Accidental Release Measures

General Information: Use proper personal protective equipment as indicated in Section 8.

Spills/Leaks: Vacuum or sweep up material and place into a suitable disposal container. Clean up spills immediately, observing precautions in the Protective Equipment section. Avoid generating dusty conditions. Provide ventilation.

Section 7 - Handling and Storage

Handling: Wash thoroughly after handling. Remove contaminated clothing and wash before reuse. Use with adequate ventilation. Minimize dust generation and accumulation. Avoid contact with eyes, skin, and clothing. Keep container tightly closed. Avoid ingestion and inhalation.

Storage: Store in a tightly closed container. Store in a cool, dry, well-ventilated area away from incompatible substances. Keep refrigerated. (Store below 4°C/39°F.)

Section 8 - Exposure Controls, Personal Protection

Chemical Name	ACGIH	NIOSH	OSHA - Final PELs
Chlorogenic Acid	none listed	none listed	none listed

OSHA Vacated PELs: Chlorogenic Acid: None listed

Engineering Controls:

Facilities storing or utilizing this material should be equipped with an eyewash facility and a safety shower. Use adequate ventilation to keep airborne concentrations low.

Exposure Limits

Personal Protective Equipment

Eyes: Wear appropriate protective eyeglasses or chemical safety goggles as described by OSHA's eye and face protection regulations in 29 CFR 1910.133 or European Standard EN166.

Skin: Wear appropriate protective gloves to prevent skin exposure.

Clothing: Wear appropriate protective clothing to prevent skin exposure.

Respirators: Follow the OSHA respirator regulations found in 29 CFR 1910.134 or European Standard EN 149. Use a NIOSH/MSHA or European Standard EN 149 approved respirator if exposure limits are exceeded or if irritation or other symptoms are experienced.

Section 9 - Physical and Chemical Properties

Physical State: Powder

ANEXOS

Color: white to yellow-beige
Odor: None reported.
pH: Not available
Vapor Pressure: Not available
Vapor Density: Not available
Evaporation Rate: Not available
Viscosity: Not available
Boiling Point: Not available
Freezing/Melting Point: 207.00 - 209.00 deg C
Decomposition Temperature: Not available
Solubility in water: soluble in hot water
Specific Gravity/Density:
Molecular Formula: C₁₆H₁₈O₉
Molecular Weight: 354.30
Section 10 - Stability and Reactivity
Chemical Stability: Stable under normal temperatures and pressures.
Conditions to Avoid: Incompatible materials, dust generation, excess heat, strong oxidant
Incompatibilities with Other Materials: Not available
Hazardous Decomposition Products: Carbon monoxide, carbon monoxide, carbon dioxide.
Hazardous Polymerization: Has not been reported.
Section 11 - Toxicological Information
RTECS#: CAS# 327-97-9: GU8480000
LD50/LC50: RTECS: Not available.
Carcinogenicity: Chlorogenic Acid - Not listed as a carcinogen by ACGIH, IARC, NTP, or CA Prop 65.
Other: No information found.
Section 12 - Ecological Information
Not available
Section 13 - Disposal Considerations
Dispose of in a manner consistent with federal, state, and local regulations.
Section 14 - Transport Information
US DOT
Shipping Name: Not regulated as a hazardous material
Hazard Class:
UN Number:
Packing Group:
Canada TDG
Shipping Name: Not available
Hazard Class:
UN Number:
Packing Group:

Section 15 - Regulatory Information

European/International Regulations

European Labeling in Accordance with EC Directives

Hazard Symbols: Not available

Risk Phrases:

Safety Phrases:

S 24/25 Avoid contact with skin and eyes.

S 28A After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 37 Wear suitable gloves.

S 45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

WGK (Water Danger/Protection)

CAS# 327-97-9: Not available

Canada

Canadian WHMIS Classifications: Not available

This product has been classified in accordance with the hazard criteria of the Controlled Products Regulations and the MSDS contains all of the information required by those regulations.

CAS# 327-97-9 is not listed on Canada's Ingredient Disclosure List.

US Federal

TSCA

CAS# 327-97-9 is not listed on the TSCA Inventory. It is for research and development use only.



Section 16 - Other Information

MSDS Creation Date: 9/02/1997

Revision #7 Date 7/20/2009

The information above is believed to be accurate and represents the best information currently available to us. However, we make no warranty of merchantability or any other warranty, express or implied, with respect to such information, and we assume no liability resulting from its use. Users should make their own investigations to determine the suitability of the information for their particular purposes. In no event shall the company be liable for any claims, losses, or damages of any third party or for lost profits or any special, indirect, incidental, consequential, or exemplary damages howsoever arising, even if the company has been advised of the possibility of such damages.

ANEXO VIII: CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE EQUIPOS



REPORTE DE SERVICIO

EMPRESA: LNRB-MAGFOR **FECHA:** 23 de Mayo del 2013

RESPONSABLE: Lic. Aura Estela Mendoza

ASUNTO: GARANTÍA **Reporte numero** MQ-008-09SN

EQUIPOS: ESPECT. 8453, AGILENT **Números de Serie:** CN22806643

Día de Inicio : 23 de Mayo del 2013 **Día finalización :** 23 de Mayo del 2013

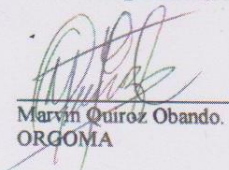

DESCRIPCION DE LABOR REALIZADA

Se realizó mantenimiento preventivo. Limpieza interna y externa del equipo. Limpieza de paso óptico, Calibración de Longitud de Onda. Primera visita de Contrato de Mantenimiento.

Al equipo se le realizaron pruebas para verificar estado electrónico y desempeño analítico con los resultados esperados que dejan al equipo listo para ejecutar análisis de acuerdo a las especificaciones exigidas por la USP y otras Normas Internacionales en las cuales el fabricante reconoce que este equipo cumple.

Se adjuntan 4 páginas que reportan como pruebas que pasan: Estabilidad, Intensidad de Lámparas, Filtro y Cortador, Corriente oscura, Ruido RMS, Deriva de Línea Base RMS. 4 horas de labor. Recibe el equipo Lic. Yelba Ayerdis, Sub-Directora Técnica de LNRB.

RECOMENDACIONES O NOTAS

<p>Ingeniero de Servicio</p>  <p>Marvin Quiroz Obando. ORGOMA</p>	<p>Cliente</p>  <p>Lic. Yelba del Socorro Ayerdis LNRB-MAGFOR</p>
	<p>Ing. Alejandro Saavedra R J MTO MAGFOR</p>

Página 1 de 1

Departamento de Soporte Técnico
Tel : 268-77-48 / Fax : 268-77-48
E-mail : mquiroz@orgoma.com

ANEXOS

Costado Sur Villa Progreso

UNI - RUPAP

Managua, Nicaragua.

Telefax: (505) 248 - 0851

e-Mail: lanamet@ibw.com.ni

http://www.mific.gob.ni/dtnm.index.htm



Laboratorio Nacional de Metrología

CERTIFICADO DE CALIBRACION

Calibration Certificate

Registro: RCB-5060-13
Register

Número de Servicio: OP-2528-13-03
Service Number

Página 1 de 3 Páginas
Page of Pages

Objeto: Balanza electrónica
Device

Marca: Mettler-Toledo GmbH
Manufacturer: CH-8606 Grifensee, Suiza

Modelo: AE200
Model / Type

Número de Serie: 1113230494
Serial Number: Inv: 014-10-5-076-092

Rango de Calibración: Máx: 0 g a 200 g
Range of Calibration

División de Escala: 0.0001 g
Scale Division: e= 0.001 g

Cliente: Laboratorio Nacional de Residuos Químicos y Biológicos (LNRQB)
Costumer: ENEL Central 300 m al Sur
Managua, Nicaragua.

Fecha de Calibración: 2013-04-23
Date of Calibration

Este Certificado de Calibración expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. Podrá ser reproducido total pero no parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del Laboratorio Nacional de Metrología. Los datos contenidos en el presente Certificado se refieren sólo al instrumento descrito en ésta página. Estos conciernen al resultado de la calibración realizada en éste instrumento en el momento y bajo las condiciones en que se realizaron las mediciones. El Laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los instrumentos calibrados o de éste documento. El Certificado de Calibración no es válido sin firma y sello autorizados.

This Calibration Certificate expresses the result of realized measurements. It shall not be reproduced other than in full, except with prior written permission of the issuing laboratory. The data contained on the present certificate refer only to the instrument described on this page and concern the result of calibration performed on this instrument at the moment and under test conditions. The issuing laboratory is not responsible for any damage resulting from the inappropriate use of the calibrated equipment or of this document. This Calibration Certificate is not valid without authorized signature and seal.

Fecha de Emisión: 2013-05-02
Date of Issue

Calibró: [Signature]
Calibrated by

Revisó: [Signature]
Revised by

2013-05-02

Majnor Ortega O.
Responsable de Calibración
Person in Charge

Lic. Gustavo Montiel
Director
Head of Laboratory

