



UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO  
FACULTAD DE FARMACIA  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y DE LA COMPOSICIÓN  
QUÍMICA DE LAS HOJAS DE TRES CULTIVARES DE *PERSEA AMERICANA*  
MILL, CON EL FIN DE ELABORAR UNA MONOGRAFÍA FARMACOPEICA.**

**Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico**

**VICTOR IGNACIO GÓMEZ SAAVEDRA**

**Director de Tesis: Q.F. Marcela Escobar P.**

**Co-director de Tesis: Q.F Carmen Olcese B.**

**2013**

## DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanas por el apoyo incondicional en todos los momentos, doy gracias que hayamos coincidido en esta vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá Olga y mi papá Víctor por estar conmigo, por su preocupación y por entregarme cariño y cuidado.

A mi directora de tesis Marcela Escobar porque desde el momento en que la conocí no ha dejado de apoyarme tanto en el desarrollo de la tesis como en otras instancias universitarias siempre con un consejo o una palabra.

A mi co-directora de tesis Carmen Olcese por su apoyo en cada instancia de la tesis desde la compañía en la recolección hasta la revisión hoja por hoja de la tesis gracias además por la preocupación.

A las profesoras Cecilia Rubio y Marcela Goddard por el conocimiento entregado y sus consejos para la realización de un buen trabajo de tesis.

A mis hermanas Vale y Pauli por el apoyo, el cariño, la preocupación constante por ser mis hermanas.

Al laboratorio de la Farmacopea Chilena por entregarme las herramientas para desarrollar la tesis, pero en especial agradezco a la gente que trabaja en el laboratorio Don Denis y Daniela dos personas que entregan un ambiente grato de trabajo y generan un ambiente familiar, cariñoso y de preocupación tanto para mi como para la Aino, Cala, Claudio, Dani, Don Adolfo, Maka, Nico, Margarita, Oscar y Pia.

Al Sr Jaime Borquez Gongora por darme la posibilidad de recolectar las hojas desde sus arboles.

A mis mejores amigos y equipo de fútbol Diego, Enzo, Miguel e Ítalo por la amistad incondicional y por estar en todos los momentos tanto en victorias como en las derrotas y a nuestra animadora Cindy Vásquez.

A la Ale, Angélica, Camila, Catita, Daniel, José, JC, Margarita, Nicol, Pazita por su amistad durante toda la época universitaria y más.

A las secretarias de la facultad Sra Cristina, Johanna y Susan por estar siempre dispuestas a ayudar en todas las consultas y tramites durante mis 6 años de carrera.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
ÍNDICE GENERAL.....	i - v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi - ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix - x
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3 – 23</b>
2.1. Definición de medicamento herbario, fitofármaco y de medicina.....	3 – 4
herbaria o fitoterapia.	
2.2. Clasificación de la fitoterapia.....	4
2.3. Apogeo de la fitoterapia.....	5 – 8
2.4. Las farmacopeas y el control de calidad.....	8 – 11
2.5. El palto.....	12 - 17
2.5.1. Características botánicas vegetativas de la <i>P. americana</i> .....	12 – 14
2.5.2. Características botánicas reproductivas.....	15 – 17
2.6. Etnofarmacología de las hojas de <i>P. americana</i> .....	18
2.7. Flavonoides presentes en las hojas de <i>P. americana</i> .....	18 – 20
2.8. Cultivares de <i>P. americana</i> .....	20 – 23
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>25 – 26</b>
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	26
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27 – 55</b>
5.1. Equipos, materiales y reactivos.....	27 – 29
5.2. Muestras.....	30 – 32

5.3. Metodología.....	32 – 33
5.4. Recolección, secado y selección.....	34 – 35
5.4.1. Recolección.....	34
5.4.2. Secado y selección.....	34 – 35
5.5. Caracterización botánica de la anatomía foliar.....	35 – 36
5.5.1. Características macromorfológicas y análisis morfométrico.....	35 – 36
5.5.1.1. Muestreo.....	35
5.5.1.2. Elaboración de los ejemplares para el herbario.....	35
5.5.1.3. Características organolépticas y macromorfológicas cualitativas.....	35
5.5.1.4. Análisis morfométrico.....	35
5.5.1.4.1. Análisis de tramos.....	36
5.5.1.4.2. Análisis morfométrico del peciolo, lámina, ancho de lámina y hoja..	36
5.5.2. Características micromorfológicas de la lámina foliar.....	36 – 38
5.5.2.1. Preparación de las muestras para observaciones microscópicas,.....	36 – 37
reactivos y registro	
5.5.2.2. Microcorte transversal de la lámina.....	37 – 38
5.5.3. Características microscópicas del polvo.....	38
5.6. Determinación de la composición química establecida.....	39 – 55
5.6.1. Ensayos farmacopeicos generales.....	39 – 42
5.6.1.1. Pérdida por secado.....	39
5.6.1.2. Cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.....	39 – 40
5.6.1.3. Materia extraíble.....	40 – 41
5.6.1.4. Aceites esenciales.....	41 – 42
5.6.2. Ensayos químicos cualitativos.....	42 – 48
5.6.2.1. Cromatografía en capa fina.....	42 – 43
5.6.2.2. Tamizaje fitoquímico.....	43 – 48
5.6.3. Ensayos químicos cuantitativos.....	48 – 55





7.3.1.2. Cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.....	130
7.3.1.3. Materia extraíble.....	131
7.3.1.4. Aceites esenciales.....	131 - 132
7.3.2. Ensayos químicos cualitativos.....	132 – 136
7.3.2.1. Cromatografía en capa fina.....	132 – 133
7.3.2.2. Tamizaje fitoquímico.....	133 – 136
7.3.3. Ensayos químicos cuantitativos.....	136 – 141
7.3.3.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	136 – 137
7.3.3.2. Cuantificación de taninos.....	137 – 138
7.3.3.3. Cuantificación de flavonoides totales.....	139
7.3.3.4. Cuantificación de rutina, quercetina y apigenina por HPLC.....	139 – 141
7.4. Elaboración de la monografía.....	141 – 142
<b>8. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>144 – 152</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>153 – 158</b>
10.1. Curva de calibrado ácido gálico.....	153
10.2. Curva de calibrado pirogalol.....	154
10.3. Curva de calibrado quercetina.....	155
10.4. Curva de calibrado rutina HPLC.....	156
10.5. Curva de calibrado quercetina HPLC.....	157
10.6. Curva de calibrado apigenina HPLC.....	158
<b>11. APÉNDICE.....</b>	<b>159 – 165</b>
11.1. Fundamentos de los métodos químicos.....	158 – 162
11.2. Preparación de reactivos para el desarrollo del tamizaje fitoquímico.....	163
11.3. Fundamento diafanización y tinciones.....	164

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Comparación de MCYA, medicina tradicional y medicina convencional entre Chile y china.....	5
Figura 2: Importancia de los ensayos de calidad.....	8
Figura 3: Parte de una monografía farmacopeica.....	9
Figura 4: Características vegetativas de <i>P. americana</i> .....	14
Figura 5: Características del sistema reproductivo y del fruto de <i>P. americana</i> .....	17
Figura 6: Estructura general de los flavonoides y posición de sus sustituyentes.....	19
Figura 7: Ejemplares herborizados de la materia vegetal utilizada.....	31
Figura 8: Ubicación geográfica del lugar de recolección.....	32
Figura 9: Metodología de trabajo para la realización de la monografía farmacopeica para <i>P. americana</i> .....	33
Figura 10: Tramos, caracteres morfométricos y lugar de los cortes.....	38
Figura 11: Ensayos desarrollados al extracto n-hexánico.....	43
Figura 12: Ensayos desarrollados al extracto alcohólico.....	44
Figura 13: Ensayos desarrollados al extracto acuoso.....	44
<i>Figura 14: Forma de la hoja de cada cultivar.....</i>	<i>59</i>
Figura 15: Molde de las nervaduras de las hojas de los tres cultivares.....	60
Figura 16: Fruto de los tres cultivares.....	60
Figura 17: Análisis estadístico de Tukey para las cuatro características evaluadas.....	63
Figura 18: Correlación entre las características evaluadas para cv. Edranol.....	64
Figura 19: Correlación entre las características evaluadas para cv. Hass.....	65
Figura 20: Correlación entre las características evaluadas para cv. Fuerte.....	66

Figura 21: cv. Edranol: En vista superficial hoja.....	67
Figura 22: cv. Edranol: tricomas.....	68
Figura 23: cv. Edranol: En el corte transversal hoja.....	68
Figura 24: cv. Edranol: En el corte transversal nervio medio.....	69
Figura 25: cv. Hass: En vista superficial hoja.....	70
Figura 26: cv. Hass: tricomas.....	71
Figura 27: cv. Hass: En el corte transversal hoja.....	71
Figura 28: cv. Hass: En el corte transversal nervio medio.....	72
Figura 29: cv. Fuerte: En vista superficial hoja y tricoma.....	73
Figura 30: cv. Fuerte: En el corte transversal hoja.....	74
Figura 31: cv. Fuerte: En el corte transversal nervio medio.....	75
Figura 32: Corte transversal de la lámina muestra la cutícula con tinción de safranina.....	76
Figura 33: Complejos estomáticos paracíticos.....	76
Figura 34: cv. Edranol: microcorte transversal de la lámina.....	77
Figura 35: cv. Hass: microcorte transversal de la lámina.....	78
Figura 36: cv. Fuerte: microcorte transversal de la lámina.....	79
Figura 37: Análisis de Tukey del número de corridas de células tabicadas.....	80
Figura 38: Estructuras del polvo cv. Edranol.....	82
Figura 39: Estructuras del polvo cv. Hass.....	83
Figura 40: Estructuras del polvo cv. Fuerte.....	84
Figura 41: Análisis de Tukey para la pérdida por secado.....	85
Figura 42: Análisis de Tukey cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.....	86
Figura 43: Análisis de Tukey para la materia extraíble en frío y en caliente.....	89

Figura 44: TLC de los cultivares más estándar de rutina.....	91
Figura 45: Diagrama de la TLC de los cultivares más estándar de rutina.....	92
Figura 46: $R_f$ y $hR_f$ de la “huella digital” de cada cultivar y del estándar de rutina.....	93
Figura 47: TLC cultivares más el estándar de quercetina y apigenina.....	95
Figura 48: Diagrama cultivares más el estándar de quercetina y apigenina.....	96
Figura 49: $R_f$ y $hR_f$ de la “huella digital” de cada cultivar y de los estándares de apigenina y rutina.....	97
Figura 50: TLC y diagrama de la elución de <i>L. nobilis</i> .....	99
Figura 51: $R_f$ y $hR_f$ de la “huella digital” para <i>L. nobilis</i> .....	100
Figura 52: Espectros ultravioleta-visible.....	103
Figura 53: Espectros infrarrojos del extracto acuoso.....	105
Figura 54: Espectros infrarrojos del extracto alcohólico.....	106
Figura 55: Espectros infrarrojos del extracto hexánico.....	107
Figura 56: Comparación de espectros alcohólicos.....	109
Figura 57: Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	110
Figura 58: Análisis estadístico de los resultados compuestos fenolicos no adsorbibles y taninos totales.....	112
Figura 59: Análisis estadístico de los resultados de los flavonoides totales.....	113
Figura 60: Cromatograma de los estándares de rutina, quercetina y apigenina.....	114
Figura 61: Cromatogramas cv. Hass sin hidrólisis y con hidrólisis.....	115
Figura 62: Cromatogramas cv. Edranol sin hidrólisis y con hidrólisis.....	116
Figura 63: Cromatogramas cv. Fuerte sin hidrólisis y con hidrólisis.....	117
Figura 64: Análisis estadístico cuantificación de quercetina.....	119

Figura 65: Estructura final de la monografía común para cv. Hass y cv. Edranol.....	120
Figura 66: Estructura final de la monografía particular para cv. Fuerte.....	121

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Factores del resurgimiento de la fitoterapia.....	6
Tabla 2: Características de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.....	21
Tabla 3: Equipos utilizados para la caracterización botánica y composición química de las hojas de <i>P. americana</i> de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.....	28
Tabla 4: Reactivos utilizados para la caracterización botánica y composición química de las hojas de <i>P. americana</i> de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.....	29
Tabla 5: Curva de calibrado ácido gálico.....	50
Tabla 6: Curva de calibrado pirogalol.....	52
Tabla 7: Curva de calibrado quercetina.....	53
Tabla 8: Gradiente modificada.....	54
Tabla 9: Curva de calibrado apigenina, rutina y quercetina.....	55
Tabla 10: Resumen de las características macromorfológicas de las hojas y del fruto.....	58
Tabla 11: Promedios de los trazos T1, T2 Y T3.....	61
Tabla 12: Relaciones entre los promedios de los tramos.....	62
Tabla 13: Promedios del tamaño del peciolo, de la lámina, del ancho de la lámina y de la hoja....	62
Tabla 14: Descripción de las características y elementos encontrados en el polvo.....	81
Tabla 15: Resultados de la pérdida por secado.....	85
Tabla 16: Resultados de las cenizas totales y de las cenizas insolubles en ácido.....	86
Tabla 17: Resultados de la materia extraíble en frío.....	87

Tabla 18: Resultados de la materia extraíble en caliente.....	87
Tabla 19: Volumen extraído de aceites esenciales en 60 g de muestra por cultivar.....	90
Tabla 20: Resultados del tamizaje fitoquímico.....	101
Tabla 21: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales.....	110
Tabla 22: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos no adsorbibles y de taninos totales.....	111
Tabla 23: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales.....	112
Tabla 24: Resultados de la cuantificación de quercetina.....	118

## 1. RESUMEN

Las monografías farmacopeicas constituyen un instrumento clave, pues facilita la elaboración de los documentos de registro de medicamentos y el cumplimiento de los parámetros de calidad, seguridad y eficacia tanto de las materias primas como de sus derivados, aportan información rigurosa y fiable, contribuyen a la formación de los profesionales de la salud y responden a las necesidades de las autoridades reguladoras, servicios de control de calidad y fabricantes de materias primas y productos farmacéuticos.

Este estudio evaluó la elaboración de una monografía farmacopeica común o particular para las hojas de tres de los cuatro cultivares de paltos (*Persea americana* Mill.) que poseen la mayor cantidad de hectáreas plantadas en Chile, estos son Hass, Fuerte y Edranol, ya que en la mayoría de los estudios químicos no se define el cultivar al que se les confieren las propiedades medicinales. Para esto se estudiaron las características botánicas y la composición química de las hojas, a través de métodos macro y microscópicos, ensayos farmacopeicos generales y ensayos químicos cualitativos y cuantitativos. De estos últimos, la cuantificación de flavonoides totales fue determinante para la decisión de elaborar una o más monografías, puesto que se les ha conferido a los flavonoides presentes en las hojas la mayoría de las propiedades farmacológicas. El resto de los ensayos permitió estructurar las monografías al definir los parámetros de calidad e identificación.

El resultado de la cuantificación de flavonoides totales mostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivares Edranol ( $17 \pm 0,49$  mg de equivalente de quercetina/1 g de muestra en base seca) y Hass ( $16,47 \pm 0,11$  mg de equivalente de quercetina/1 g de muestra en base seca), pero si entre ellos y el cultivar Fuerte ( $14,04 \pm 0,11$  mg de equivalente de quercetina/1 g de muestra en base seca), por lo tanto se elaboró en conjunto con los resultados obtenidos del resto de las pruebas dos monografías farmacopeicas.

## 1.1. SUMMARY

Pharmacopoeial monographs are a key instrument, because it facilitates the development of drug registration documentation and compliance of the parameters of quality, safety and efficacy of both raw materials and their derivatives, provide accurate information and reliable, contribute to the training of health professionals and meet the needs of regulatory authorities, quality control services and manufacturers of raw materials and pharmaceuticals.

This study evaluated the development of a common or individual pharmacopoeial monograph for leaves of three of the four cultivars of avocado (*Persea americana* Mill.) that have the greatest number of acres planted in Chile, these are Hass, Fuerte and Edranol, as in the majority of studies do not define the cultivar to which they confer medicinal properties. For this studied the botanical and chemical composition of the leaves, through macro and microscopic methods, general pharmacopoeial tests and qualitative and quantitative chemical assays. Of these last assay, the quantification of total flavonoids was the determinant for the decision to develop one or more monographs, being as they are entrusted to the flavonoids present in the leaves the majority of the pharmacological properties. The remaining tests permitted structure of the monographs to define the parameters quality and identification.

The result of the quantification of total flavonoids showed that there was no statistically significant difference between cultivars Edranol ( $17 \pm 0.49$  mg quercetin equivalent / 1 g sample on dry basis) and Hass ( $16.47 \pm 0.11$  quercetin mg equivalent / 1 g sample on dry basis), but between them and the cultivar Strong ( $14.04 \pm 0.11$  mg quercetin equivalent / 1 g sample on dry basis), thus developed in conjunction with the results of other tests two pharmacopoeial monographs.

## 2. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales, con la finalidad de cuidar la salud, es la terapia más antigua utilizada a lo largo de la historia. Esta ha recorrido un largo camino, ya que ha evolucionado por el traspaso oral, de generación en generación, desde los tiempos del herbalismo donde solo se utilizaba la droga vegetal o medicamentos herbarios tradicionales como se ha denominado en Chile (MINSAL, 2009) hasta el tiempo actual, en que este tema se ha convertido en un área del estudio científico, en el que los medicamentos herbarios se han sometido a procesos industriales, estudios clínicos y toxicológicos, cambiando su denominación a fitofármacos en el caso de Chile y Estados Unidos o fitoterápico en el caso de otros países como Argentina. De este modo han pasado a formar parte del campo de la medicina al igual que la quimioterapia, hidroterapia y electroterapia entre otras (Kumar y Kumar, 2012).

### **1.- Definición de medicamento herbario, fitofármaco y de medicina herbaria o fitoterapia.**

Los medicamentos herbarios tradicionales se definen como “plantas o partes de plantas, frescas o desecadas, enteras o trituradas, envasadas y etiquetadas artesanalmente y rotuladas con la denominación utilizada por la costumbre popular en el ámbito de las tradiciones culturales nacionales” y los fitofármacos como “productos farmacéuticos terminados y etiquetados cuyos principios activos son exclusivamente drogas vegetales o preparaciones vegetales los cuales han demostrado según estudios clínicos y toxicológicos que son eficaces y seguros (Ministerio de Salud Pública de Chile en el Decreto Supremo N° 286/2001).

La medicina herbaria o fitoterapia se define como “la utilización de plantas o partes de ella, en estado crudo o procesado tanto artesanalmente como industrialmente, para prevenir, atenuar o curar un estado patológico” (Cañigueral, 2002). Esta forma en que se define la medicina herbaria o fitoterapia, no se condice con su uso real, pues este concepto se aplica a la utilización terapéutica de productos con una actividad leve o moderada y con márgenes terapéuticos

relativamente amplios que dan lugar a tratamientos menos agresivos y no a todas las plantas o derivados de ellas, puesto que no todas poseen estas características. Debido a esto es que algunas drogas derivadas de las plantas como la morfina no son consideradas en sentido estricto como productos fitoterapéuticos (Cañigueral, 2002).

## **2.- Clasificación de la fitoterapia.**

La fitoterapia se puede clasificar dentro de la medicina convencional de un país, siempre y cuando esta forma de medicina sea la más utilizada por las personas y también se le puede clasificar dentro de la medicina complementaria y alternativa (MCYA). Esta última definida por el Centro Nacional de MCYA como el conjunto de diversos sistemas, prácticas y productos médicos y de atención de la salud que no se consideran actualmente parte de la medicina convencional (Nogales, 2010). Cuando se utiliza en conjunto con la medicina convencional se le denomina medicina complementaria y cuando se utiliza en vez de la medicina convencional, se le denomina medicina alternativa.

Dentro del conjunto de terapias que componen la MCYA (acupuntura, ayurveda, homeopatía, fitoterapia, quiropráctica, meditación, yoga, tai chi, reiki, electromagnetismo, entre otras) existen muchas que pueden definirse, además, como medicina tradicional, dependiendo de si se practican en el mismo lugar de donde proceden. En la figura N° 1 encontramos un ejemplo donde se compara el caso de Chile y China con respecto de algunas MCYA, terapias tradicionales y convencionales desarrolladas en cada país. Se observa, que en el caso de Chile, la terapéutica convencional es la alopática, mientras que la terapia herbaria, la acupuntura junto a la medicina mapuche son algunos tipos de MCYA que se realizan en nuestro país, siendo esta última, además, tradicional del país. En China, en cambio, la medicina convencional se basa en productos naturales, dejando como MCYA a la disciplina alopática y la acupuntura, que, además, es tradicional del país.

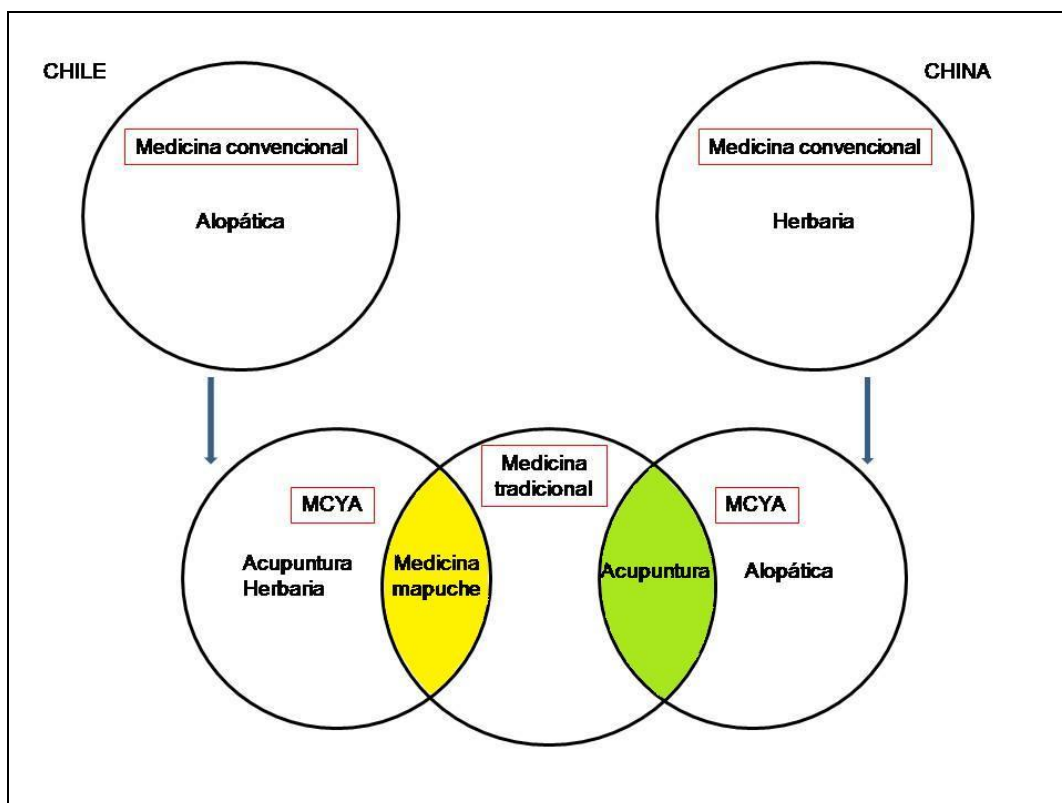


Figura N° 1: Comparación de MCYA, medicina tradicional y medicina convencional entre Chile y China.

### Apogeo de la fitoterapia.

Hasta bien entrado el siglo XX, las terapias sobre la base de hierbas, constituían el pilar del arsenal terapéutico, pasando a un segundo plano a medida que se introdujeron los productos de síntesis (Zaragoza et al. 2002), lo que resultó en un largo olvido de las drogas sobre la base de hierbas, exceptuando el caso de aquellas drogas potentes y con márgenes estrechos de seguridad como la atropina proveniente de *Atropa belladonna*, digoxina de la *Digitalis lanata* y la morfina de la *Papaver somniferum* (Kumar y Kumar, 2012). En las últimas décadas, la fitoterapia ha alcanzado un nuevo posicionamiento en el escenario actual de la salud pública mundial, debido principalmente a dos factores, como se puede observar en la tabla N° 1, el primero regido por el desarrollo científico y el segundo a causa de un factor social (Cañigueral, 2002; Nogales, 2004). Esto ha sido favorecido además por el comercio, las migraciones, los medios de comunicación de

masas y más recientemente a la red de internet que ha introducido una gran cantidad de ideas, creencias y usos (Rivera, 2002).

Tabla N°1: Factores del resurgimiento de la fitoterapia.

<b>1. Desarrollo científico</b>	<b>2. Componente social</b>
Efectos adversos de fármacos de síntesis	Dificultad de acceso a la medicina alopática
Mejor conocimiento clínico, químico y farmacológico	Disminución del tiempo de consulta médica
Desarrollo de técnicas analíticas para el control de calidad	Ausencia de resultados clínicos en enfermedades crónicas y terminales por parte de la medicina alopática
Aumento de la tecnología	

Según datos aportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), destacan que en China en el año 2005, las preparaciones sobre la base de plantas constituyeron entre el 30% y el 50% del consumo total de medicamentos, lo que equivale a 14 mil millones de dólares (más del 28% con respecto del año anterior). En Australia entre el año 2004 a 2005 se vendió un total de 1.860 millones de dólares en medicamentos sobre la base de plantas. En el Reino Unido en el año 2007 las ventas de preparados sobre la base de plantas ascendieron a 230 millones de dólares (OMS, 2011). Otros datos a destacar son los entregados por el banco de exportaciones e importaciones de Estados Unidos en donde se señala que el mercado mundial del comercio de plantas medicinales tiene una tasa de crecimiento de un 7% al año (Verma y Singh, 2008); mientras que los aportados por la empresa alemana Analize and Realice, firma consultora de productos naturales, alimentos, dispositivos médicos y medicamentos sobre la base de hierbas, exponen que el mercado mundial de plantas medicinales en el año 2008 ascendió a 83 mil millones de dólares, de los cuales América Latina aporta con 0,9 mil millones (Silveira et al. 2008). En Chile, la situación no es distinta, pues se estima que en 2009 alrededor del 80% de la población utilizó la

medicina herbaria o fitoterapia como tratamiento paralelo a los métodos alopáticos. Además, el Ministerio de Salud Pública (MINSAL) durante el año 2009 publicó un compendio con los medicamentos herbarios tradicionales utilizados en el país, sumándole a esto, importantes laboratorios en Chile que se han incorporado a la comercialización fitofármacos, entre los que destacan los laboratorios Andrómaco, Bayer, Boehringer, Chile, Gardenhouse, Knop, Merck y Prater (Morales y Morales, 2009).

Este nuevo posicionamiento, ha tenido como consecuencia, el aprovechamiento en algunos casos para adulterar materias primas vegetales e introducir de forma ilegal los llamados “productos milagros” (Zaragoza et al. 2002), cuyo objetivo es el tratamiento y la cura de enfermedades terminales o crónicas. Esto acompañado por el poco conocimiento por parte de los profesionales de la salud sobre las plantas medicinales, su utilización y la escasa evidencia sobre eficacia, seguridad y calidad de la mayoría de las materias primas vegetales y los productos derivados de estas, comparado con la gran cantidad de indicaciones que se les atribuye a generado finalmente un mal uso de esta terapia.

Para que la fitoterapia sea una herramienta realmente útil, es necesario hacer un uso racional de la misma, el que será posible solamente si el profesional de la salud conoce sus límites y posibilidades. Para lograr esta situación, deberá tener a su disposición medicamentos herbarios tradicionales y fitofármacos de calidad, siendo esta la base sobre la que reposara la seguridad, eficacia y reproducibilidad de los mismos, debe además disponer de información rigurosa y fiable y adquirir una formación adecuada en este campo (Cañigual, 2006). Por lo dicho anteriormente, es de vital importancia estudiar, revisar y realizar ensayos de calidad a las materias primas vegetales y a los productos derivados de ella, debido a su variabilidad química intrínseca y a la existencia tanto de variedades (var.) como de cultivares (cvs.) para una misma especie, agregando además, que se encuentran compuestas por matrices complejas, por lo que muchas veces, no se conocen los principios activos, la extracción puede ser compleja y la metodología muchas veces no está descrita (Busse, 2000) (Figura N° 2).

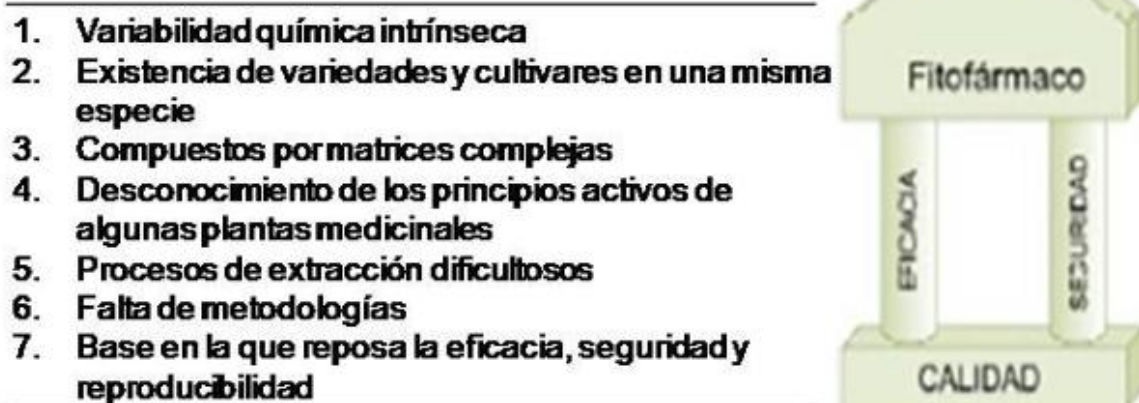


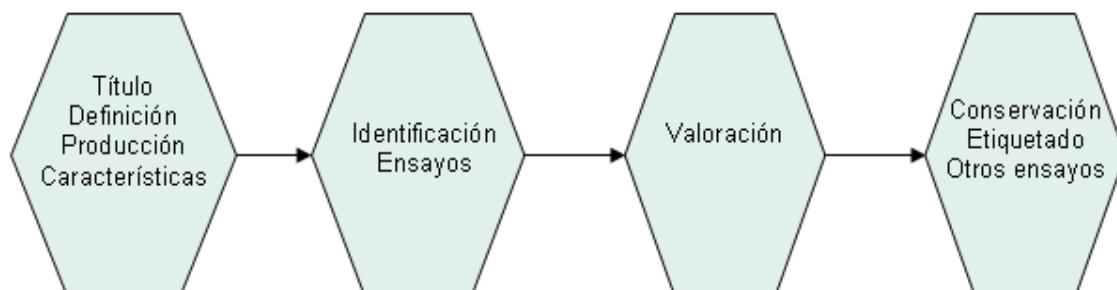
Figura Nº 2: Importancia de los ensayos de calidad (adaptado de Busse, 2000).

#### 4.- Las farmacopeas y el control de calidad.

Para controlar la calidad, tanto de las drogas de síntesis como aquellas de origen vegetal, se dispone de compendios normativos denominados farmacopeas, las cuales están compuestas por monografías en las que se establecen los métodos analíticos de control de calidad y las especificaciones que estas deben poseer (Cañigual, 2006). Destaca entre ellas: la Farmacopea Europea, la Real Farmacopea Española, la Farmacopea Británica y la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Mientras que en Latinoamérica, sobresalen la Farmacopea Argentina, la Farmacopea Brasileña y en especial la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, ya que poseen un tomo especial sobre drogas vegetales denominada Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

Las monografías farmacopeicas constituyen un instrumento clave, pues entre sus ventajas se encuentran el facilitar la elaboración de la documentación de registro de medicamentos y el cumplimiento de los parámetros de calidad, seguridad y eficacia tanto de las materias primas como de sus derivados, aportar información rigurosa y fiable, contribuir a la formación de los profesionales de la salud y responder a las necesidades de las autoridades reguladoras, servicios

de control de calidad y fabricantes de materias primas y productos farmacéuticos (Cañigual, 2002). En la figura N° 3, se detallan las partes que componen una monografía farmacopeica.



*Figura N° 3:* Partes de una monografía farmacopeica.

En el título va el nombre del principio activo, en el caso de los medicamentos alopáticos; y el nombre de la planta medicinal y la parte de ella, en el caso de las droga de origen vegetal. Los títulos aparecen en español o bien, en francés o inglés, según las versiones correspondientes y en la Real Farmacopea Española, la Farmacopea Brasileña y la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos bajo el título figura un subtítulo en latín o el nombre científico, como es el caso de las materias primas vegetales.

La definición constituye una descripción oficial de la sustancia, preparación u otro objeto de la monografía. En el caso de drogas vegetales, la definición describe, por ejemplo, si se trata de una droga entera o pulverizada.

La producción se refiere a aspectos particulares del método de fabricación pero no de forma exhaustiva. Contiene instrucciones de carácter obligatorio para los fabricantes y puede referirse por ejemplo a las materias primas, a los procedimientos de fabricación, su validación y su control.

En el apartado de las características se incluyen algunas cualidades del principio activo o droga vegetal, por ejemplo la solubilidad. Esta parte de la monografía no es obligatoria (Real Farmacopea Española, 2005).

En la sección de identificación se incluyen ensayos que tienen como objetivo confirmar, con un grado de seguridad aceptable, que el producto se ajusta a la descripción dada en la etiqueta. Muchas veces existen dos identificaciones para una misma droga, siendo la primera para utilizarse bajo cualquier circunstancia y la segunda para la identificación siempre que se pueda demostrar, que la sustancia o la preparación proceden de un lote cuyo cumplimiento de los requisitos de la monografía está certificado. En esta sección destacan los ensayos botánicos macroscópicos, microscópicos, espectroscópicos (infrarrojo y ultravioleta-visible) y la cromatografía en capa fina (TLC). Con estas pruebas se obtienen patrones de identificación, los que se pueden utilizar para detectar marcadores negativos o compuestos adulterantes, los que se pueden caracterizar y llevar un registro de ellos (Bandoni, 2011).

En el apartado de los ensayos, en el caso de drogas de origen vegetal, se incluyen datos como: las cenizas insolubles en ácido, cenizas totales, materias solubles, contenido de agua y aceites esenciales (Real Farmacopea Española, 2005).

La valoración, es un apartado muy importante dentro de la monografía farmacopeica, más aún, para las materias primas herbarias, pues están compuestas por una gran cantidad de metabolitos que se encuentran formando matrices complejas, lo que dificulta la elección de cual valorar. Dentro de los compuestos que forman esta matriz, encontramos aquellos que son los determinantes de la actividad biológica de la droga o principios activos, aunque estos son muchas veces desconocidos para un gran número de drogas de origen vegetal. En cambio, los marcadores activos son aquellos que contribuyen con la actividad biológica, pero que se desconoce si son los únicos responsables de esta actividad, son en su mayoría conocidos. Estos ensayos juntos con los anteriores son cruciales, ya que entregan una información de sustancial relevancia tanto para conocer la calidad de la materia prima como para identificarla.

Existe también, un grupo de drogas que no tienen definidos principios, ni marcadores activos, por lo tanto para generar especificaciones se utilizan marcadores analíticos que son aquellos compuestos que se encuentran en mayor o menor cantidad en la droga vegetal. Por último, existen otros constituyentes de la matriz de las drogas de origen vegetal que no son analizados en la sección de valoración como toxinas, alérgenos, sustancias inertes como azúcares o sales inorgánicas y sustancias no solubles como celulosa y lignina. Además, esta sección describe el método analítico utilizado, generalmente métodos espectroscópicos y cromatográficos y la forma en que se calculan los resultados.

Finalmente, cabe mencionar el apartado de la conservación en donde se exponen aquellas condiciones para mantener la estabilidad del producto y puede ser impuesta por alguna autoridad competente, el etiquetado en donde se indican aquellas condiciones necesarias para mostrar la conformidad o no con la monografía y por último, se encuentran otros tipos de ensayos, como por ejemplo, determinación de impurezas tales como: aflatoxinas, metales pesados y materias extrañas.

En el laboratorio de la Farmacopea Chilena, se lleva a cabo la elaboración de una farmacopea centrada principalmente en las drogas de origen vegetal utilizadas en Chile, ya que algunas materias primas vegetales, dependiendo del país, tienen diferentes usos o simplemente, no se utilizan. Hoy se busca renovar la farmacopea chilena, editada por última vez en 1942 y así establecer las principales normas y especificaciones de calidad.

Las materias primas vegetales a las que actualmente se les desarrolla una monografía farmacopeica deben cumplir ciertos criterios de inclusión como: un uso amplio y justificado, que se haya demostrado científicamente su identidad y que esté disponible. Destacan la hoja de boldo (*Peumus boldo*), hoja de matico (*Buddleja globosa*), sumidad de pasiflora (*Passiflora caerulea*), hoja de romero (*Rosmarinus officinalis*), la flor del tilo (*Tilia platyphyllos*) y la hoja del palto (*Persea americana*) entre otras.

## 5.- El palto.

La especie *Persea americana* Mill., también denominada *Persea gratísima* Gaerth o con su nombre común palto o aguacatero (Figura N° 4A), es nativa de América y fue descrita por primera vez por Philip Miller en 1754; se considera que la especie que dio origen al palto proviene de la zona montañosa situada al occidente de México y Guatemala (Tamayo et al. 2008), desde donde, de forma principal, se dispersó a las Antillas (Sudamérica), lo que llevó a clasificar al palto en tres razas, siendo estas la mexicana, la guatemalteca y la antillana. Esta clasificación se correlaciona con su clasificación por ecotipos o variedad en donde se encuentra la *P. americana* var. *drymifolia* que corresponde a la raza mexicana, *P. americana* var. *guatemalensis* que corresponde a la raza guatemalteca y la *P. americana* var. *americana* que corresponde a la raza antillana (Mandemaker, 2007). Posteriormente se introdujo a Brasil, el sur de Europa, Hawai, California, Sudáfrica, India, Israel, Malasia, Nueva Zelanda, Australia, Turquía, en otros. (Adriazola, 2007; Tamayo et al. 2008). Pertenece a la familia de las *Lauraceae*, que está formada por 52 géneros, entre ellos el género *Persea* y cerca de 3.500 especies, en donde destacan especies como el alcanforero (*Cinnamomun camphora*), el laurel (*Laurus nobilis*), el lingue (*Persea lingue*) y la canela (*Cinnamomun zeylanicum*) (Tamayo et al. 2008).

### 5.1.- Características botánicas vegetativas de la *P. americana*.

La raíz de la *P. americana*, se encuentra conformada por un haz primario, que posee una forma pivotante, el cual puede superar un metro de profundidad. Se distribuye de forma radial y se ramifica en haces secundarias y terciarias (Tamayo et al. 2008) (figura N° 4B). La raíz le da el sustento necesario al árbol para que comience su crecimiento.

A lo largo de la temporada, sufre dos periodos ("flush") de crecimiento vegetativo intercalado con dos periodos de crecimiento radical (Mena, 2004) (Figura N° 4C), pudiendo alcanzar una altura entre los 8 a 20 metros (Gupta, 1995; Alonso, 1998) y un diámetro de tronco, superior a un metro.

Las hojas (Figura N° 4D) se disponen en forma alterna, son simples, coriáceas, brevemente peciolada, glabras, de 10 a 40 cm de largo (Parodi, 1959); agudas o acuminadas, de borde enteros y desiguales en la base; penninervias y de color verde oscuro en el haz; frecuentemente lustrosas, pálidas y glaucescente por el envés (Gupta, 1995), donde presenta entre 4 a 10 pares de nervaduras laterales prominentes (Tamayo et al. 2008); su forma es diversa pasando por elípticas, elíptico-lanceoladas (Parodi, 1959), ovales, elípticas y algunas veces ovadas (Gupta, 1995). Además se encuentran provistas de yemas axilares conformadas por tejido meristemático (Adriazola, 2007).



Figura N° 4: Características vegetativas de *P. americana*. (A) Palto (árbol); (B) Raíz (Tamayo et al. 2008); (C) Fenología (Mena, 2004); Hojas, haz y envés.

## **5.2.- Características botánicas reproductivas.**

La floración en la *P. americana* comienza a fines de septiembre y se prolonga hasta el mes de noviembre. La flor es actinomorfa, bisexuadas, compuesta por nueve estambres funcionales. El ovario es sésil con estilo alargado, las flores son pequeñas y abiertas y pueden medir de 0,5 a 1,5 cm de diámetro (Gardiazabal, 1998). Estas van dispuestas en inflorescencias llamadas panículas, las que se forman en la parte terminal de las ramas (Calabrese, 1992).

La especie presenta un comportamiento floral llamado dicogamia protoginea, que se define como la maduración a destiempo del gineceo con respecto del androceo, siendo el gineceo el que madura primero (Figura N° 5A y 5B). En la mayoría de los casos, pueden suceder dos fenómenos: el primero ocurre cuando el estigma está receptivo y las anteras no liberan polen y el segundo, cuando no lo está y se produce la liberación de polen. La flor se abre en dos momentos: el estado masculino abre en una parte del día y el correspondiente al femenino, durante la otra parte del mismo día. Según lo anterior, la *P. americana* se ha clasificado en dos grupos: A y B. Los de tipo A poseen flores que abren al estado femenino por la mañana y actúan como masculina durante la tarde del día siguiente. Por el contrario, los tipos B abren sus flores como femeninas por la tarde y como masculinas por la mañana del día siguiente (Adriazola, 2007).

La polinización de la flor conduce a la fertilización, convirtiéndose esto en un determinante del éxito en la formación del fruto, el cual depende principalmente de la competencia entre las mismas flores de una inflorescencia para ser polinizadas, puesto que pueden llegar a coexistir miles de inflorescencias; un buen agente polinizador como las abejas y los abejorros y la distribución de los diferentes tipos de paltos (A y B). Debido a esto es que la cantidad de cuaja por flor es 0,001% (Saieg, 2006).

El fruto denominado palta (Figura N° 5C) es una baya grande y carnosa con una semilla. Su forma va desde piriforme a globosa. El epicarpio es de color verde amarillento hasta morado oscuro o negro cuando maduran algunos tipos de palta; es variable en grosor y textura. El

mesocarpio o pulpa varía desde amarillento a verde y de consistencia mantecosa a acuosa. El fruto es uniseminado (Figura N° 5D) y la semilla contiene un embrión, un endospermo que se consume durante el desarrollo del embrión y un testa seminal externo de color café. De la semilla se puede extraer aceite el que es rico en ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados (Alonso, 1998).

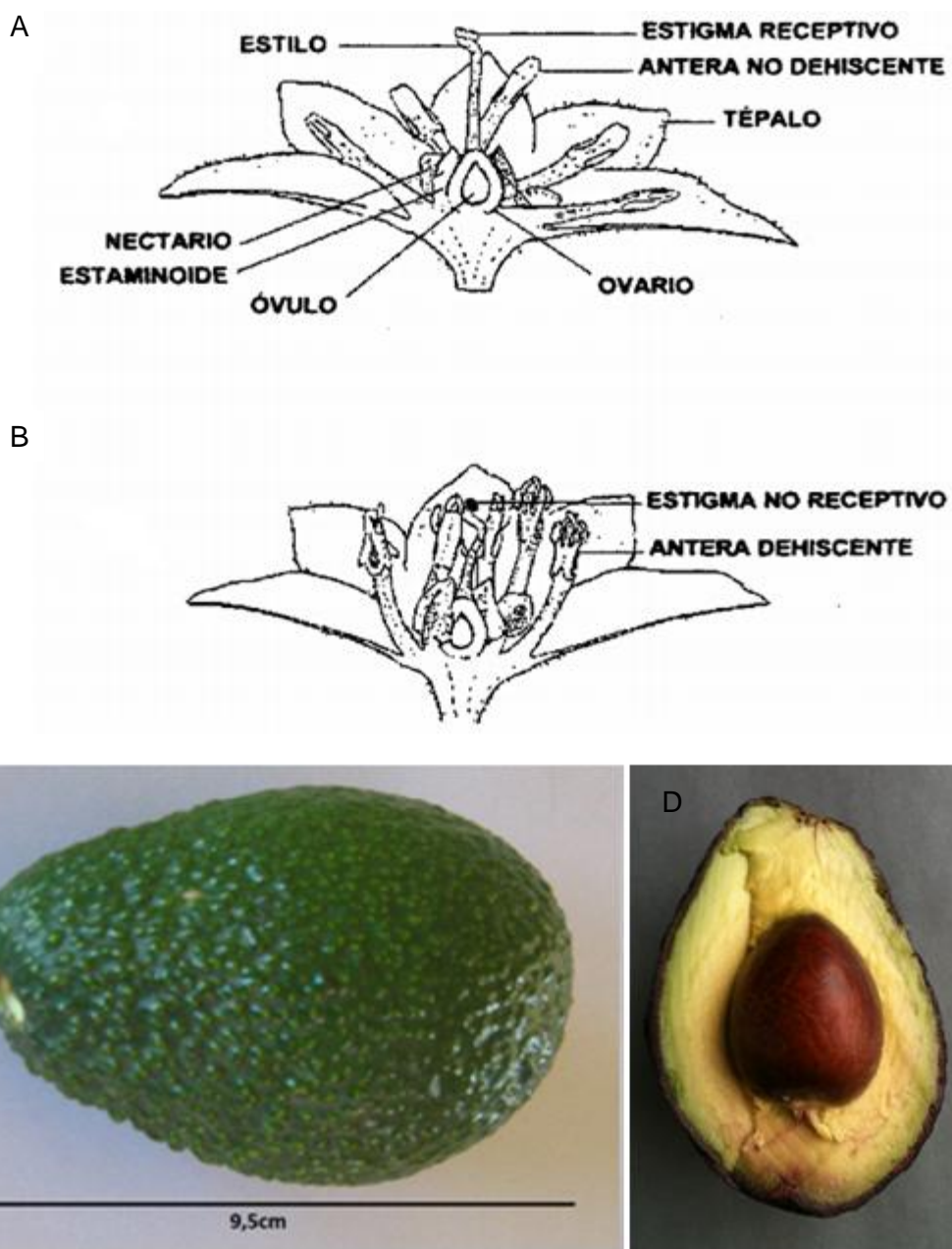


Figura Nº 5: Características del sistema reproductivo y del fruto de *P. americana*. (A) Flor en estado femenino (Gardiazabal, 1998); (B) Flor en estado masculino (Gardiazabal, 1998); (C) Fruto; (D) Semilla.

### **Etnofarmacología de las hojas de *P. americana*.**

Aparte del alto valor nutricional que aporta el fruto, las hojas son de gran importancia en la etnofarmacología de países como México, Chile y en países que han adoptado su cultivo, como por ejemplo: Israel, Senegal, India, Malasia y Sudáfrica.

En Chile, desde la época precolombina, se han utilizado las hojas del palto para la elaboración de decoctos, lo que no ha cambiado en la actualidad donde, además, se producen jarabes sobre la base de sus hojas. Estos preparados se utilizan para tratar afecciones respiratorias como: tos, catarro, bronquitis, resfríos; malestares estomacales, enfermedades de la piel y como analgésico e antiinflamatorio en dismenorreas (Adeyemi et al. 2002; Minsal, 2009). Además se han descubierto otras propiedades medicinales para las hojas como: antihipertensiva (Adeboye et al. 1999; Owolabi et al. 2010), anticonvulsivante (Ojewole y Amabeoku, 2006), antiulcerosa (Ukwe y Nwafor, 2004; Olawale et al. 2011), hipoglicemiante (Antia et al. 2005), antiviral (De Almeida et al. 1998) y antibacteriana (Cushnie y Lamb, 2005; Salazar et al. 2007; Gómez et al. 2008). A pesar de esto, aún no se conocen los componentes activos de muchas de estas propiedades medicinales, salvo las relacionadas con las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias analgésicas y antihipertensiva, para las cuales se ha reportado a los flavonoides como posibles causantes de dichas actividades (Adeboye et al. 1999; Adeyemi et al. 2002; Salazar et al. 2007; Gómez et al. 2008; Owolabi et al. 2010).

### **7.- Flavonoides presentes en las hojas de *P. americana***

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides, representan la clase más importante y numerosa. Son metabolitos secundarios de las plantas y se encuentran en las hojas, semillas, frutos y flores. Son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de la planta, al quelar metales, regular el crecimiento y la diferenciación, transferir energía y proteger contra agentes agresores como lo son la radiación ultravioleta, diferentes microorganismos y el medio ambiente (Cushnie y Lamb, 2005). Químicamente se caracterizan por ser compuestos fenólicos de

bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a un anillo pirano (C) (Figura N° 6). Sobre este esqueleto pueden darse una gran cantidad de sustituciones, lo que origina las diferentes clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles (catequinas y proantocianidinas), antocianidinas, chalconas, auronas e isoflavonas.

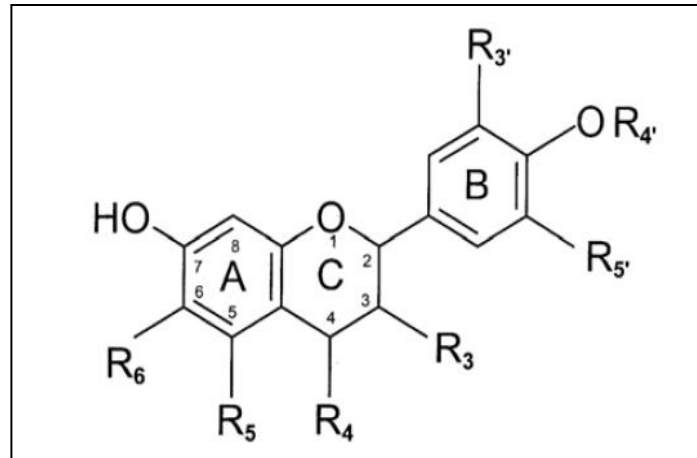


Figura N° 6: Estructura general de los flavonoides y posiciones de sustitución (Cushnie y Lamb, 2005).

En las hojas del palto se han reportado flavonoles como la quercetina, rutina e isorhamnetina y flavonas como la apigenina y luteolina (Owalabi et al. 2010). Estos tipos de flavonoides tienen actividad antibacteriana, atribuida principalmente a sus grupos hidroxilos presentes en su estructura. Éstos inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, causan daño a nivel de la membrana plasmática de los microorganismos e inhiben el metabolismo energético (Cushnie, 2005; Salazar et al. 2007; Gómez et al. 2008), con lo que se podría constatar el uso de las hojas de palto para resfríos, catarros y bronquitis. También poseen actividad inhibitoria sobre las ciclooxigenasas, disminuye la actividad del complemento y la actividad de la mieloperoxidasa (Adeyemi et al. 2002; Enciso y Arroyo, 2011), lo que concuerda con su uso analgésico y antiinflamatorio. Y por último aumenta las moléculas vasodilatadoras y disminuye las vasoconstrictoras, disminuye la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, disminuye la

agregación plaquetaria y mejora la función endotelial (Adeboye et al. 1999; Owolabi et al. 2010), lo que coincidiría con el uso como antihipertensivo. Lo anterior deja en evidencia una posible relación entre los flavonoides y las actividades medicinales descritas para la hoja de *P. americana*.

#### **8.- Cultivares de *P. americana*.**

Como se había mencionado con anterioridad el palto posee una alta tendencia a la polinización cruzada, causado por su comportamiento floral, lo que llevó con el tiempo a que las tres razas generaran entrecruzamientos genéticos y que posteriormente junto a técnicas de propagación y de selección, principalmente a través de injertos, se desarrollaran una gran cantidad de cultivares comerciales de *P. americana* existentes en la actualidad.

Muchas veces el término “cultivar” (cv.) se confunde con variedad, pero difieren en que la variedad es una adaptación de la especie generada por alguna modificación del medio ambiente y el cultivar es generado por el manejo y la selección del hombre con el fin de mejorar el añerismo, generar genotipos resistentes tanto a *Phytophthora* como a la salinidad y al pH y con una alta capacidad de incorporación de nutrientes, esto con el fin de obtener una mayor productividad y calidad del fruto. Además la variedad es un taxón mientras que el cultivar no.

En Chile existen aproximadamente 3000 hectáreas plantadas de *P. americana*, que se distribuyen principalmente entre las regiones Metropolitana, Valparaíso y Libertador Bernardo O'Higgins (Lemus et al. 2010). Esto se debe a que las condiciones de cultivo son muy favorables, ya que existen buenas condiciones climáticas y de riego, buenos métodos de cultivo y poco desarrollo de plagas (Spiess, 2004).

El cultivo de *P. americana* tanto en Chile, como en otros países, se basa principalmente en los diferentes cultivares comerciales existentes como: Hass, Fuerte, Edranol, Negra de la Cruz, Ester, Zutano, Bacon, entre otras, aunque también y debido a la intensa polinización cruzada antes mencionada se obtuvieron cultivares propios de la región, ejemplo de esto son: Margarita, Champions y Pájaro Negro (Gardiazabal, 2001), pero con el tiempo fueron perdiendo presencia,

siendo actualmente, los cultivares Hass, Fuerte, Negra de la Cruz y Edranol los que poseen mayor cantidad de huertos respectivamente.

Algunas características de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol son descritas en la tabla N° 2.

Tabla N° 2: Características de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.

<b>Cultivar</b>	<b>Hass</b>	<b>Fuerte</b>	<b>Edranol</b>
<b>Raza</b>	Híbrido 85% raza guatemalteca y 15% raza mexicana <sup>1</sup>	Híbrido 50% raza guatemalteca y 50% raza mexicana <sup>1</sup>	Híbrido de raza guatemalteca y mexicana <sup>2</sup>
<b>Origen</b>	California	México	California
<b>Tipo de flor</b>	A	B	B
<b>Mejor polinizador</b>	Fuerte	Hass	Hass
<b>Fruto (g)</b>	150-400	250-400	300-350
<b>Color del fruto</b>	Verde y morado cuando madura	Verde opaco	Verde claro
<b>Tamaño del fruto (cm)</b>	8-10	10-12	12-15
<b>Forma del fruto</b>	Ovoide-piriforme	Piriforme-oblonga	Piriforme
<b>Epicarpio</b>	Rugoso	Rugoso	Liso

1: (Bender, 2010); 2: (Mandemaker, 2007)

El hecho de poseer diferentes cultivares de donde poder recolectar la materia vegetal difiere de la situación de otras drogas de origen vegetal a las que se les desarrolla, actualmente, una monografía por parte del laboratorio de la Farmacopea Chilena. Lo anterior, ha traído consigo el surgimiento de las siguiente interrogante ¿A que cultivar o cultivares es al que se le atribuyen las propiedades medicinales descritas? Revisando la bibliografía, con respecto de los usos de *P.*

*americana* se observa que no se define el cultivar, ejemplo de esto es el ISP y los diferentes estudios realizados por grupos de investigadores citados en este trabajo como Adeyemi et al. (2002), Ojewole et al. (2006) y Owalabi et al. (2010), por citar algunos. Debido a lo anterior surgió una segunda interrogante ¿Se debe realizar una monografía farmacopeica particular o común para las hojas de los cultivares de *P. americana*? El no conocer los cultivares sobre los cuales se han realizado los diferentes estudios químicos y farmacológicos impide responder esta pregunta, por lo que se ha decidido realizar un estudio botánico y químico de las hojas de tres de los cuatro cultivares de *P. americana* que presentan mayor número de hectáreas plantadas en Chile, estos son Hass, Fuerte y Edranol, con el fin de compararlos para poder dar respuesta a la segunda interrogante y desarrollar finalmente su monografía farmacopeica. Para ello se caracterizaron botánicamente las hojas de forma macroscópica y microscópica y se determinó su composición química, mediante ensayos farmacopeicos generales como: pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido, materia extraíble y volumen de aceites esenciales, ensayos químicos cualitativos de identificación como: el tamizaje fitoquímico para metabolitos secundarios y la cromatografía en capa fina (TLC) y ensayos químicos cuantitativos como: valoración de compuestos fenólicos totales y taninos por espectroscopia ultravioleta-visible y de flavonoides totales por espectroscopia ultravioleta-visible y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La prueba de cuantificación para flavonoides totales permitió la decisión de elaborar una monografía común o particular, ya que éste es un marcador activo y por lo mismo un buen determinante de la actividad farmacológica de la hoja. A pesar de ello los otros ensayos que conforman el estudio son de igual importancia, tanto para caracterizar y generar límites que envuelvan los resultados de los tres cultivares, en el caso que se hubiera determinado una monografía común o para generar límites particulares si se hubiera determinado monografías particulares como para establecer diferentes métodos complementarios, ya sean analíticos o botánicos, para identificar y evaluar la calidad de las hojas de *P. americana*.

Finalmente con este estudio se pretendió generar normas y estándares compendiales y responder a la necesidad de descripción farmacopeica para *P. americana*, pues no existe, en las farmacopeas más utilizadas, una descripción para ellas.

### 3. HIPÓTESIS

La composición química en flavonoides totales en los diferentes cultivares difiere en forma estadísticamente significativa por lo que se desarrollará, en conjunto con las características botánicas y las otras características químicas evaluadas, una monografía farmacopeica particular para cada cultivar de *P. americana*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1.- Objetivo general

Determinar las características botánicas y la composición química, de las hojas de *P. americana* de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol, con el fin de desarrollar una monografía farmacopeica.

#### **4.2.- Objetivos específicos**

1. Recolectar, secar, seleccionar y almacenar las hojas de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol, mediante procedimientos limpios, no agresivos y a tiempo, con el fin de asegurar un material de buena calidad.
2. Determinar las características botánicas de las hojas de los tres cultivares a estudiar, a través de una evaluación macro y microscópica para generar parámetros de identificación.
3. Determinar parámetros farmacopeicos generales para drogas vegetales como: pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles y materia extraíble y aceites esenciales, utilizando métodos que permitan definir la calidad de las hojas a estudiar.
4. Identificar cualitativamente por medio de un tamizaje fitoquímico la posible presencia de algunos metabolitos secundarios y mediante TLC la presencia de rutina, quercetina y apigenina, con el fin de elaborar parámetros de identificación para las hojas de los tres cultivares.
5. Cuantificar por técnicas de espectroscopia ultravioleta-visible compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, taninos totales y por HPLC rutina, quercetina y apigenina para generar parámetros de valoración para cada cultivar.
6. Elaborar una monografía farmacopeica para las hojas de *P. americana*, utilizando para ello los resultados y los ensayos realizados para la caracterización botánica y química.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Equipos, materiales y reactivos.

Los equipos, materiales y reactivos utilizados para la caracterización botánica y de la composición química de las hojas de los cultivares Has, Fuerte y Edranol se presentan en la tabla N° 3 y N° 4 respectivamente.

Tabla N° 3: Equipos utilizados para la caracterización botánica y de la composición química de las hojas de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.

<b>Equipos</b>	<b>Marca</b>	<b>Características</b>
Balanza analítica	Radwag	
Baño termostático	Memmert	
Baño de ultrasonido	P. Selecta	
Cámara digital	Sony	
Centrífuga	Eppendorf	
Cromatógrafo líquido	Shimadzu	Bomba cuaternaria LC-20AD Autoamplifier SIL-20AC <sub>ht</sub> Interface CBM-20A Detector de arreglo de diodo SPD-M20A Compartimiento de la columna CTO-20AC
Desecador	Equilab	
Espectrofotómetro ultravioleta-visible	Shimadzu	Modelo: UV-1800
Espectrofotómetro infrarrojo	PerkinElmer	Modelo: Spectrum 100
Estufa	Bender	
Manta calefactora	Temptra	
Material fungible de laboratorio		
Micropipeta	Gilson	
Microscopio óptico	Konus academy UV Nikon (E-200)	
Micrótopo	Leitz	
Molinillo	IKA A11	
Mufla	Vulcan 3-550	Escalamiento de temperatura
pHmetro	Termo scientific	Modelo: Orion 3
Pie de metro	Redline	
Placa calefactora	Termo scientific	
Rotavapor	Buchi	Bomba al vacío V-700 Rotador R-21 Controlador de bomba V-850
Tamices	Cisa	
Termómetro ambiental	Marienfeld	
Vorteador	Termo scientific	

Tabla N° 4: Reactivos utilizados para la caracterización botánica y de la composición química de las hojas de los cultivares Hass, Fuerte y Edranol.

<b>Reactivos sólidos</b>	<b>Marca</b>	<b>Reactivos líquidos</b>	<b>Marca</b>
Acetato de potasio 99% de pureza	Loba	Acetato de etilo	Lab-Tec
Acetato de plomo trihidratado	Loba	Acetonitrilo grado HPLC	Merck
Ácido gálico p.s	Merck	Ácido clorhídrico p.a	Loba
Ácido L-ascórbico 99% de pureza	Sigma	Ácido fórmico p.a	Merck
Ácido pícrico 99,8% de pureza	Loba	Ácido sulfúrico p.a	Sigma
Apigenina 98% de pureza	Merck	Ácido trifluoroacético p.a	Merck
Carbonato de sodio anhidro p.a	Sigma	Agua destilada	
Cloruro de sodio p.a	J.T Baker	Agua ultrapura	
Cloruro de hierro (III) hexahidratado 99% de pureza	Loba	Alcohol amílico p.a	Merck
Cloruro de mercurio (II) 99,5% de pureza	Loba	Anhídrido acético p.a	Merck
Difenilborinato p.s	Merck	Etanol absoluto p.a	Merck
Floroglucinol p.m	Sigma	Etanol grado HPLC	Merck
Gelatina p.b	Loba	Etil metil cetona p.a	Merck
Hidrato de cloral (-)	Merck	Folin Ciocalteu (-)	Merck
Hidróxido de sodio p.a	Merck	Folin Denis p.	Sigma
Quercetina dihidratada 95% de pureza	Merck	Metanol p.a	Merck
Magnesio en cinta	Vimaroni	n-Hexano p.a	Merck
Nitrato de aluminio nonahidratado p.a	Loba	Polietilenglicol 400 (-)	Sigma
Nitrato de bismuto pentahidratado p.a	Loba	Tetrahidrofurano p.a	Merck
Rutina $\geq$ 95% de pureza	Chromadex	Tolueno p.a	Merck
Polvos de piel (-)	Sigma		
Pirogalol $\geq$ 98% de pureza	Sigma		
Sílica gel GF254	Merck		
Sep-Pack 500mg	Waters		
Sudan III p.m	Merck		
Sulfato de sodio p.a	Merck		
Yoduro de potasio p.a	Arquimed		

p: puro; p.a: para análisis; p.b: para bacteriología; p.m: para microscopia; p.s: para síntesis; (-) no se registra el grado.

## 5.2.- Muestras

Las muestras utilizadas fueron hojas adultas de tres cultivares de *Persea americana*: Edranol, Hass y Fuerte (Figura N° 7). Se recolectaron en mayo de 2011 desde cultivos controlados situados en la comuna de La Cruz (provincia de Quillota, región de Valparaíso, Chile, latitud sur 32°51'10'', longitud oeste 71°14'3'') (Figura N° 8). La Cruz se caracteriza por poseer un clima mediterráneo, con veranos secos e inviernos húmedos. Destacan entre las condiciones climáticas una temperatura que varía desde 7° C a los 26,5 °C en el verano y de 4,5 °C a 19 °C en el invierno, una humedad relativa anual entre un 70 y un 85% y las precipitaciones para 2010 fueron aproximadamente 209,9 mm<sup>3</sup> de agua caída (Dirección Meteorológica de Chile, 2010).

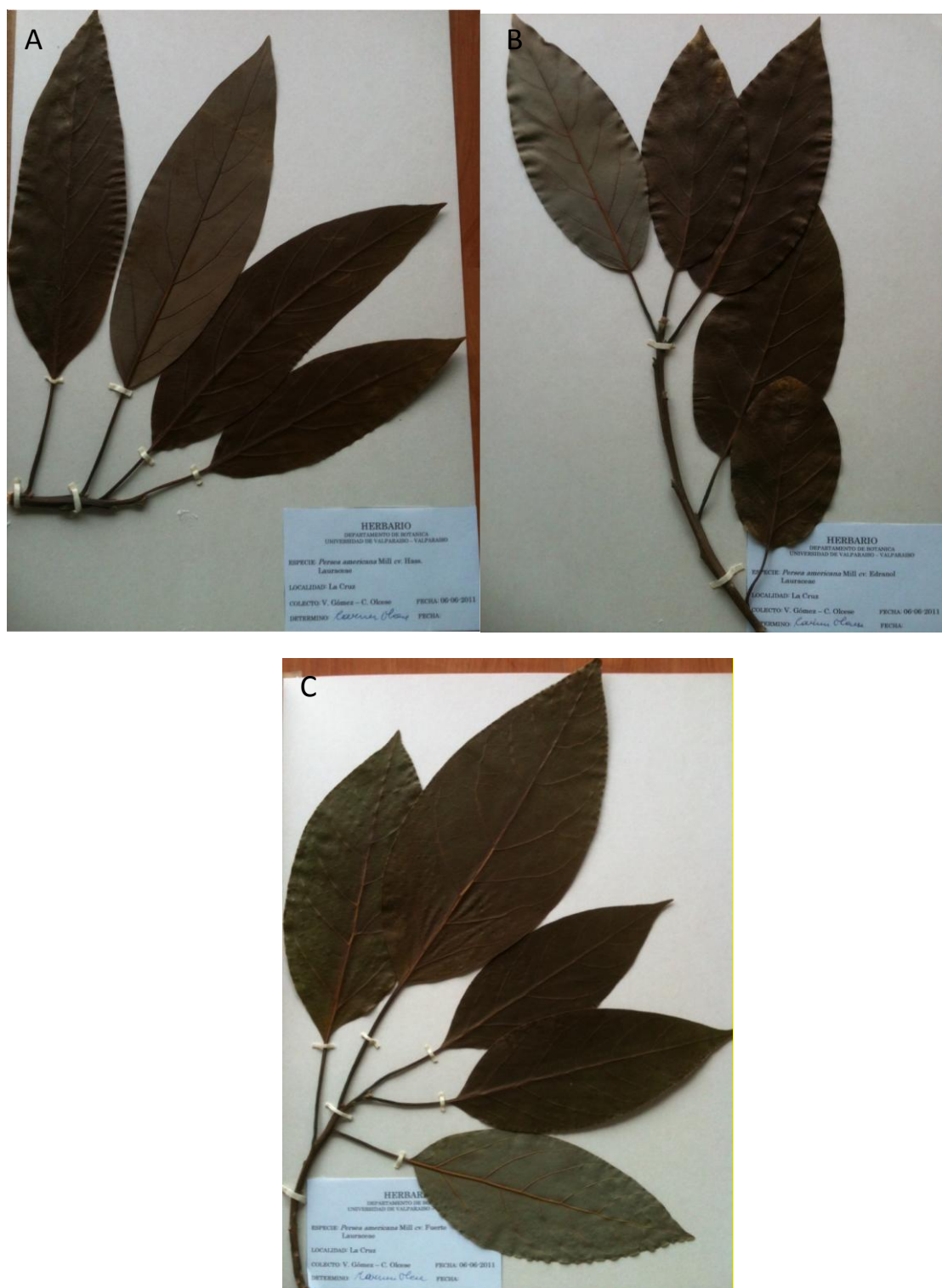


Figura N° 7: Ejemplares herborizados de la material vegetal utilizada. (A) cv. Hass. (B) cv. Edranol (C) cv. Fuerte.



Figura N° 8: Ubicación geográfica del lugar de recolección.

### 5.3.- Metodología.

Para la elaboración de la monografía farmacopeica para la hoja de *P. americana* primero se recolectó la materia vegetal de cada cultivares a estudiar (Figura N° 9). Posteriormente se separó una pequeña cantidad para la caracterización botánica, una parte de ella se herborizó y otra parte se almacenó en un refrigerador entre 4 y 8 °C, con la cual se realizó un análisis botánico macro y micromorfológicos, mientras que el resto del material recolectado se secó en forma artesanal a temperatura ambiente. Luego se seleccionó el material seco con la mejor calidad organoléptica, tanto de color como de textura y se guardó una contramuestra. Posteriormente para el desarrollo de los ensayos químicos se pulverizó la cantidad necesario de materia vegetal para cada uno de ellos y se guardó también una contramuestra del polvo. Las pruebas para evaluar la composición química fueron: ensayos farmacopeicos generales, en donde se encuentran la pérdida por secado, cenizas totales, cenizas insolubles en ácido, materia extraíble y volumen de aceites esenciales, ensayos de identificación como el tamizaje fitoquímico y la TLC y ensayos de cuantificación para compuestos fenólicos totales, taninos totales, flavonoides totales, rutina, quercetina y apigenina. Finalmente se utilizaron los resultados y los métodos y se elaboró la monografía farmacopeica.

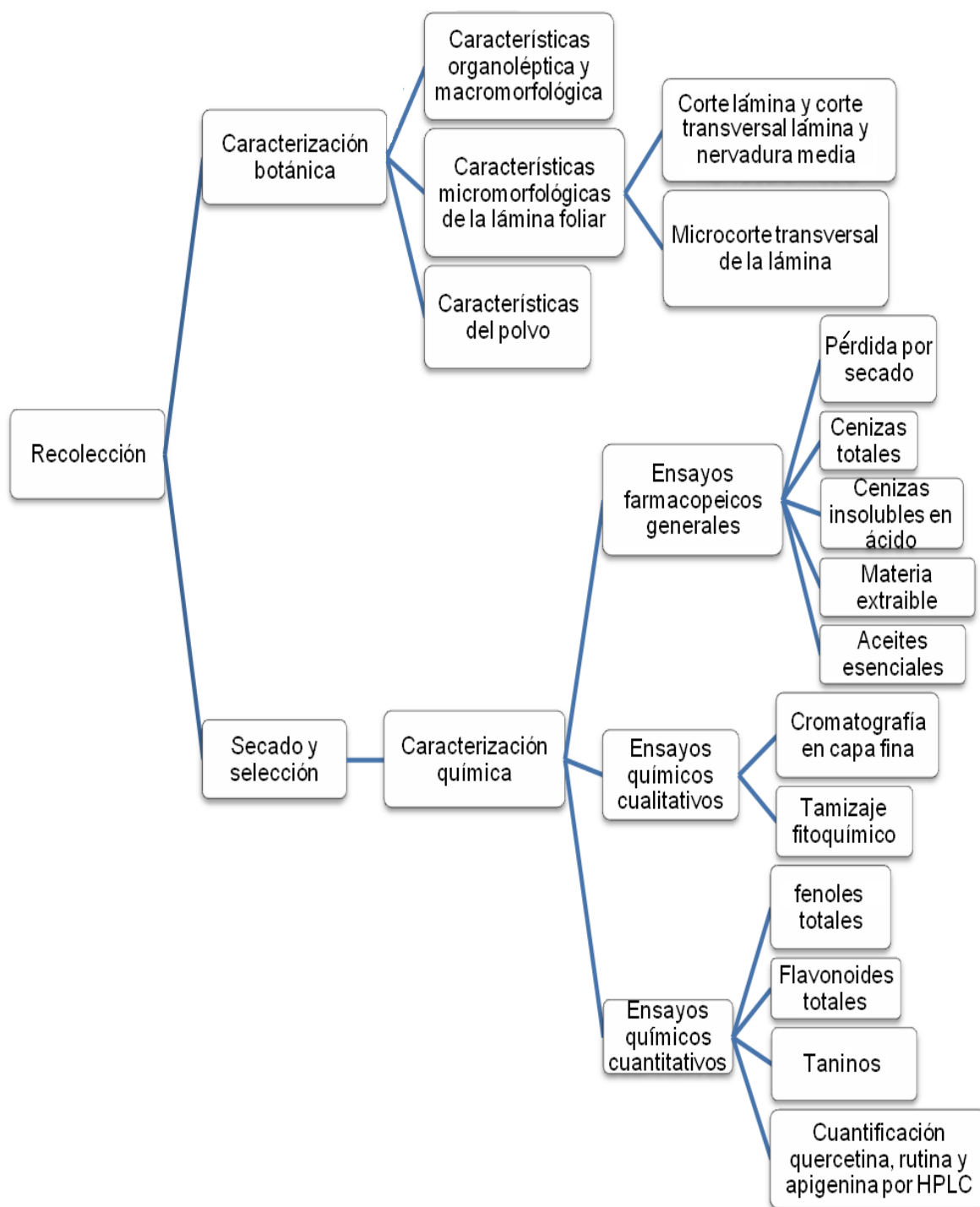


Figura N° 9: Metodología de trabajo para la realización de la monografía farmacopeica para *P. americana*.

#### **5.4.- Recolección, secado y selección.**

##### **5.4.1.- Recolección.**

Se identificaron los tres cultivares por su fruto, ya que son característicos de cada uno de ellos. Posteriormente se recolectaron hojas adultas extendidas que se reconocieron por poseer un color más verde, menor flexibilidad y mayor grosor de las hojas con respecto de las hojas jóvenes. Estas hojas se extrajeron de forma manual, directa y al menos de dos árboles por cada cultivar. Finalmente se depositaron en sacos debidamente rotulados y que permitieran el intercambio de aire. De este material se escogió una pequeña cantidad para la caracterización botánica y el resto se llevó a secar.

##### **5.4.2.- Procesamiento de las muestras, secado, selección y almacenamiento.**

Este proceso se llevó a cabo de manera artesanal inmediatamente luego de la recolección. Se extendieron las hojas sobre papel en un área debidamente ventilada, protegida de la luz, con una humedad relativa para la zona de un 80% (Boletín Agroclimático Regional, 2011) y una temperatura aproximada de 16 °C medida a través de un termómetro ambiental. Durante el transcurso del secado se voltearon las hojas cada dos días, lo que fue realizado inicialmente con las hojas en las ramas, luego en el transcurso de la primera semana del secado se sacaron de las ramas y se dejaron solo las hojas. Finalmente en la última parte del proceso de secado se despeciolaron las hojas y se continuó con el proceso de secado hasta que las hojas tuvieran una pérdida por secado aproximada entre un 10% y un 12%

Al finalizar el proceso de secado se procedió a seleccionar aquellas hojas que presentaran mejor coloración y que no se encontraran oscurecidas y/o incompletas, con el fin de emplear en los ensayos químicos las hojas con la mejor calidad. Por último las hojas seleccionadas se volvieron a depositar en los sacos, los que se almacenaron protegidos de la luz y en un

ambiente seco, lugar desde donde finalmente se extrajo el material para realizar las pruebas químicas.

#### **5.5.- Caracterización botánica de la anatomía foliar.**

##### **5.5.1.- Características macromorfológicas y análisis morfométrico.**

###### **5.5.1.1.- Muestreo.**

Se realizó de acuerdo a lo establecido para drogas de origen vegetal según la Farmacopea Europea 5.0 (2005).

###### **5.5.1.2.- Elaboración de los ejemplares para el herbario.**

Como forma de complementar la caracterización macromorfológica se herborizaron dos ejemplares por cada cultivar, para ello las hojas frescas se extendieron y se prensaron. A este material final se les adjuntó una imagen de su fruto, ya que es un parámetro que caracteriza a los cultivares y que se utilizó como complemento para una pequeña descripción del fruto. Al terminar los análisis los herbarios se depositaron en el Herbario de la facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, Chile.

###### **5.5.1.3.- Características organolépticas y macromorfológicas cualitativas.**

Se eligieron aproximadamente cincuenta hojas, a las que se les describieron las características organolépticas del haz y del envés tales como: color, olor, textura y las características macromorfológicas como: forma de la lámina, forma del borde, forma del ápice, base y tipo de nervadura. Esta última característica se resaltó desarrollando un molde con la hoja.

###### **5.5.1.4.- Análisis morfométrico.**

Las características macromorfológicas se complementaron con un análisis morfométrico, junto con el cual se determinó la forma de la hoja.

#### **5.5.1.4.1.- Análisis de tramos.**

Para esto se midieron cincuenta hojas por cada cultivar utilizando un pie de metro y además se definieron tres tramos en la lámina de la hoja, el primero se definió entre la base y la mitad de la hoja, tramo basal, el segundo se definió en la mitad de la hoja, tramo medio y el último entre la mitad y el ápice, tramo apical, los que también se midieron (Figura N° 10).

#### **5.5.1.4.2.- Análisis morfométrico del peciolo, lámina, ancho de lámina y hoja.**

Además del análisis de los tramos a las cincuenta hojas se les determinaron otras características como: el tamaño de la hoja (lámina más peciolo), del peciolo, de la lámina y del ancho en la mitad de la hoja y se generaron relaciones como: tamaño de la lámina/tamaño del peciolo, tamaño de la lámina/ancho de lámina y tamaño de hoja/tamaño del peciolo (Figura N° 10).

#### **5.5.2.- Características micromorfológicas de la lámina foliar.**

##### **5.5.2.1.- Preparación de las muestras para observaciones microscópica, reactivos y registro.**

Se hicieron de acuerdo a métodos generales para el análisis microscópico de drogas vegetales (Evans, 1991; British Pharmacopoeia, 2009) con algunas modificaciones. A las hojas frescas se les realizaron tanto cortes transversales a mano alzada en la lámina como al nervio medio (Figura N° 10). También se realizaron cortes de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente para la observación de la epidermis, los que se diafanizaron. Este proceso se realizó en un vaso precipitado, en el cual se añadieron las secciones obtenidas y se les agregó etanol al 95% v/v, con el fin de remover los pigmentos. Esta mezcla se llevó a ebullición por 30 min en una placa calefactora. Este proceso se efectuó dos veces a las muestras, debido al exceso de pigmentos. Luego se desechó el solvente y los cortes se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se adicionó a las muestras una solución de hidróxido de sodio al 5% v/v en agua. Esto se llevó a ebullición por 30 min en placa calefactora y se volvió a lavar con agua destilada para

posteriormente dejar reposar los cortes en hidrato de cloral. Finalmente se examinaron los cortes mediante un microscopio óptico y se observó la epidermis superior e inferior, cutícula, estomas y tricomas con aumento de 100x y 400x.

El corte transversal de la lámina se diafanizó solamente con hidrato de cloral. Posteriormente se examinó el corte en un microscopio óptico con aumento de 400x. Este mismo corte luego fue sometido a tinción con floroglucinol-HCl, siendo observado al microscopio con aumento de 400x. Para resaltar la cutícula se tiñeron con una solución de safranina alcohólica.

El corte transversal del nervio medio se sometió a una tinción con floroglucinol-HCl y se observó al microscopio con un aumento de 400x los tejidos característicos del corte como: xilema, floema, colénquima y fibras esclerenquimáticas.

Finalmente todas las observaciones se registraron con fotografías utilizando una cámara digital.

#### **5.5.2.2.- Microcorte transversal de la lámina.**

Se utilizaron tres muestras por cultivar, las que se incluyeron en parafina. Posteriormente se ejecutaron tres microcortes transversales del nervio medio por muestra (Figura N° 10) de 8  $\mu$ m de espesor, utilizando un micrótopo con cuchillo de cristal. Luego se tiñó con safranina y verde rápido. Finalmente se observaron los cortes al microscopio con un aumento de 400x y se registró con la cámara fotográfica digital.

Se hizo además un análisis del primer estrato de parénquima en empalizada. Este análisis constó en seleccionar diez imágenes fotográficas registradas al observar los tres microcortes transversales por cultivar. En estas imágenes se tomó un máximo de cinco células epidérmicas desde donde se contó el número de divisiones o tabiques de las diferentes hileras que formaban el primer estrato del parénquima en empalizada. Después se calculó un promedio entre la cantidad de divisiones por hileras en cada foto y se desarrolló el análisis estadístico.

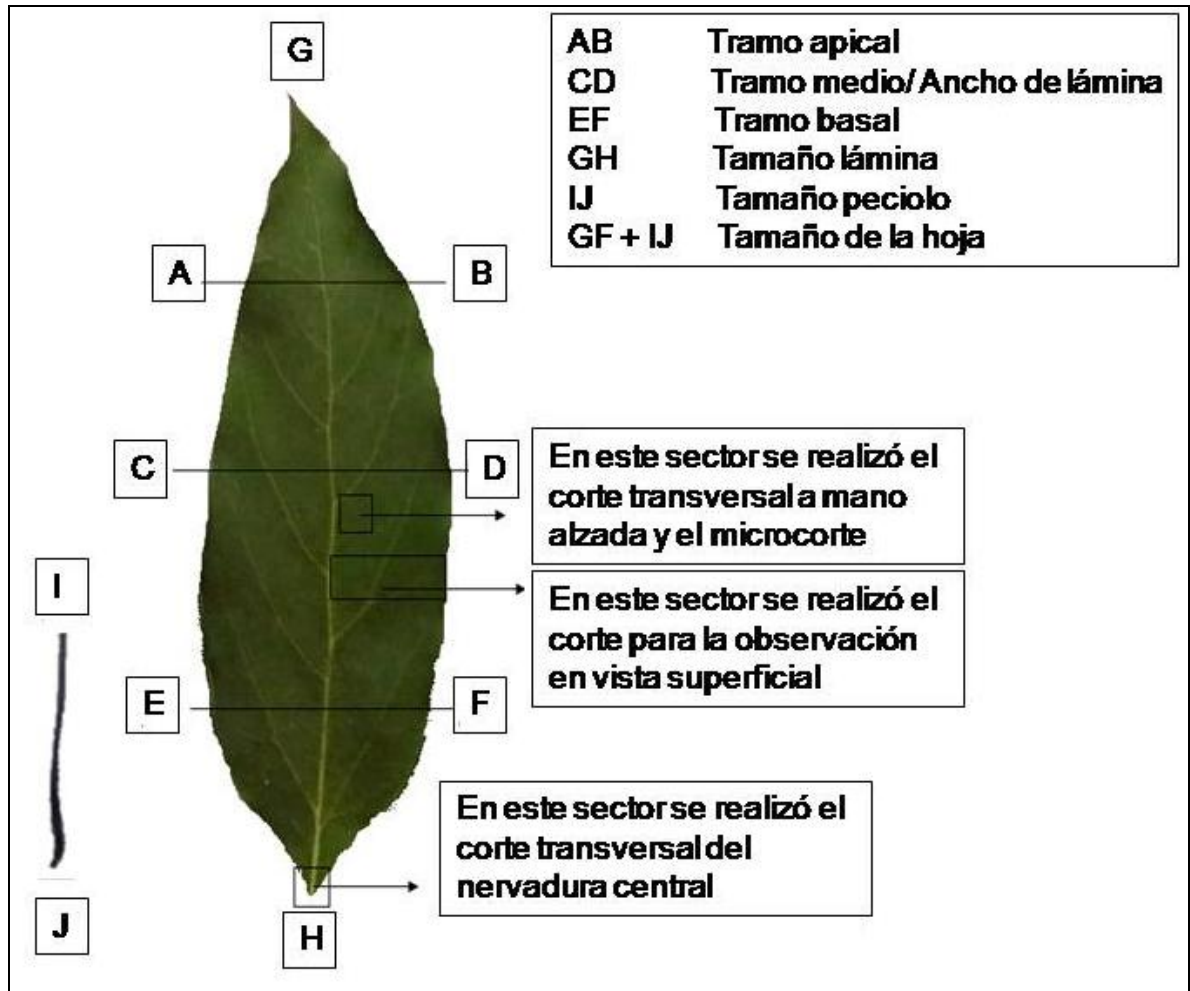


Figura N° 10: Tramos, caracteres morfométricos y lugar de los cortes.

### 5.5.3.- Características microscópicas del polvo.

Se empleó material seco, el cual se pulverizó mediante un molinillo y se tamizó por malla # 45. Este material se estudió en microscopio con aumento de 100x sin decoloración. Luego se decoloró con hidrato de cloral y se analizó con aumento de 100x y 400x. Después se sometió a tinción con floroglucinol-HCl y se observó con aumento de 100x y 400x. Las diferentes estructuras del mesófilo y de las nervaduras observadas en el polvo se fotografiaron utilizando una cámara digital.

## **5.6.- Determinación de la composición química establecida.**

El muestreo para estas pruebas también se realizó de acuerdo a lo establecido para drogas de origen vegetal según la Farmacopea Europea 5.0 (2005).

### **5.6.1.- Ensayos farmacopeicos generales.**

#### **5.6.1.1.- Pérdida por secado.**

Se aplicó la metodología descrita en 2005 por la Real Farmacopea Española.

Primero se pesó una cápsula Petri (m1) y en ella se pesaron 2 g (m2) de hojas fragmentada mediante un molinillo y tamizada por malla # 6. Luego esto se secó a 105 °C en estufa durante 1 h. Trascorrida la hora se dejó enfriar en un desecador para luego ser pesada (m3). Finalmente se repitió el secado y el pesado hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no fuera mayor al 0,25% del peso de la muestra.

La pérdida por secado se calculó como:  $m2 - (m3 - m1) * 100/2$

El resultado se expresó en porcentaje de peso perdido por secado en 1 g de muestra trozada (Real Farmacopea Española, 2005).

#### **5.6.1.2.- Cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.**

Se utilizó la metodología descrita en 2005 por la Real Farmacopea Española.

Se pesó en un crisol 1 g de la materia vegetal pulverizada (m1) mediante un molinillo y tamizada por malla # 20. Posteriormente la muestra se calcinó en la mufla por 6 h, la que se programó para que en la primera hora mantuviera una temperatura de 105 °C para secar, la segunda hora a una temperatura de 300 °C para precalcinar y finalmente las 4 horas restantes a una temperatura de 650 °C para incinerar. Finalmente se dejó enfriar en el desecador y se pesó.

Las cenizas totales se calcularon como:  $(m1/m2)*100$

El resultado se expresó en porcentaje de cenizas totales en base seca (Real Farmacopea Española, 2005).

Para las cenizas insolubles en ácido se empleó la metodología descrita en 2005 por la Real Farmacopea Española.

Se utilizaron las cenizas totales obtenidas en el procedimiento anterior y se les agregó, en el mismo crisol 25 mL de ácido clorhídrico concentrado ( $\text{HCl}_{\text{conc}}$ ) diluido en agua (2 partes de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  más 5 mL de agua) y se llevó a ebullición por 5 min en un placa calefactora. Después se filtró cuantitativamente a través de un filtro libre de cenizas y se enjuagó el crisol y el filtro con agua caliente hasta que el filtrado estuviera libre de cloruros. Para comprobar esto se agregaron gotas de ácido nítrico y de solución de nitrato de plata 0,1 N al filtrado, sin que se formase precipitado ni turbidez lechosa. Posteriormente se colocó el filtro en el crisol y se introdujo en la mufla, previamente programada con el mismo escalamiento de temperatura utilizado para las cenizas totales. Finalmente se dejó enfriar en la desecadora y se pesó (m1).

Las cenizas insolubles en ácido se calcularon como:  $(\text{cenizas totales}/m1) * 100$

El resultado se expresó como porcentaje en base seca (Real Farmacopea Española, 2005).

#### **5.6.1.3.- Materia extraíble.**

Se utilizó la metodología descrita en 2001 por la Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos mexicanos.

En frío: Se pesó aproximadamente 4 g de hojas pulverizadas mediante un molinillo y tamizadas por malla #20 y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa de vidrio. Después se agregó 100 mL de solvente extractivo y se dejó macerar durante 24 h protegido de la luz agitando frecuentemente durante las primeras 6 h. Posteriormente se filtró y de este filtrado se extrajo una alícuota de 25 mL, que posteriormente se colocó en una cápsula de porcelana (m1) y se llevó a sequedad en un baño termostático. Finalmente se secó a 105 °C en una estufa por 1

h y luego de esto se enfrió en un desecador para luego ser pesada (m2). Esta última parte del procedimiento se repitió hasta alcanzar un peso constante. Este procedimiento se realizó en agua, etanol 96% v/v y n-hexano como solventes extractivos.

La materia extraíble en frío se calculó como:  $(m_2 - m_1) * 1000$

El resultado se expresó como mg de materia extraída en 1 g de muestra en base seca.

*En caliente:* Se pesó aproximadamente 2 g de hojas (m1) pulverizadas mediante un molinillo y tamizadas por malla #20 y se transfirió a un cartucho de papel filtro previamente pesado (m2). A la muestra contenida en el cartucho se le realizó una extracción Soxhlet durante 5 h utilizando 100 mL de solvente extractivo dispuesto en un balón de destilación de 250 mL. Luego de la extracción se dejó enfriar y se retiró el cartucho con el residuo. Por último se secó el cartucho en una estufa a 105° C por 30 min, se enfrió en un desecador y se pesó (m3). Este procedimiento se realizó en agua, etanol 96% v/v y n-hexano como solventes extractivos.

La materia extraíble en caliente se calculó como:  $m_1 - (m_3 - m_2) * 1000 / 2$

El resultado se expresó como mg de materia extraída en 1 g de muestra en base seca.

#### **5.6.1.4.- Aceites esenciales.**

Este ensayo se realizó adaptando el método descrito por la Real Farmacopea Española en 2005.

Se pesó en un 60 g de muestra pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 7. Esta muestra se llevó a un matraz de base redonda de 1 L, al que se le agregó 600 mL de agua destilada y se colocó en una manta calefactora. Antes de comenzar el proceso de destilación al matraz se le colocó un adaptador con tapa, al cual se le conectó un refrigerante colocando en su parte inferior un matraz para recibir el agua y el aceite esencial condensado. Durante el transcurso del proceso se agregó continuamente agua destilada para que no se quemara la muestra. El proceso se detuvo luego de recibir 1 L de destilado y a este destilado obtenido se le extrajo el

aceite esencial mediante la utilización de un embudo decantación en el que se agregó una primera fracción de 500 mL del destilado y luego 50 mL de éter etílico. Se agitó y se le agregó suficiente cloruro de sodio para separar las fases. El proceso de separación se realizó dos veces por cada fracción de 500 mL. A la fracción orgánica obtenida se le agregó una cantidad suficiente de sulfato de sodio para adsorber el agua que no se haya separado de la fase orgánica. Se separó el líquido del sólido y se evaporó el éter en una placa calefactora. El volumen obtenido se comparó contra un volumen conocido.

Los resultados se expresaron en  $\mu\text{L}$  por 60 g de muestra pulverizada.

### **5.6.2.- Ensayos químicos cualitativos.**

#### **5.6.2.1.- Cromatografía en capa fina.**

Se adaptó la metodología general descrita por Wegner y Bladt (2009) para la identificación de flavonoides por TLC.

*Apigenina y quercetina:* Se extrajo por separado 1 g de hojas de cada cultivar pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 45 con 10 mL de metanol en un baño de ultrasonido durante 10 min. Después se dejó enfriar y se filtró. De los extractos obtenidos se aplicaron aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  separados un centímetro sobre la base de una placa de sílica gel de 10 x 20 cm. Posteriormente se eluyeron en una cámara cromatográfica aproximadamente hasta los 15 cm utilizando como fase móvil tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (5:4:1) contra un estándar de quercetina y apigenina, los que se prepararon pesando 0,1 mg de quercetina en 2 mL de metanol y 0,1 mg de apigenina en 2 mL de metanol y de los que se aplicó 5  $\mu\text{L}$ . Luego se retiró la placa y se secó en una estufa a 105° C por 5 min. Luego se rociaron sobre la placa dos reveladores, el primero fue 2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol y el segundo fue polietilenglicol 400 al 5% en metanol. Se dejó reposar la placa por 30 min y luego se examinó bajo luz ultravioleta de onda larga (365 – 360 nm).

Rutina: Se utilizó la misma forma de extracción, de aplicación, de distancia recorrida, de secado y de revelación que se utilizaron en la cromatografía anterior, solamente se cambió la fase móvil que en este caso fue acetato de etilo: metil etil cetona: agua: ácido fórmico (50:30:10:10) y el estándar que fue la rutina, la que se preparó con 0,1 mg de rutina en 2 mL de metanol.

De las dos TLC se escogió aquella que tuviera una mejor elución, separación y calidad, la que se comparó contra otra especie de la familia de las *Lauraceae*.

Los resultados de las TLC se expresaron según la relación de flujo ( $R_f$ ) que es la razón entre las distancias recorridas desde el origen hasta el centro de la señal de interés y el frente de la fase móvil y también se expresaron multiplicando por cien el cociente anterior ( $hR_f$ ).

#### 5.6.2.2.- Tamizaje fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico se desarrolló según los métodos descritos por Hervet et al. (2006) y Tamayo et al. (2011). Se emplearon los extractos n-hexánico, alcohólico y acuoso, de las hojas de *P. americana* de cada cultivar obtenidos en la determinación de la materia extraíble en frío. Los ensayos realizados en cada extracto se pueden observar en las figuras N° 11, 12 y 13.

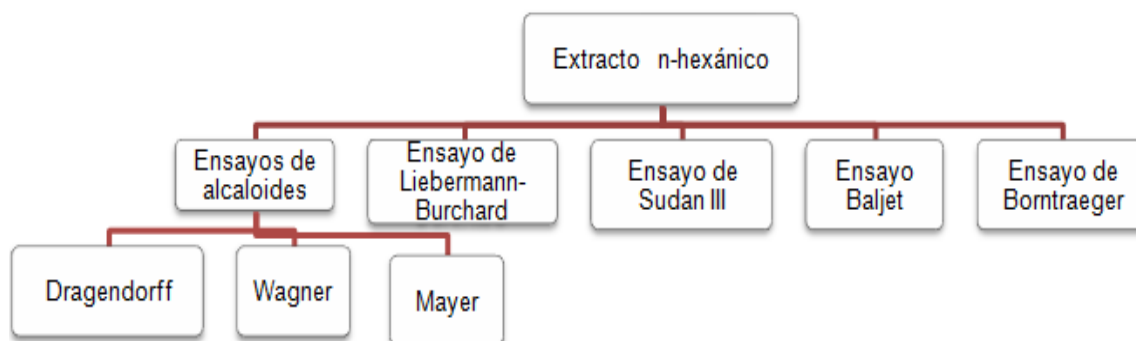


Figura N°11: Ensayos desarrollados al extracto n-hexánico.

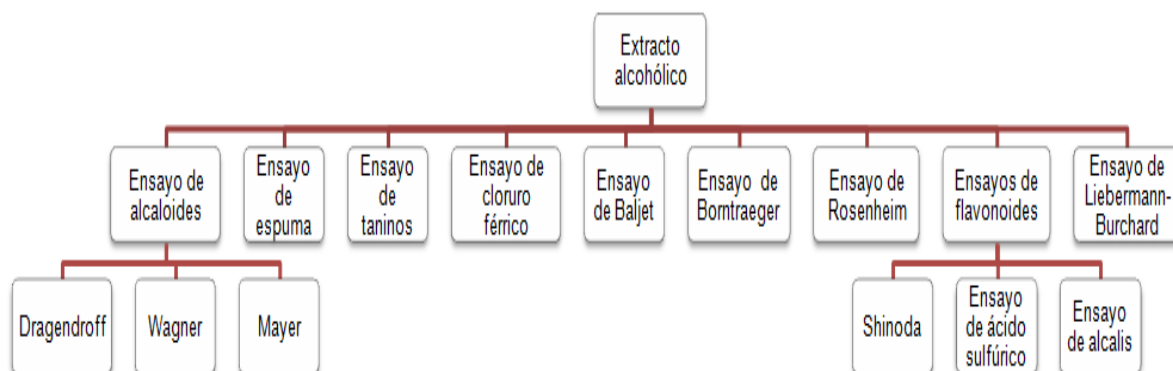


Figura N°12: Ensayos desarrollados al extracto alcohólico.

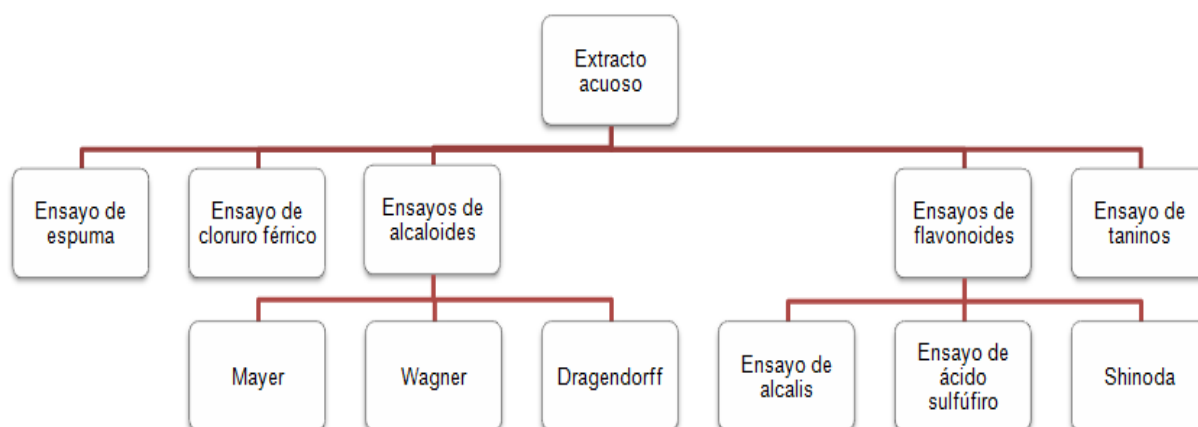


Figura N°13: Ensayos desarrollados al extracto acuoso.

#### Ensayos para determinar presencia de alcaloides.

Una alícuota de 10 mL del extracto se llevó a una cápsula de porcelana y se calentó en baño termostático hasta la evaporación del solvente. El residuo se redisolvió en 2 mL de ácido clorhídrico al 1% v/v en agua y se calentó suavemente por 5 min. Posteriormente se filtró y el filtrado se distribuyó en tres tubos. Al primer tubo se le agregó 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorff, al segundo 2 a 3 gotas de reactivo de Mayer y al tercer tubo 2 a 3 gotas de reactivo de Wagner. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló opalescencia, turbidez o precipitado en alguno de estos ensayos.

#### Ensayo de Lieberman-Burchard.

Una alícuota de 2 mL del extracto se colocó en un tubo de ensayo y se le adicionó 1 mL de anhídrido acético mezclando vigorosamente. Después se deslizó, por la pared del tubo, 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló un cambio rápido de coloración desde verde a azul oscuro/ negro.

#### Ensayo de Baljet.

Se añadió una alícuota de 2 mL del extracto alcohólico a un tubo de ensayo y se le añadió 1 mL de reactivo e Baljet. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló un precipitado rojo. En el caso del extracto hexánico se evaporó el solvente de la alícuota y se redisolvió en la misma cantidad de alcohol y se procedió de la misma forma.

#### Ensayo de Sudan III.

Se agregó una alícuota de 2 mL del extracto a un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL de reactivo de Sudan III. El resultado se expresó como positivo si se desarrollaron gotas oleosas de color rojo oscuro.

#### Ensayo de Bortranger.

A una cápsula de porcelana se le agregó una alícuota de 2 mL del extracto y se evaporó el solvente en un baño termostático. El residuo obtenido se redisolvió en 1 mL de cloroformo. Luego se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua, se agitó y se dejó en reposo hasta su separación. En el caso del extracto hexánico se omitió el paso de la evaporación. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló una coloración rosada o roja en la fase acuosa alcalina.

#### Ensayo de espuma.

Se adicionó una alícuota de 2 mL del extracto acuoso a un tubo de ensayo y se agitó fuertemente durante 5 min. El ensayo se consideró positivo si apareció espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistió por más de 2 min. En el caso del extracto alcohólico se diluyó cinco veces su volumen con agua y se procedió de la misma forma.

#### Ensayo de cloruro férrico.

Se utilizó 2 mL del extracto en un tubo de ensayo y se le adicionó 3 gotas de una solución de cloruro férrico al 5% p/v en solución salina fisiológica. El resultado se expresó como positivo para compuestos fenólicos en general si se desarrolló una coloración rojo-vino y positivo para una predominancia de taninos si se desarrolló una coloración verde intensa.

#### Ensayos para determinar presencia de flavonoides:

Se desarrollaron tres tipos de ensayos para determinar la presencia de flavonoides.

#### Shinoda.

A un tubo se le añadió una alícuota de 1 mL del extracto y se le añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y unas virutas de magnesio. Al terminar la reacción se le adicionó 2 mL de alcohol amílico y se agitó. Se dejaron separar las fases y se observó la coloración del alcohol amílico. El resultado se expresó como positivo para flavonas si se observó una coloración amarilla o anaranjada, positivo para flavonol o flavanonol si se observó una coloración rojo carmesí o magenta y positivo para flavanonas si el color fue violeta-azul.

#### Ensayo con ácido sulfúrico concentrado.

Se tomó una alícuota de 1 mL del extracto y se concentró a seco en una cápsula de porcelana. Posteriormente se añadió unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y se observó la

coloración. El resultado se expresó como positivo para flavonas y flavonoles si se desarrolló una coloración amarilla intensa y positivo para flavanonas si se desarrolló una coloración anaranjada

#### Ensayos con álcalis.

Se agregó una alícuota de 1 mL del extracto a un tubo de ensayo y se basificó con hidróxido de sodio al 5% p/v en agua. El resultado se expresó como positivo para flavonas y flavanonol si se observó una coloración amarilla y positivo para flavanonas y flavonol si se desarrolló una coloración amarilla a anaranjada.

#### Ensayo de taninos.

Se utilizó una alícuota de 10 mL del extracto acuoso y se filtró. De este filtrado se tomaron 3 mL y se llevaron a un tubo de ensayo al que se le añadió 1-2 gotas de cloruro férrico al 10% p/v en agua destilada. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló una coloración azul (taninos hidrolizables) o verde (taninos condensados). Para confirmar el resultado se dividió el resto del extracto en tres partes iguales en tubos de ensayos. Al primero se le adicionó el reactivo de gelatina al 1% p/v en agua destilada, al segundo el reactivo de gelatina-sal y al último una solución salina al 10% p/v en agua destilada. El resultado se expresó como positivo si se desarrolló un precipitado, en el primero y en el segundo tubo, mientras que en el tercer tubo no haya desarrollado de precipitado. En el caso del extracto etanólico se evaporó 5 mL en un baño termostático y el residuo obtenido se redisolvió en 10 mL de agua destilada y se procedió de la misma forma.

#### Ensayo de Rosenheim.

Permite determinar la presencia de leucoantocianidinas o antocianidinas. Para ello se añadió en un tubo una alícuota de 1 mL del extracto. Luego se adicionó 1 mL de  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  y se calentó durante 10 min, luego del cual se enfrió. Posteriormente se añadió 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico y se agitó. Finalmente se dejó en reposo y se observó la coloración de la fase

amílica. El resultado se expresó como positivo para leucoantocianidinas si se observó una coloración rojo a marrón en la fase amílica y como positivo para antocianidinas si se observó una coloración rojo azulado.

Los ensayos descritos para realizar el tamizaje fitoquímico fueron complementados con espectros ultravioleta-visibles e infrarrojo de los mismos extractos utilizados en el tamizaje y fueron desarrollados originalmente para evaluar la materia extraíble en frío que se utilizó en el tamizaje. En el caso del espectro ultravioleta-visible se utilizó una alícuota de 3 mL de cada tipo de extracto y se midió en un rango entre los 200 y los 800 nm. Para el caso del espectro infrarrojo se llevó una alícuota de 10 mL a sequedad en rotavapor a 40 °C. El residuo obtenido de este proceso se mezcló en un mortero con bromuro de potasio en una relación de 1:100 y se comprimó. Finalmente al comprimido se le realizó un espectro infrarrojo. Además se realizó un espectro infrarrojo para un extracto alcohólico de otra especie de la familia de las *Lauraceae*.

### **5.6.3.- Ensayos químicos cuantitativos.**

#### **5.6.3.1.- Cuantificación de compuestos fenólicos totales.**

Este ensayo se realizó según lo descrito por la Organización Internacional de Estandarización (ISO) (2005).

Tratamiento de la muestra: Se pesó en un tubo de centrifuga de 50 mL aproximadamente 0,2 g de muestra pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 45, al que se le agregó 5 mL de una solución a 70 °C de metanol 70% v/v en agua y se mezcló en un agitador. Después se dejó en un baño termostático a 70 °C por 10 min, en donde a los 5 y a los 10 min se volvió a agitar. Luego se centrifugó por 10 min a 3500 rpm. Transcurrido este tiempo se separó el sobrenadante y el precipitado se sometió nuevamente a un proceso de extracción con 5 mL del mismo solvente anterior y se repitieron los mismos pasos. Finalmente se juntaron los dos extractos y se aforó a 10 mL con el mismo solvente y se dejó enfriar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Determinación: 1 mL del extracto final se llevó a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua destilada. De esta solución se extrajo 1 mL y se llevó a un tubo de ensayo, al que posteriormente se le adicionó 5 mL de reactivo Folin Ciocalteu y se dejó reposar por 8 min. Luego de este tiempo se adicionó 4 mL de carbonato de sodio al 7,5% p/v en agua y se dejó reposar por 60 min. Finalmente se midió a 765 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible contra una curva de ácido gálico usando como blanco la misma mezcla anterior cambiando solamente el extracto por agua. El resultado se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico en 1 g de muestra en base seca.

Curva de ácido gálico: Se elaboró una solución madre de ácido gálico anhidro de 1 mg/mL, con la cual se generó una curva de calibrado de seis estándares de diferentes concentraciones, los que se pueden observar en la tabla N° 5. Por cada punto se tomó 1 mL y se añadió cada uno a un tubo de ensayo diferente. Luego se adicionó a cada tubo 5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu. Se agitó y se dejó reposar por 8 min, luego de los cuales se le adicionó 4 mL de carbonato de sodio 7,5% p/v y se dejó reposar por 60 min. Finalmente se midió a 765 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, usando como blanco la misma mezcla anterior cambiando solamente el volumen de ácido gálico por agua y se elaboró la curva de calibrado (Anexo N° 1).

Tabla N° 5: Curva de calibrado de ácido gálico.

Estándar	Volumen (mL)		Concentración (ug/mL)
	Solución madre	Final	
1	1	100	10
2	2	100	20
3	3	100	30
4	4	100	40
5	5	100	50
6	6	100	60

#### 5.6.3.2.- Cuantificación de taninos.

Este ensayo se adaptó según el método descrito en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2001), al cual se le realizó una modificación en la forma de cuantificar el resultado descrita por Palici (2005).

Tratamiento de la muestra: Se pesó en un matraz de fondo redondo de 250 mL 1,5 g de muestra pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 80. Esto se llevó a ebullición por 30 minutos a reflujo. Luego de este tiempo se enfrió y se transfirió a un matraz volumétrico de 250 mL completando el volumen con agua. Posteriormente se dejó decantar y se filtró, descartando los primeros 50 mL del filtrado. El resto del filtrado constituyó la solución madre.

Determinación de compuestos fenólicos totales: Se transfirió 5 mL de la solución madre a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con agua destilada. Luego en un matraz volumétrico de 25 mL se mezcló 2 mL de esta solución con 1 mL de reactivo de Folin Denis y 10 mL de agua y se aforó con carbonato de sodio al 29% p/v en agua. Finalmente se esperó 30 min y se midió la

absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible contra una curva de calibrado de pirogalol, utilizando como blanco la misma mezcla anterior reemplazando la muestra por agua. Los resultados de los compuestos fenólicos totales de las muestras se expresaron como mg de equivalentes de pirogalol en 1 g de muestra en base seca.

*Determinación de compuestos fenólicos no adsorbibles por polvos de piel o compuestos no taninos:* Se pesó 0,1 g de polvos de piel en un vaso precipitado de 100 mL y se adicionó 10 mL de solución madre y se agitó vigorosamente por 60 min. Luego se filtró y se llevó 5 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 25 mL completando el volumen con agua. Una alícuota de 2 mL de esta solución se llevó a un matraz volumétrico de 25 mL y se mezcló con 1 mL de reactivo de Folin Denis y 10 mL de agua y se completó el volumen con carbonato de sodio 29% p/v. Finalmente se esperó 30 min y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible contra una curva de calibrado de pirogalol. Se uso como blanco la mezcla anterior reemplazando la muestra por agua. Los resultados de los compuestos fenólicos totales no adsorbibles de las muestras se expresaron como equivalentes de pirogalol en 1 g de muestra en base seca.

*Determinación de compuestos fenólicos adsorbibles por polvos de piel o taninos:* Se calcularon a través de la resta entre los compuestos fenólicos totales y los compuestos fenólicos no adsorbibles por polvos de piel.

*Preparación de la curva de calibrado:* Se elaboró una solución madre de pirogalol de 0,5 mg/mL con la cual se generó una curva de calibrado de cinco estándares de diferentes concentraciones, la que se puede observar en la tabla N° 6. Por cada punto se tomó 2 mL y se añadió cada uno a un matraz volumétrico de 25 mL diferente. Después se le adicionó un 1 mL de reactivo de Folin Denis, 10 mL de agua y se completó el volumen con carbonato de sodio 29% p/v. Finalmente se esperó 30 min y se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible contra una curva de calibrado de pirogalol (Anexo N° 2), utilizando como blanco la misma mezcla anterior reemplazando la muestra por agua.

Tabla N° 6: Curva de calibrado pirogalol.

Estándar	Volumen (mL)		Concentración (ug/mL)
	Solución madre	Final	
1	1	100	10
2	2	100	20
3	3	100	30
4	4	100	40
5	5	100	50
6	6	100	60

#### 5.6.3.3.- Cuantificación de flavonoides totales.

Este ensayo se realizó según el método descrito por Lock et al. (2006).

Tratamiento de la muestra: Se pesó en un vaso precipitado de 100 mL 1 g de muestra pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 45, a lo que se añadió 20 mL de etanol 80% v/v en agua. Luego se llevó al ultrasonido programado a una temperatura de 50 °C por 30 minutos. Después se dejó enfriar y se filtró, recogiendo el filtrado en un matraz volumétrico de 25 mL el cual se aforó con etanol al 80% v/v en agua.

Determinación: Se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL 100 µL del extracto anterior, 200 µL de solución de acetato de potasio 1M en agua, 200 µL de nitrato de aluminio al 10% p/v en agua y se completó el volumen con etanol 80% v/v. Finalmente se dejó reposar por 40 min y se procedió a medir a 415 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible contra una curva de calibrado de quercetina, utilizando como blanco la misma mezcla reemplazando el extracto por

etanol 80% v/v. Los resultados de los flavonoides totales en las muestras se expresaron como mg de equivalentes de quercetina en 1 g de muestra en base seca.

Preparación de la curva de calibrado: Se pesó en un matraz de 10 mL aproximadamente 2,7 mg de quercetina y se aforó con etanol 80% v/v, conformándose así la solución madre con la que se generó una curva de calibrado (Anexo N° 3) de cinco estándares, la que se puede observar en la tabla N° 7. De cada punto se tomó 100  $\mu$ L por separado y se les añadió 200  $\mu$ L de acetato de potasio 1M en agua más 200  $\mu$ L de nitrato de aluminio 10% p/v. Luego se midió a 415 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible, utilizando un blanco conformado por 200  $\mu$ L de acetato de potasio 1M en agua más 200  $\mu$ L de nitrato de aluminio 10% p/v y etanol al 80% v/v hasta un aforo de 10 mL.

Tabla N° 7: Curva de calibrado quercetina.

Estándar	Volumen de la solución madre (mL)	Acetato de potasio 1M ( $\mu$ L)	Nitrato de aluminio 10% ( $\mu$ L)	Volumen final (mL)	Concentración (ng/mL)
1	100	200	200	10	2,7
2	200	200	200	10	5,4
3	350	200	200	10	9,45
4	500	200	200	10	13,5
5	700	200	200	10	18,9

#### 5.6.3.4.- Quantificación de rutina, quercetina y apigenina por HPLC.

Se utilizó el método de cromatografía líquida de Lombard et al. (2005), el cual se adaptó para la determinación de apigenina, rutina y quercetina.

Tratamiento de la muestra: Se pesó en un matraz erlenmeyer aproximadamente 5 g de droga pulverizada mediante un molinillo y tamizada por malla # 40 y se le adicionó 35 mL de etanol

grado HPLC 80% v/v en agua ultrapura. Esta mezcla se dejó en un baño de ultrasonido por 20 min. Posteriormente la mezcla se agregó a un tubo de centrifuga y se centrifugó por 15 min a 3500 rpm. Se separó el sobrenadante del sedimento y a este último se le realizó una segunda extracción con 35 mL y se repitió el proceso. Luego se juntaron los dos sobrenadantes y se adicionaron a un matraz de aforo de 100 mL, el que se aforó con etanol grado HPLC 80% v/v (solución 1). De esta solución se tomaron 60 mL, los que se dejaron en un matraz redondo base plana y se les agregó 15 mL de ácido clorhídrico al 6 N y 0,5 mg de ácido ascórbico. A la mezcla anterior se le realizó un proceso de reflujo a 90 °C por 2 h. Se dejó enfriar la mezcla y se llevó a pH 4,5 con hidróxido de sodio 15 N. Finalmente se llevó a un aforo de 100 mL con etanol grado HPLC 80% v/v (solución 2).

Determinación: 2 mL de la solución 1 y 2 se filtraron cada uno por separado a un vial, a través de una membrana de 0,2 µm de diámetro de poro y se llevó al HPLC donde se eluyó utilizando una gradiente modificada de dos fases móviles la A compuesta por 98% de agua ultrapura, 1,5% de tetrahidrofurano y un 0,1% de ácido trifluoroacético una B compuesta por acetonitrilo. Esta gradiente se puede observar en la tabla N° 8.

Tabla N° 8: Gradiente modificada.

<b>Gradiente modificada</b>	<b>Porcentaje de fase móvil (B)</b>	<b>Tiempo</b>
Isocrática	17	2
Gradiente	90	33
Gradiente	95	1
Isocrática	95	3
Gradiente	17	2
Isocrática	17	15
		Final:

Se utilizó un flujo para la gradiente de 1mL/min, una temperatura de horno de a 40 °C y una longitud de onda de 352 nm. Los resultados se expresaron como mg de quercetina, rutina o apigenina, según corresponda, en 1 g de muestra en base seca.

Preparación de las curvas de calibrado: Se pesó 1,1, 0,9 y 0,9 mg de estándares de quercetina, rutina y apigenina respectivamente y se llevó cada uno por separado a un matraz volumétrico de 5 mL, los que se aforaron con etanol HPLC al 80% v/v. Con estas soluciones se elaboró tres curvas de calibrado (Anexo N° 4 - 6), cada una con cinco estándares como se puede observar en la tabla N° 9 y se utilizó la misma fase móvil descrita la determinación de para la muestra problema.

Tabla N° 9: Curva de calibrado apigenina, rutina y quercetina.

Estándar	Volumen (µL)					Concentración (ug/mL)
	Apigenina	Rutina	Quercetina	Etanol 80%	Final	
1	21	21	17	1450	1509	2,5
2	42	42	34	1400	1518	5
3	83	83	68	1270	1504	10
4	170	170	140	1020	1500	20
5	340	340	280	540	1500	40

### 5.7.- Elaboración de la monografía

En este punto se compararon los datos obtenidos y se decidió entre elaborar una monografía general o más de una. Además se seleccionaron los mejores ensayos a utilizar para caracterizar la hoja de P. americana y se diseñó así el formato para la monografía farmacopeica.

### **5.8.- Análisis estadístico**

Para comparar los datos obtenidos para los tramos, tamaño del peciolo, de la lámina, de la hoja, del ancho de la lámina, conteo de corridas celulares del primer estrato del parénquima en empalizada y para las pruebas cuantitativas químicas se realizó un análisis de varianza de un solo factor, luego del cual se le aplicó la prueba de las medias de Tukey. Adicionalmente a las medidas del tamaño del peciolo, de la lámina, del ancho y de la hoja se les realizó un coeficiente de correlación de Pearson para determinar su relación. Todas estas pruebas estadísticas se realizaron con un  $P \leq 0,05$ .

Las pruebas químicas se realizaron en triplicado exceptuando la cromatografía en capa fina, la determinación del volumen de aceites esenciales, las cuales se realizaron una vez por cultivar y la cromatografía líquida que se realizó doce veces en total (seis veces en días consecutivos), con lo que se evaluó repetibilidad.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1.- Recolección, secado, selección y almacenamiento.**

#### **6.1.1.- Recolección.**

Como resultado de la recolección manual se obtuvo un saco de 5 kg por cultivar de hojas adultas, de color verde oscuro y textura coriácea.

#### **6.1.2.- Secado, selección y almacenamiento.**

Como resultado de este proceso se obtuvo una pérdida por secado cercana 10% por g de hoja triturada (Tabla N° 15) resultado con el que se detuvo el proceso como se había programado, transcurriendo un mes desde el comienzo del proceso. La mayoría de las hojas presentaron un color verde oscuro, textura rugosa y de fácil trituración. Al finalizar la selección se obtuvo aproximadamente un kg de hojas por cultivar almacenado.

### **6.2.- Caracterización botánica de la anatomía foliar.**

#### **6.2.1.- Análisis organoléptico, macromorfológico y morfométrico..**

##### **6.2.1.1.- Características organolépticas y macromorfológicas.**

Los resultados de la observación de las características macromorfológica y organoléptica de las hojas frescas y del fruto se observan en la tabla N° 10.

Tabla N° 10: Resumen de las características macromorfológicas de las hojas y del fruto.

<b>Cultivar</b>	<b>Edranol</b>	<b>Hass</b>	<b>Fuerte</b>
<b>Peciolada</b>	Si	Si	Si
<b>Textura de la hoja</b>	Coriácea	Coriácea	Coriácea
<b>Color del haz</b>	Verde	Verde oscuro	Verde
<b>Color del envés</b>	Opaco y glaucescentes	Opaco y glaucescentes	Opaco y glaucescentes
<b>Forma</b>	Ovada	Lanceolada	Ovada
<b>Ápice</b>	Agudo	Agudo, ligeramente	Agudo
<b>Base</b>	Redondeado	Aguda e	Cuneada
<b>Borde</b>	Liso	Liso	Liso
<b>Estipulas</b>	Si	Si	Si
<b>Nervadura</b>	Prominentes en el envés. Color	Prominentes en el envés. Color	Prominentes en el envés. Color
<b>Olor</b>	Anisado al pulverizar la	Anisado al pulverizar la	Anisado (++) al pulverizar
<b>Fruto</b>	Baya	Baya	Baya
<b>Forma</b>	Piriforme	Piriforme	Piriforme
<b>Textura</b>	Liso	Rugoso	Rugoso fino
<b>Presencia lenticelas</b>	Si (++) , verde claro	No	Si, verde claro

(++): Mayor con respecto de los otros cultivares.

Las mayores diferencias se encontraron en la forma (Figura N° 14), la base y el aroma de la hoja no así en las nervaduras (Figura N° 15), borde, ápice y estipulas, mientras que los frutos difieren en la forma, color, textura y en la presencia de lenticelas (Figura N° 16).

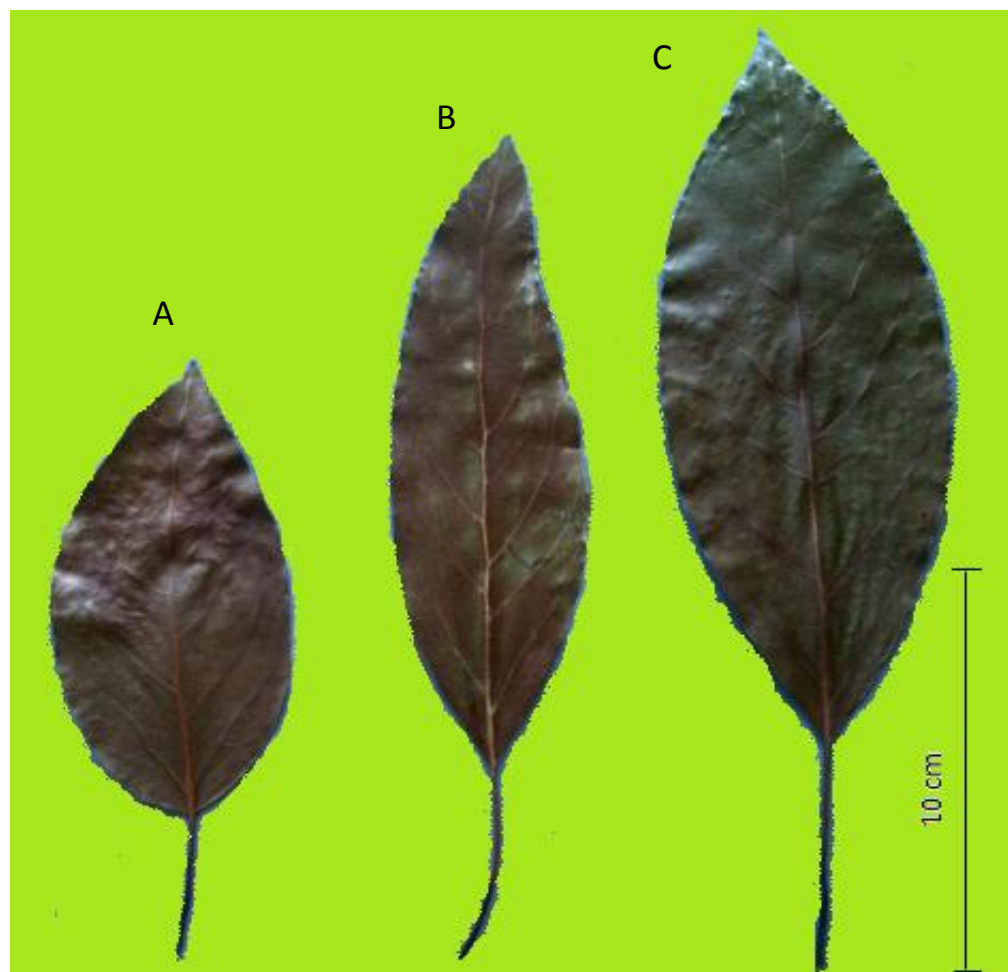


Figura N° 14: Forma de la hoja de cada cultivar. (A) cv. Edranol; (B) cv. Hass; (C) cv. Fuerte.

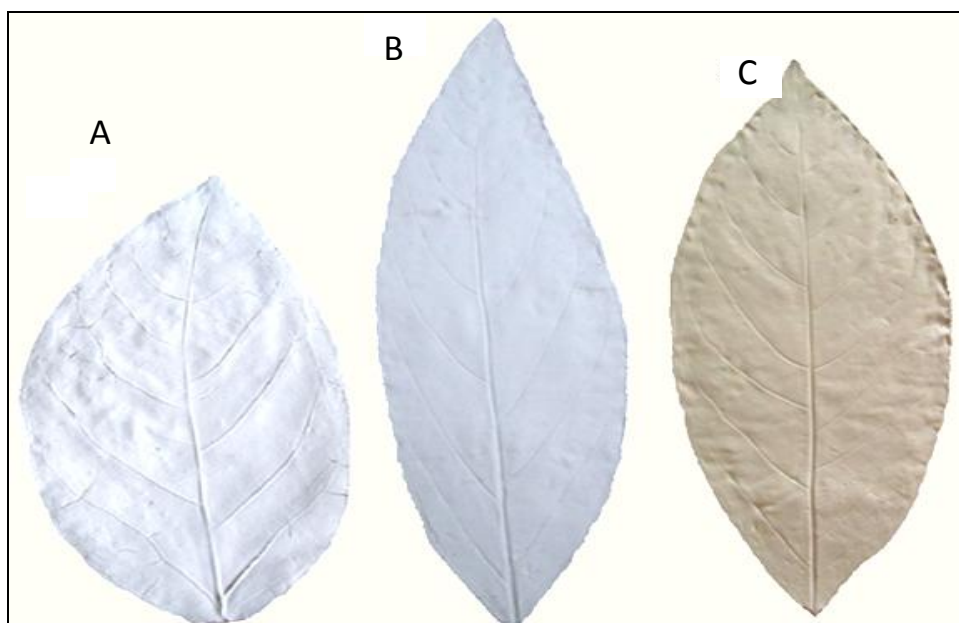


Figura N° 15: Molde de las nervaduras de las hojas de los tres cultivares. (A) cv. Edranol; (B) cv. Hass; (C) cv. Fuerte.

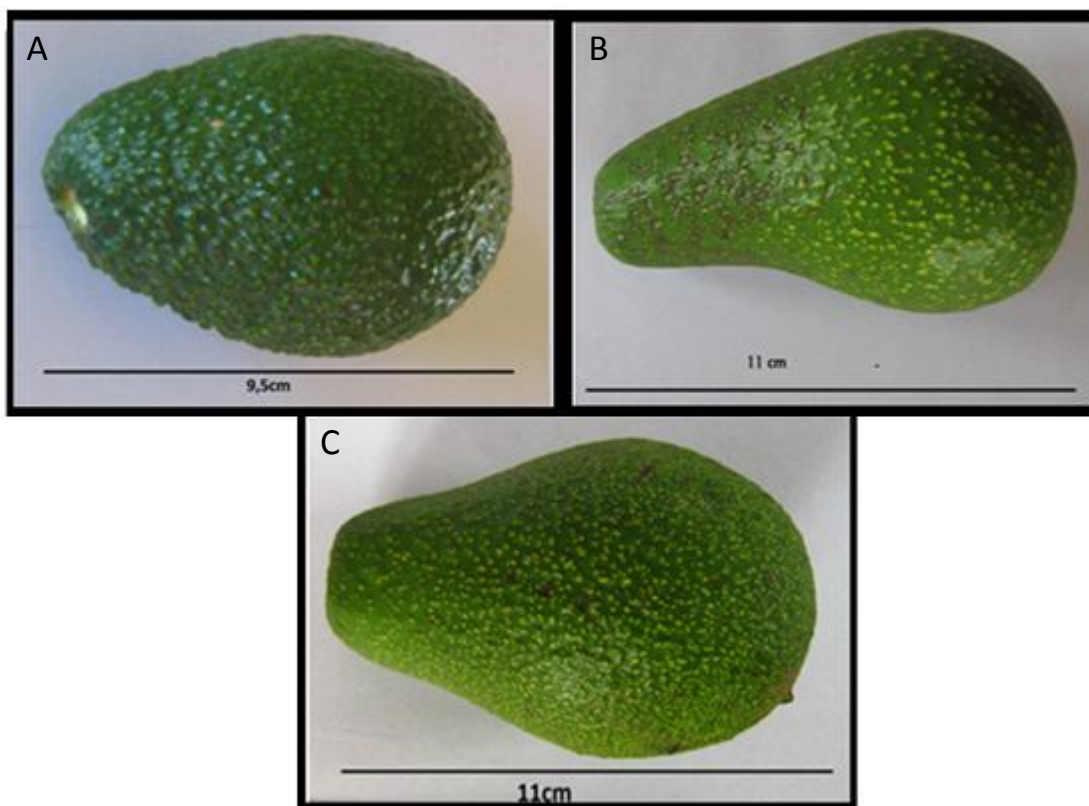


Figura N° 16: Fruto de los tres cultivares. (A) cv. Edranol; (B) cv. Hass; (C) cv. Fuerte.

### 6.2.1.2.- Análisis morfométrico.

#### 6.2.1.2.1.- Análisis de tramos.

Los resultados obtenidos del análisis morfométrico de los tramos se muestran en la tabla N° 11.

Tabla N° 11: Promedios de los trazos T1, T2 Y T3.

<b>Cultivar</b>	<b>T1 (cm) <sup>(y)</sup></b>	<b>T2 (cm) <sup>(y)</sup></b>	<b>T3 (cm) <sup>(y)</sup></b>
<b>Edranol</b>	6,4 ± 0,8 a	7,3 ± 0,9 a	5,3 ± 0,9 a
<b>Hass</b>	5,6 ± 0,7 b	6,5 ± 0,7 b	5,0 ± 0,7 a
<b>Fuerte</b>	7,4 ± 1,4 c	9,7 ± 1,6 c	7,3 ± 1,6 b
<b>DMS</b>	0,5	0,6	0,5

y: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Valores con la misma letra dentro de las columnas no presentan diferencias significativas según el test de Tukey (P≤0,05).

DMS: Diferencia mínima significativa según test de Tukey.

Los datos de la tabla muestran una diferencia significativa, según la prueba de Tukey, entre cada tramo de cada cultivar.

Con respecto de los promedios de los tramos se desglosa que cv. Edranol presenta un T1 superior a T3 más marcado que en el caso de los cultivares Fuerte y Hass. Para cv. Hass se observan promedios similares para T1 y T3. En todos los cultivares T2 presenta un tamaño superior con respecto de los otros dos tramos. Finalmente con respecto de cv. Fuerte este posee los mayores promedios para los tres tramos y presenta un promedio similar para T1 y T3.

Con los resultados anteriores se generaron relaciones entre los tramos. Las relaciones entre los tramos no difieren significativamente (Tabla N° 12).

Tabla N° 12: Relaciones entre los promedios de los tramos.

<b>Cultivar</b>	<b>T1/T3 <sup>(y)</sup></b>	<b>T2/T1 <sup>(y)</sup></b>	<b>T2/T3 <sup>(y)</sup></b>
<b>Edranol</b>	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2
<b>Hass</b>	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
<b>Fuerte</b>	1,0 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1

y: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

#### 6.2.1.2.2.- Análisis morfométrico peciolo, lámina, ancho de lámina y hoja.

Los resultados de los análisis del tamaño del peciolo, lámina, ancho de la lámina y hoja se presentan a continuación (Tabla N° 13).

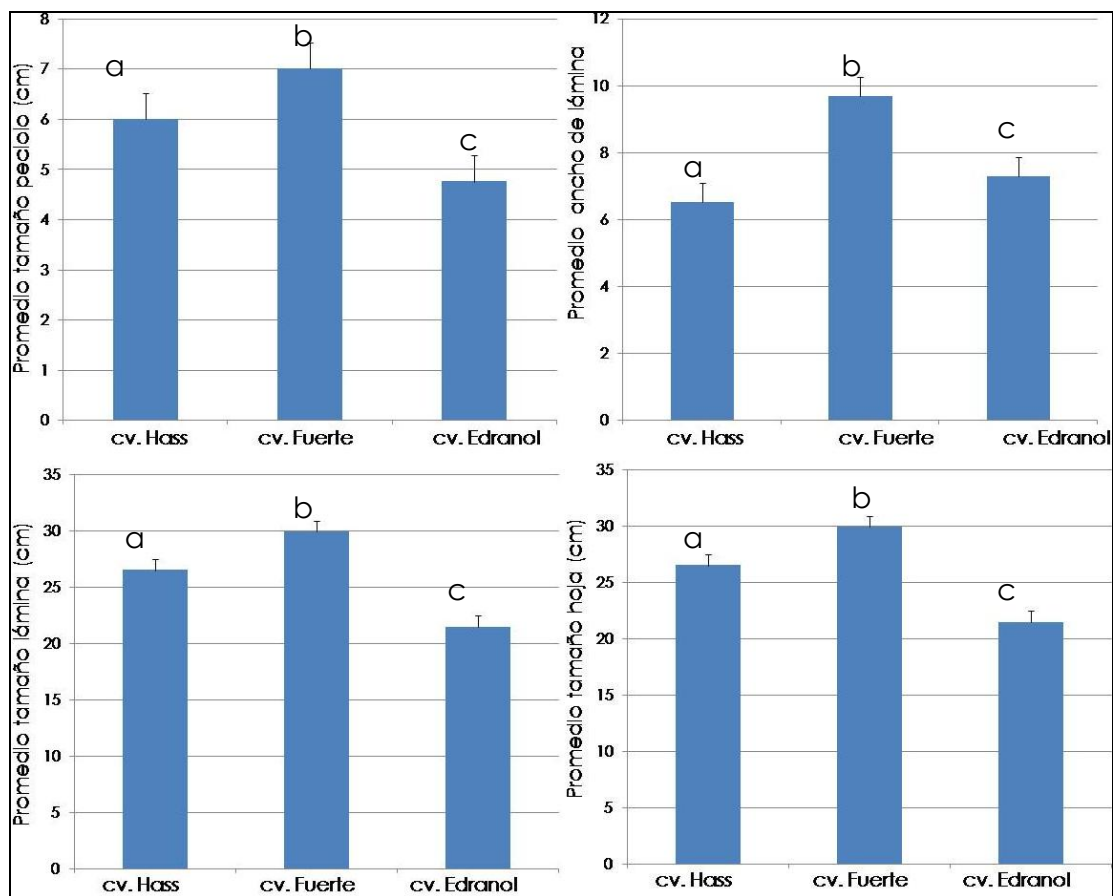
Tabla N° 13: Promedios del tamaño del peciolo, de la lámina, del ancho de la lámina y de la hoja.

<b>Cultivar</b>	<b>Hoja (cm) <sup>(y)</sup></b>	<b>Lámina (cm) <sup>(y)</sup></b>	<b>Ancho (cm) <sup>(y)</sup></b>	<b>Peciolo (cm) <sup>(y)</sup></b>
<b>Edranol</b>	21,5 ± 2,5 a	16,7 ± 2,0 a	7,3 ± 0,9 a	4,8 ± 0,6 a
<b>Hass</b>	26,5 ± 3,0 b	20,5 ± 2,5 b	6,5 ± 0,7 b	6,0 ± 0,8 b
<b>Fuerte</b>	29,9 ± 4,0 c	22,9 ± 3,0 c	7,3 ± 1,6 c	7,0 ± 1,4 c
<b>DMS</b>	1,7	2,3	0,6	0,5

y: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Valores con la misma letra dentro de las columnas no presentan diferencias significativas según el test de Tukey (P≤0,05).

DMS: Diferencia mínima significativa según test de Tukey.



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 17: Análisis estadístico de Tukey para las cuatro características evaluadas. (A) Promedio del tamaño peciolo; (B) Promedio ancho de la lámina; (C) Promedio tamaño lámina; (D) Promedio tamaño hoja.

De la tabla N° 13 y de la figura N° 17 se desprende que existen diferencias significativas entre los resultados de las cuatro características evaluadas por cada cultivar.

Al desglosar los resultados obtenidos se puede observar un predominio por parte de cv. Fuerte, con respecto de los promedios de las cuatro características analizadas. cv. Edranol presenta los menores promedios de la lámina, peciolo y hoja. Otro resultado destacable son los mayores promedios para el tamaño de la lámina y de la hoja de cv. Hass con respecto de cv. Edranol, no así su promedio de ancho de la lámina.

Con los resultados anteriores se evaluó la correlación entre las características evaluadas con un  $P \leq 0,05$  y un valor crítico de 0,279. La correlación si difiere significativamente (Figura N° 18, 19 y 20).

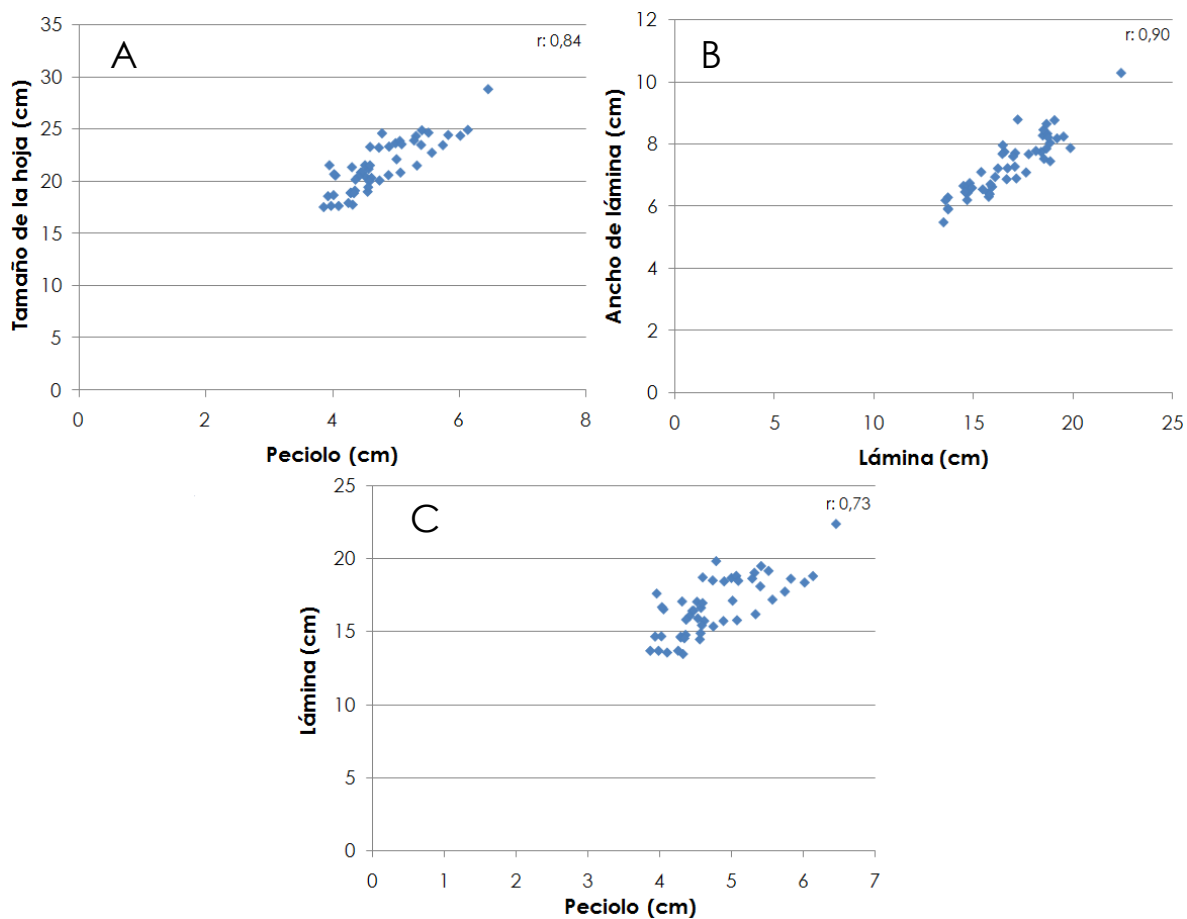


Figura N° 18: Correlación entre las características evaluadas para cv. Edranol. (A) Pecíolo vs lámina; (B) Lámina vs ancho de lámina; (C) Pecíolo vs hoja.

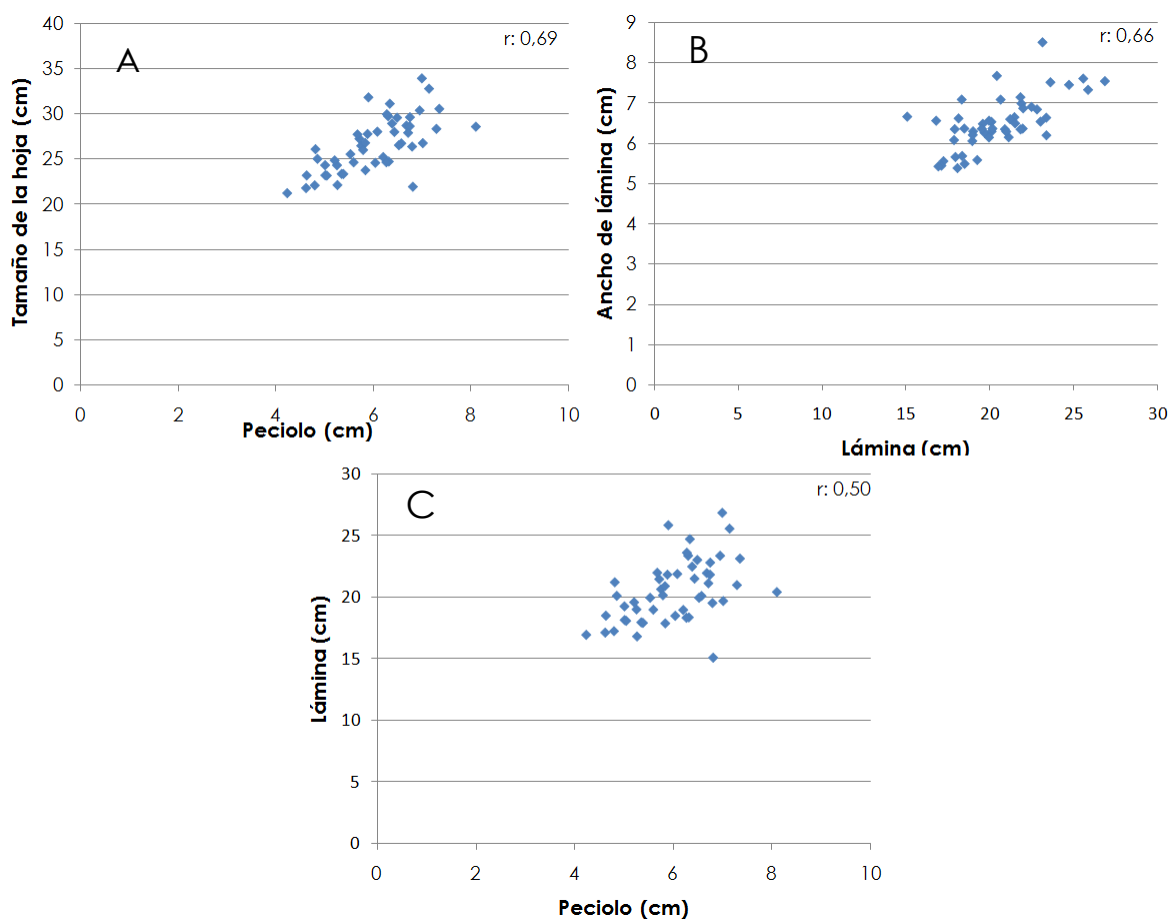


Figura N° 19: Correlación entre las características evaluadas para cv. Hass. (A) Pecíolo vs lámina; (B) Lámina vs ancho de lámina; (C) Pecíolo vs hoja.

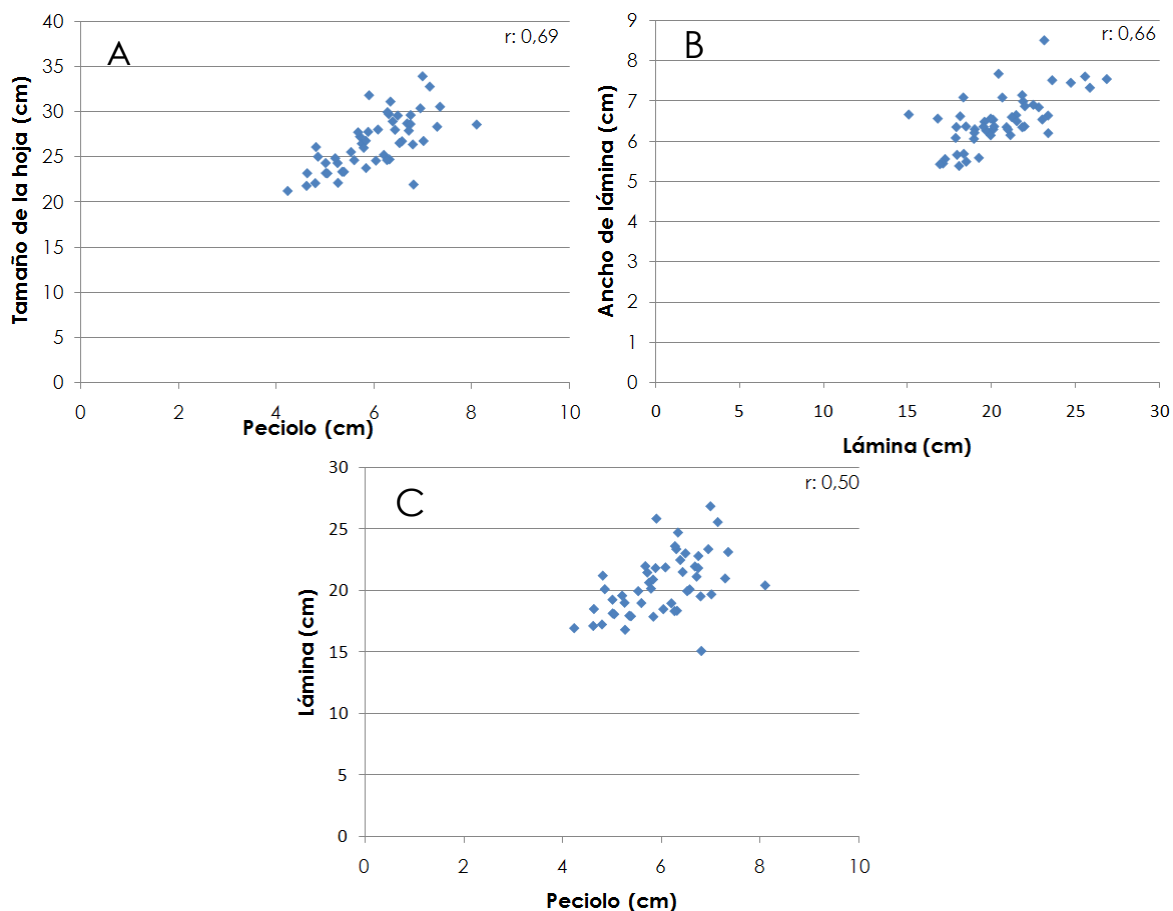
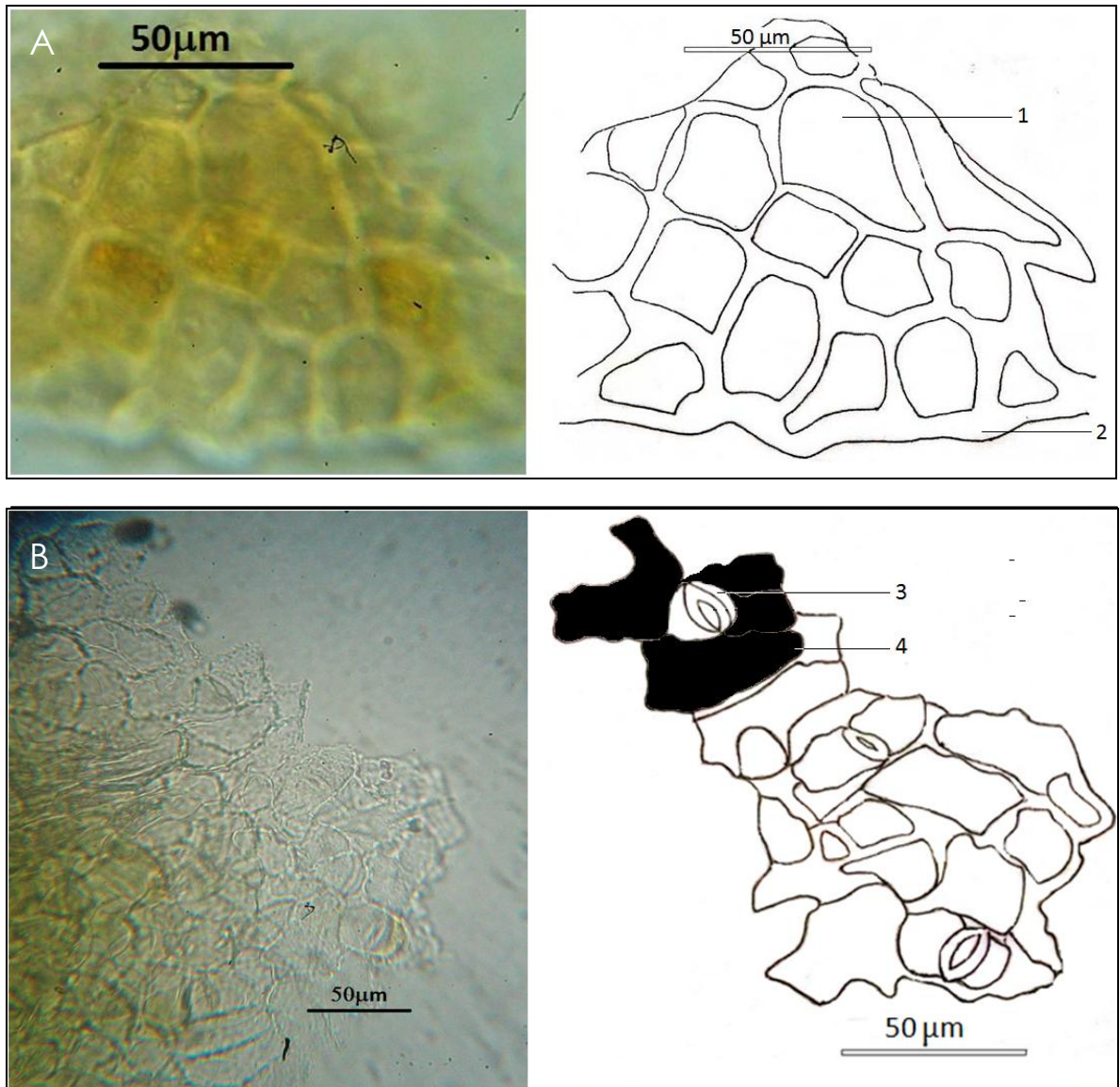


Figura N° 20: Correlación entre las características evaluadas para cv. Fuerte. (A) Pecíolo vs lámina; (B) Lámina vs ancho de lámina; (C) Pecíolo vs hoja.

## 6.2.2.- Características micromorfológicas de la lámina foliar.

### 6.2.2.1.- Preparación de las muestras para observaciones microscópica, utilización de los reactivos y registro.

Los resultados de los diferentes cortes realizados a las hojas de cada cultivar se observan en las figuras N° 21 a 31. Todas las imágenes que se observan a continuación se encuentran con un aumento de 400X y fueron tomadas por la Químico Farmacéutico Carmen Olcese Bruna.



*Figura N° 21: **cv. Edranol:*** En vista superficial, se observa la epidermis del haz (A) y la epidermis del envés (B), ambas se presentan como una capa compacta de células poliédricas de paredes rectas y curvas (1), ambas se observan con cutículas (2). La epidermis del envés presenta además estomas, por lo general anomocíticos, dos células guardianas (3) con forma elíptica, y células anexas que se encuentran generalmente en número de cuatro a cinco (4).

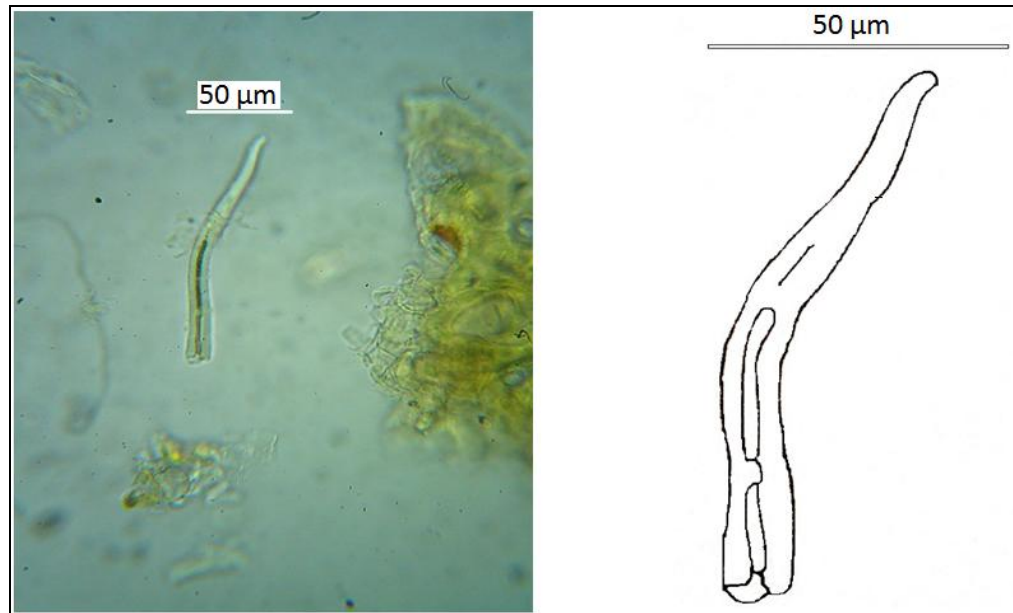


Figura N° 22: **cv. Edranol:** En vista superficial se observan tricomas tectores simples, de forma cónica y unicelulares escasos.

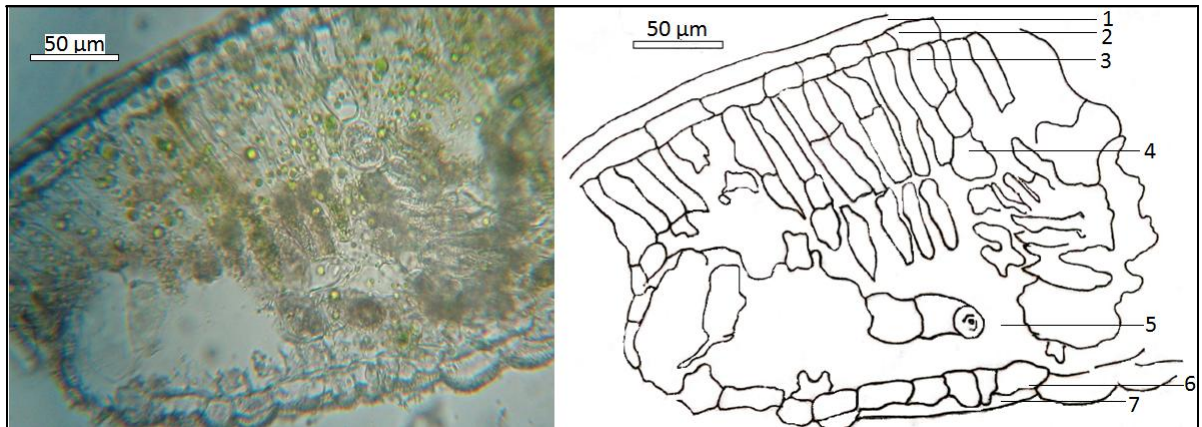
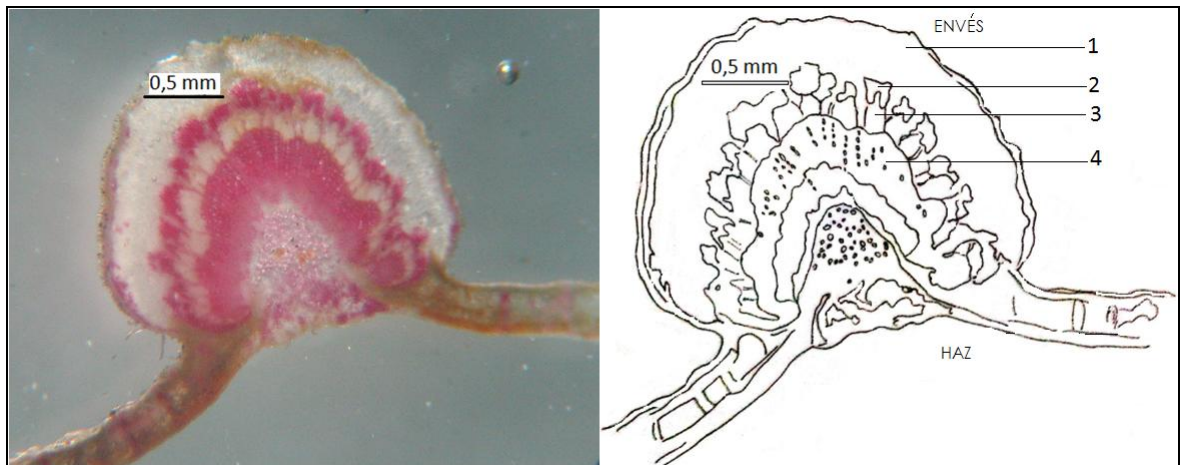
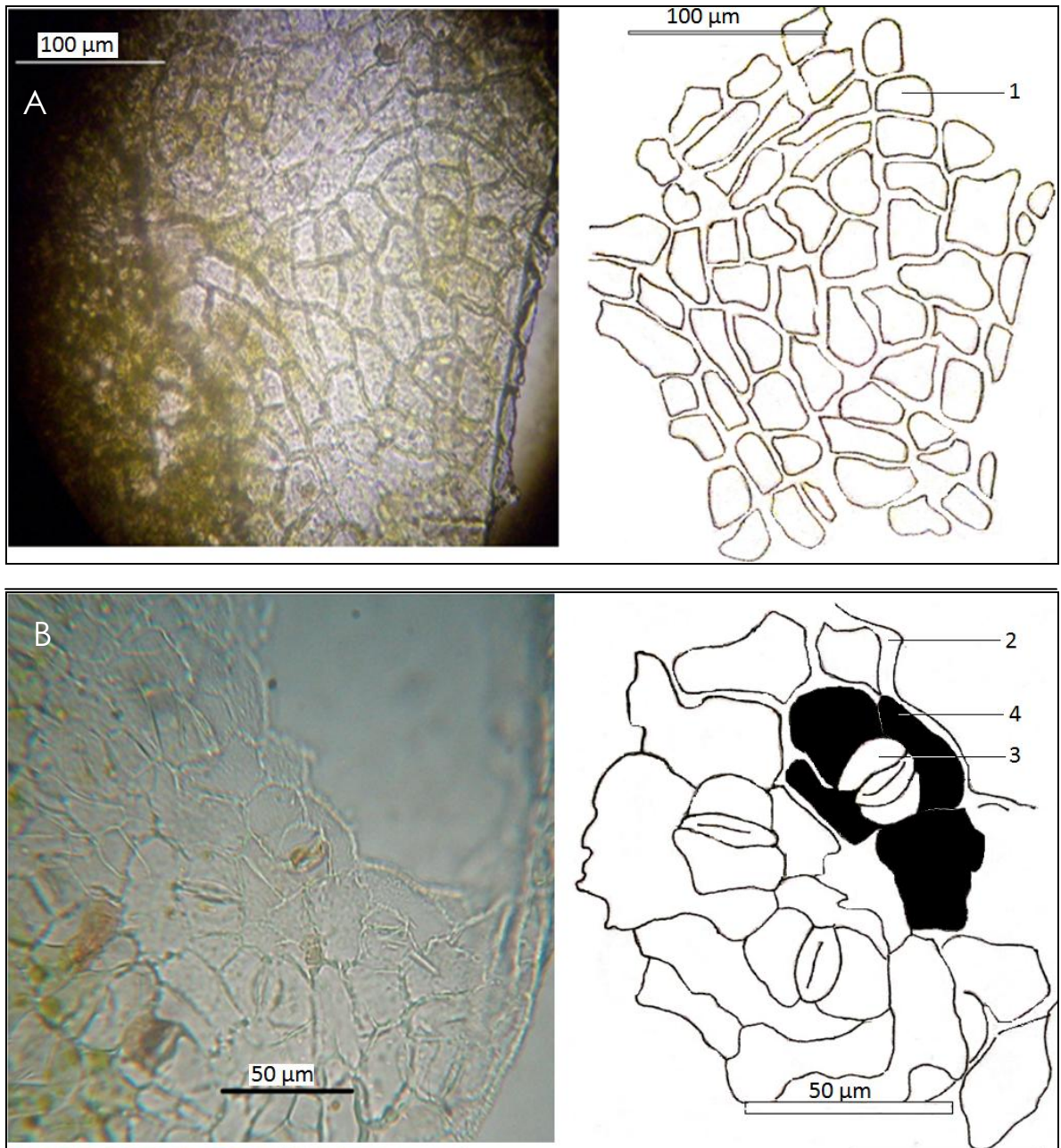


Figura N° 23: **cv. Edranol:** En el corte transversal de la lámina a mano alzada se observa ambas epidermis con cutícula (1) y (7), la cual presenta una superficie plana, la epidermis superior (2), el mesófilo bifacial compuesto por dos estratos de parénquima en empalizada (3), el más interno está compuesto por células prismáticas más cortas y más anchas y un estrato de parénquima esponjoso (5) compuesto por células poliédricas dispuestas en forma compacta, la epidermis inferior (6) y la cutícula del envés (7). Se observan además células ovoides de contenido cristalino (4).



*Figura N° 24: **cv. Edranol:*** En el corte transversal a mano alzada del nervio medio, tras una tinción con floroglucina-HCl se observa el xilema (4) hacia el haz, el floema (3) en forma de un arco hacia el envés, una corrida de fibras esclerenquimáticas (2) y el colénquima (1) hacia el envés.



*Figura N° 25: **cv. Hass:*** En vista superficial, se observa la epidermis del haz (A) y del envés (B), se presentan como una capa compacta de células poliédricas de paredes rectas y curvas (1), ambas se observan con cutículas (2). La epidermis del envés presenta además estomas, por lo general anomocíticos, dos células guardianas (3) con forma elíptica y células anexas que se encuentran generalmente en número de cuatro (4).

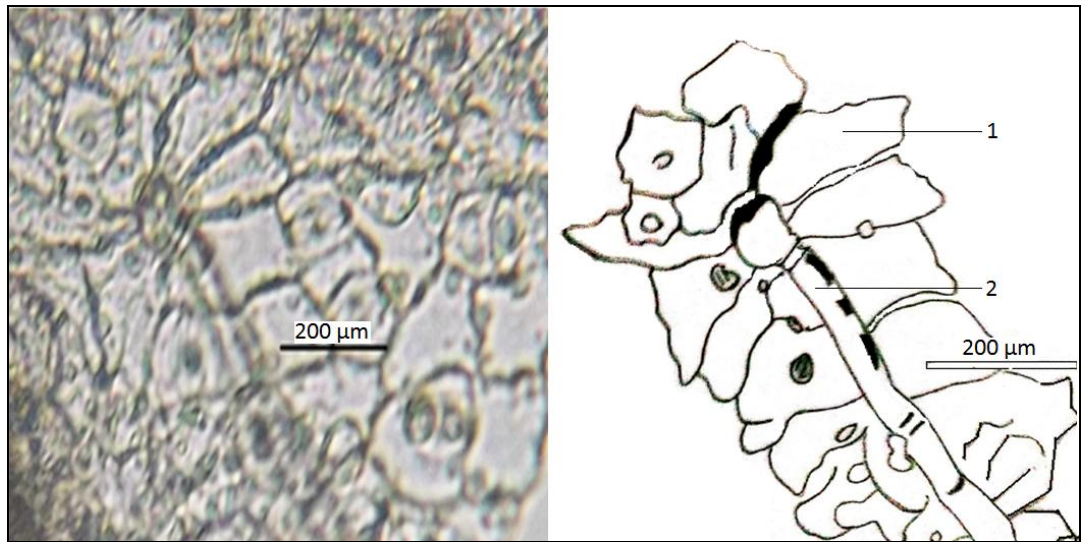


Figura N° 26: **cv. Hass:** En vista superficial se observan las células de la epidermis del envés (1) y tricomas tectores simples, de forma cónica y unicelulares escasos.

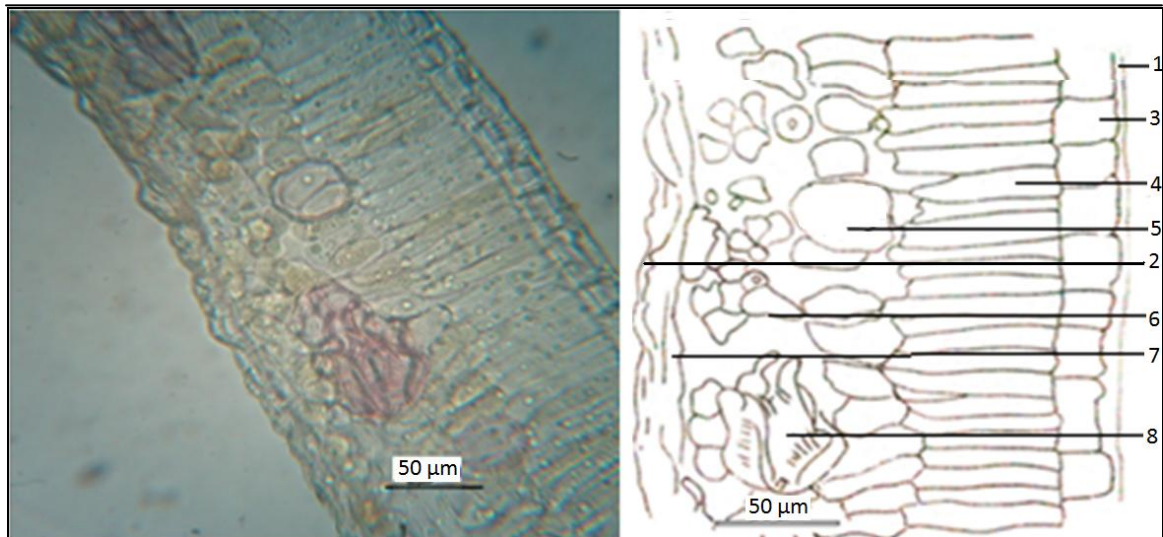


Figura N° 27: **cv. Hass:** En el corte transversal de la lámina a mano alzada se observa ambas epidermis con cutícula (1) y (2), la cual presenta una superficie plana, la epidermis superior (3), el mesófilo bifacial compuesto por dos estratos de parénquima en empalizada (4), el más interno está compuesto por células prismáticas más cortas y más anchas y un estrato de parénquima esponjoso (6) compuesto por células poliédricas dispuestas en forma compacta con presencia de escasas esclereidas (8), la epidermis inferior (7) y la cutícula del envés (2). Se observan además células ovoides de contenido cristalino (5).

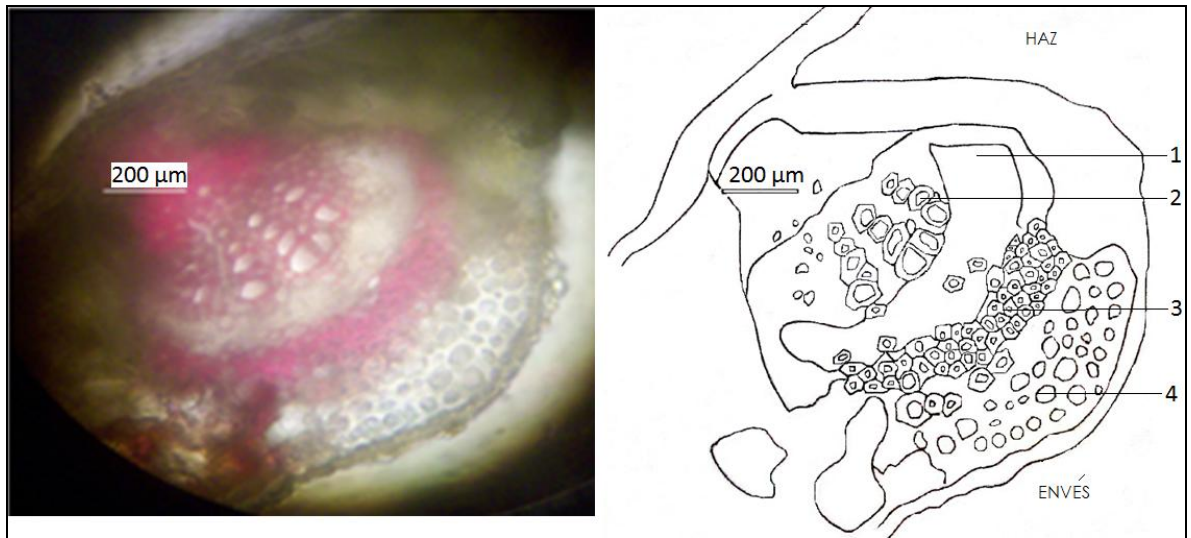
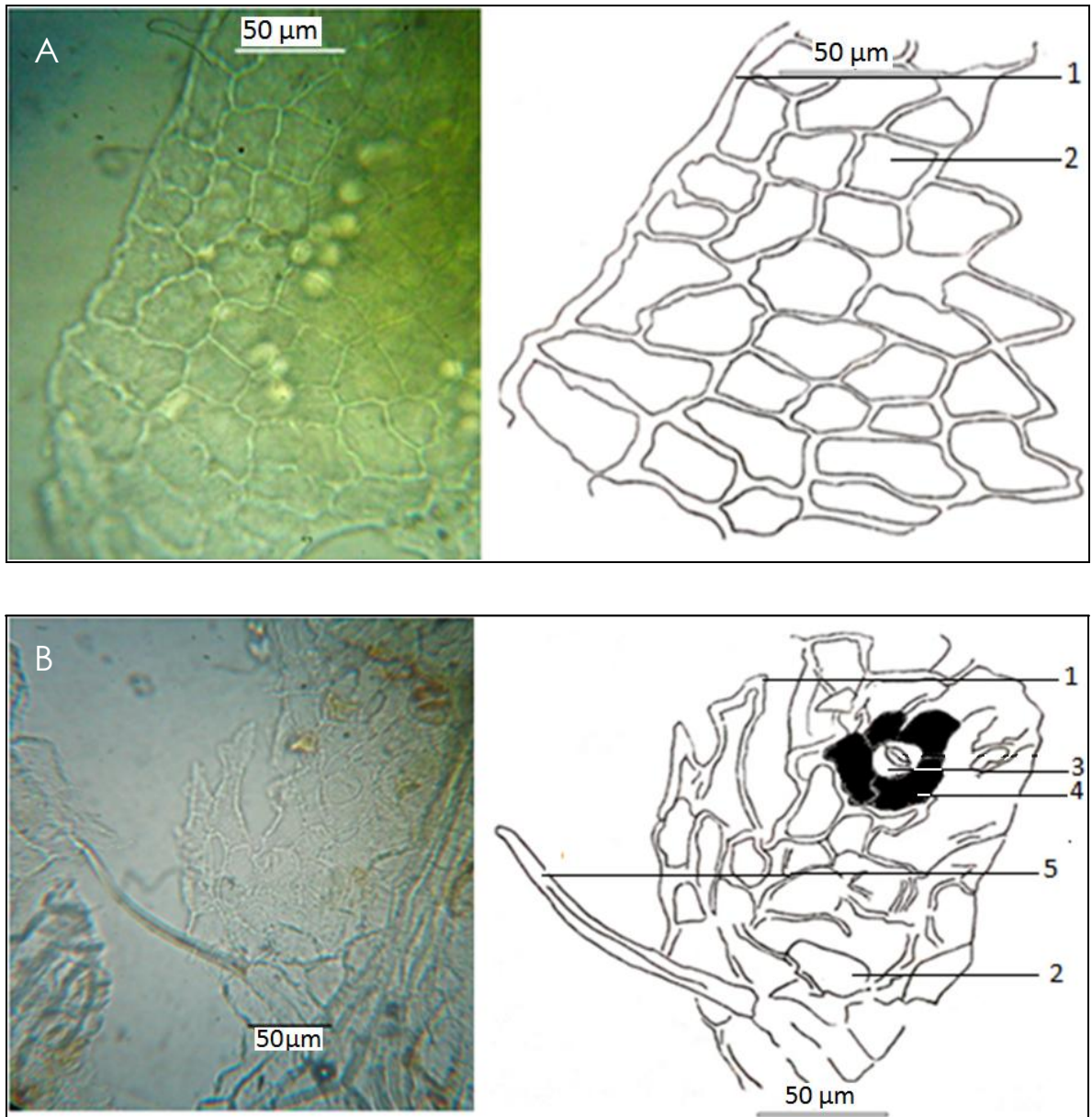
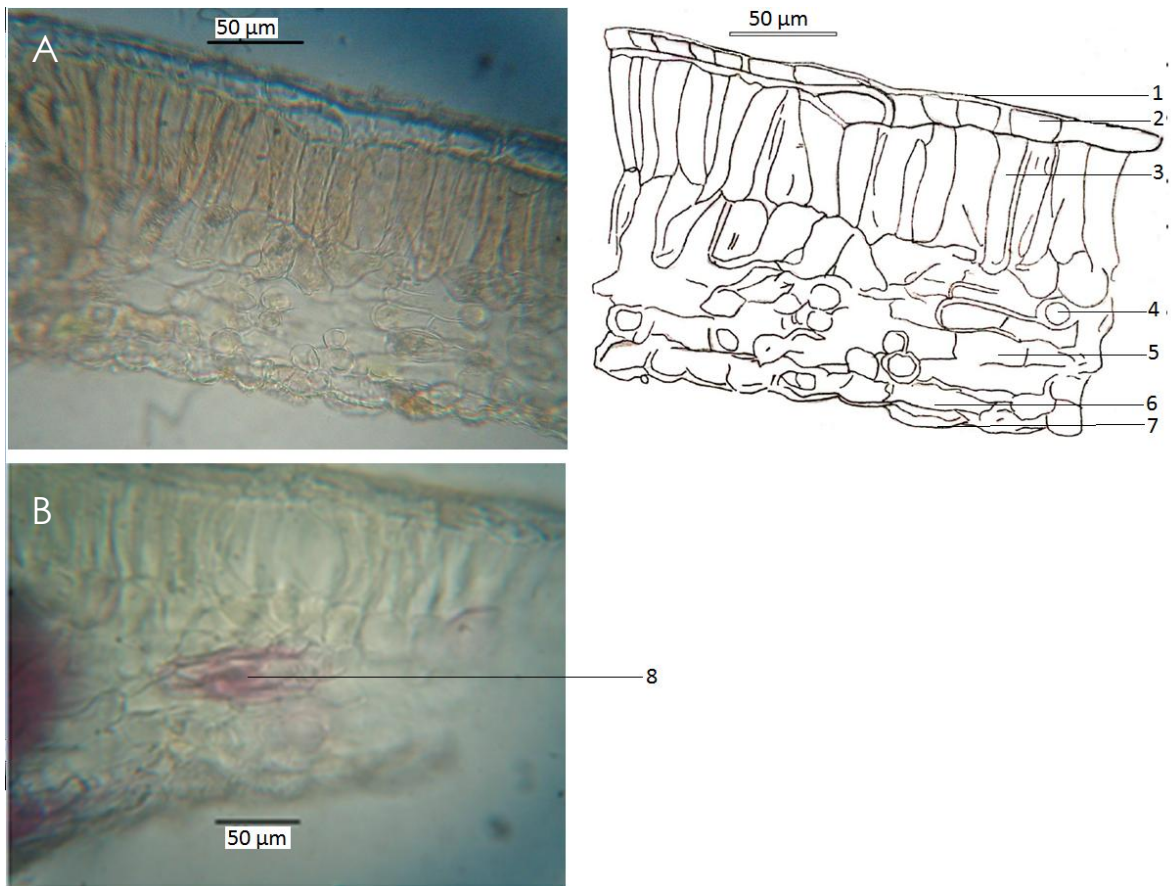


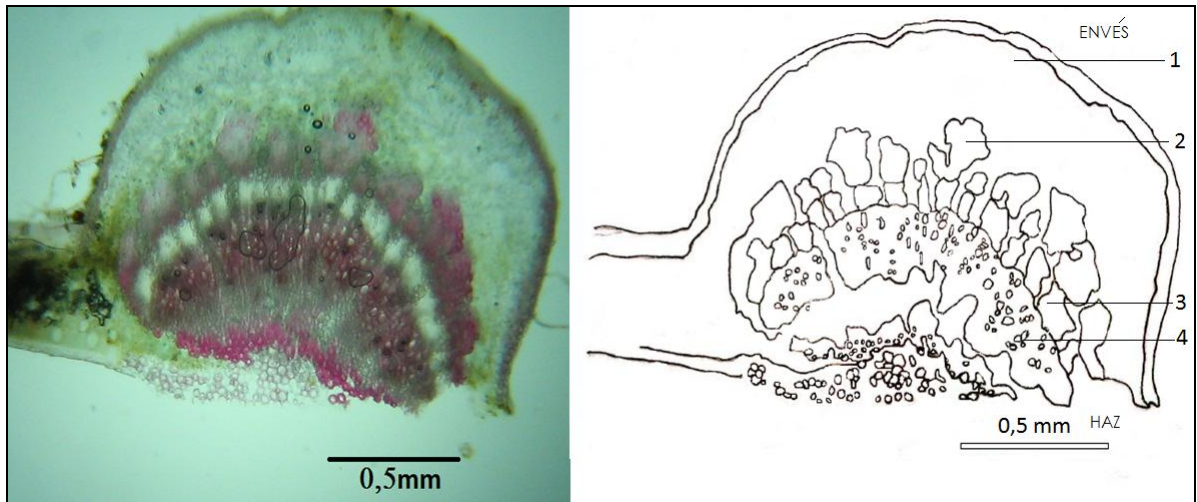
Figura N° 28: **cv. Hass:** En el corte transversal a mano alzada del nervio medio, tras una tinción con floroglucina-HCl se observa el xilema (2) hacia el haz, el floema (1) en forma de un arco hacia el envés, una corrida de fibras esclerenquimáticas (3) y el colénquima (4) hacia el envés.



*Figura N° 29: **cv. Fuerte:** En vista superficial, se observa la epidermis del haz (A) y del envés (B), se presentan como una capa compacta de células poliédricas de paredes rectas y curvas (2), ambas con cutículas (1). La epidermis del envés presenta además estomas, por lo general anomocíticos, dos células guardianas (3) con forma elíptica y células anexas que se encuentran generalmente en número de cuatro (4) y tricomas tectores (5) simples, de forma cónica y unicelulares escasos.*



*Figura N° 30: **cv. Fuerte:*** (A) En el corte transversal de la lámina a mano alzada se observa ambas epidermis con cutícula (1) y (7), la cual presenta una superficie plana, la epidermis superior (2), el mesófilo bifacial compuesto por dos estratos de parénquima en empalizada (3), el más interno está compuesto por células prismáticas más cortas y más anchas, y un estrato de parénquima esponjoso (5) compuesto por células poliédricas dispuestas en forma compacta, la epidermis inferior (6) y la cutícula del envés (7). Se observan además células ovoides de contenido cristalino (4); (B) Haz vascular teñido con floroglucina-HC (8).



*Figura N° 31: **cv. Fuerte:** En el corte transversal a mano alzada del nervio medio, tras una tinción con floroglucina-HCl se observa el xilema (4) hacia el haz , el floema (3) en forma de un arco hacia el envés, una corrida de fibras esclerenquimáticas (2) y el colénquima (1) hacia el envés.*

De las descripciones de las estructuras obtenidas tras los cortes cabe destacar que no existen grandes diferencias en las estructuras, en cuanto a su forma y disposición, salvo la presencia de esclereida en el corte transversal de la lámina de cv. Hass. Cabe destacar también que la cutícula se encuentra presente tanto en la epidermis superior como inferior (Figura N° 32) y que a pesar de encontrar un patrón estomático anomocíticos igual se encuentran estomas del tipo paracíticos, aunque en menor cantidad (Figura N° 33).

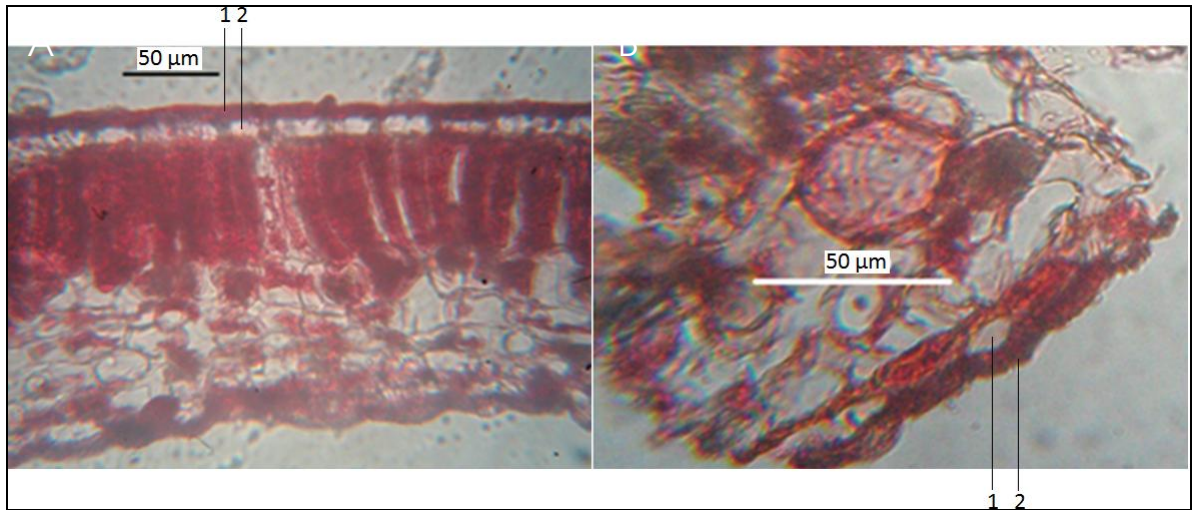


Figura N° 32: Corte transversal de la lámina muestra la cutícula con tinción de safranina. (A) cv. Fuerte muestra la cutícula (1) con tinción de safranina, mientras que la epidermis del haz no (2); (B) cv. Edranol muestra la cutícula (1) con tinción de safranina, mientras que la epidermis del envés no (2).

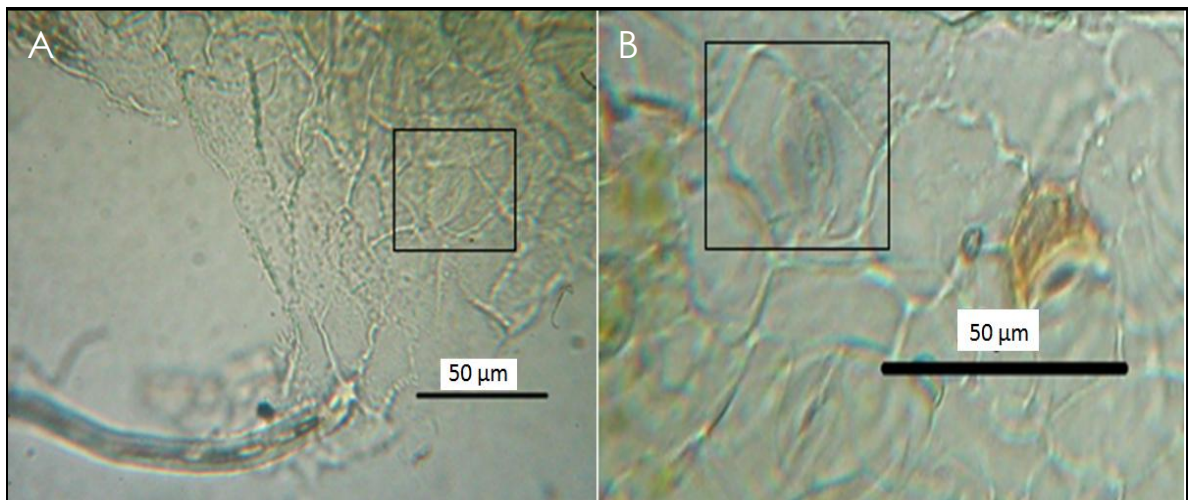
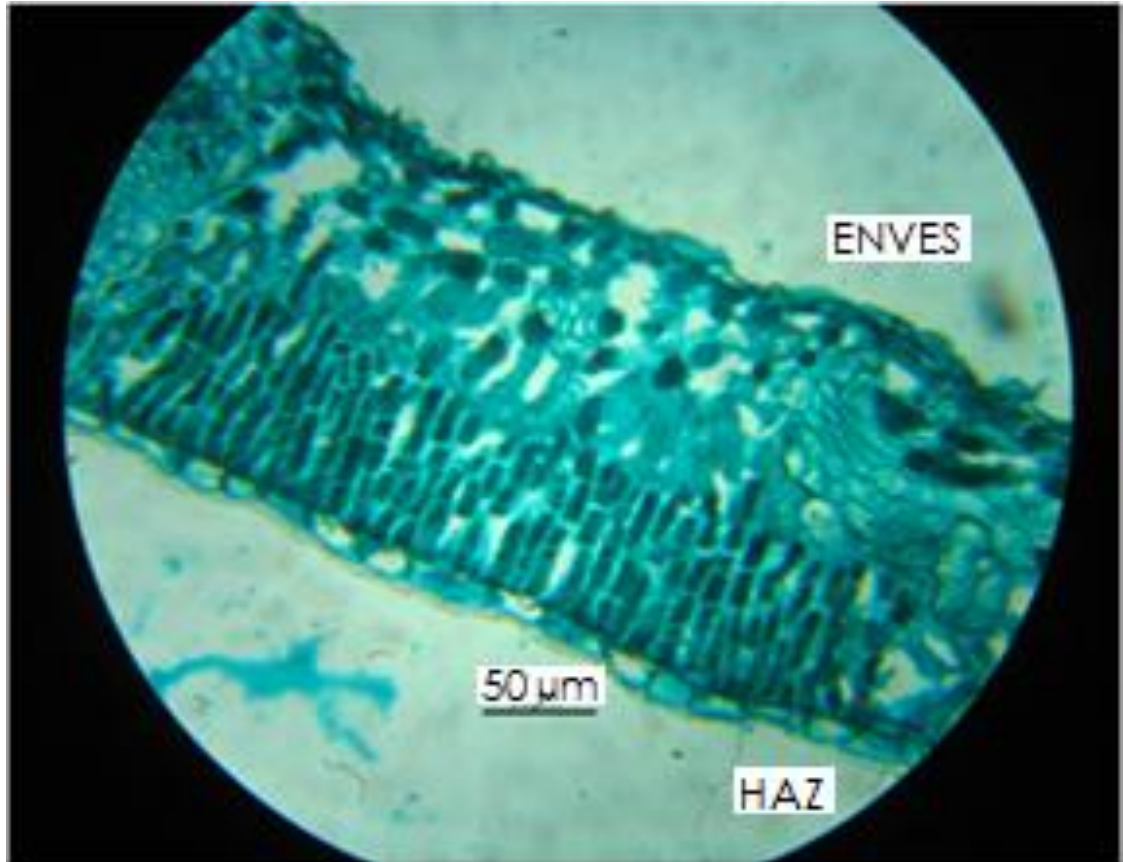


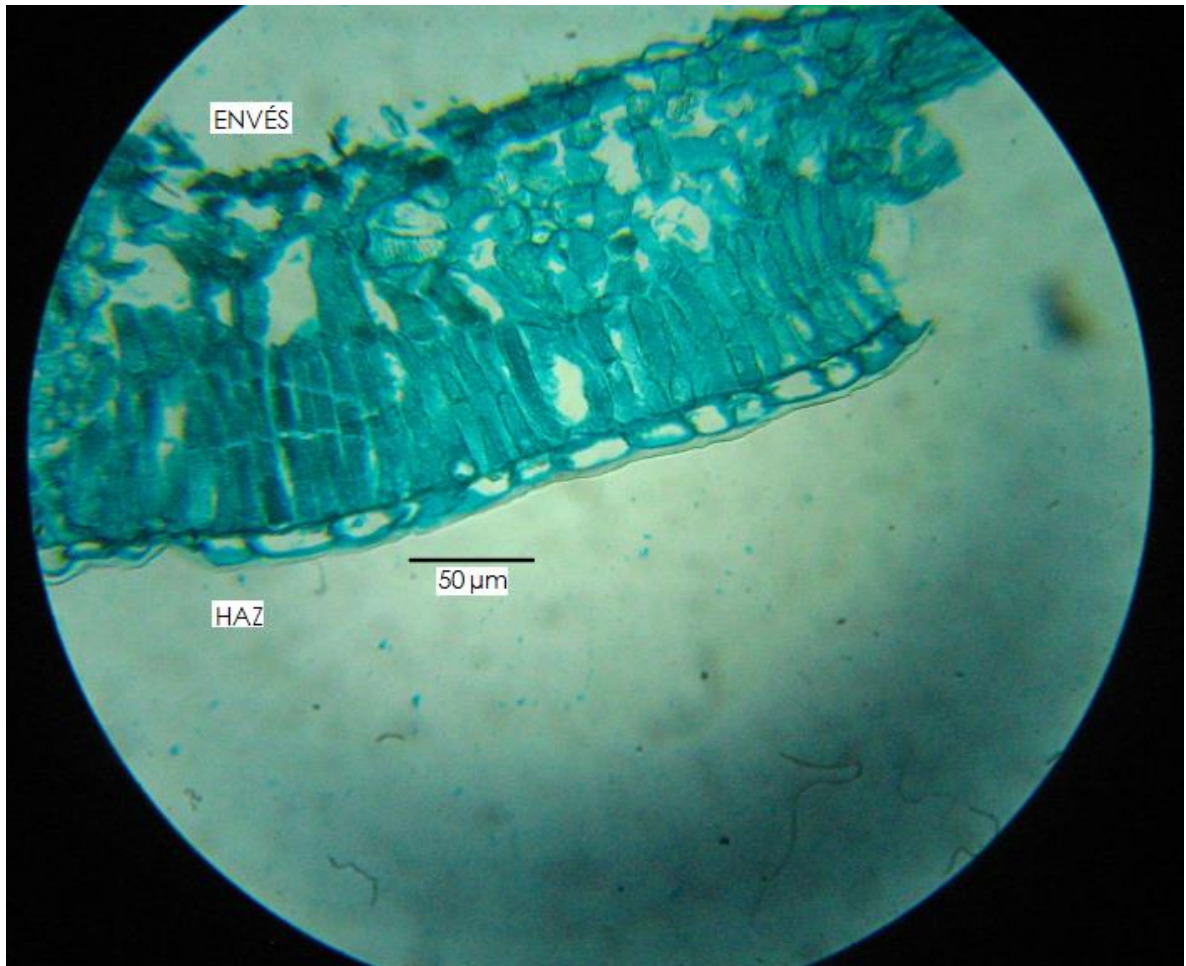
Figura N° 33: Complejos estomáticos paracíticos. (A) cv. Fuerte; (B) cv. Hass donde además se observa un complejo estomático anomocítico.

### 6.2.2.2. Microcorte transversal de la lámina foliar.

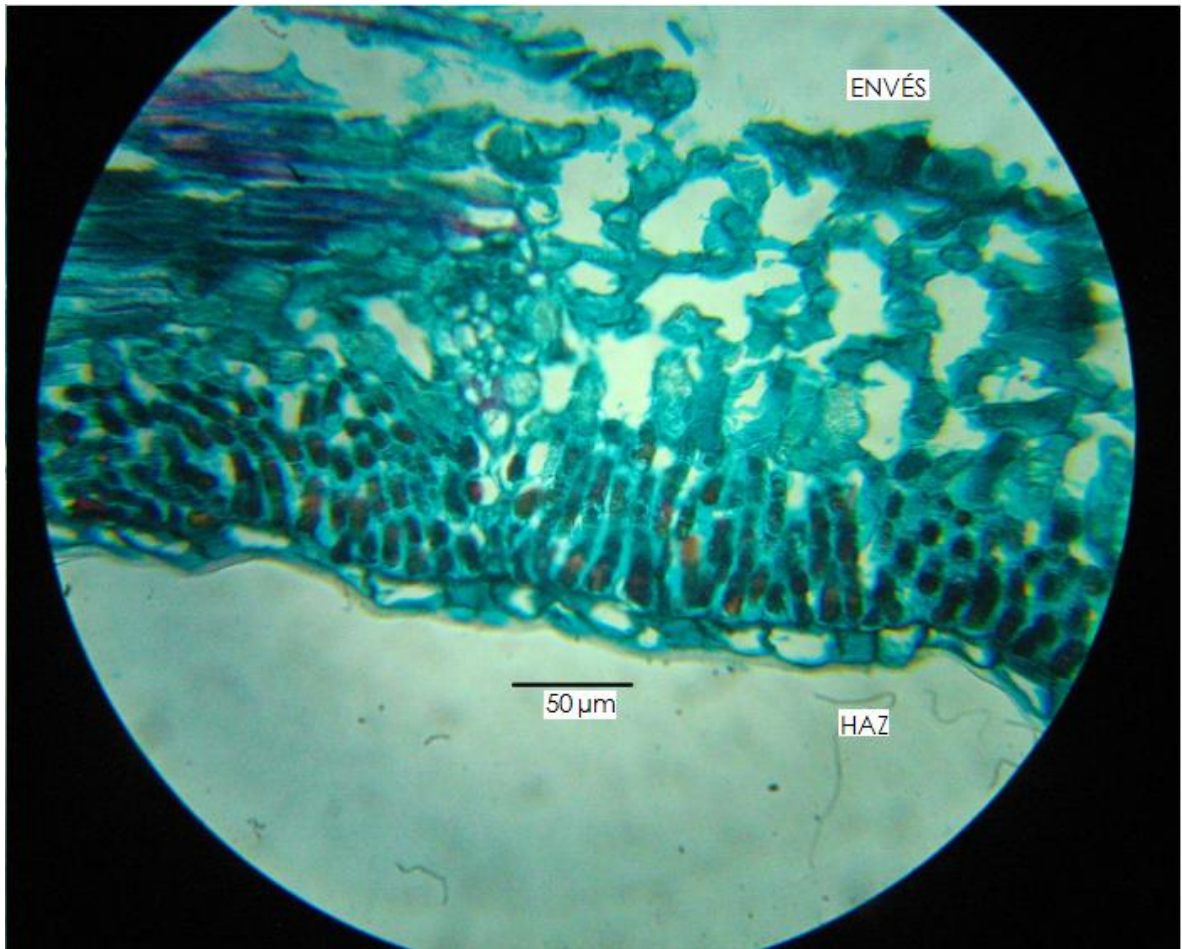
Los resultados de las descripciones de los cortes por cada cultivar se presentan en las figuras N° 34, 35 y 36.



*Figura N° 34: cv. Edranol:* En el microcorte transversal de la lámina con micrótopo se puede destacar, a diferencia del corte a mano alzada, que el estrato de parénquima empalizada más cercana al haz, se encuentra compuesto por células poliédricas de diferentes longitudes que se presentan tabicadas periclinálmente, mientras que el estrato más cercano al envés se encuentra compuesto por una sola corrida de células más anchas con una longitud regular a lo largo del mesófilo y en contacto con el parénquima esponjoso.

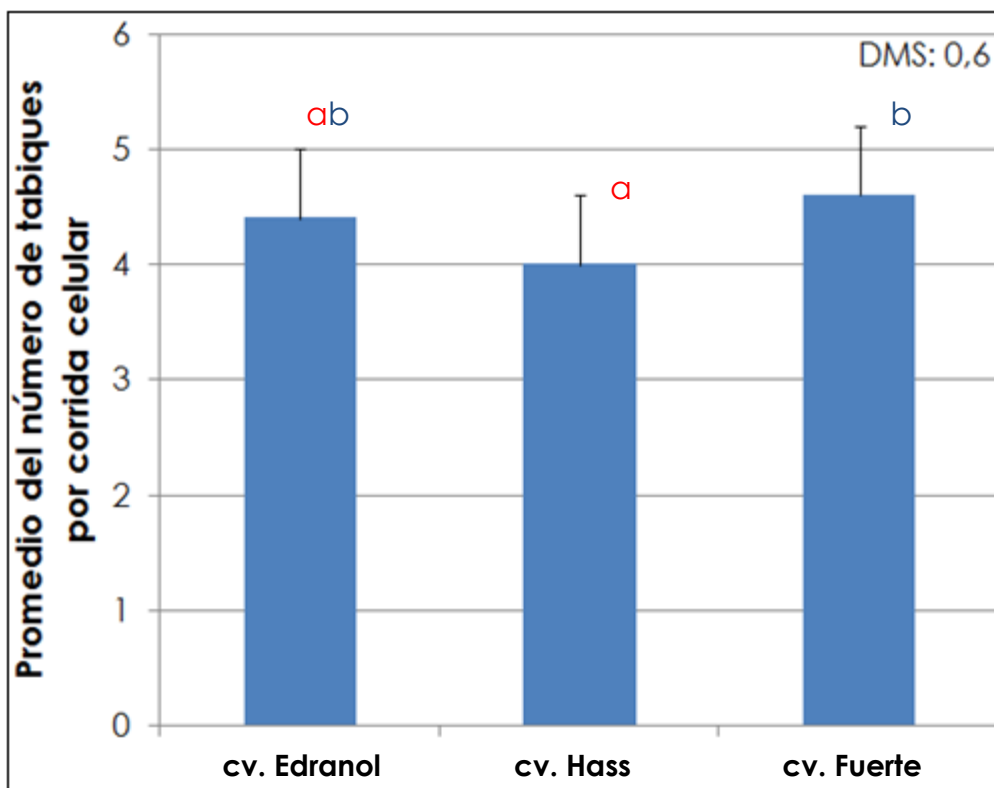


*Figura N° 35: cv. Hass:* En el microcorte transversal de la lámina se puede destacar, a diferencia del corte a mano alzada, que el estrato de parénquima en empalizada más cercana al haz, se encuentra compuesto por células poliédricas de diferentes longitudes tabicadas periclinálmente, mientras que el estrato más cercano al envés se encuentra compuesto por una sóla corrida de células más anchas con una longitud regular a lo largo del mesófilo y en contacto con el parénquima esponjoso.



*Figura N° 36: cv. Fuerte:* En el microcorte transversal de la lámina se puede destacar, a diferencia del corte a mano alzada, que el estrato de parénquima en empalizada más cercana al haz, se encuentra compuesto por células prismáticas de diferentes longitudes tabicadas periclinálmente, mientras que el estrato más cercano al envés se encuentra compuesto por una sólo corrida de células más anchas con una longitud regular a lo largo del mesófilo y en contacto con el parénquima esponjoso.

De los resultados se destaca la presencia de tabicaciones en el primer estrato del parénquima en empalizada. El análisis en el número de tabicaciones mostró una diferencia estadísticamente significativa entre cv. Hass y cv. Fuerte (Figura N° 37).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
 Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

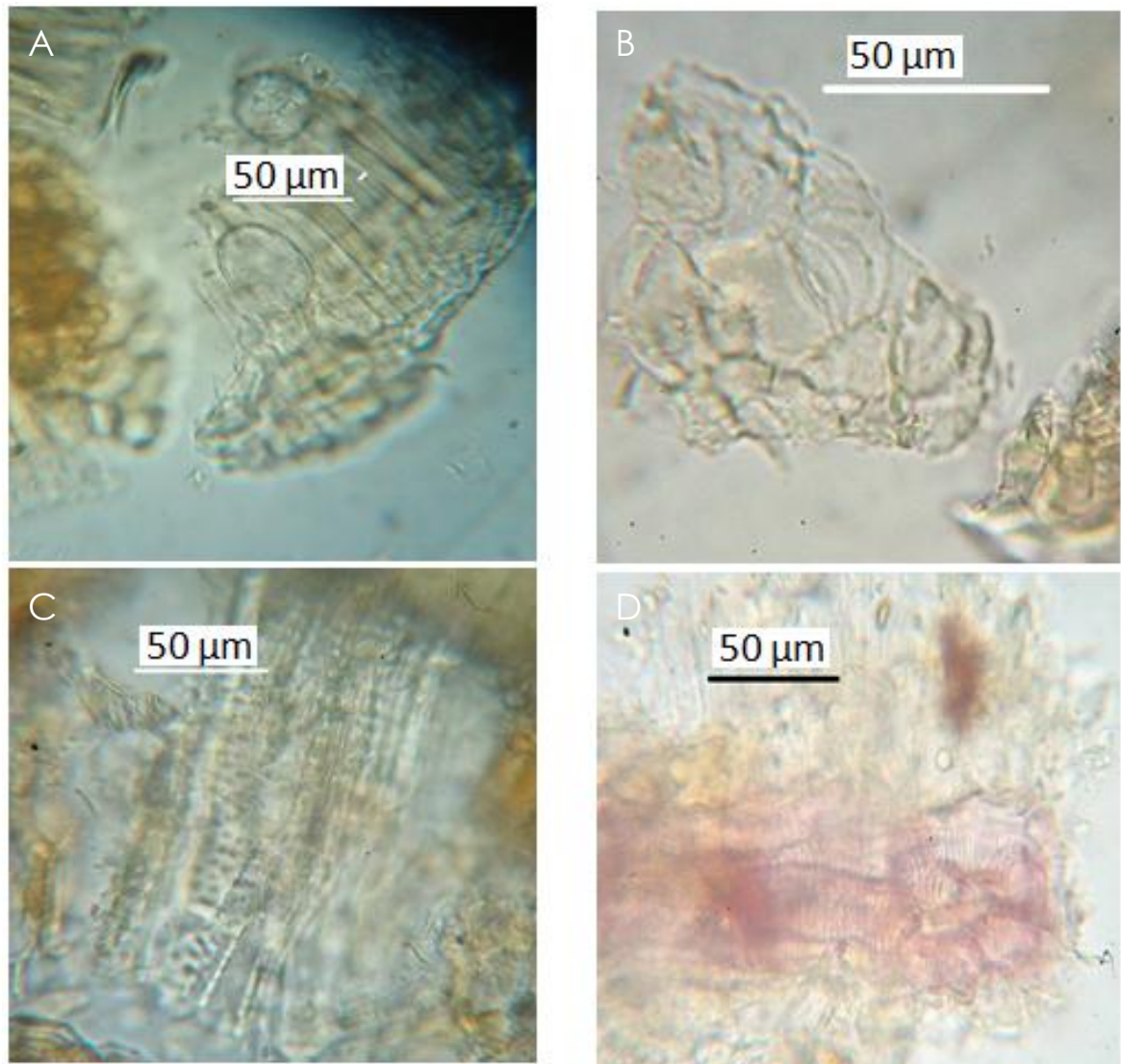
Figura N° 37: Análisis de Tukey del número de corridas de células tabicadas.

### 6.2.3.- Características microscópicas del polvo.

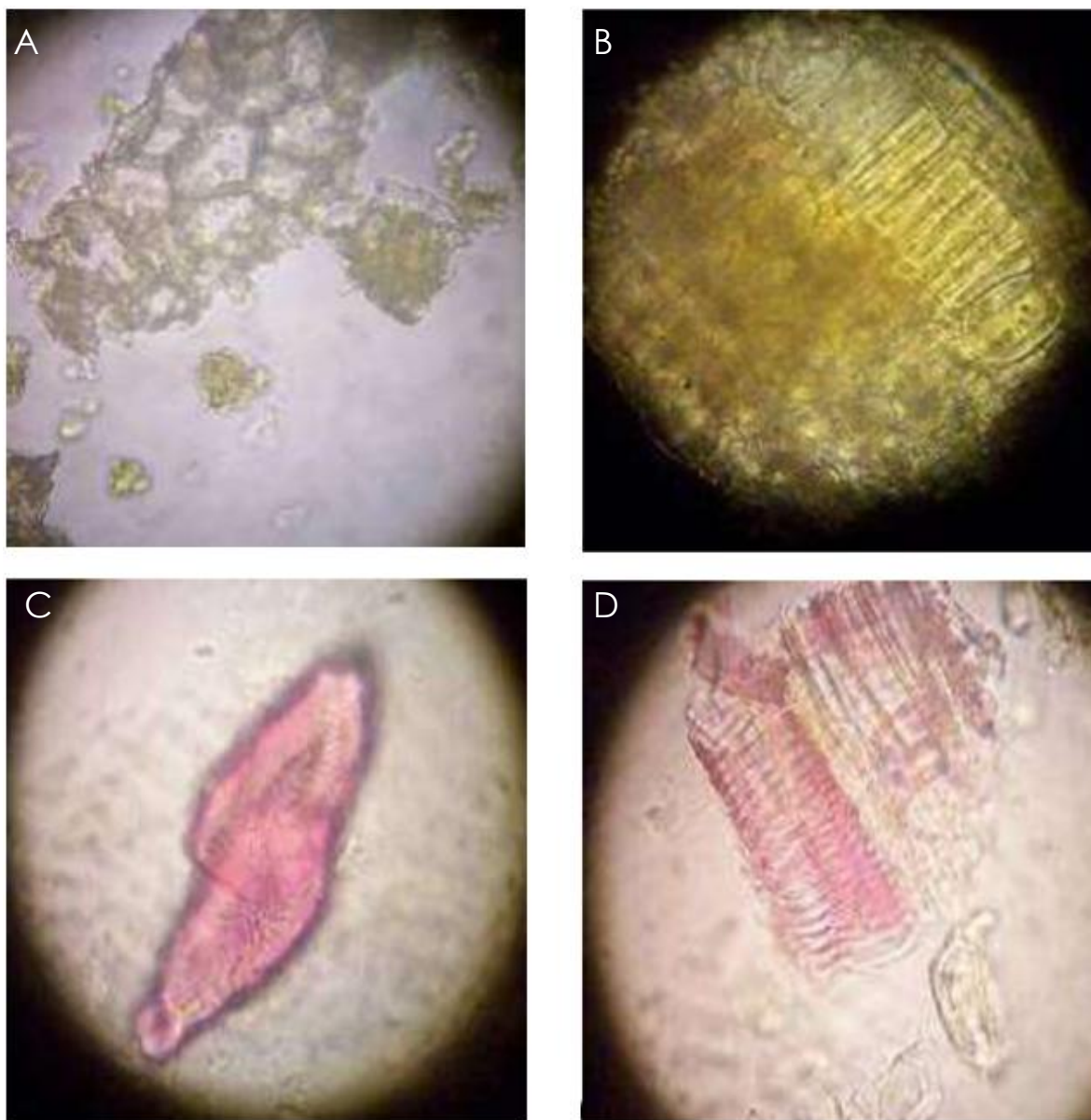
Las descripciones del polvo se observan en la tabla N° 14 seguidas de algunas fotografías (Figuras N° 38 – 40).

Tabla N° 14: Descripción de las características y elementos encontrados en el polvo.

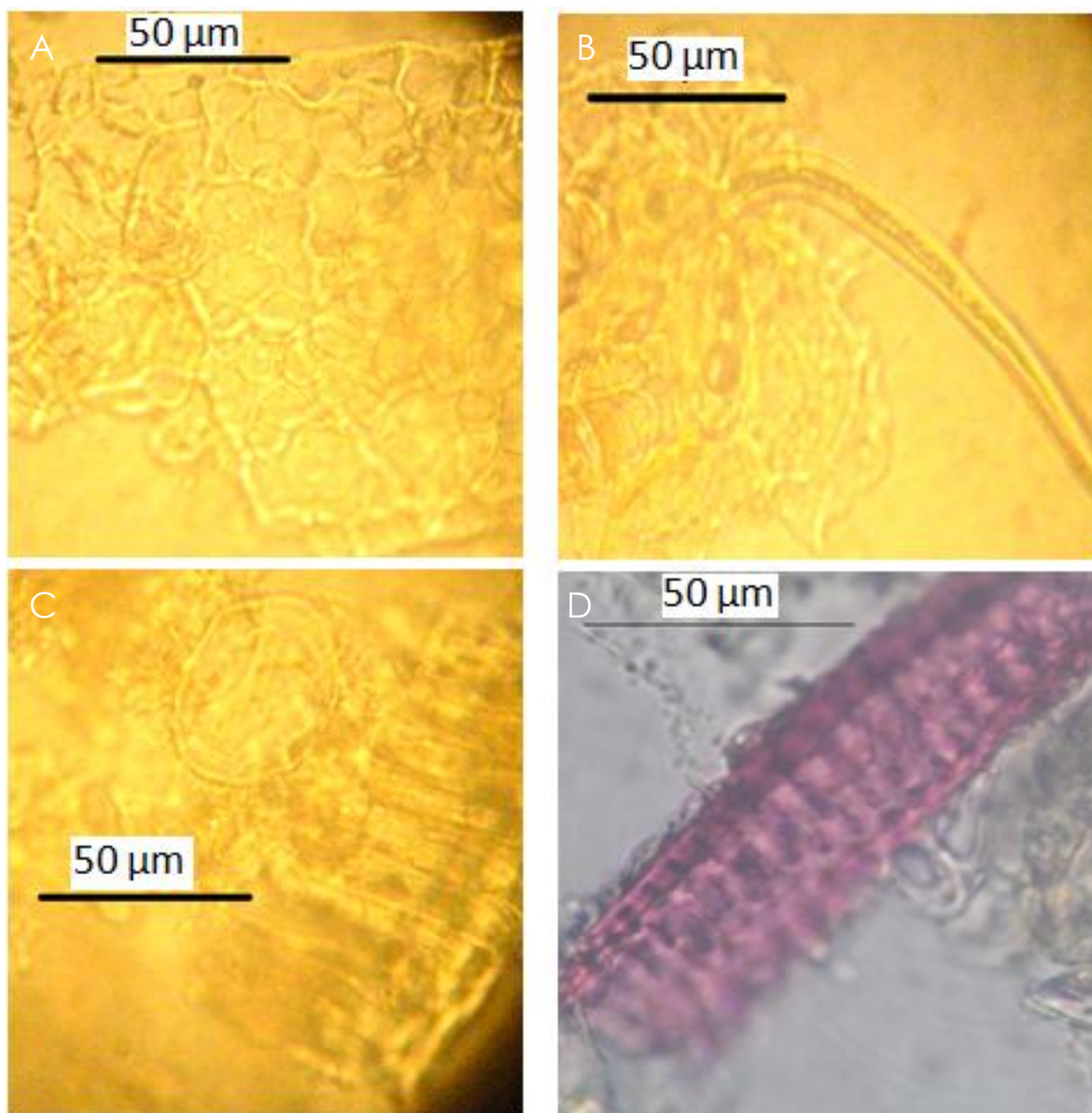
<b>Cultivar</b>	<b>Color</b>	<b>Presencia de tricomas</b>	<b>Presencia de células</b>	<b>Fragmentos</b>	<b>Haces vasculares</b>
<b>Edranol</b>	Verde oscuro	Si	Si	Si, parénquima, epidermis y cutícula.	Si, punteados y espiralados
<b>Hass</b>	Verde oscuro	Si	Si	Si, parénquima, epidermis y cutícula.	Si, punteados y espiralados
<b>Fuerte</b>	Verde oscuro	Si	Si	Si, parénquima, epidermis y cutícula.	Si, punteados y espiralados



*Figura N° 38:* Estructuras del polvo cv. Edranol. (A) Parénquima en empalizada, cutícula y células ovoides con contenido cristalino; (B) Epidermis inferior y estoma; (C) Haz vascular con puntuaciones sin tinción de floroglucina-HCl; (D) Haz vascular espiralado con tinción de floroglucina-HCl.



*Figura N° 39:* Estructuras del polvo cv. Hass. (A) Epidermis superior conformada por células poliédricas; (B) Parénquima en empalizada con células ovoides con contenido cristalino; (C) Esclereida con tinción de floroglucina-HCl; (D) Haz vascular espiralado con tinción de floroglucina-HCl.



*Figura N° 40:* Estructuras del polvo cv. Fuerte. (A) Epidermis superior conformada por células poliédricas; (B) Tricoma tector simple unicelular anclado a la epidermis inferior; (C) Parénquima en empalizada con células ovoides con contenido cristalino; (D) Haz vascular con tinción de floroglucina-HCl.

Los resultados de la descripción del polvo no difieren cualitativamente.

### 6.3. Determinación de la composición química establecida.

#### 6.3.1.- Ensayos farmacopeicos generales.

##### 6.3.1.1.- Pérdida por secado.

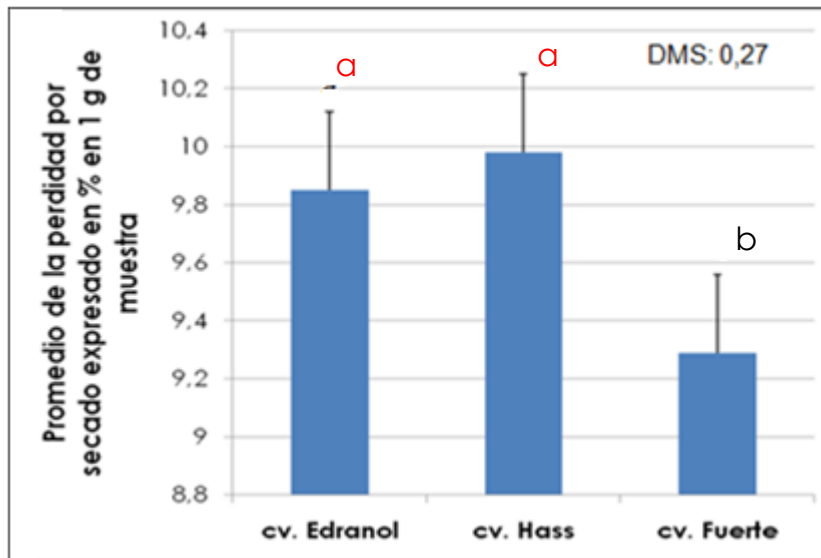
Tabla N° 15: Resultados de la pérdida por secado.

Cultivar	Pérdida por secado <sup>(y)</sup> (%)
Edranol	9,85 ± 0,03
Hass	9,98 ± 0,04
Fuerte	9,29 ± 0,18

<sup>y</sup>: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

La humedad de cv. Fuerte difiere significativamente con respecto de cv. Hass y cv.

Edranol (Figura N° 41).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 41: Análisis de Tukey para la pérdida por secado

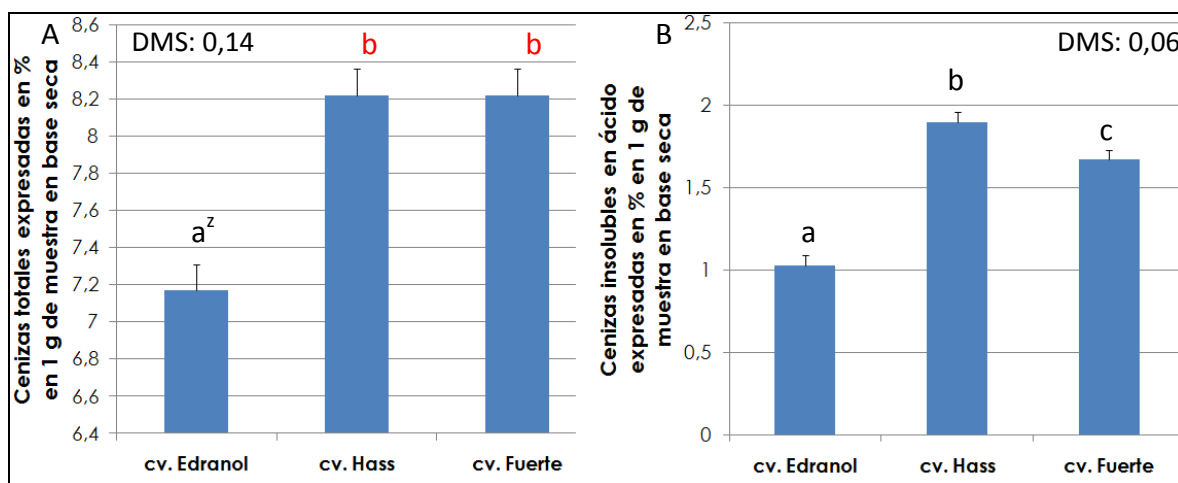
### 6.3.1.2.- Cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.

Tabla N° 16: Resultados de las cenizas totales y de las cenizas insolubles en ácido.

Cultivar	Cenizas totales <sup>(y)</sup> (%)	Cenizas insolubles en ácido <sup>(y)</sup> (%)
Edranol	7,17 ± 0,02	1,03 ± 0,02
Hass	8,22 ± 0,09	1,90 ± 0,01
Fuerte	8,22 ± 0,02	1,67 ± 0,02

<sup>y</sup>: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Las cenizas totales de cv. Edranol difieren significativamente con respecto de cv. Fuerte y cv. Hass, mientras que las cenizas insolubles en ácido difieren significativamente entre todos los cultivares (Figura N° 42).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 42: Análisis de Tukey. (A) Cenizas totales; (B) Cenizas insolubles en ácido.

### 6.3.1.3.- Materia extraíble en frío y en caliente.

Tabla N° 17: Resultados de la materia extraíble en frío.

	<b>Materia extraíble en frío <sup>(y)</sup> (mg)</b>		
<b>Cultivar</b>	Agua	Etanol 96 % v/v	n-hexano
<b>Edranol</b>	166,26 ± 1,95	157,22 ± 4,54	26,90 ± 0,67
<b>Hass</b>	142,25 ± 1,16	133,09 ± 0,75	31,25 ± 1,06
<b>Fuerte</b>	164,25 ± 1,41	134,54 ± 1,38	24,13 ± 0,61

<sup>y</sup>: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Tabla N° 18: Resultados de la materia extraíble en caliente.

	<b>Materia extraíble en caliente <sup>(y)</sup> (mg)</b>		
<b>Cultivar</b>	Agua	Etanol 96 % v/v	n- hexano
<b>Edranol</b>	323,33 ± 0,92	278,72 ± 2,33	129,72 ± 1,34
<b>Hass</b>	260,08 ± 1,38	273,98 ± 2,49	128,19 ± 0,77
<b>Fuerte</b>	311,83 ± 0,83	305,65 ± 1,03	140,27 ± 0,35

<sup>y</sup>: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

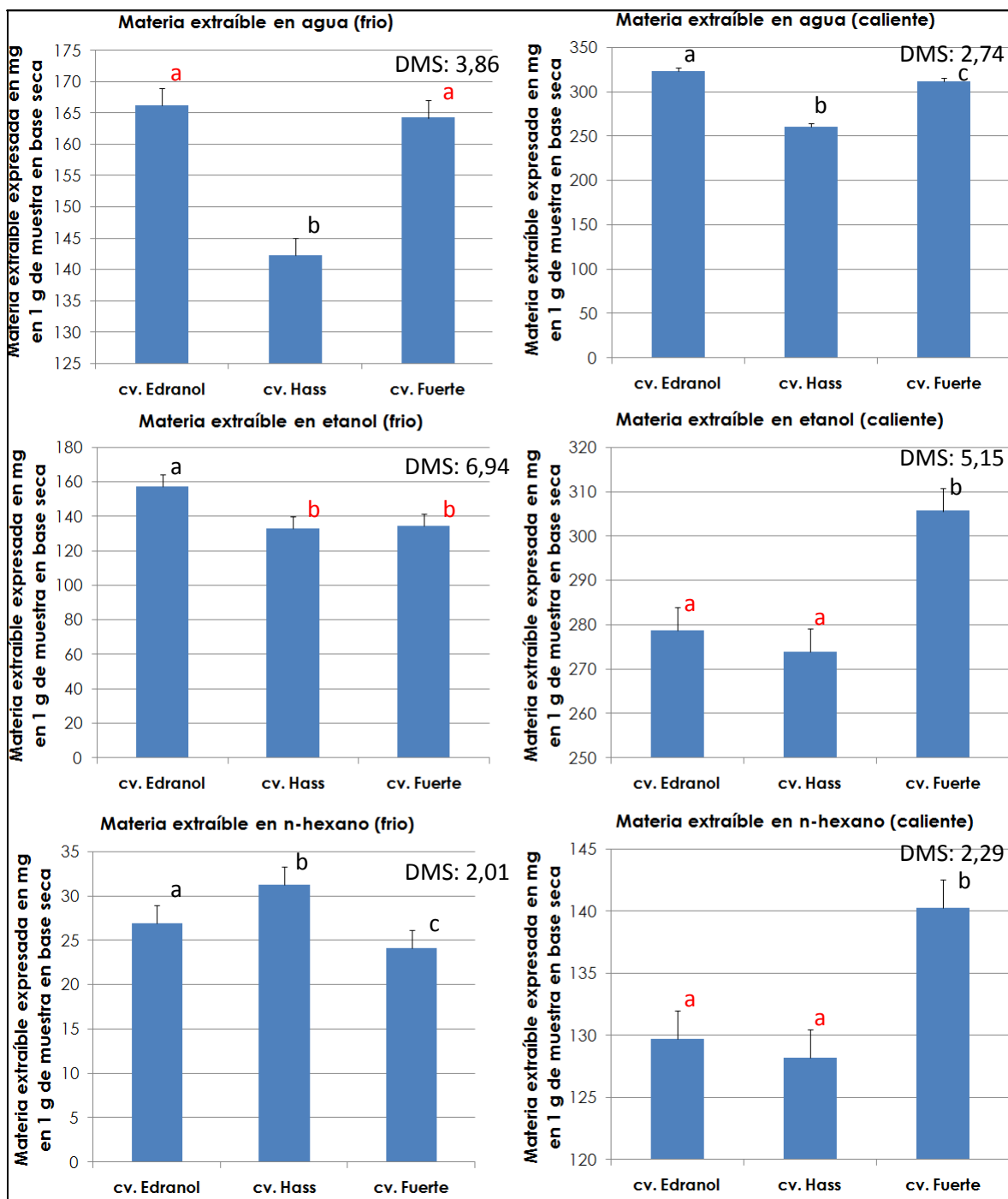
Existe una mayor cantidad de materia extraíble cuando se utiliza el solvente en caliente y cuando se aumenta la polaridad del solvente.

cv. Edranol posee una cantidad significativamente mayor de materia extraíble en agua en caliente, luego sigue cv. Fuerte y finalmente cv. Hass, mientras que en agua en frío cv. Edranol y cv. Fuerte poseen la mayor cantidad difiere significativamente con respecto de cv. Hass.

cv. Fuerte posee una cantidad mayor de materia extraída en etanol en caliente que difiere significativamente con respecto de cv. Edranol y cv. Hass, mientras que en etanol en frío cv.

Edranol posee la mayor cantidad que difiere significativamente con respecto de cv. Hass y cv. Fuerte.

cv. Fuerte posee una cantidad mayor de materia extraíble en n-hexano en caliente que difiere significativamente con respecto de cv. Edranol y cv. Hass, mientras que en frío cv. Hass posee una cantidad significativamente mayor en n-hexano en frío, luego sigue cv. Edranol y finalmente cv. Fuerte (Figura N° 43).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 43: Análisis de Tukey para la materia extraíble en frío y en caliente.

**6.3.1.4.- Aceites esenciales o volátiles.**

Tabla N° 19: Volumen extraído de aceites esenciales en 60 g de muestra por cultivar.

<b>Cultivar</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>) extraído en 60 g de muestra</b>
<b>Edranol</b>	10
<b>Hass</b>	10
<b>Fuerte</b>	60

cv. Fuerte es el que posee una mayor cantidad de aceite esencial.

**6.3.2.- Ensayos químicos cualitativos.****6.3.2.1.- Cromatografía en capa fina.**

Los resultados de los patrones cromatográficos de cada cultivar y del estándar de rutina se observan en la figura N° 44 seguido de un diagrama del resultado de la TLC en la figura N° 45 y de los resultados de  $R_f$  y  $hR_f$  en la figura N° 46.

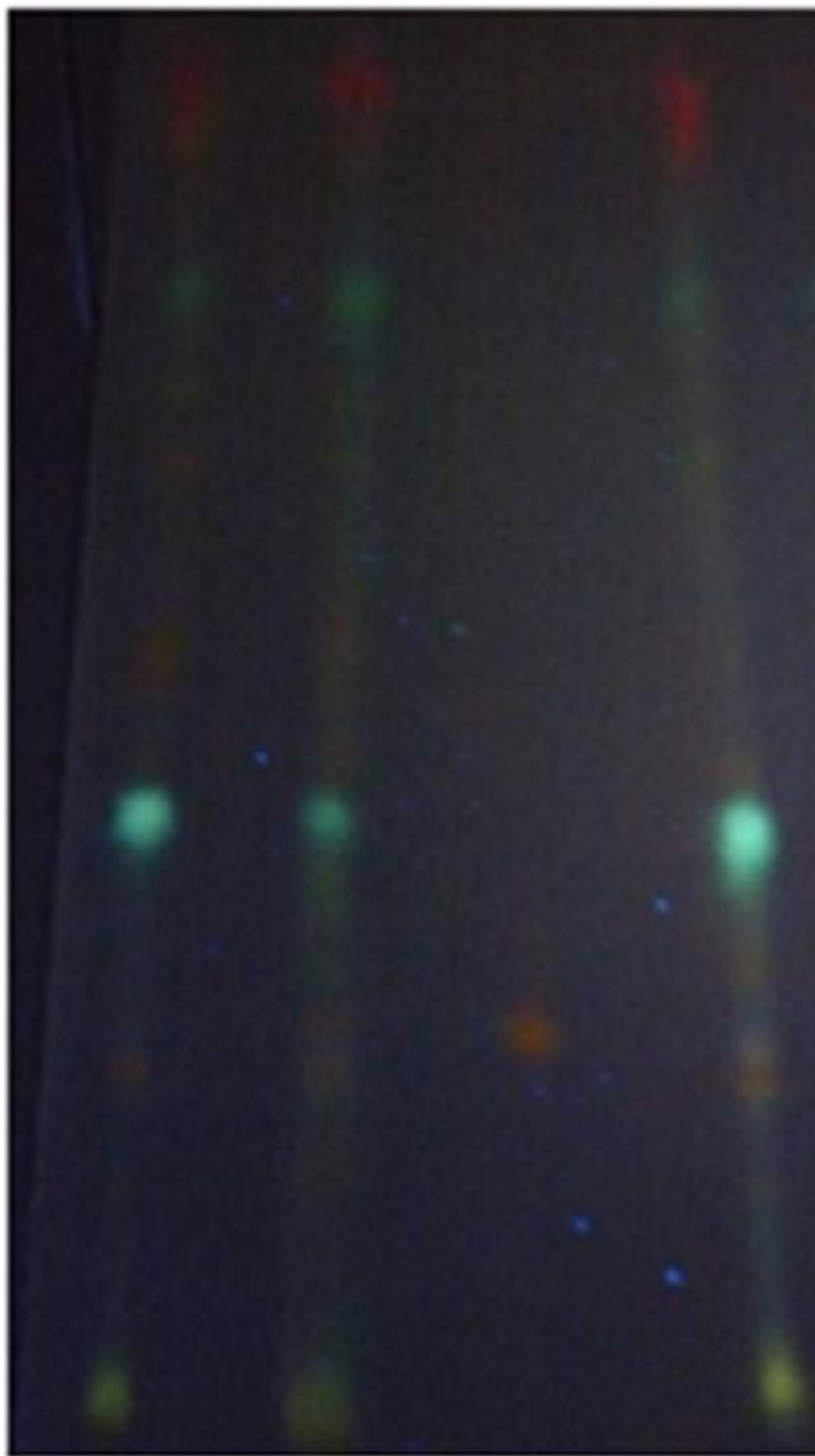


Figura N° 44: TLC de los cultivares más estándar de rutina.

<b>ZONA ALTA DE LA PLACA</b>			
F. Roja	F. Roja		F. Roja
F. Verde	F. Verde		F. Verde
F. amarilla	F. amarilla		F. amarilla
F. anaranjada	F. anaranjada		F. anaranjada
F. anaranjada	F. anaranjada		F. anaranjada
F. anaranjada	F. anaranjada		F. anaranjada
F. Verde	F. Verde		F. Verde
F. anaranjada	F. anaranjada	F. anaranjada	F. anaranjada
F. amarilla	F. amarilla		F. amarilla
cv. Edranol	cv. Hass	Rutina	cv. Fuerte

Figura N° 45: Diagrama de la TLC de los cultivares más estándar de rutina.

F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100	F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100		F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100
F. Verde Rf: 0,7933 hRf: 79,33	F. Verde Rf: 0,7933 hRf: 79,33		F. amarilla Rf: 0,7933 hRf: 79,33
F. amarilla Rf: 0,7067 hRf: 70,67	F. amarilla Rf: 0,7000 hRf: 70,00		F. amarilla Rf: 0,7067 hRf: 70,67
F. Anaranjada Rf: 0,6467 hRf: 64,67	F. Anaranjada Rf: 0,6400 hRf: 64,00		F. Anaranjada Rf: 0,6467 hRf: 64,67
F. Anaranjada Rf: 0,5000 hRf: 50,00	F. Anaranjada Rf: 0,5000 hRf: 50,00		F. Anaranjada Rf: 0,5000 hRf: 50,00
F. Anaranjada Rf: 0,4267 hRf: 42,67	F. Anaranjada Rf: 0,4333 hRf: 43,33		F. Anaranjada Rf: 0,4333 hRf: 43,33
F. Verde Rf: 0,3800 hRf: 38,00	F. Verde Rf: 0,3733 hRf: 37,33		F. Verde Rf: 0,3667 hRf: 36,67
	F. Anaranjada Rf: 0,2333 hRf: 23,33		F. Anaranjada Rf: 0,2133 hRf: 21,33
		F. Anaranjada Rf: 0,2267 hRf: 22,67	
F. Anaranjada Rf: 0,2067 hRf: 20,67	F. Anaranjada Rf: 0,2067 hRf: 20,67		F. Anaranjada Rf: 0,1933 hRf: 19,33
F. Amarilla Rf: 0,067 hRf: 6,7	F. Amarilla Rf: 0,067 hRf: 6,7		F. Amarilla Rf: 0,067 hRf: 6,7
cv. Edranol	cv. Hass	Rulina	cv. Fuerte

Figura N° 46: R<sub>f</sub> y hR<sub>f</sub> de la “huella digital” de cada cultivar y del estándar de rutina.

Los patrones cromatográficos de cada cultivar no presentan grandes diferencias exceptuando para cv. Edranol que presentó solo una señal de fluorescencia anaranjada con un hRf de 20,67, mientras que los otros cultivares presentaron dos señales de fluorescencia anaranjada, una de ellas con un hRf cercana a 20 y la otra con un hRf de 23,33, 21,33 y 22,00 para los cultivares Hass y Fuerte.

El estándar presento una señal de fluorescencia anaranjada con un hRf de 22,67. Las señales más cercanas de los cultivares y con el mismo patrón de fluorescencia presentan un hRf de 20,67, 23,33 y 21,33 para cv. Edranol, cv. Hass y cv. Fuerte respectivamente.

Los resultados de los patrones cromatográficos de los cultivares y de los estándar de apigenina y quercetina se observan en la figura N° 47, seguido de un diagrama del resultado de a TLC en la figura N° 48 y de los resultados de  $R_f$  y  $hR_f$  en la figura N° 49.

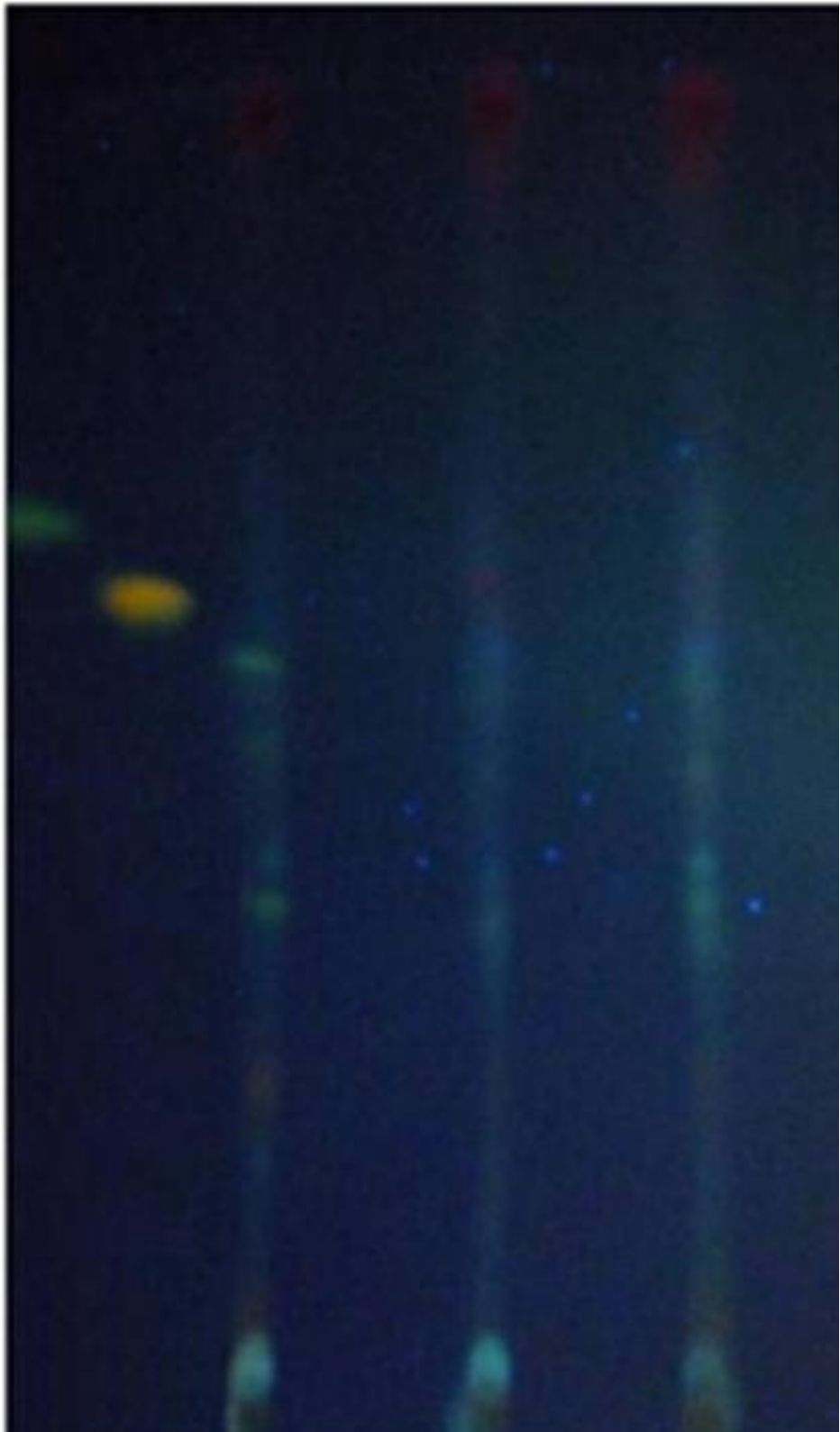


Figura N° 47: TLC cultivares más el estándar de quercetina y apigenina.

<b>ZONA ALTA DE LA PLACA</b>			
	F. Roja	F. Roja	F. Roja
F. Verde			
F. anaranjada	F. roja	F. Roja	F. Roja
	F. azul	F. azul	F. azul
	F. amarilla	F. amarilla	F. amarilla
	F. anaranjada	F. anaranjada	F. anaranjada
	F. amarilla	F. amarilla	F. amarilla
	F. Verde	F. Verde	F. Verde
	F. anaranjada	F. anaranjada	F. anaranjada
	F. anaranjada	F. anaranjada	F. anaranjada
	F. Verde	F. Verde	F. Verde
<b>Apigenina/ quercetina</b>	<b>cv. Edranol</b>	<b>cv. Hass</b>	<b>cv. Fuerte</b>

Figura N° 48: Diagrama cultivares más el estándar de quercetina y apigenina.

F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100	F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100		F. Roja Rf: 1,000 hRf: 100
F. Verde/ Apigenina Rf: 0,652 hRf: 65,20			
	F. Roja Rf: 0,630 hRf: 63,00	F. Roja Rf: 0,615 hRf: 61,50	F. Roja Rf: 0,622 hRf: 62,20
F. Anaranjada/ quercelina Rf: 0,590 hRf: 59,00	F. Azul Rf: 0,578 hRf: 57,80	F. Azul Rf: 0,556 hRf: 55,60	F. Azul Rf: 0,570 hRf: 57,00
	F. Amarilla Rf: 0,548 hRf: 54,80	F. Amarilla Rf: 0,533 hRf: 53,30	F. Amarilla Rf: 0,541 hRf: 54,10
	F. Verde Rf: 0,407 hRf: 40,70	F. Verde Rf: 0,407 hRf: 40,70	F. Verde Rf: 0,415 hRf: 41,50
	F. amarilla Rf: 0,370 hRf: 37,00	F. amarilla Rf: 0,363 hRf: 36,30	F. amarilla Rf: 0,385 hRf: 38,50
	F. Verde Rf: 0,341 hRf: 34,10	F. Verde Rf: 0,341 hRf: 34,10	F. Verde Rf: 0,348 hRf: 34,80
	F. Anaranjada Rf: 0,252 hRf: 25,20	F. Anaranjada Rf: 0,252 hRf: 25,20	F. Anaranjada Rf: 0,259 hRf: 25,90
	F. Anaranjada Rf: 0,089 hRf: 8,9	F. Anaranjada Rf: 0,089 hRf: 8,9	F. Anaranjada Rf: 0,089 hRf: 8,9
	F. Verde Rf: 0,037 hRf: 3,7	F. Verde Rf: 0,044 hRf: 4,4	F. Verde Rf: 0,044 hRf: 4,4
Apigenina/ quercelina	cv. Edranol	cv. Hass	cv. Fuerte

Figura N° 49: R<sub>f</sub> y hR<sub>f</sub> de la “huella digital” de cada cultivar y de los estándares de apigenina y rutina.

Los resultados de los patrones cromatográficos no difieren cualitativamente y no se observo por parte de ningún cultivar alguna señal con la mismo fluorescencia y  $hR_f$  que los estándares de apigenina y quercetina.

Al comparar esta TLC con respecto de la anterior se observa que al primera presenta una mejor calidad.

Los resultados del patrón cromatográfico de *L. nobilis* se observan en al figura N° 50 en conjunto con un diagrama de la TLC y seguida de los resultados de los  $R_f$  y  $hR_f$  en la figura N° 51.

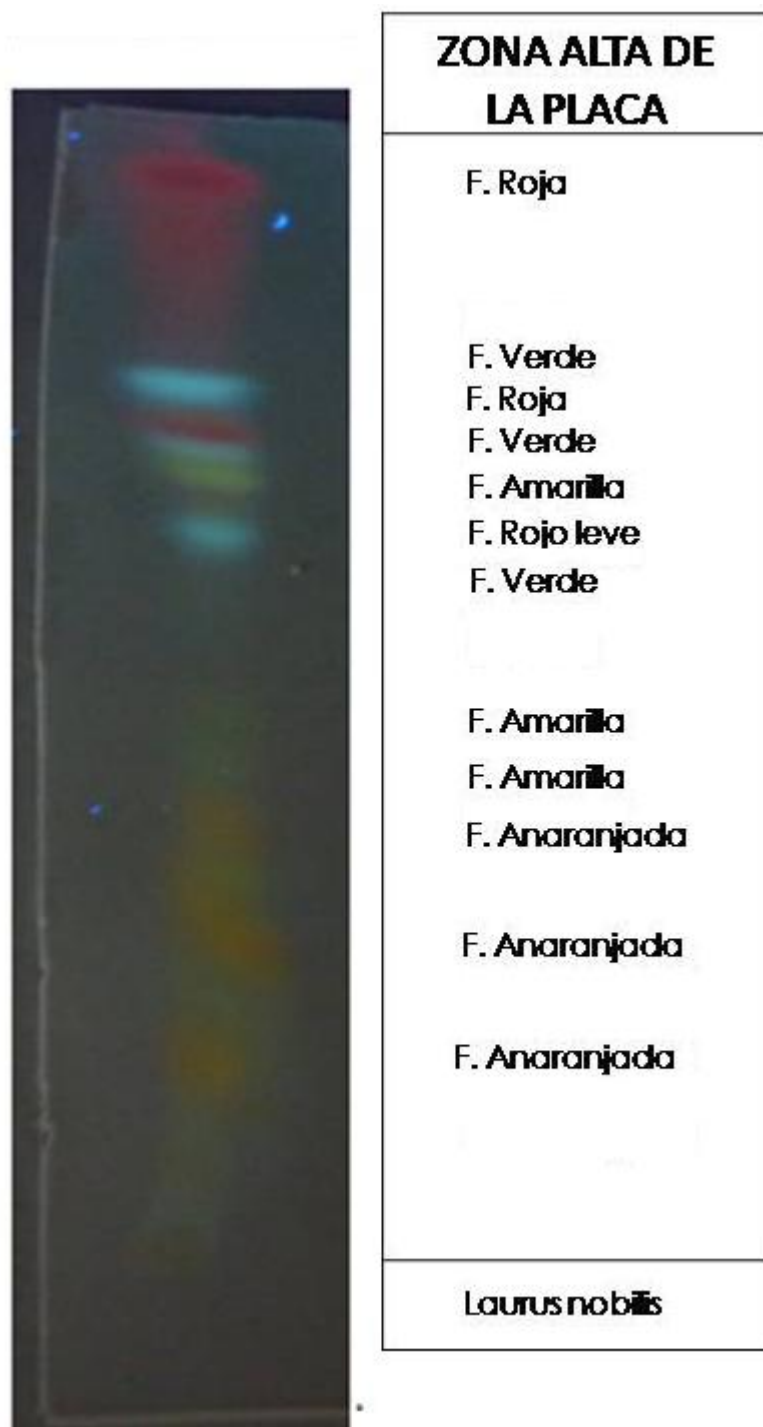


Figura N° 50: TLC y diagrama de la elución de *L. nobilis*.

F. Roja Rf: 1,0 hRf: 100
F. Verde Rf: 0,67 hRf: 67
F. Rojo Rf: 0,61 hRf: 61
F. verde Rf: 0,60 hRf: 60
F. Amarilla Rf: 0,58 hRf: 58
F. Rojo leve Rf: 0,56 hRf: 56
F. Verde Rf: 0,53 hRf: 53
F. Amarilla Rf: 0,39 hRf: 39
F. Amarilla Rf: 0,37 hRf: 37
F. Anaranjada Rf: 0,32 hRf: 32
F. Anaranjada Rf: 0,24 hRf: 24
F. Anaranjada Rf: 0,14 hRf: 14
Laurus nobilis

Figura N° 51: R<sub>f</sub> y hR<sub>f</sub> de la "huella digital" para *L. nobilis*.

El resultado del patrón cromatográfico y de los Rf y hRf de *L. nobilis* difiere cualitativamente con respecto de los resultados obtenidos para cada cultivar en las mismas condiciones de elución.

### 6.3.2.2.- Tamizaje fitoquímico.

Los tres cultivares no difieren cualitativamente en la presencia de metabolitos secundarios (Tabla N° 20).

Tabla N° 20: Resultados del tamizaje fitoquímico.

Cultivar	Dragen.	Wagn.	Mayer	LB	Sudan	Baljet	Bornt.	Tn. <sup>u</sup>	CF. <sup>v</sup>	Rose. <sup>w</sup>	Shin. <sup>x</sup>	Ác. Sulf. <sup>y</sup>	Álc. <sup>z</sup>	Esp.
Edranol	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)
	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)		E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)
	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)								E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)
Hass	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)
	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)		E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)
	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)								E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)
Fuente	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (+)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>H</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (+)
	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AL</sub> (+)		E <sub>AL</sub> (+)	E <sub>AL</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)
	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)	E <sub>AC</sub> (-)								E <sub>AC</sub> (+)		E <sub>AC</sub> (+)	E <sub>AC</sub> (+)

E<sub>H</sub>: Extracto hexánico; E<sub>AL</sub>: Extracto alcohólico; E<sub>AC</sub>: Extracto acuoso; Dragen: Dragendorff; Wagn: Wagner; L.B: Liebermann Buchard; Bornt.: Borntraeger; Tn: Taninos; CF: Cloruro férrico; Rose: Rosenheim; Shin: Shinoda; Ác. Sulf: Ácido sulfúrico; Álc: Alcalis; Esp: Espuma; <sup>u</sup>: Coloración verde intensa (predominancia de taninos); <sup>v</sup>: Coloración verde (taninos condensados) pruebas de gelatina/gelatina-sal/sal confirman taninos; <sup>w</sup>: Fase amilica coloración roja (Leucoantocianidinas) <sup>x</sup>: Fase amilica coloración anaranjada (flavonas); <sup>y</sup>: Coloración amarilla intensa en alcohol y agua (flavonas y flavonoles); <sup>z</sup>: Coloración amarilla en alcohol (flavonas, flavonoles y isoflavonas) y coloración anaranjada en agua (flavononas y flavonol).

De los resultados cabe destacar la presencia de esteroides/triterpenos, saponinas, cumarinas, y compuestos fenólicos como taninos y flavonoides.

Los resultados de los espectros ultravioleta-visible e infrarrojos de los extractos en frío del tamizaje fitoquímico se observan en la figura N° 52 y en las figuras N° 53, 54 y 55 respectivamente.

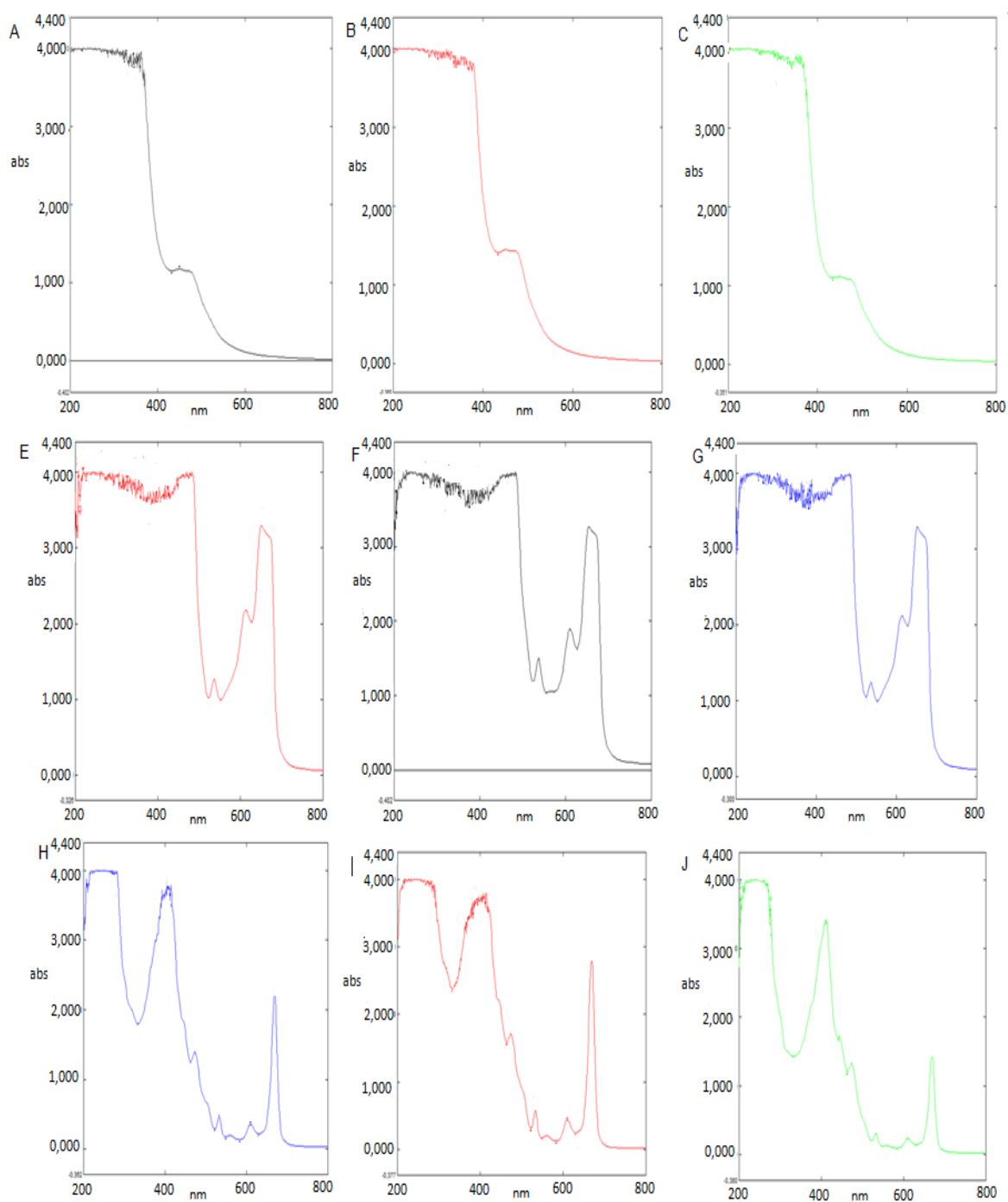


Figura N° 52: Espectros ultravioleta-visible. (A) Extracto acuoso cv. Fuerte; (B) Extracto acuoso cv. Edranol; (C) Extracto acuoso cv. Hass; (D) Extracto alcohólico cv. Fuerte; (E) Extracto alcohólico cv. Edranol; (F) Extracto alcohólico cv. Hass; (G) Extracto hexánico cv. Fuerte; (H) Extracto hexánico cv. Edranol; (I) Extracto hexánico cv. Hass.

No existen diferencias entre los espectros de cada cultivar utilizando el mismo solvente pero si existen diferencias entre los espectros de los diferentes solventes. Se observan en el extracto acuoso la presencia de una gran banda de absorción entre los 200 y los 400 nm y otra banda más pequeña aproximadamente a los 500 nm. En el caso del extracto alcohólico se observa una gran banda entre los 240 y los 500 nm y una banda más pequeña aproximadamente a los 650 nm. Finalmente en el extracto hexánico se observa una banda aproximadamente a los 400 nm y una banda bien definida a los 650 nm.

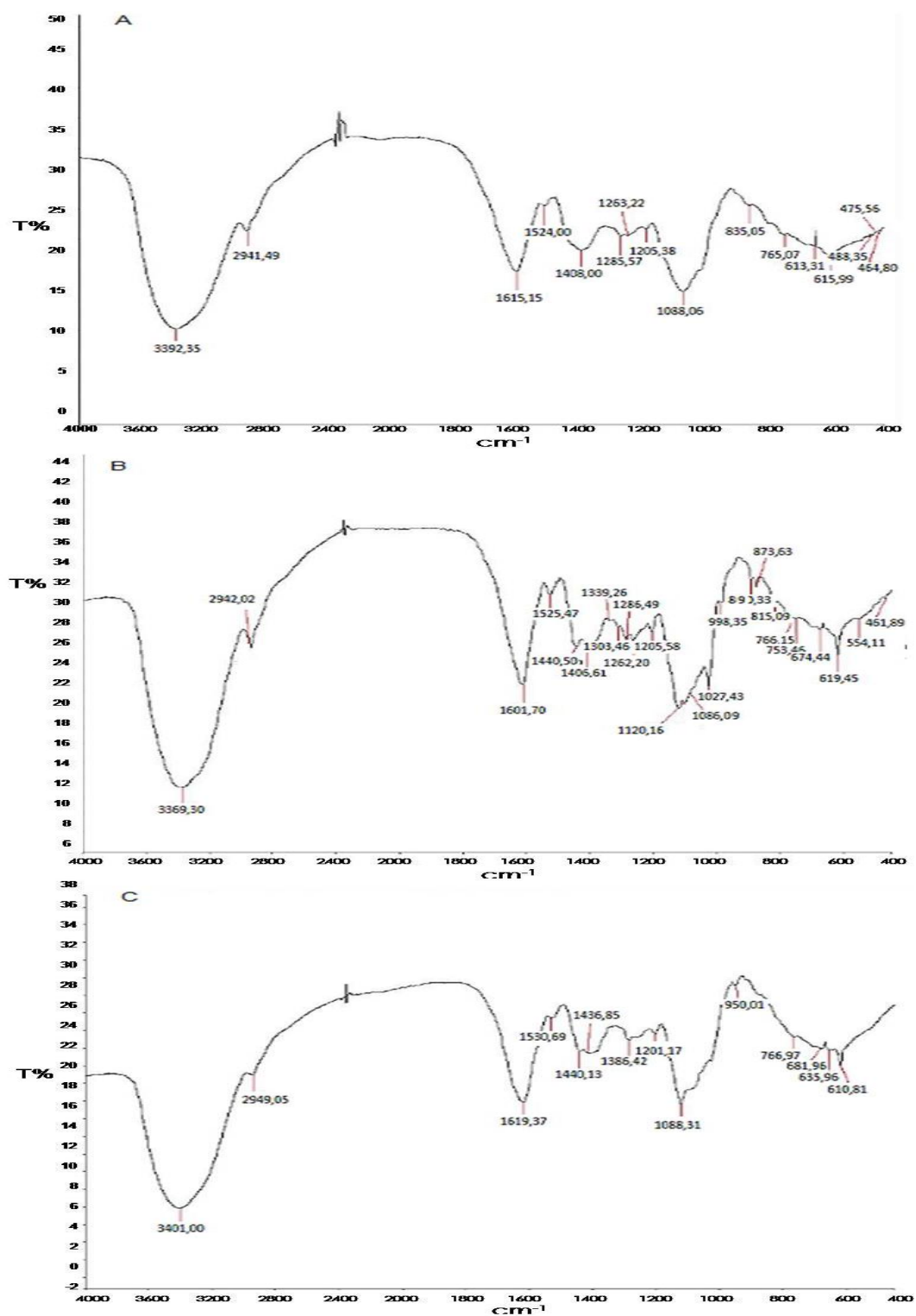


Figura N° 53: Espectros infrarrojos del extracto acuoso. (A) cv. Fuerte; (B) cv. Edranol; (C) cv. Hass.

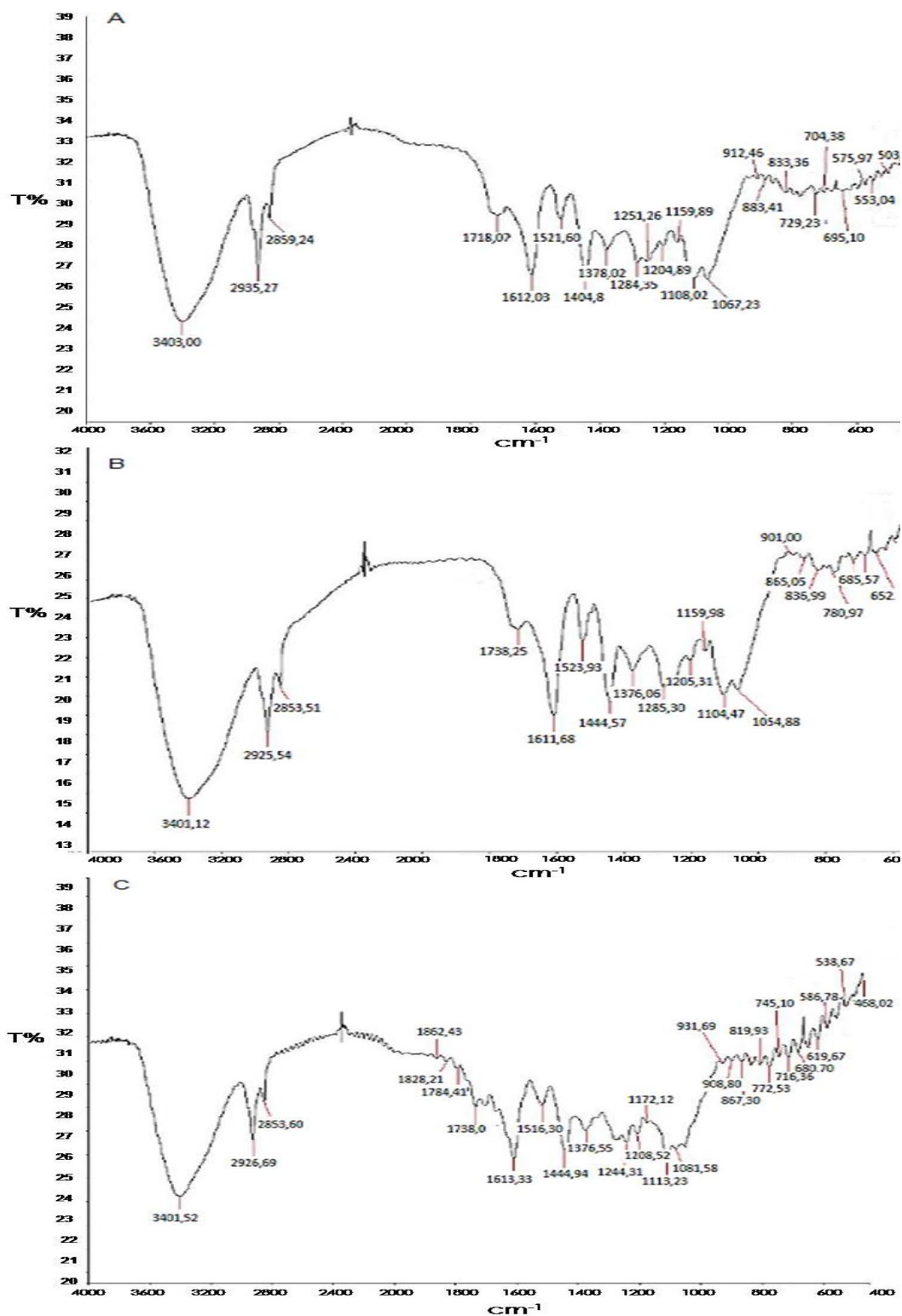


Figura N° 54: Espectros infrarrojos del extracto alcohólico. (A) cv. Fuerte; (B) cv. Edranol; (C) cv. Hass.

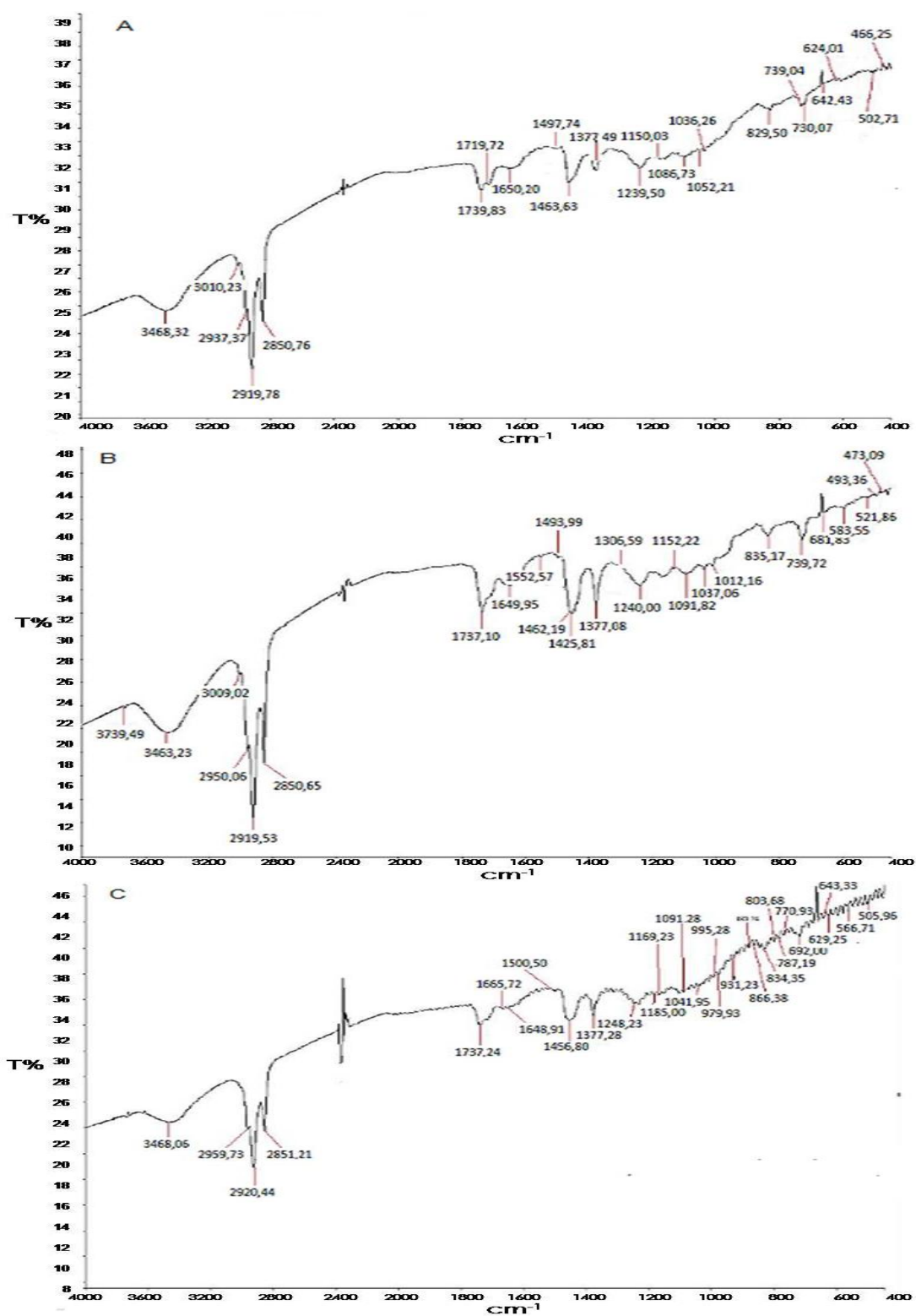


Figura N° 55: Espectros infrarrojos del extracto hexánico. (A) cv. Fuerte; (B) cv. Edranol; (C) cv. Hass.

Los espectros infrarrojos del extracto acuoso muestran grandes diferencias exceptuando para el espectro de cv. Edranol en donde se observa un pico más definido a los  $1020\text{ cm}^{-1}$  aproximadamente. En los tres espectros encontramos una banda pronunciada a los  $3400\text{ cm}^{-1}$  característico de los grupos hidroxilos y una banda entre los  $1615 - 1610\text{ cm}^{-1}$  característico de los alquenos.

Los espectros infrarrojos del extracto alcohólico no difieren cualitativamente y presentan bandas características a los  $3400\text{ cm}^{-1}$ , entre los  $1615 - 1610\text{ cm}^{-1}$ , entre los  $1080 - 1060\text{ cm}^{-1}$  característico de la unión oxígeno - carbono y a los  $2940\text{ cm}^{-1}$  característico de los alcanos. En comparación con el extracto acuoso presenta una banda a los  $1720\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630\text{ cm}^{-1}$  característicos de los ésteres y a los  $2850\text{ cm}^{-1}$  característico de los alcanos.

Los espectros infrarrojos del extracto hexánico no difieren cualitativamente y presentan semejanzas con los espectros de los otros extractos como una banda a los  $3400\text{ cm}^{-1}$  y una banda a los  $1630\text{ cm}^{-1}$ .

Finalmente cabe destacar que existen una característica común en todos los espectros expuestos esta es un pico entre los  $2000$  y los  $1700\text{ cm}^{-1}$  característico del bromuro de potasio.

En comparación con respecto de un espectro infrarrojo de un extracto alcohólico de *L. nobilis* se observa una banda extra cercana a los  $1600\text{ cm}^{-1}$  en donde los cultivares estudiados solo presentan una banda (Figura N° 56).

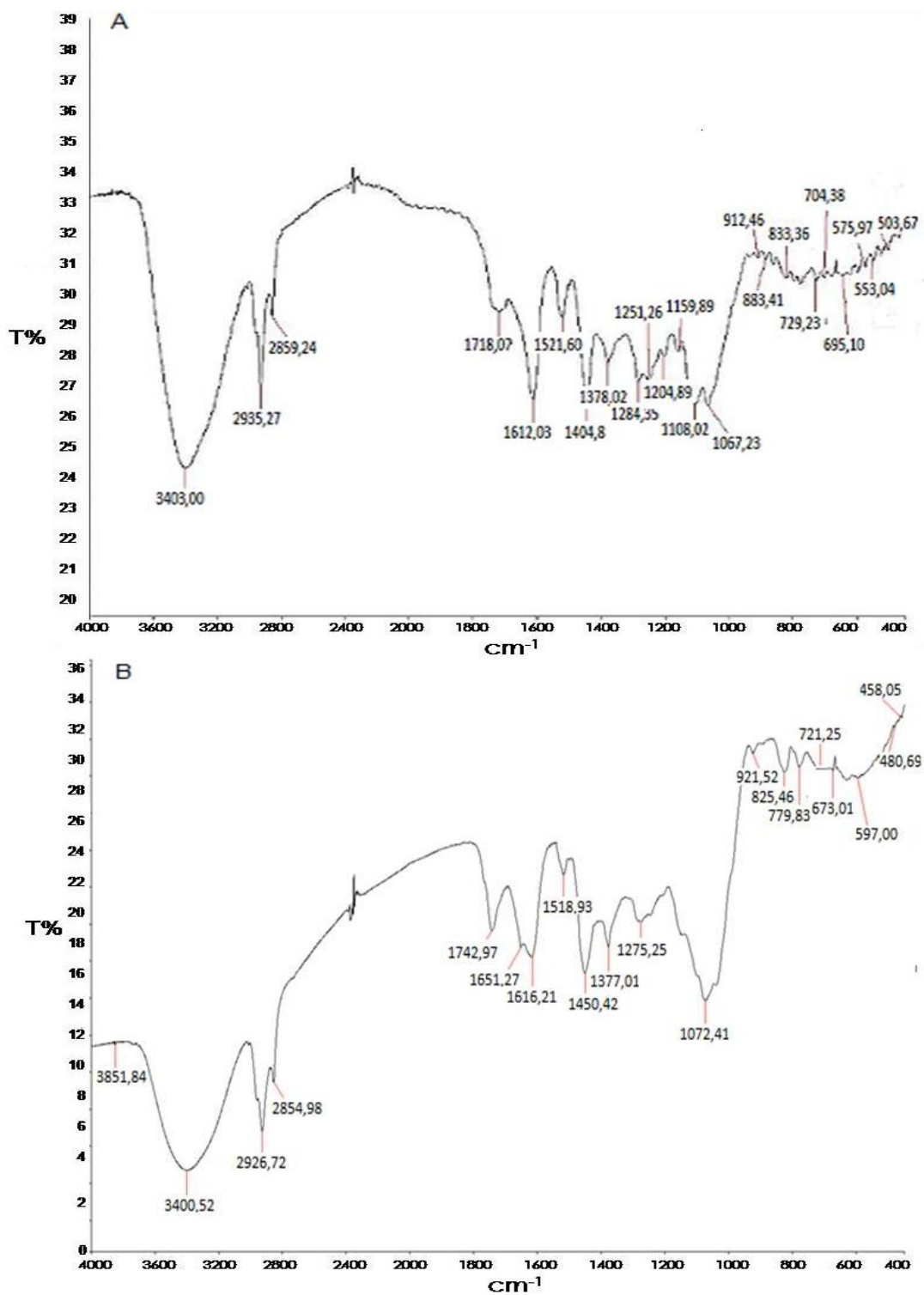


Figura N° 56: Comparación de espectros alcohólicos. (A) cv. Fuerte; (B) *L. nobilis*.

### 6.3.3. Ensayos químicos cuantitativos.

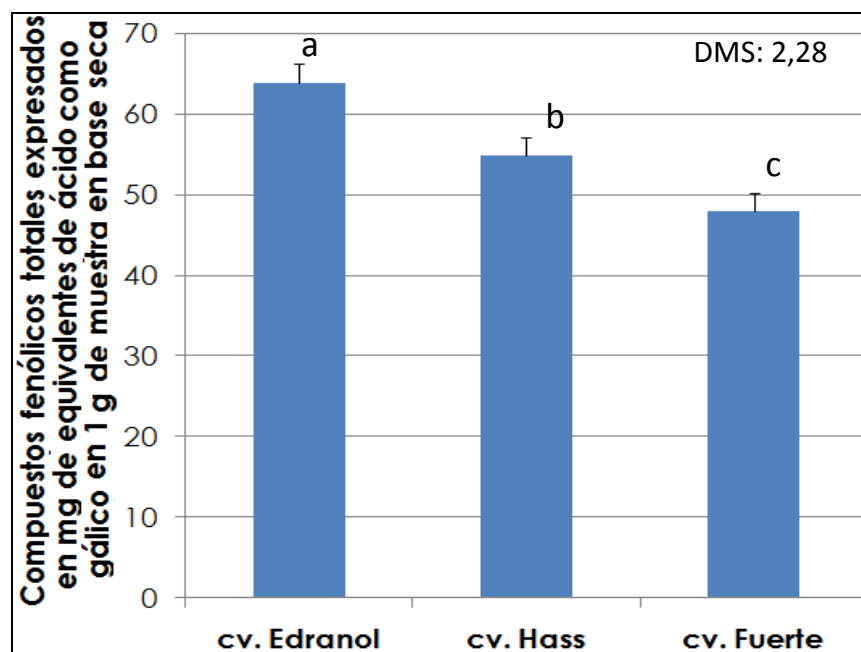
#### 6.3.3.1. Cuantificación de compuestos fenólicos totales.

Tabla N° 21: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales.

Cultivar	Compuestos fenólicos totales (mg de equivalentes de ácido gálico/ 1 g de muestra en base seca) <sup>(y)</sup>
Edranol	63,97 ± 1,20
Hass	54,90 ± 0,78
Fuerte	47,98 ± 0,66

y: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Los resultados muestran una diferencia significativa en la cantidad de compuestos fenólicos totales siendo el mayor valor para cv. Edranol y el menor para cv. Fuerte (Figura N° 57).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Barras de error: Del tipo superior y determina DMS.

Figura N° 57: Análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos totales.

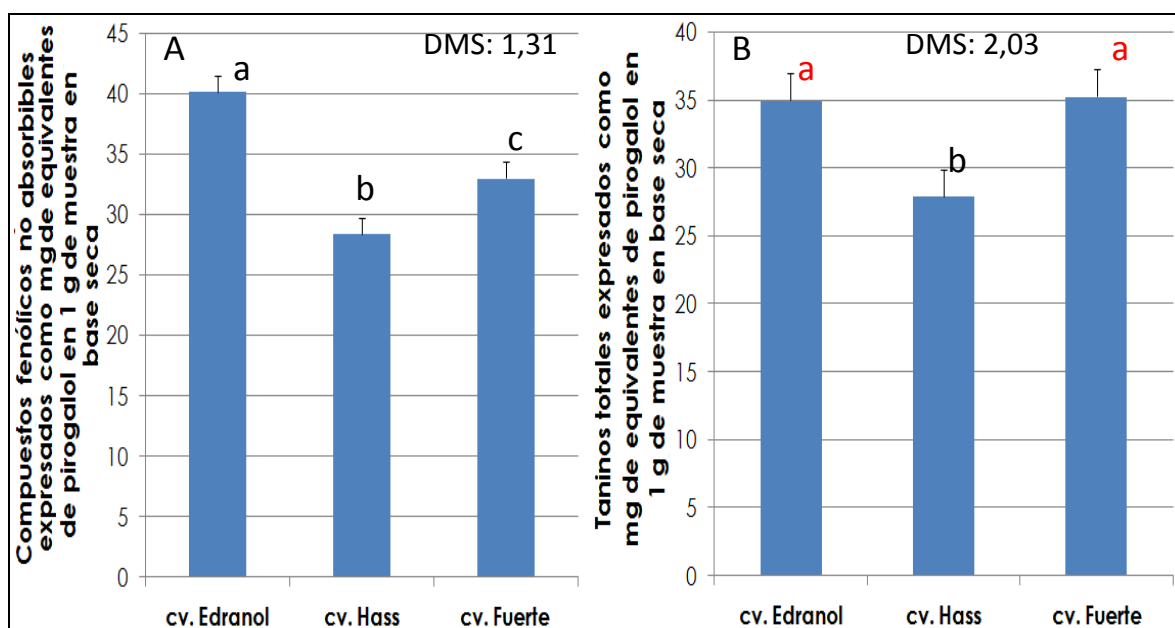
### 6.3.3.2.- Cuantificación de taninos.

Tabla N° 22: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos no adsorbibles y de taninos totales.

<b>Cultivar</b>	<b>Compuestos fenólicos no adsorbibles (mg de equivalentes de pirogalol / 1 g de muestra en base seca) <sup>(y)</sup></b>	<b>Taninos totales (mg de equivalentes de pirogalol / 1 g de muestra en base seca) <sup>(y)</sup></b>
<b>Edranol</b>	40,22 ± 0,25	34,99 ± 0,97
<b>Hass</b>	28,42 ± 0,61	27,91 ± 0,58
<b>Fuerte</b>	33,05 ± 0,62	35,29 ± 0,84

y: Promedio ± desviación estándar (x ± D.S).

Los resultados de los compuestos fenólicos no adsorbibles son significativamente diferentes siendo el cv. Edranol el que posee la mayor cantidad y cv. Hass la menor, mientras que los resultados de los taninos totales muestran una diferencia significativa para cv. Hass con respecto de cv. Edranol y cv. Fuerte siendo estos últimos los que poseen el valor mayor (Figura N°58).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 58: Análisis estadístico de los resultados. (A) Compuestos fenolicos no adsorbibles; (B) Taninos totales.

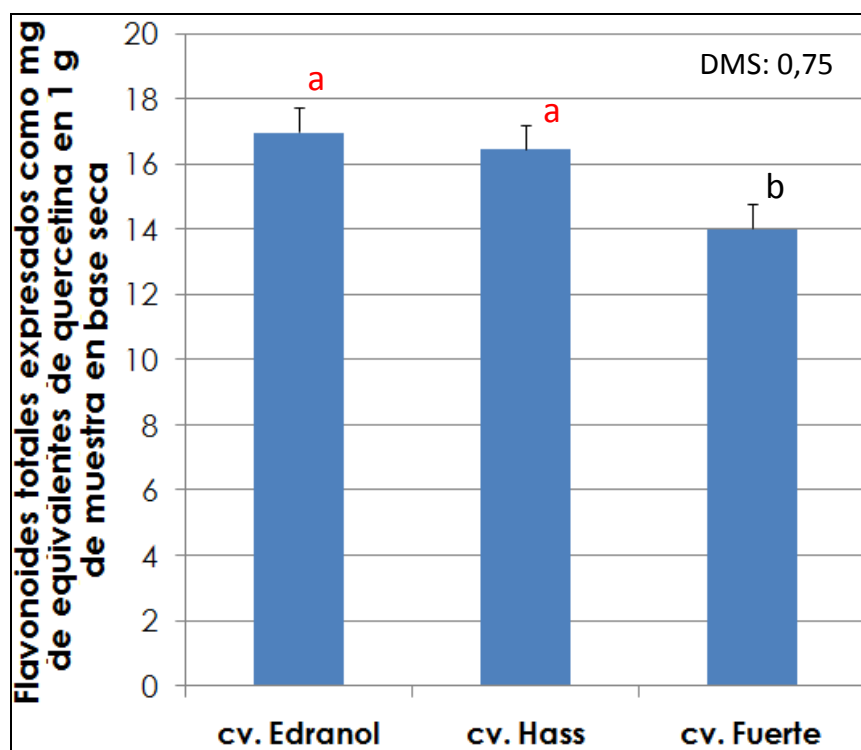
### 6.3.3.3.- Cuantificación de flavonoides totales.

Tabla N° 23: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales.

Cultivar	Flavonoides totales (mg de equivalentes quercetina / 1 g de muestra en base seca) <sup>(y)</sup>
Edranol	63,97 ± 1,20
Hass	54,90 ± 0,78
Fuerte	47,98 ± 0,66

y: Promedio ± desviación estándar ( $x \pm D.S.$ ).

Los resultados de los flavonoides totales muestran una diferencia significativa para cv. Fuerte con respecto de cv. Edranol y cv. Hass siendo estos últimos los que poseen el valor mayor (Figura N°59).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
 Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 59: Análisis estadístico de los resultados de los flavonoides totales.

#### 6.3.3.4.- Quantificación de rutina, quercetina y apigenina por HPLC.

Los resultados de los cromatogramas por HPLC de los estándares y los tres cultivares con y sin hidrólisis se observan en las figuras N° 60 – 63.

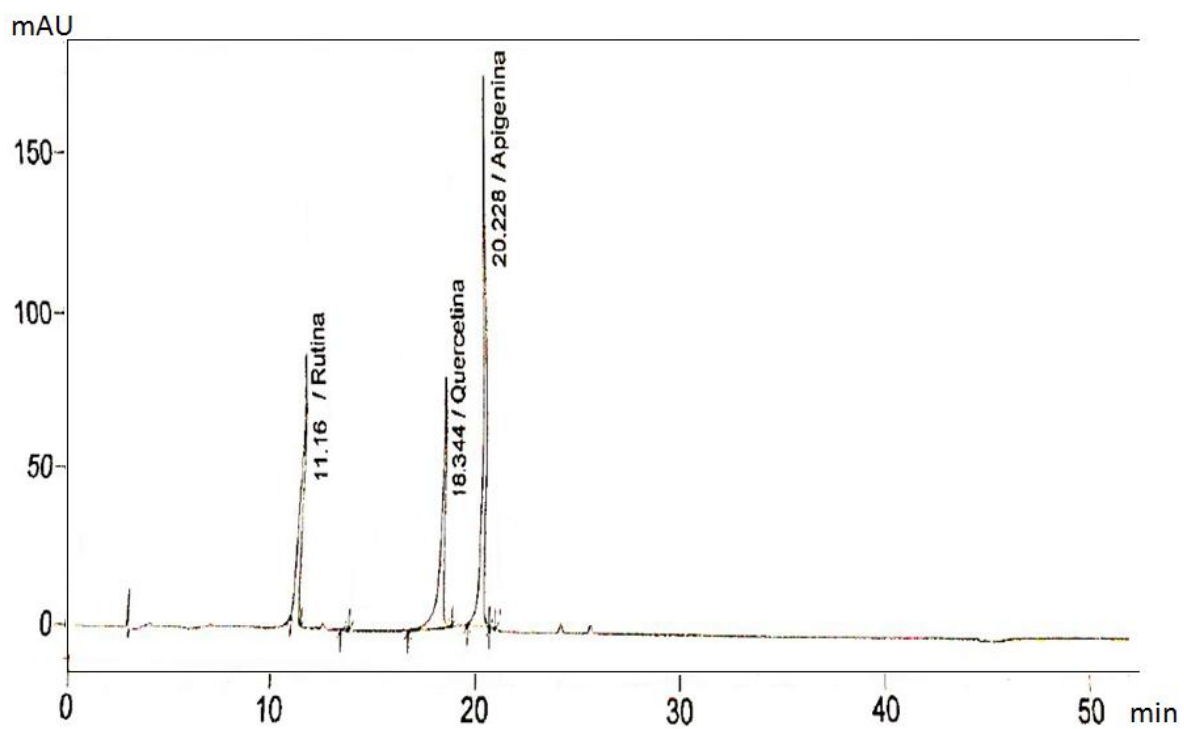


Figura N° 60: Cromatograma de los estándares de rutina, quercetina y apigenina.

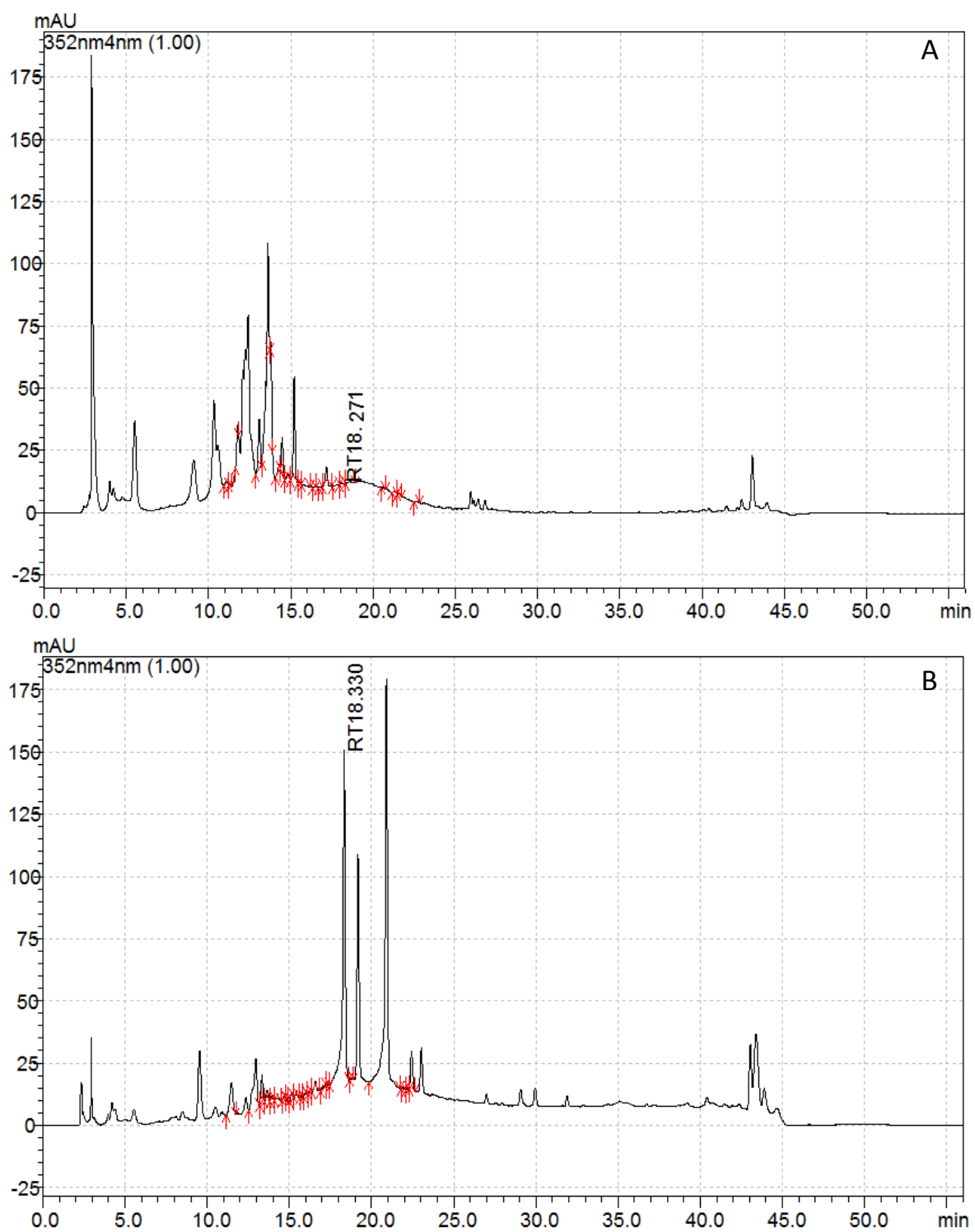


Figura N° 61: Cromatogramas cv. Hass. (A) Sin hidrólisis; (B) Con hidrólisis.

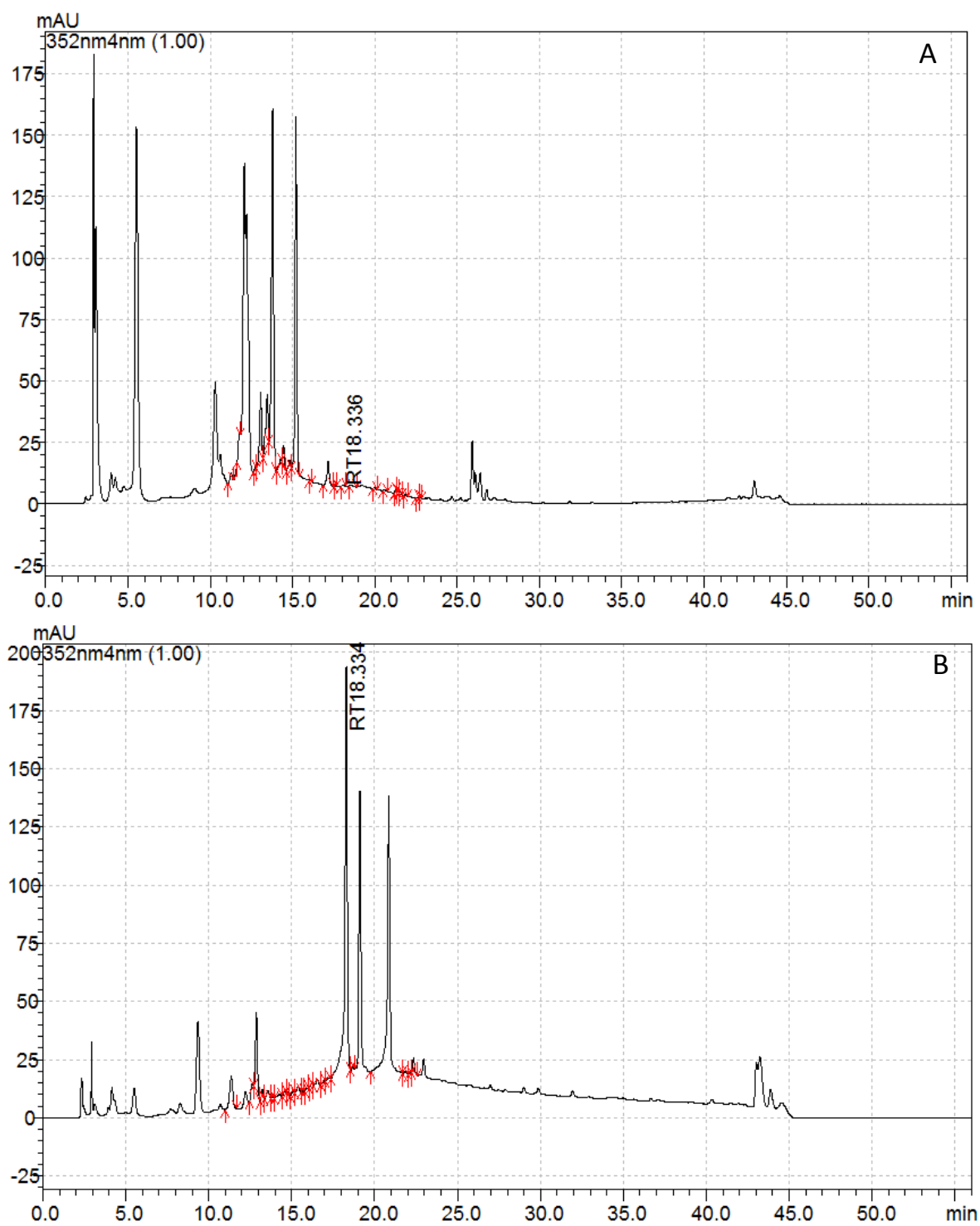


Figura N° 62: Cromatogramas cv. Edranol. (A) Sin hidrólisis; (B) Con hidrólisis.

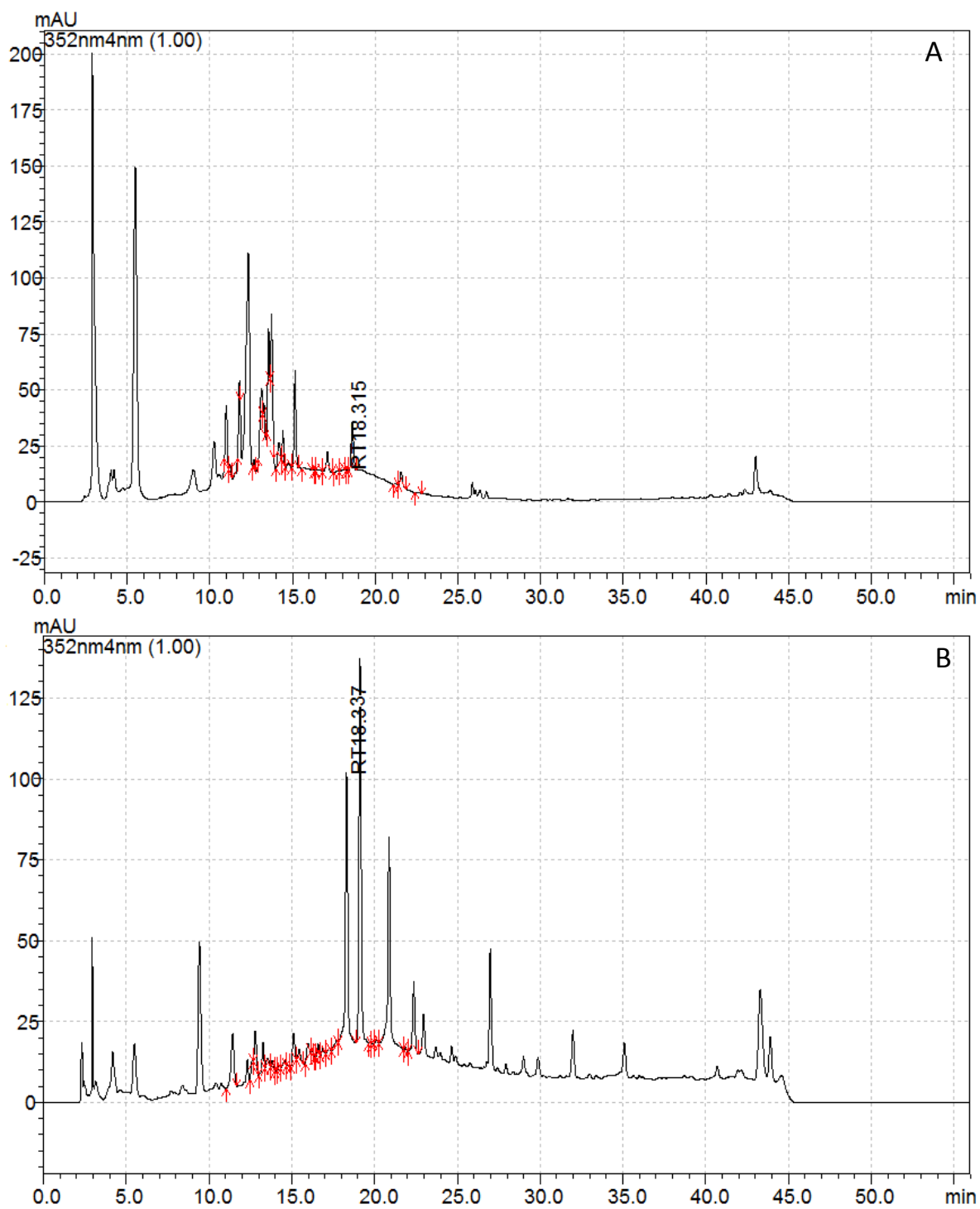


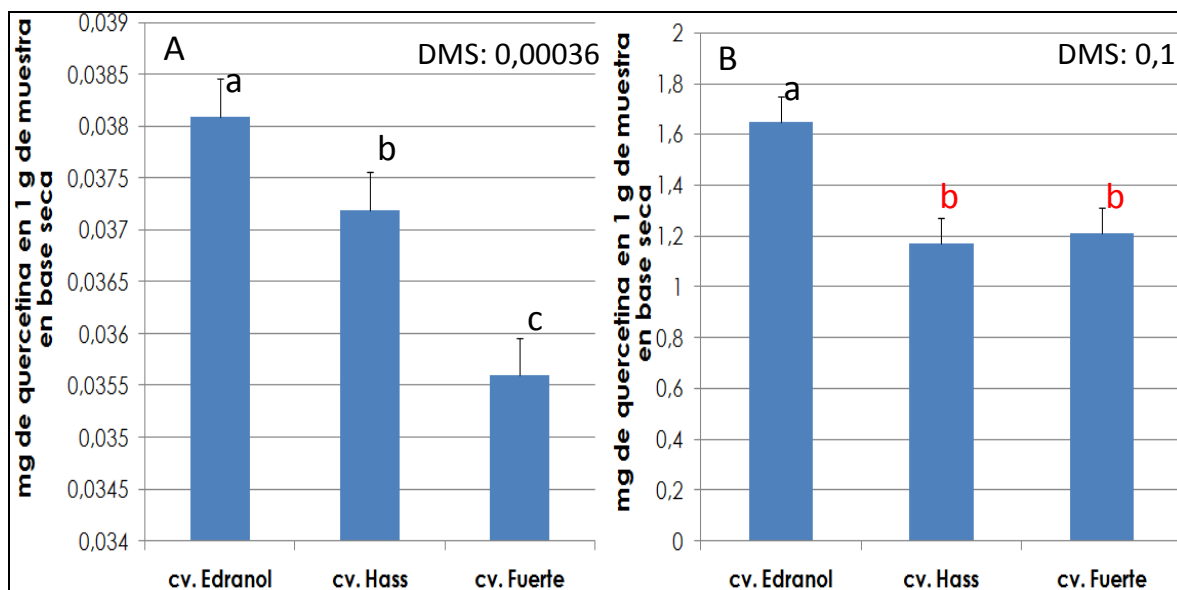
Figura N° 63: Cromatogramas cv. Fuerte. (A) Sin hidrólisis; (B) Con hidrólisis.

No se detectó en los cromatogramas con y sin hidrólisis de los tres cultivares la apigenina ni la rutina, mientras que si se detectó la quercetina (Tabla N° 24).

Tabla N° 24: Resultados de la cuantificación de quercetina

Quercetina (mg) / 1 g de muestra en base seca						
Cultivar	Sin hidrólisis <sup>(y)</sup>		Con hidrólisis <sup>(y)</sup>		Sin hidrólisis <sup>(y)</sup>	Con hidrólisis <sup>(y)</sup>
	1 día	2 día	1 día	2 día	1 - 2 días	1 - 2 días
<b>Edranol</b>	0,0381 ± 0,0002	0,0381 ± 0,0002	1,65 ± 0,14	1,68 ± 0,09	0,0381 ± 0,0002	1,67 ± 0,11
<b>Hass</b>	0,0372 ± 0,0007	0,0373 ± 0,0003	1,17 ± 0,08	1,18 ± 0,05	0,0372 ± 0,0005	1,18 ± 0,07
<b>Fuerte</b>	0,0356 ± 0,0004	0,0355 ± 0,0002	1,21 ± 0,06	1,17 ± 0,04	0,0355 ± 0,0003	1,19 ± 0,05

Los resultados de la cuantificación de quercetina sin un proceso previo de hidrólisis difieren significativamente siendo además estos valores menores con respecto de los obtenidos tras un proceso de hidrólisis en donde cv. Edranol es el que posee el mayor valor y difiere significativamente con respecto de cv. Hass y cv. Fuerte (Figura N° 64).



Columnas con diferentes letras difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )  
Barras de error: Del tipo superior y determinan DMS.

Figura N° 64: Análisis estadístico cuantificación de quercetina. (A) Proceso sin hidrólisis; (B) Proceso con hidrólisis.

#### 6.4.- Elaboración de la monografía

Se elaboraron dos monografías para la hoja de *P.americana*, una común para cv. Hass y cv. Edranol y una particular para cv. Fuerte. Se seleccionaron los ensayos de cloruro de fierro y Shinoda como primeras pruebas de para identificar la presencia de flavonoides, seguidas de la cromatografía para la identificación de rutina y para la monografía de cv. Fuerte se adicionó el cromatograma en HPLC. Además se dejó solamente la cuantificación de flavonoides totales como prueba de valoración y todas las monografías llevaron sus respectivas descripciones botánicas. El formato de cada monografía se presentan en las figuras N° 65 y N° 66.

<p>TÍTULO NOMBRE CIENTÍFICO</p>
SINONIMOS
NOMBRES COMUNES
DEFINICIÓN
DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA
DESCRIPCIÓN DE LA HOJA
-ORGANOLÉPTICA
-MACROSCÓPICA
-MICROSCÓPICA
DESCRIPCIÓN DEL POLVO
IDENTIFICACIÓN
-GENERAL
- TAMIZAJE FITOQUÍMICO
-CIORURO FÉRRICO
-SHINODA
-CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PARA RUTINA
ENSAYO GENERALES
-PERDIDA POR SECADO
-CENIZAS TOTALES Y CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO
-MATERIA EXTRAIBLE
-VOLUMEN DE ACEITES ESENCIALES
VALORACIÓN
- FLAVONOIDES TOTALES

Figura N° 65: Estructura final de la monografía común para cv. Hass y cv. Edranol.



## 7. DISCUSIÓN

### 7.1.- Recolección, secado y almacenamiento.

La calidad de la materia prima tiene una importancia fundamental y es indispensable la utilización de buenas practicas tanto de recolección como de secado y almacenamiento (Sharapin, 2000), es por ello que la homogeneidad obtenida tanto en el aspecto como en el color de las hojas entre los cultivares fue muy probable debido primero a que fueron recolectadas en el mismo lugar, en la misma fecha y utilizando las mismas practicas de recolección descritas por Álvarez y Martínez (2003), por lo que fueron sometidos a las mismas condiciones ambientales que podrían limitar su calidad y su composición química y que son características de la fecha de recolección, como son: el clima, la temperatura, las precipitaciones, la radiación solar y la misma posibilidad de ser atacados por diferentes patologías (Osorio, 2009; Rincón et al. 2011) y segundo podría deberse a que los tres cultivares son híbridos entre las razas mexicana y guatemalteca (Bender, 2000; Mandemaker, 2007), esto presume características de adaptación similar.

El secado interrumpe los procesos de degradación internos e impide el crecimiento de microorganismo (Sharapin 2000), pues al descender la cantidad de agua, las enzimas detienen su actividad. Además al utilizar un secado del tipo artesanal no se daña la capa superficial de las células como sucede al aplicar temperaturas elevadas, así la planta conserva sus características físicas, químicas, organolépticas, microbiológicas y farmacológicas.

El almacenamiento permite conservar por más tiempo las características organolépticas y químicas de la materia prima, pues esta sigue un proceso de degradación continuo (Álvarez y Martínez, 2003), debido a esto es que se mantuvo protegida de la luz, de microorganismos y aireada.

## **7.2.- Caracterización botánica de la anatomía foliar.**

### **7.2.1.- Análisis organoléptico, macromorfológico y morfométrico.**

#### **7.2.1.1.- Características organolépticas y macromorfológicas.**

No existe una gran cantidad de información específica en cuanto a la descripción de las hojas de los cultivares estudiados, exceptuando el cv. Hass que es un poco más descrito, pues es el cultivar más importante económicamente tanto en Chile como a nivel mundial (Sotomoyor, 1996; Lemus et al. 2010). En obras y estudios de autores como Parodi (1959), Gupta (1995), Tamayo et al. (2008) y Adiazola (2007) citados en la introducción y otros como Miller (1754), González A. (1994) y Benezzer (2008) existen más bien detalles generales para las hojas de *P. americana* que concuerdan con los resultados obtenidos en la descripción si estos se englobaran en un solo cultivar. Esta escasa especificación podría deberse a la diversidad de cultivares existentes y/o a que los diferentes autores describieron en general la hoja de *P. americana* sin hacer diferencia entre los cultivares, es por eso que en el caso por ejemplo de la forma de las hojas se pueden encontrar formas como: elíptica, elíptica-lanceolada (Parodi, 1959; Muñoz et al. 2004), oblonga (Miller, 1754), oval y oblonga-lanceolada (Tamayo et al. 2008), lo que se corresponde a las formas observadas que van desde ovada para cv. Fuerte y cv. Edranol hasta lanceolada para el cv. Hass. Lo mismo sucede con otras características particulares como el ápice y la base mientras que otras características como el color, la textura y la nervadura al no detectarse diferencias entre los cultivares estudiados no se ven afectadas por esto y concuerdan con lo declarado por Gupta (1995) y Tamayo et al (2008). Estas características comunes que muchas veces se repiten también en las diferentes especies de la familia de las *Lauraceae* se deberían a las similitudes genéticas de los cultivares. (Ude et al. 2003; Suwanvijitr et al. 2010), aunque hay otras características que difieren como el aroma y que se deberían en una mayor proporción en este caso a las diferencias genéticas causadas por el entrecruzamiento genético de las razas de *P. americana* más que al medio externo, ya que los cultivares estudiados fueron sometidos a un medio común.

En contraste con la hoja, para el fruto sí existe información específica para cada cultivar. Esta mayor descripción podría deberse a que a nivel mundial el fruto es lo más utilizado de la *P. americana* y además una de las razones para el desarrollo de nuevos cultivares con el fin de mejorar el añerismo y la resistencia a las enfermedades para lograr así una mejor producción (Lemus et al. 2010), esto demuestra que las peculiaridades del fruto son la principal forma de determinar un cultivar (López et al. 2007). Entre estas descripciones, que coinciden con lo observado en este estudio, se encuentran por ejemplo para cv. Edranol se describe en la literatura un fruto de forma piriforme, alargado, de piel gruesa, color verde brillante y con presencia de lenticelas (Díaz, 1994) y por otra parte también como un fruto de piel gruesa y con gran cantidad de lenticelas de color verde opaco (Belmar, 1996; Sotomayor, 1996), cv. Hass se describe de forma ovoide a piriforme (Sotomayor, 1996), cáscara algo rugosa, de color verde, la que se va poniendo negra a medida que la fruta se ablanda y madura (Gardiazabal, 1991) y para cv. Fuerte se describe una forma piriforme a oblongo (Carrillo, 1991), cáscara de color verde oscuro opaco, de superficie ligeramente áspera, medianamente gruesa (Sotomayor, 1996) y con presencia de puntos grises o lenticelas (Ceballo, 1977), las que podrían ser causante de la ligera rugosidad observada.

#### **7.2.1.2.- Análisis morfométrico.**

##### **7.2.1.2.1.- Análisis de tramos.**

Los estudios morfométricos permiten establecer diferentes patrones que usualmente son suficiente para diferenciar cultivares y variedades y que son indispensables para su caracterización siempre que estos posibiliten discernir claramente entre un cultivar y otro (Santiago et al. 2005), siendo por ello que las relaciones obtenidas entre los tramos no se podrían utilizar a diferencia de lo obtenido para cada tramo.

No existe en la bibliografía consultada algún estudio de este tipo tanto de tramos para la lámina o de otra característica de la hoja de *P. americana*, de algún cultivar en particular o de alguna especie de la familia de las *Lauraceae*, que permita diferenciar los cultivares usando la hoja

y con el que se pueda comparar los datos. A pesar de ello las formas particulares de cada lámina foliar de los distintos cultivares explicaría los resultados encontrados, por ejemplo el cv. Edranol al poseer una forma redondeada en la base concuerda con un T1 mayor a un T3, en el caso de cv. Hass al poseer una lámina de forma lanceolada concordaría con un T1 y un T3 similares y para cv. Fuerte al poseer la lámina más grande y con una forma ovada explicaría porque posee los promedios mayores y un T1 y T3 similares.

#### **7.2.1.2.2. Análisis morfométrico peciolo, lámina, ancho de lámina y hoja.**

Los parámetros morfométricos se encuentran íntimamente relacionados con el hábito de crecimiento (Vázquez et al. 2006) es por esto que el cv. Fuerte al poseer un hábito extendido de crecimiento (Sotomayor, 1996) podría deberse su mayor tamaño de la hoja, la lámina, el ancho en la mitad y el peciolo con respecto de los otros cultivares. Un estudio realizado por Castillo et al. (1998) corroboraría lo establecido con anterioridad, ya que plantea que la hoja de cv. Fuerte presenta una mayor cantidad de azúcares reductores en comparación con cv. Hass, debido posiblemente a que debe satisfacer un mayor requerimiento energético al poseer estructuras más grandes. A pesar de ello cv. Hass también posee un hábito de crecimiento extendido incluso superando a cv. Fuerte al quinto año de desarrollo (Samaniego et al. 1999), mientras que cv. Edranol posee un menor crecimiento y de forma erecta, lo que posibilita un mayor contacto con la fuente lumínica en contrario con cv. Hass que debido a su tipo de crecimiento el exponer su lámina a la fuente lumínica es de suma importancia, esto explicaría que cv. Hass posea una lámina mayor pero no un ancho mayor con respecto de cv. Edranol.

Unido al tamaño de la lámina debe coexistir un peciolo proporcional pues este debe proveer los movimientos fototrópicos para captar la energía lumínica necesaria para la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2006), concordando con un tamaño de peciolo mayor para el cv. Fuerte y un peciolo menor para cv. Edranol, ya que este presenta una lámina menor.

La *P. americana* var. *drymifolia* es aquella que presenta hojas de menor tamaño con respecto de var. *americana* y var. *guatemalensis* siendo esta última la que presenta un mayor tamaño es por esta causa que cv Fuerte al poseer un 50 % de este tipo de genes debería poseer las hojas más pequeñas pero no es así, esto podría deberse a la predominancia de la expresión de los alelos que codifican para el tamaño de la hoja provenientes de var. *guatemalensis* por sobre la var. *drymifolia*, cabe agregar además que los procesos de polinización cruzada y la presión ambiental generan una división y expansión celular específica.

El análisis morfométrico puede verse afectado por los niveles umbrales de ciertos elementos que tienen un rol significativo en el crecimiento como el nitrógeno o el boro y algunas moléculas reguladores del crecimiento (PRG's) (Saig, 2000) que se sabe juegan roles importantes en procesos de inducción floral tanto en el control de la distribución de nutrientes como de hormonas (González A, 1994) y por último agregar también dos factores que podrían ser causantes de la diferencia en los resultados en especial de la lámina, el primero es la presión umbral de turgencia impuesta por el contenido de agua y de los solutos que estimulan bombas de protones situadas en la membrana plasmática generando una expansión de la pared celular y la expansina proteína encargada de liberar los enlaces entre la celulosa y hemicelulosa y relajar la tensión de la pared para la expansión.

### **7.2.2.- Características micromorfológicas de la lámina foliar.**

#### **7.2.2.1.- Vista superficial y cortes transversal de la lámina y del nervio medio**

No se encontró en la bibliografía consultada algún estudio donde se compararan estos tres cultivares, pero sí se encontró un estudio realizado por Morales et al. (1992) en donde se analiza la histología de las hojas de *P. Indica* y dos cultivares de *P. americana* que son cv. Fuerte y cv. Orotava. Este estudio muestra tras un corte transversal de la lámina, un mesófilo de disposición bifacial o dorsiventral con un parénquima en empalizada bien desarrollado y un parénquima esponjoso con grandes lagunas, describen la epidermis superior como una estructura formada por

células bastantes regulares, con una gruesa capa de cutícula y no presenta estomas, entretanto que la epidermis inferior está formada por células más pequeñas, irregulares, con numerosos tricomas pequeños en el envés y un parénquima esponjoso como un estrato constituido por células poliédricas en la que existen estructuras cristalinas, lo que concuerda con lo observado en este estudio. Cabe destacar que con respecto de la última estructura no se encontró algún estudio cuantitativo o cualitativo que dejara claro que cultivar posee una mayor cantidad de estas células cristalinas aunque por el aroma que desprende la hoja se podría suponer que es cv. Fuerte.

Morales et al. (1992) también describe un patrón paracítico para las células anexas, esto concuerda en cierta medida con lo observado en este estudio, pues a pesar de encontraron estomas paracíticos existe una predominancia de un patrón anomocítico. Esto podría deberse a la delgada línea que existe para diferenciar un patrón de otro, por lo que la apreciación del patrón está muy sujeto al observador y a su interpretación. Además como se puede observar en los estudios realizados por Morales et al. (1992), Chartzoulakis et al. (2002) y Barrientos y Rodríguez (2003) las variaciones tanto estomáticas como de otras estructuras están sujetas a una serie de modificaciones según su germoplasma y al ambiente, esto se refleja en que la densidad estomática puede variar de 100 a 610 estomas por  $\text{mm}^2$  bajo diferentes condiciones y etapas del desarrollo. No solo los estomas pueden verse afectados por diferentes condiciones ambientales como el contacto con la radiación solar o las sequias sino que también puede causar que el parénquima en empalizada presente uno o dos estrato (Morales et al. 1992), ya que en el caso de las sequias la conductancia estomática disminuye para no perder agua y por lo tanto, disminuye la asimilación de carbono inhibiéndose la fotosíntesis, lo que se ve reflejado en una disminución en el espesor del parénquima y de otros componentes histológicos del mesófilo (Chartzoulakis et al. 2002).

Ahora con respecto de la familia de las *Lauraceae* Arambarri et al. (2006) establecen parámetros similares a los observados en este estudio, por ejemplo que las paredes de las células que conforman la epidermis de las hojas son rectas y curvas, siendo más curvas las que conforman la epidermis inferior y Upton et al. (2011) destaca la presencia de cristales de oxalato de

calcio del tipo rafidios, esto no se observa en las muestras estudiadas, pudiendo ser un patrón de diferencia con algunas especies de la familia.

En cuanto a los cortes realizados en el nervio medio no se encontraron resultados para *P. americana*, pero sí se encontró que no existen diferencias entre los cultivares descritos en este estudio y otros estudios de especies de la familia como *Cinnamomum* spp. (Revindra et al. 2004) y *Ocotea duckei* (Coutinho et al. 2006).

#### **7.2.2.2. Microcorte transversal de la lámina foliar.**

Las tabicaciones observadas coinciden con lo registrado por Morales et al. (1992) en microcortes de hojas de cv. Fuerte y cv. Orotava, lo que demuestra que no solo los cultivares estudiados presentan estas tabicaciones, sino que también otros cultivares de *P. americana*. Esta cualidad podría ser útil para generar un patrón discriminador entre los cultivares, siendo una de las razones por la que se realizó un conteo del primer estrato del parénquima en empalizada.

No se encontró alguna razón que explicara la diferencia en el número de tabicaciones, pero se podría suponer una estrecha relación entre el espesor del mesófilo y el número de estas tabicaciones que conforman el primer estrato, por lo mismo cv. Fuerte poseería una mayor cantidad, aunque como se había mencionado con anterioridad también la influencia del ambiente como el contacto con la radiación solar podría estar interfiriendo.

#### **7.2.3.- Características del polvo.**

No se encontró algún estudio donde se observara el polvo o se compararan y/o buscaran diferencias entre las estructuras observadas en los cortes con respecto del polvo, aunque se esperaría que las estructuras no cambiaran pues se trabaja con la misma muestra, por lo que existen las mismas estructuras pero mucho más seccionadas salvo algunas estructuras como los vasos del xilema, ya que están formando parte del tejido vascular y son liberados solo al pulverizar la lámina.

### **7.3. Determinación de la composición química establecida.**

#### **7.3.1.- Ensayos farmacopeicos generales.**

##### **7.3.1.1.- Pérdida por secado**

No se encontró en la bibliografía consultada algún valor con respecto de la pérdida por secado para la hoja de *P. americana* o sobre algún cultivar, sin embargo se cuentan con datos aportados por la Real Farmacopea Española (2005) para otras materias primas que varían en promedio entre un 10 - 11 % que coinciden con los datos obtenidos.

Con respecto del secado artesanal se conoce que elimina el agua libre que es aquella que se libera con facilidad por los procesos de secado sin la necesidad de utilizar temperaturas, pero no elimina el agua ligada o retenida, la cual la única manera de extraerla es a través de procesos de secado que involucren temperaturas de  $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Muñoz, 1996), esto haría suponer que cv. Fuerte poseía una mayor cantidad de agua libre que de agua ligada con respecto de los otros cultivares o también podría deberse a una mayor cantidad de compuestos volátiles que se perderían al ambiente generando una mayor diferencia de peso.

Por lo dicho anteriormente es que nunca se llega a una humedad cercana a cero con un proceso del tipo artesanal, pues estos valores dependen mucho de la forma, la temperatura y el tiempo en que se realizó el proceso de secado. A pesar de ello el proseguir con un proceso de secado artesanal puede causar la acción de enzimas, bacterias y hongos al existir un tiempo de secado muy prolongado y el aumentar la temperatura podría descomponer químicamente la materia prima (García y Fernandez., 2002).

### **7.3.1.2.- Cenizas totales y cenizas insolubles en ácido.**

Las hojas constituyen una de las principales reservas para los elementos inorgánicos (González, 2002) que son uno de los componentes que conforman las cenizas totales en conjunto con los residuos de arena, sílica y tierra o también llamadas cenizas insolubles en ácido (Sharapin, 2000), esto coincide con lo encontrado en este estudio, puesto que cv. Fuerte es el que posee una lámina más grande y una mayor cantidad de cenizas aportadas por los elementos inorgánicos, ya que a pesar que cv. Hass no difiere estadísticamente en cuanto a las cenizas totales sí posee una mayor cantidad de cenizas insolubles que cv. Fuerte. Lo anterior también podría ser la razón por la que cv. Edranol posee una menor cantidad de cenizas aportadas por los elementos inorgánicos, puesto que es la que posee una lámina menor, aunque hay que tener claro que el valor puede variar según el lugar de donde se recolectó la muestra, debido a las diferentes estrategias de fertilización y al tipo de suelo desde donde se absorben estos compuestos, a pesar de ello esta variable se puede descartar, debido a que las hojas de los tres cultivares supondrían condiciones similares al ser recolectadas desde un mismo lugar.

Con respecto de las cenizas totales se encontró en la bibliografía consultada información para la hoja de *P. americana*, pero no datos particulares para cada cultivar. En estos datos se destaca al potasio como el elemento mayoritario presentes en las hojas, seguido del sodio, magnesio, calcio, fósforo, zinc y cobre (Arukwe et al. 2012). Ahora si se compara lo declarado por la Real Farmacopea Española, 2005 para otras materias primas los datos obtenidos no sobrepasarían el valor máximo promedio de 5 – 6 %.

En el caso de las cenizas insolubles en ácido no se encontraron datos generales para *P. americana* ni tampoco datos particulares para los cultivares, pero la Real Farmacopea Española, 2005 establece valores máximos para otras materias primas que en promedio poseen un valor máximo de 2%, lo que concuerda con lo obtenido en este estudio.

### **7.3.1.3.- Materia extraíble en frío y en caliente.**

La maceración es un proceso en el cual el solvente se satura con la droga, mientras que la extracción en caliente permite la evaporación, desaturación y recuperación del solvente aumentando la solubilidad de la materia prima (Núñez, 2008), debido a esto es que se obtuvo una mayor cantidad de materia extraíble en caliente que en frío. Otro factor que afecta la cantidad de materia extraíble es la afinidad del principio activo por el solvente (Vicente, 2010), esto podría ayudar a suponer que tipos de compuestos predominan en la matriz de la materia prima, es por eso que en el caso de cv. Edranol al existir una mayor cantidad de materia extraída en los solventes más polares posiblemente estos serían los compuestos fenólicos (taninos y flavonoides), mientras que cv. Fuerte podría tener una menor cantidad de estos compuestos con respecto de los otros dos cultivares, ya que a medida que disminuye la polaridad aumenta la materia extraíble, especialmente cuando el extracto es en caliente, pues cuando es en frío no sucede esta tendencia, pero podría deberse a que la temperatura mejoraría la extracción de sus compuestos más apolares presentes en la materia prima, mientras que una maceración en frío extraería solo los compuestos más superficiales que se encontrarían en cantidades similares en los otros cultivares, aunque no se encontró nada con respecto de esto en la bibliografía consultada.

### **7.3.1.4.- Aceites esenciales o volátiles.**

De la composición del aceite esencial de la hoja del palto se ha reportado un importante contenido de limoneno, eucaliptol,  $\alpha$ -terpineol (Avello et al. 2012) y monoterpenos hidrocarbonados especialmente  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno (Palazzo et al. 2008). Sin embargo no hay referencias en la bibliografía consultada en donde se haya realizado una comparación de la cantidad de los aceites esenciales entre diferentes cultivares de *P. americana*, pero sí existen estudios como los de Sagredo y Bratley (1995) y Rincón et al. (2011) en donde se han extraído aceites esenciales de cultivares particulares de *P. americana* var. *drymifolia*, que es aquella que posee una mayor cantidad de aceites esenciales (Bender, 2000), lo que concuerda con lo obtenido, ya que cv. Fuerte es el cultivar que posee una mayor cantidad de genes pertenecientes a la raza mexicana y fue el

que obtuvo un valor mayor para los aceites esenciales. Esto además corroboraría lo encontrado en las características organolépticas de la hoja, en la cual se describió a cv. Fuerte con una mayor intensidad de aroma al pulverizar la hoja seca, esto no había sido posible determinar cuantitativamente en los cortes transversales de la lámina.

### **7.3.2.- Ensayos químicos cualitativos.**

#### **7.3.2.1.- Cromatografía en capa fina.**

La cromatografía en capa fina sigue siendo la forma más usada, eficaz, de bajo costo y rápida para la identificación y separación de compuestos en la que la extracción es un etapa limitante y donde existen métodos como la maceración y la percolación los cuales son los más utilizados (Wagner y Bladt, 2009), pero que no son tan eficiente como la extracción soxhlet que es un método más lento pero que permite una mayor extracción que los métodos anteriores (Wagner y Bladt, 2009), pero que aun así es un método perjudicial para aquellos compuestos termolábiles como los flavonoides al utilizar temperaturas elevadas, a diferencia del baño ultrasonido que no necesita alcanzar temperaturas tan elevadas y que a través de un efecto mecánico permitiendo una buena penetración del solvente en la matriz (Wagner y Bladt, 2009) el que debe permitir la extracción del componente a analizar, en este caso los flavonoides, por ello se utilizó metanol, pues extrae tanto flavonoides hidrofílicos y lipofílicos.

El tipo eluyente no debe ser complicado en su composición, no ser afectado por la temperatura y su composición dependerá de la estructura química que se quiera separar (Wagner y Bladt, 2009) en este caso los estándares de apigenina y quercetina que se encuentran en su forma no glicosilada y la rutina es un glicósido de la quercetina (quercetina 3-O-rutinosido), (Wagner y Bladt, 2009), por lo mismo se utilizó una fase móvil casi totalmente orgánica compuesta por tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (5:4:1) para la apigenina y quercetina así los glicosidos quedan retenidos al principio de la placa y no interfieren en las señales de estos estándares y para la rutina una fase móvil compuesta por acetato de etilo/ metil etil cetona/ agua/ ácido fórmico

(50:30:10:10) que es una fase móvil más apolar que la anterior así la rutina genera más interacciones con la fase estacionaria que con la fase móvil en comparación con los otros glicósidos permitiendo una mejor separación de la rutina.

Owolabi et al. (2010) realizaron un estudio en el cual a través de un cromatografía en columna detectaron y cuantificaron cinco flavonoides entre ellos quercetina, rutina y apigenina que concuerda en cierta medida con lo encontrado en este estudio, puesto que no se detectó apigenina ni quercetina, lo que podría deberse a que estos dos compuestos se presentan en las materias primas vegetales en mayor proporción en su forma glicosilada que como agliconas, por tanto se debería someter a la muestra a un proceso de hidrólisis ácida o básica a través de método de maceración o con aplicación de temperatura para liberar así los azúcares de los flavonoides y luego de este proceso sembrar la muestra (Waksmundzka y Sherma, 2011) y en el caso de la rutina a pesar de tener un  $R_f$  cercano no se puede asegurar que las muestras posean rutina, más aun, debido a que Owolabi et al. utilizaron una metodología distinta, diferentes épocas y lugares de extracción de la materia prima a analizar, desconocimiento del cultivar con el que trabajaron en el otro estudio y además a la existencia de una gran gama de tipos de glicósidos como de la quercetina, apigenina kaempferol e isoharmnetina que podrían poseer un  $R_f$  cercanos al calculado para la rutina, sin embargo con estos resultados sí se puede establecer un patrón característico para la hoja de *P. americana* como se pudo comprobar con respecto del patrón de *L. nobilis* y tal vez poder diferenciarse en cierta medida entre cv. Edranol con respecto de cv. Hass y cv. Fuerte.

### **7.3.2.2.- Tamizaje fitoquímico.**

No se encontró en la bibliografía consultada algún tamizaje fitoquímico comparativo entre diferentes cultivares, lo que si se encontró fue un tamizaje para cv. Hass y dos tamizajes generales para la hoja del palto. El primero es realizado por Salazar et al. (2007) en donde analizan un extracto etanólico del cv. Hass en el cual se detectó la presencia de triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos y antocianidinas y la ausencia de alcaloides y quinonas, resultados que concuerdan con lo encontrado para los tres cultivares analizados y del segundo tipo

de estudio se encuentra el realizado por Olawale (2007) donde analizan un extracto acuoso de la hoja del palto y detectan la presencia saponinas, taninos, flavonoides y alcaloides, difiriendo este último con lo encontrado en este análisis pudiendo deberse a la metodologías realizadas, puesto que Olawale (2007) utiliza una mayor cantidad de muestra en un volumen menor, por consiguiente su extracto es más concentrado. Por último Arukwe et al. (2012) detectaron la presencia de saponinas, taninos, flavonoides y alcaloides siendo este último la única diferencia. Esta diferencia se podría explicar porque Arukwe et al. (2012) utiliza un método cuantitativo para realizar el tamizaje, lo que podría hacer la diferencia, ya que en este estudio los alcaloides se identifican cualitativamente.

Existen otros estudios que corroboran la presencia de algunos de los metabolitos encontrados como Agomuo et al. (2012) quien detectó vitamina E y la vitamina A, esto estaría confirmando estructuras triterpénicas encontradas. Owolabi et al. (2010) como se había mencionada con anterioridad detectaron flavonoides como rutina, quercetina, apigenina y luteolina, lo que confirma los flavonoides y compuestos fenólicos encontrados en el tamizaje fitoquímico

Las bandas encontradas entre los 200 y 400 nm detectada en los extractos acuosos podría estar confirmando la presencia de flavonoides encontrados en el tamizaje, ya que estos presentan dos bandas de absorción, la primera entre los 240 y los 280 nm debida a su anillo aromático y la segunda entre los 300 y los 550 nm debida a los sustituyentes del anillo pirano, siendo esta segunda banda entre los 300 y los 380 nm para las flavonas y flavanoles (Waksmundzka y Sherma, 2011), los cuales se detectaron en el tamizaje y concuerdan con la banda observada. En el caso de la banda detectada entre los 500 nm posiblemente sean debido a las antocianidinas, compuestos que presentan absorbancia entre los 465 – 560.

El gran pico encontrado en el extracto alcohólico podría deberse a una sumatoria de las bandas de cada cromóforo aportado por cada metabolito secundario encontrado en el extracto entre ellos los flavonoides, los triterpenos/esteroides y las antocianidinas los que poseen bandas de absorbancia entre los 240 y los 500 nm, lo que podría estar generando esta gran banda que se

observa en los espectros (Pasto y Johnson, 2003), mientras que la banda alrededor de los 650 nm es característica de la clorofila (Dinoiu et al. 2011).

La banda que se observa a los 650 nm en el extracto hexánico es característica de la clorofila y la banda encontrada cerca de los 400 nm podría ser a causa de los esteroides y terpenoides encontrados en el tamizaje fitoquímico del extracto, pues poseen bandas de absorbancia cercanas entre los 320 nm y los 414nm (Pastos y Johnson, 2003).

Sobre los picos encontrados en el espectro infrarrojo del extracto acuoso se puede establecer que el detectado a los  $2940\text{ cm}^{-1}$  es característico de los alcanos (C-H) presente en la mayoría de las estructuras orgánicas y los picos encontrados entre los  $1080 - 1060\text{ cm}^{-1}$  y entre los  $990$  y los  $830\text{ cm}^{-1}$  son típicos de la unión C-O que encontramos en los grupos alcoholes (C-OH) presentes en los flavonoides.

En el extracto alcohólico los picos detectados en  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $1615 - 1610\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080 - 1060\text{ cm}^{-1}$  y una banda en los  $2940\text{ cm}^{-1}$  se deberían a los múltiples compuestos, detectados en el tamizaje fitoquímico, que absorben a esas longitudes de onda, como los compuestos fenólicos, las cumarinas (compuestos aromáticos), clorofila (enlaces C=C) y los terpenoides. Todos estos compuestos detectados también en el tamizaje fitoquímico, mientras que las diferencias con respecto del espectro infrarrojo del extracto acuoso detectadas cerca de los  $1720\text{ cm}^{-1}$  y los  $1630\text{ cm}^{-1}$  son peculiares de los ésteres ( $\text{COO}^-$ ) que se encuentran conformando la estructura de las cumarinas y clorofila y el pico a los  $2850\text{ cm}^{-1}$  es típico también de los alcanos que son abundantes en los terpenos y esteroides detectados también en el tamizaje fitoquímico.

El pico encontrado a los  $3400\text{ cm}^{-1}$  en el extracto hexánico podría deberse a algunos flavonoides del tipo apolar, pero como no se realizaron pruebas de este tipo en el tamizaje fitoquímico del extracto hexánico no se podría confirmar este hecho y el pico encontrado a los  $1630\text{ cm}^{-1}$  correspondería a la clorofila debido a sus grupos ésteres ( $\text{COO}^-$ )

No se encontró un espectro infrarrojo de otra especie de la familia, a pesar de ello se comparo un espectro infrarrojo de un extracto alcohólico de *L. nobilis* el que no mostro grandes diferencias a diferencia de lo que había sucede en la comparación entre las cromatografías en capa fina esto podría deberse a que los extractos pueden tener diferentes compuestos pero estos estar formado por grupos funcionales similares.

En cuanto a la comparación se puede establecer que las diferencias puntuales encontradas no son suficientes como para establecer al espectro infrarrojo como un patrón de identificación para la especie menos para identificar un cultivar por sobre otro, pero a pesar de todo esto es importante ahondar en el tema y comparar contra otras especies donde quizás si se encuentren diferencias más significativas.

### **7.3.3.- Ensayos químicos cuantitativos.**

#### **7.3.3.1.- Cuantificación de compuestos fenólicos totales.**

La composición genética del germoplasma y su posterior expresión afecta la composición química de la materia prima vegetal (Vázquez et al. 2006), esto podría ser una de las razones por la cual cv. Edranol posee una mayor cantidad de compuestos fenólicos y cv. Fuerte el que posee la menor cantidad, ya que estas materias primas al igual que cv. Hass y como se ha recalado con anterioridad son híbridos en diferentes proporciones entre la raza mexicana y la raza guatemalteca (Bender, 2000; Mandemaker, 2007). Por otro lado la fecha de recolección, el lugar y la presión ambiental también afectan la concentración de los metabolitos secundarios, ya sea aumentando o disminuyendo, encontrando en este último punto estímulos como la temperatura, infecciones, sequía y la radicación solar que pueden afectar la expresión de diferentes enzimas involucradas por ejemplo en la síntesis de flavonoides (Saslowky, 2000), esto podría explicar el porque cv. Edranol posee una mayor concentración de compuestos fenólicos totales, puesto que al poseer un crecimiento menor y en forma erecta en comparación con cv. Fuerte que posee un crecimiento mayor y más extendido, muy similar al cv. Hass, por lo mismo existiría una exposición al sol por

parte de las hojas de cv. Edranol mucho mayor que las hojas del cv. Fuerte, que al poseer un gran crecimiento muchas veces las ramas de la copa tienden a tapar a las hojas más cercanas a la base. Este punto no se pudo comprobar en el análisis microscópico, puesto que de haberse visto muy afectada la hoja, al no recibir suficiente radiación solar, se hubiese observado un parénquima fotosintetizador reducido, inclusive con un solo estrato en vez de dos (Morales et al. 1992). Esto sí se observó y que concuerda con lo obtenido es la mayor cantidad de compuestos polares extraíbles en solventes polares por parte de cv. Edranol y en menor cantidad por parte de cv. Fuerte.

Finalmente hay que tener en cuenta que el método de cuantificación es inespecífico y que puede sobrevalorar la cantidad de compuestos fenólicos totales especialmente si existen compuestos glicosilados o taninos condensados (Waterhouse, 2002) como es en este caso, sin embargo es difícil medir cada compuesto por separado, puesto que cada familia de compuestos que conforman este grupo tienen sus longitudes de onda máxima de absorción características en el espectro ultravioleta-visible, por lo que hay que tratar los valores con sumo cuidado.

#### **7.3.3.2.- Cuantificación de taninos.**

Al igual que en el análisis anterior una de las razones por la que podría deberse la diferencia en taninos, podría ser la diferencia genética que existe entre los cultivares, lo que podría traducirse en una mayor expresión de genes que codifican para enzimas sintetizadoras (Vázquez et al. 2012), por lo que estaría pasando en el caso de cv. Edranol y cv. Fuerte que posee un mayor porcentaje de taninos. Ahora dejando de lado el fenotipo del cultivar se ha encontrado que la relación con el ambiente es muy importante en la síntesis de taninos, especialmente su relación con la defensa contra herbívoros, ya que entre más se vea afectadas las hojas por depredadoras más sintetiza taninos (Doll et al. 2012), a raíz de esto entonces lo que podría estar pasando es que las hojas de cv. Fuerte y cv. Edranol sean más atractivas que las del cv. Hass. Además cabe mencionar que el almacenamiento de los taninos es en las hojas, esto haría a pensar que cv. Fuerte al poseer una lámina mayor podría acumular una mayor cantidad de estos compuestos

fenólicos, pero no explicaría porque cv. Edranol posee una mayor cantidad que cv. Hass y una cantidad similar a cv. Fuerte. Lo anterior tampoco se pudo comprobar en el análisis microscópico de cv. Fuerte, pues no se encontró ningún patrón que pudiera estar advirtiendo de ante mano, que se iban a encontrar más taninos, ya que no se observó ninguna célula idioblástica que pudiera estar indicando su presencia.

Al analizar la sumatoria tanto de los compuestos no adsorbibles como de los taninos estos coinciden con lo encontrado en la cuantificación de compuestos fenólicos totales en que existe un predominio por parte de cv. Edranol, en desmedro de cv. Fuerte y cv. Hass, además esto demuestra que cv. Fuerte posee una mayor proporción de taninos conformando la totalidad de compuestos fenólicos que los otros cultivares, ya que posee la misma cantidad de taninos que cv. Edranol pero cv. Edranol es mayor en compuestos fenólicos no adsorbibles y totales. Una de las posibles razones podría deberse a la expresión genética o principalmente al mayor contacto con la radiación solar y que

No se encontró en la bibliografía consultada algún estudio donde se compararan estos cultivares o se cuantificaran taninos. No obstante, se encontró algunos estudios donde solo detectan su presencia como en el caso de Salazar et al. (2007).

Finalmente hay que tener en cuenta al igual que el método anterior es inespecífico (Waterhouse, 2002), ya que utilizan el mismo método y además consideran solo los taninos hidrolizables, puesto que los taninos condensados quedan retenidos en el residuo de la extracción, debido a que son polímeros mayoritariamente formados por catequinas o epicatequinas que pueden llegar a poseer un peso molecular cercano a los 500 g/mol, lo que genera su precipitación (Arranz, 2010), por eso hay que tratar los valores con sumo cuidado.

### **7.3.3.3.- Cuantificación de flavonoides totales.**

La radiación solar afecta la expresión genética y es uno de los limitantes en la síntesis de enzimas que actúan en las primeras etapas en la síntesis de flavonoides que afectarían directamente el contenido de compuestos fenólicos totales (Saslowsky, 2000; Amallesh et al. 2011; Doll et al. 2012), por tanto y como se dijo anteriormente cv. Edranol al poseer un crecimiento erecto y no de una alta densidad con relación a los otros dos cultivares generaría este predominio por en cuanto a los compuestos fenólicos, aunque no hay que dejar de lado el componente genético, que podría explicaría por ejemplo que cv. Fuerte al encontrarse más alejado genéticamente con respecto de los otros cultivares, pues posee en su germoplasma con mayor cantidad de genes pertenecientes a la raza mexicana, podría estar causando que sea el cultivar con menor cantidad de flavonoides.

Ahora al relacionar estos datos con el ensayo de taninos, sabiendo que fueron extraídos en solventes distintos, se podría establecer una relación en cuanto a que en la cuantificación de taninos cv. Hass presento una menor cantidad, pero ahora se encuentra como uno de los mayores, esto podría deberse a que cv. Hass presenta en su totalidad de compuestos fenólicos un predominio de flavonoides, siendo por esto que da un valor mayor y para cv. Fuerte sería lo contrario y comprobaría el predominio de los taninos en cuanto a su cantidad de compuestos fenólicos totales.

### **3.4.- Cuantificación de rutina, quercetina y apigenina por HPLC.**

El proceso de hidrólisis permite simplificar el análisis al resultar compuestos mas simples y permite hacer una limpieza previa al extracto antes de ser analizado en el equipo (Waksmundzka y Sherma, 2011), en este caso particular es bien sabido que la apigenina posee una gran capacidad de generar enlaces con los azúcares al igual que la quercetina, de hecho la rutina es una quercetina glicosilada con una rutinosa (disacárido) (Wagner y Bladt, 2009) y que tras un proceso de hidrólisis se transforma casi en un 100% en quercetina (Wang et al. 2011), por lo tanto

al no detectar la rutina sin previo proceso de hidrólisis se dio por descartada su presencia y luego del proceso la apigenina no apareció, por consiguiente tampoco existían glicósidos de apigenina a diferencia de la quercetina, esto confirma que en la TLC con estándar de rutina, las señales cercanas al estándar aportadas por las muestras no son rutina y también confirma que en el caso de la TLC con estándar de apigenina y quercetina era necesario un proceso previo de hidrólisis, en este caso para detectar la quercetina presente en la muestra.

Al igual que como se dijo con anterioridad y puesto que este ensayo se encuentra de alguna forma contenido en el ensayo de los flavonoides totales es que la influencia de la carga genética de cada cultivar y la presión del ambiente, ya sea la temperatura y/o el contacto con la radiación solar (Saslowsky, 2000; Amallesh et al. 2011; Doll et al. 2012), por lo mismo es que cv. Edranol mantiene nuevamente su predominancia en la cantidad del compuesto evaluado dejando a cv. Hass en un segundo lugar, a pesar que en la cuantificación de flavonoides totales resultaran sin diferencias significativas, esto podría deberse a que cv. Hass puede tener en su fitocomplejo una mayor cantidad de otros flavonoides que en la sumatoria se equiparen con cv. Edranol. También cabe destacar que cv. Edranol tendría una mayor cantidad de compuestos glicosilados que los otros dos cultivares, debido a que luego del proceso de hidrólisis termina con una diferencia mayor que cuando no se realiza el proceso de hidrólisis.

Con respecto de los datos de quercetina sin hidrólisis, las diferencias significativas observadas no se traducen en una gran diferencia en cantidad, de hecho están muy cercanas, las diferencias se notan mucho más luego del proceso de hidrólisis, ya que este proceso libera a la quercetina, que pese a que no se haya encontrada como rutinósido, puede estar formando enlaces con ramnosa, glucosa, galactosa, entre otras (Wagner y Bladt, 2009). No obstante los datos obtenidos luego del proceso de hidrólisis fueron mucho más dispersos y con una menor repetibilidad, tal vez en algunas muestras fue insuficiente la cantidad de agente antioxidante ocupado, lo que hizo que variara la cantidad total de quercetina, por tanto en futuros estudios será necesario ahondar en este punto. Otro punto que pudo haber afectado estos datos fueron los

cambios de pH primero en la hidrólisis y luego en llevarlo a un pH que no afectara la columna del cromatógrafo.

En cuanto a la bibliografía consultada destaca el estudio realizado por Owolabi et al. (2010) en el cual si se detecta rutina y apigenina a diferencia de este estudio, esto se podría deber primero a que este autor no define el cultivar con el cual realiza el análisis y segundo utiliza una metodologías distintas, puesto que la cantidad de muestra que ocuparon fue alrededor de 1,5 kg mientras que en este estudio se utilizó 5 g, además Owolabi et al. desarrollan una serie de extracciones sucesivas generando tal vez una mejor extracción, aunque finalmente en su análisis ellos detectan los flavonoides en el extracto etanólico.

#### **7.4.- Elaboración de la monografía**

Las pruebas de valoración son muy importante dentro de la monografía farmacopeica, más aún, para las materias primas herbarias, pues están compuestas por una gran cantidad de metabolitos que se encuentran formando matrices complejas y debe valorar de una forma veraz el contenido de aquel metabolito o marcador activo que servirá para determinar una materia prima (Real Farmacopea Española, 2005), es por consiguiente que los compuestos fenólicos totales al ser un ensayo inespecífico no se consideró como una prueba de valoración al igual que el contenido de flavonoides por HPLC, pues no detectó la presencia de dos de los tres flavonoides analizados, siendo por lo mismo muy poco influyente como para afectar una decisión y el contenido de taninos, el cual es un ensayo que no posibilita determinar la totalidad de los taninos y que al igual que los compuestos fenólicos totales en un ensayo inespecífico, mientras que el ensayo de los flavonoides totales es más exacto y cuantifica la totalidad de estos, por lo que parece adecuado su utilización como una prueba de valoración.

La decisión de separar los cultivares en dos monografías según el ensayo de los flavonoides totales parece acertado pues el cv. Fuerte posee una mayor proporción de taninos totales, los cuales han sido asociados con la cicatrización (Vázquez et al. 2012), lo que podría ser

importante en el tratamiento de las úlceras y que es una de las propiedades que se le asigna a la hoja de *P. americana*, por lo tanto sería interesante ahondar en ese tema y además otra cualidad por la que parece acertado dejar a cv. Fuerte separada es por poseer una mayor cantidad de aceites esenciales.

A pesar de la importancia de la prueba de valoración no hay que olvidar los resultados de las otras pruebas desarrolladas, puesto que son necesarias para un buen desarrollo de la estructura de la monografía, pues en las monografías farmacopeicas resaltan otros puntos de importancia partiendo por el título, los ensayos generales y los ensayos de identificación, resaltando en este último punto que tanto los ensayos macroscópicos, microscópicos, el tamizaje fitoquímico orientado hacia la identificación de los flavonoides y la TLC que se utilizaron como patrones comunes para los tres cultivares, ya que no mostraron diferencias, pero si se logro con el cromatograma por HPLC, ya que este si mostro una diferencias entre cv. Fuerte y los otros dos cultivares por lo que se justifica aun más que cv. Fuerte haya quedado como una monografía particular.

## 8. CONCLUSIONES

1. La materia prima de los tres cultivares analizados tuvo una calidad homogénea.
2. La descripción macroscópica de la hoja de *P. americana* debe ser en particular para cada cultivar.
3. Las características macroscópicas se pueden considerar como un mejor patrón de identificación para la hoja de los cultivares estudiados que las características microscópicas.
4. Los ensayos químicos de identificación no permitieron generar un patrón de identificación para los cultivares, pero si para la hoja de *P. americana*.
5. El componente genético y la presión del ambiente generarían más diferencias entre los cultivares en los ensayos cuantitativos que en los ensayos cualitativos.
6. Las características de los cultivares son peculiares de la fecha y el lugar de donde se recolectaron las hojas.
7. Se rechaza la hipótesis inicial pues no todos los cultivares estudiados presentaron diferencias significativas en la cuantificación de flavonoides totales, por tanto se elaboraron dos monografías.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adeboye J, Fajonyomi M y Taiwo J. 1999. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. *Phytotherapy*. 70:15-20.
- Adeyemi O, Okpo S y Oguntin O. 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. *Phytotherapy*. 73:375-380.
- Adriazola C. Efecto de la carga frutal de árboles de paltos (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en alta intensidad, sobre la floración y cuaja de la temporada siguiente. Tesis para optar al título de Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, 2007
- Agomuo E, Amadi B y Duru M. 2010. Some biochemical studies on the leaves and fruits of *Persea americana*. *IJRRAS*. 11(3):556-560.
- Aguilar G. Determinación de la actividad hipoglucemiante de *Phoradendron tormentosum* Engelm, sobre un modelo de ratas diabéticas de experimentación. Tesis para optar a la maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, 2001.
- Alonso J. 1998. Tratado de fitomedicina, bases clínicas y farmacológicas. Editorial Isis, Buenos Aires, 183-186 pp.
- Álvarez N y Martínez J. 2003. Algunos procedimientos para asegurar la calidad de los medicamentos herbarios. *BLACPMA*. 3(1):1-7.
- Amalesh S, Gouranga D y Kumar S. 2011. Roles of flavonoids in plants. *Int. J. Pharm. Sci. Tech.* 6(1):12-35.
- Andersen M y Markham K. 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway, New York, 143-148 pp.
- Arambarri A, Freire S, Colares M, Bayón N, Novoa M, Monti C y Stenglein S. 2006. Leaf anatomy of medicinal Shrubs and trees from gallery forest of the Paranaense Province (Argentina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 41(3-4):233-268.
- Antia B, Okokon J y Okon. 2005. Hypoglycemic activity of aqueous *Persea americana* Mill. *Indian J. Pharmacol.* 37:325-326.

Arango A. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Tesis para optar al doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia, 2002.

Arranz S. Compuestos polifenólicos (Extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis para optar al doctorado en Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de bromatología II, 2010.

Arukwe U, Amadi B, Duru M, Agomuo E, Adindu E, Odika P, Lele K, Egejuru L y Anudike J. 2012. Chemical composition of *Persea americana* leaf fruit and seed. IJRRAS. 11(2): 346-349.

Avello M, Canales C, Gatica C, Bustos E, Brieva A, Pastene E y Bittner M. 2012. Efectos antimicrobianos de extractos de plantas chilenas de las familias Lauraceae y Atherospermataceae. Rev. Cubana. Plant. Med. 17(1):73-83.

Bandoni A. 2011. Evaluación farmacopeica de la calidad de drogas vegetales y productos relacionados. Estado actual en las farmacopeas argentina y brasilera. Dominguezia. 27(2):35-56.

Barrientos A y Rodriguez J. 1994. Hass avocado plants response under drought conditions. Revista Chapingo serie Horticultura. 1(2):191-198.

Belmar R. Variación estacional de la concentración de aceite y humedad de la pulpa, y calidad en frutos de palto (*Persea americana* Mill.) cvs. Bacon y Edranol. Tesis para optar al título de Agrónomo, Universidad Católica de Valparaíso, Chile. 1996.

Bender G. 2000. Avocado botany and commercial cultivars grown in California. Botany book, 19-24 pp.

Benezer M. Análisis de estrés oxidativo en aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) en respuesta a la infección por *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis para optar a maestro de Ciencias en Biología Experimental. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2008.

British Pharmacopoeia Commission. 2009. British Pharmacopoeia. Market Towers, Elms Lane, London.

Busse W. 2000. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. J. Drug information. 34:15-23.

Calabrese F. 1992. El aguacate. 1<sup>st</sup> ed. Editorial Mundi-Prensa. España, 249 pp.

Cañigueral S. 2002. La fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? Revista de Fitoterapia. 2(2):101-121.

Cañigueral S. 2006. Las monografías de calidad, seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales. Revista de Fitoterapia. 6(S1):25-29.

Carrillo C. Almacenaje de frutos de palto (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte en atmósfera controlada. Tesis para optar al título de agrónomo, Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, Chile. 1991.

Castillo A, Colinas M, Ortega M, Martínez A y Avitia E. 1998. Variación estacional de carbohidratos en hojas e inflorescencias de aguacatero (*Persea americana* Mill.). Revista Chapingo serie horticultura. 4(1):13-18.

Ceballos S. Preservación de palta (*Persea americana* Mill.) variedad Fuerte, mediante el uso de aditivos químicos y bajas temperaturas. Tesis para optar al título de licenciado en Agronomía. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, 1977.

Chaparro D y Rosas C. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural la Montaña del Ocaso, Quimbaya- Quindío. Tesis para optar al título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, carrera de Microbiología Industrial. 2006.

Chartzoulakis K, Patakas A, Kofidis G, Bosabalidis A y Nastou A. Water stress affects leaf anatomy, gas Exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. Scientia Horticulturae. 95:39-50.

Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2001. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud, México D.F.38, 44 pp.

Coutinho D, Agra M, Basílio I y Barbosa J. 2006. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo. Braz J. Pharmacogn. 16(4):537-544.

Cushnie T y Lamb A. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents. 26:343-356.

De Almeida A, Miranda M, Simoni I, Wigg M, Lagrota M, y Costa S. 1998. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* leaf infusión. Phytotherapy. 12:562-567. Gardiazabal F. 1998. Floración en paltos. Seminario internacional de paltos, Viña del Mar, Chile, 51-72 pp.

Díaz R. Efectos de la aplicación al follaje de cuatro dosis de paclobutrazol sobre el rendimiento, crecimiento vegetativo y características de los frutos de palto (*Persea americana* Mill.) cvs. Fuerte y Edranol. Tesis para optar al título de agrónomo, Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Chile, 1994.

Dinoiu V, Vasilescu M, Latus A y Lungu L. 2011. The fluorescence and UV-Vis absorption spectra of some plant extracts in etanol and in polymeric pluronic L64 micelles. Rev. Chim. (Bucharest). 62(4):396-400.

Doll U, Rodríguez I, Soto C y Razmilic I. 2012. Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hoja de dos procedencias de *Ungi molimae* de la región del Maula (Chile). Bosque. 33(2):203-209.

Enciso E y Arroyo J. 2011. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less. en un modelo experimental en ratas. An. Fac. Med. 72(4):231-237.

European Pharmacopoeia. 2008. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> ed. Coincil of Europe, cop. Strasbourg.

Evans W. 1991. Farmacognosia: Trease y Evans. 13<sup>th</sup> ed. Editorial Interamericana, Madrid.

Flores A, Prieto E, De Los Ríos E y Ruiz S. 2001. Estudio farmacognóstico y fitoquímico de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo – Región Junín. Perú. Rev. Med. Vallejiana. 5(1):50-64.

Gallegos C, Valdez R, Barrón M, Barrientos A y Nieto R. 2006. Caracterización morfológica de 40 cultivares de nopal de uso como hortaliza del banco de germoplasma del Crucen-UACH. Revista Chapingo serie horticultura. 12(1) 41-49.

Gardiazabal F. 1998. Floración en paltos. Sociedad Gardiazábal y Magdahl. Seminario internacional de paltos. Viña del Mar 4,5 y 6 de noviembre 1998. 57-72 pp.

Gardiazabal F. 2001. Historia y desarrollo del palto en Chile. California avocado society. 85:93-112.

García E y Fernández I. 2002. Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de alimentos, España.

Gómez R, Arzate C, Quintanilla R, Tamez P, Tamez R, Monreal E y Rodriguez C. 2008. Antimicrobial activity of *Persea americana* Mill. and *gimnosperma glutinosum* (Spreng.) Less

(Asteraceae) leaf extracts and active fractions against *Mycobacterium tuberculosis*. AEJSR. 3(2):188-194.

González A. Caracterización histológica y evaluación de campo de ápices terminales provenientes de distintos flush de crecimientos vegetativo de palto (*Persea americana* Mill.) en los cultivares Hass y Fuerte. Tesis para optar al título de agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Chile, 1994.

González F. Efecto de la fertilización con N-P-K-Ca en palto (*Persea americana* Mill.) cv. Hass sobre su desarrollo, productividad y postcosecha. Tesis para optar al título de Agrónomo. Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, Chile, 2002.

Gupta M. 1995. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Convenio Andrés Bello. CYTED. Editorial Presencia Ltda. Santa Fe de Bogotá, 341-345 pp.

Hervet W, Gonzalez L y Payo A. 2006. Metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana de *Pluchea carolinensis*. Rev. Cubana. Farm. 40(2):12-28.

ISO 14502-1. 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.

Juárez M. Estudio preliminar de la composición esterooidal del ofiuroideo *Ophiocoma aethiops*. Tesis para optar al título de Biólogo Marino. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, Oaxaca. 2011.

Kumar Saravana y Kumar Sunil. 2012. Importance of traditional system of medicine – a review. J. of Phytotherapy. 2(1):1-6.

Lemus G, Ferreyra R, Gil P, Sepúlveda P, Maldonado P, Toledo C y Barrera C. 2010. El cultivo del palto. Instituto de investigaciones agropecuario. Boletín N° 129.

Lock O, Cabello I y Doroteo V. 2006. Análisis de flavonoides en plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Perú, 1-11 pp.

Lombard K, Peffley E, Geoffriau E, Thompson L y Herring A. 2005. Quercetin in onion (*Allium cepa* L) after heat-treatment simulating home preparation. J. Food. Compos. Anal. 18:571-581 pp.

López G, Medina R, Guillén A, Ramírez G, Aguilar J y Valdivia M. 2007. Características fenotípicas de hoja y fruto en selecciones de aguacate criollo de clima subtropical en el estado de Nayarit. Revista Fuente Año 4. 10:56-62.

Madrid C, Madrid V y Moreno G. 2003. Análisis de vinos, mostos y alcoholes. 1<sup>st</sup> ed. Editorial Mundi-Prensa, 258-259 pp.

Mandemaker A. 2007. Photosynthesis of avocado. NZ Avocado Growers' Association. 7:1-10.

Mena F. 2004. Fenología del palto, su uso como base del manejo productivo. 2° seminario internacional de paltos, Quillota, Chile, 1-8pp.

Miller P. 1754. The Gardeners Dictionary. 4th ed. Londres.

Ministerio de Salud Chile. 2009. Medicamentos herbarios tradicionales. 1<sup>st</sup> ed. Minsal, Santiago, Chile, 5, 6, 141 pp.

Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005. Real Farmacopea Española. 3<sup>th</sup> ed. Boletín oficial del Estado, Madrid, España, 19-291 pp.

Morales Miguel y Morales Juan. 2009. Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina (fitoterapia moderna y racional) basada en la evidencia científica. Sociedad chilena de fitoterapia (SOCHIFITO). 1-7 pp.

Morales D, Jiménez M, Wagner J y Larcher W. 1992. Caracterización morfológica e histológica de las hojas de sol y sombra de *Persea indica* (L) Spreng. y *Persea americana* Mill. Vieraea. 21:61-76.

Muñoz F. 1996. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Editorial Mundo-Prensa, Barcelona, 315-325 pp.

Muñoz O, Montes M y Wilkomirsky T. 2004. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. 2<sup>nd</sup> ed. Editorial Universitaria, San Miguel, Santiago de Chile, 175-176 pp.

Nogales G. 2004. Medicina alternativa y complementaria. Rev. Chil. Neuro-Psiquiatr. 42(4):243-250.

Nuñez C. 2008. Extracciones con equipo soxhlet. Cenunez.com.ar.

Ojewole J y Amabeoku. 2006. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) leaf aqueous extract in mice. Phytotherapy. 20:696-700.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Traditional medicines: Global situation, issues and challenges. 3<sup>th</sup> ed. OMS, Ginebra, Suiza. 1-9 pp.

Olawale F. 2007. Phytochemical screening and mineral contents of leaves of some nigerian woody plants. Res. J. Phytochem. 1(1):33-39.

Osorio E. 2009. Aspectos básicos de farmacognosia. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, 13-20 pp.

Owolabi M, Coker H y Jaja S. 2010. Bioactivity of the phytoconstituents of the leaves of *Persea americana*. J. Med. Plant. Res. 4(12):1130-1135.

Pajan M, Villalón C, Escalona J, Bordies A y Valdés R. 2002. Determinación de los posibles tipos de flavonoides presentes en el limo medicinal, materia prima. Revista cubana de química. 14(3)16:23.

Pallazzo M, Agius B, Wright W, Moriarity D y Setzer W. 2008. Chemical compositions and cytotoxic activities of leaf essential oils of four Lauraceae tree species from Monteverde, Costa Rica. Rec. Nat. Prod. 3(1):32-37.

Palici I. 2005. Método para la determinación cuantitativa de polifenoles y taninos de productos vegetales. Seria F Quimica 8(2):21-32.

Parodi L. 1959. Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería. Editorial Acme, Buenos Aires, Vol. 1 discusión de las plantas cultivadas, 374-378 pp.

Pasto D y Johnson C. 2003. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverte S.A, Barcelona, 91-119 pp.

Ravindran P, Nirmal K y Shylaja M. 2004. *Cinnamon and Cassia*. Editorial CRC Press, London, 14-30 pp.

Rincón C, Sánchez J y Espinosa F. 2011. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) d los bancos de germoplasma INIFAP-Michoacán. Revista Mexicana de biodiversidad. 82(1)19-49.

Rivera D. 2002. El contexto etnobotánico mediterráneo y la fitoterapia. Revista de Fitoterapia. 2(1):47-55.

Ruíz S, Venegas E, Chávez M y Eustaquio C. 2010. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. UCV – Scientia. 2(2):11-22.

Sagredo L y Bartley P. 1995. Volatile components of avocado leaves (*Persea americana* Mill.) from the Mexican race. J. Sci. Food. Agric. 67:49-51.

Saieg D. Evaluación del comportamiento reproductivo y vegetativo del palto (*Persea americana* Mill.) cv. Hass, en función de la carga frutal presente. Tesis para optar al título de Agrónomo, Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 2006.

Salazar A, Pereañez J, Quintana J, Jiménez S y Rey J. 2007. Análisis fitoquímico preliminar e inhibición de los efectos hemolíticos, proteolíticos y coagulantes del veneno de *Bothrops asper* con extractos etanólicos obtenidos del aguacate. III Congreso latinoamericano del aguacate. Colombia 33-47 pp.

Samaniego J. 1999. Crecimiento y producción de cuatro cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill.), en el sur de Sonora México. Revista Chapingo serie horticultura. 58:61-66.

Sandoval E. 2005 Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 97 pp.

Saslowsky D. Molecular genetics and subcellular localization of flavonoid metabolism in *Arabidopsis*. Tesis para optar a doctor en biología, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2000.

Sharapin. 2000. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. Revista de Fitoterapia. 1(3):197-203.

Silveira D, Taylor P y Martínez J. 2010. Regulation herbal medicine. BLACPMA. 9(3):151-152.

Sotomayor C. 1996. Todo lo que usted desea saber sobre: El palto. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile, Santiago, 299-316 pp.

Spiess C. 2004. La industria de la plata en Chile. 2º Seminario Internacional de Paltos, Valparaíso, Chile.

Suwanvijitr T, Kaewmuangmoon J, Cherdshewasart W y Chanchao C. 1997. Morphometric and genetic variation in *Pueraria mirifica* cultivars across Thailand. Pak. J. Bot 42: 97-109.

Tamayo R, Verdecia E y Tamayo I. 2011. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, étereo y acuoso de las hojas y tallo de *Isocarpha cubana* B. *Multimed* 15(3).15-26.

Tamayo V, Cordoba O y Londoño M. 2008. Tecnología para el cultivo del aguacate. 1<sup>st</sup> ed. Produmedios, Colombia, 11-48 pp.

Taiz, L y Zeiger E. Fisiología vegetal. Editorial Universitat Jaume I, Vol. I, 861-890 pp.

Ude G, Kenworthy W, Costa J, Cregan P y Alvernaz J. 2003. Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America and North American ancestral line determined by amplified fragment length polymorphism. *Crop Science* 43:1858-1867.

Upton R, Graff A, Jolliffe G, Langer R y Williamson E. 2011. Botanical Pharmacognosy. American Herbal Pharmacopoeia. CRC Press, Sound Parkway, New York.

Ukwe C y Nwafor S. 2004. antiulcer activity of aqueous leaf extract of *Persea americana*. *Niger. J. Pharmacol. Res.* 3:91-95.

Vázquez A, Álvarez E, López J, Wall A y De La Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua.* 7(2):84-93.

Verma S y Singh S. 2008. Current and future status of herbal medicines. *Veterinary world.* 1(11):347-350.

Wagner H y Blatt S. 2009. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2<sup>nd</sup> ed. Editorial Springer, London, 195 - 209 pp.

Waksmundzka M y Sherma J. 2011. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. CRC Press, London, 13-20, 109-120, 535-563 pp.

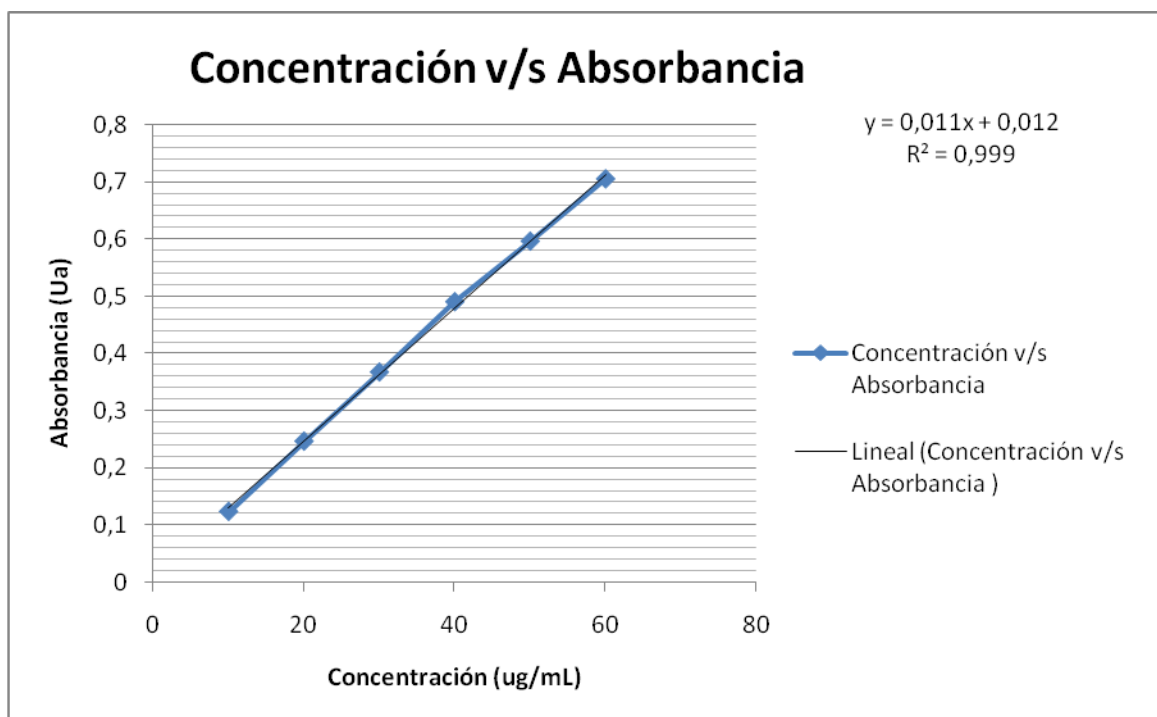
Wang J, Zhao Lu, Sun G, Liang Y, Wu F, Chen Z y Cui S. 2011. A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *African J. of Biotech.* 10(8):1460-1466.

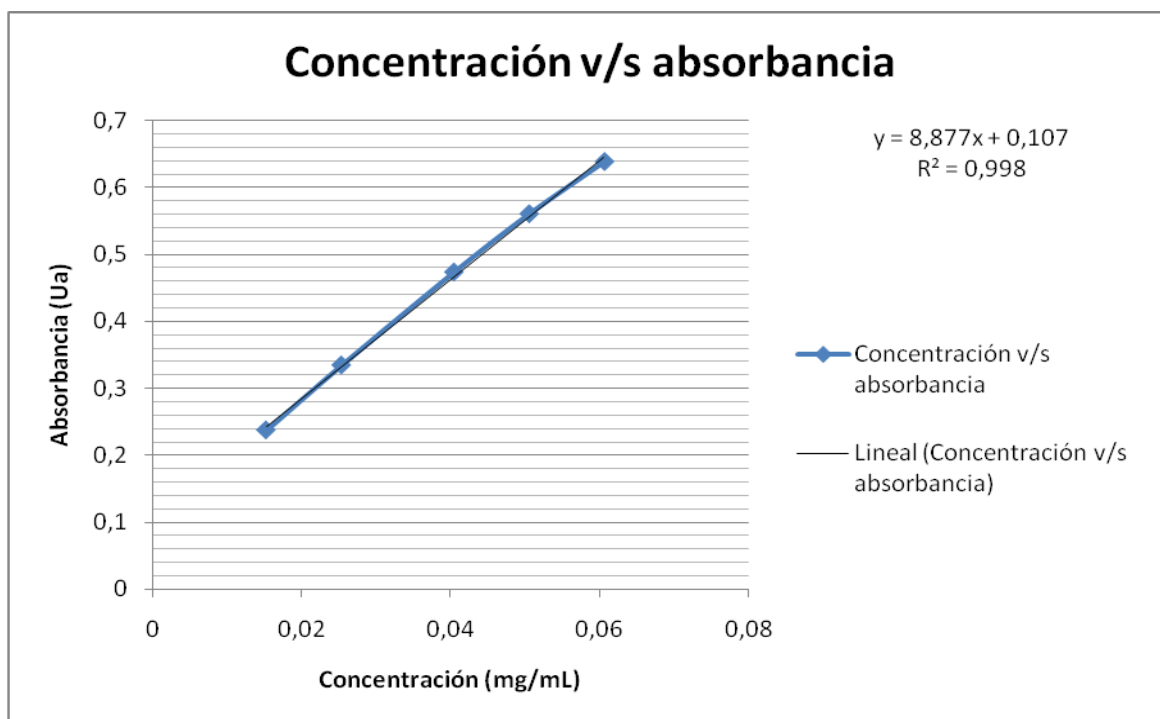
Waterhouse A. 2002. Determination of total phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry (CPFA)*. Editorial John Wiley and Sons, United Kindon, 11. 1.1-11. 1.8.

Zaragozá F, Tofiño M y Oliveira L. 2002. Flavonoides y fitoterapia. *Revista de Fitoterapia.* 2(1):21-32.

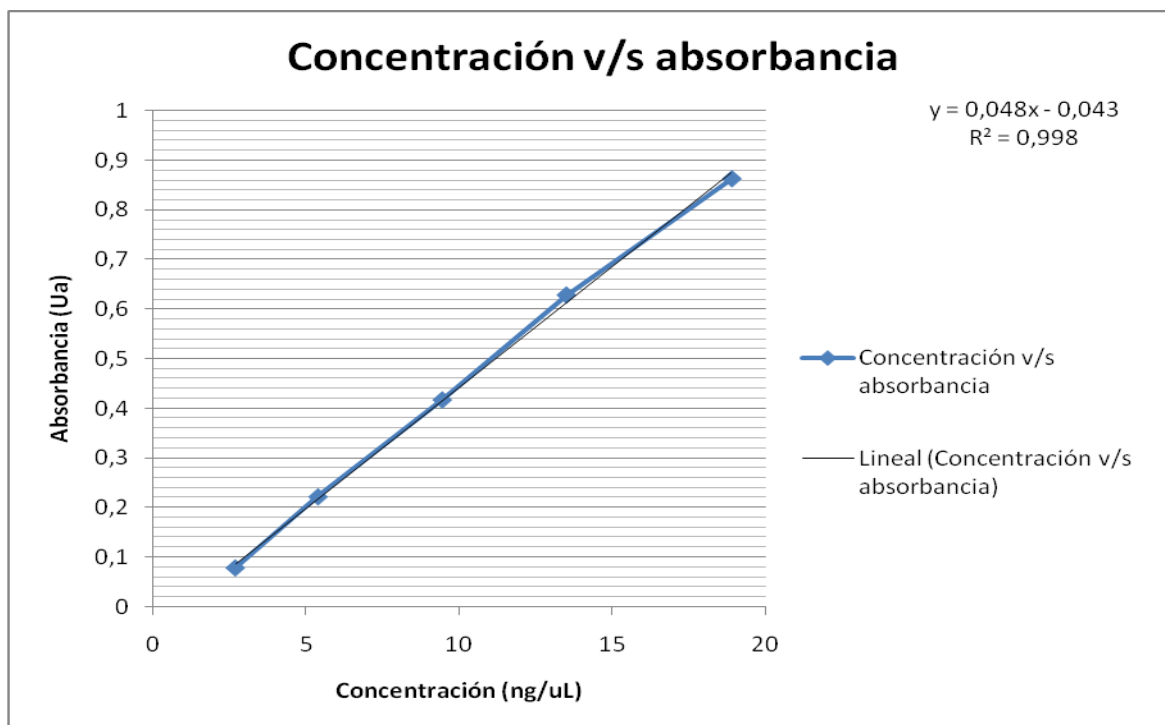
## 10. ANEXOS

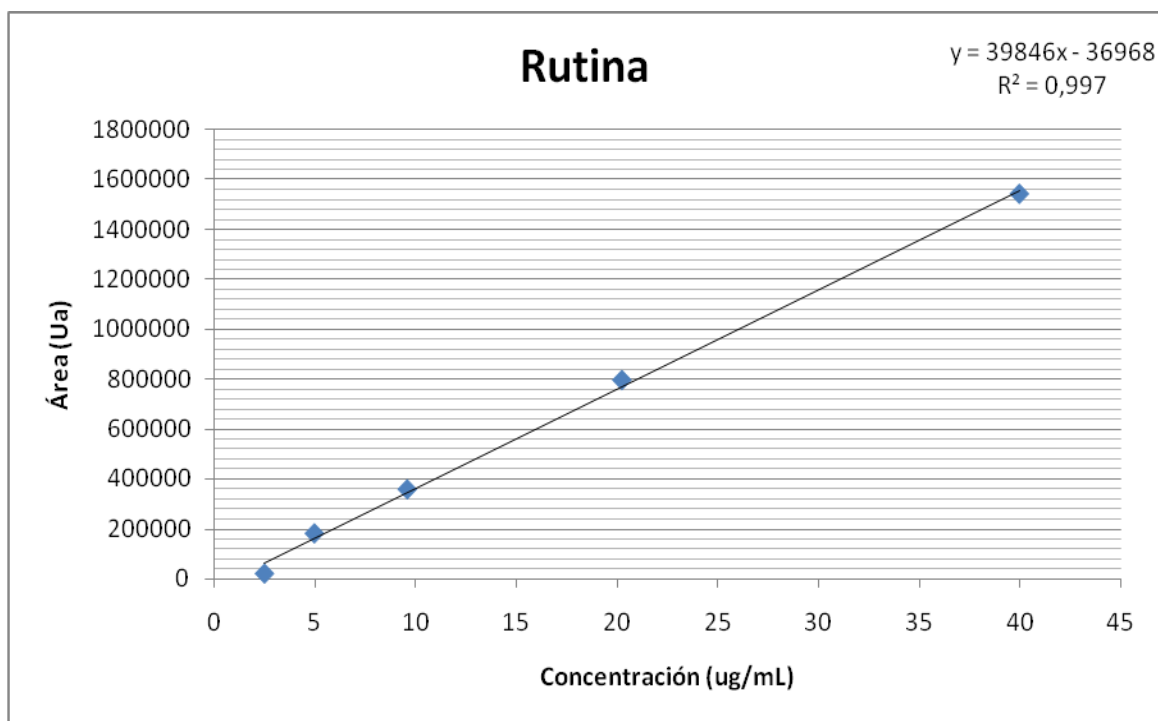
### 10.1.- CURVA DE CALIBRADO ÁCIDO GÁLICO

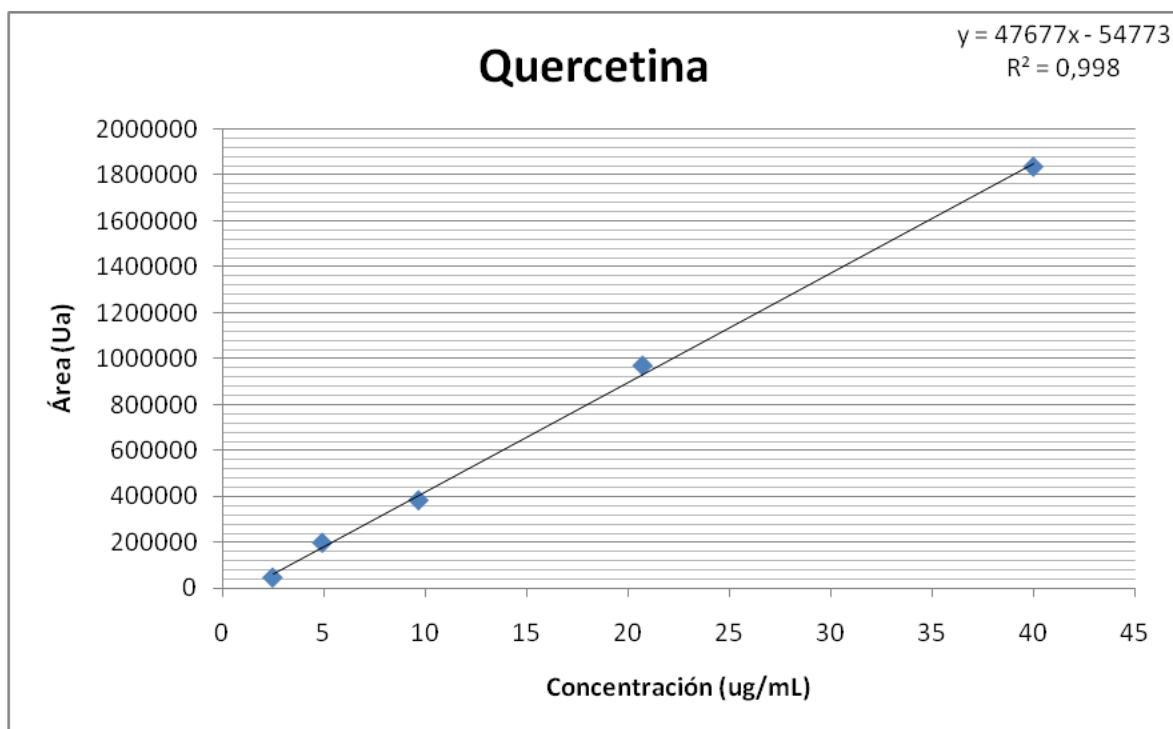


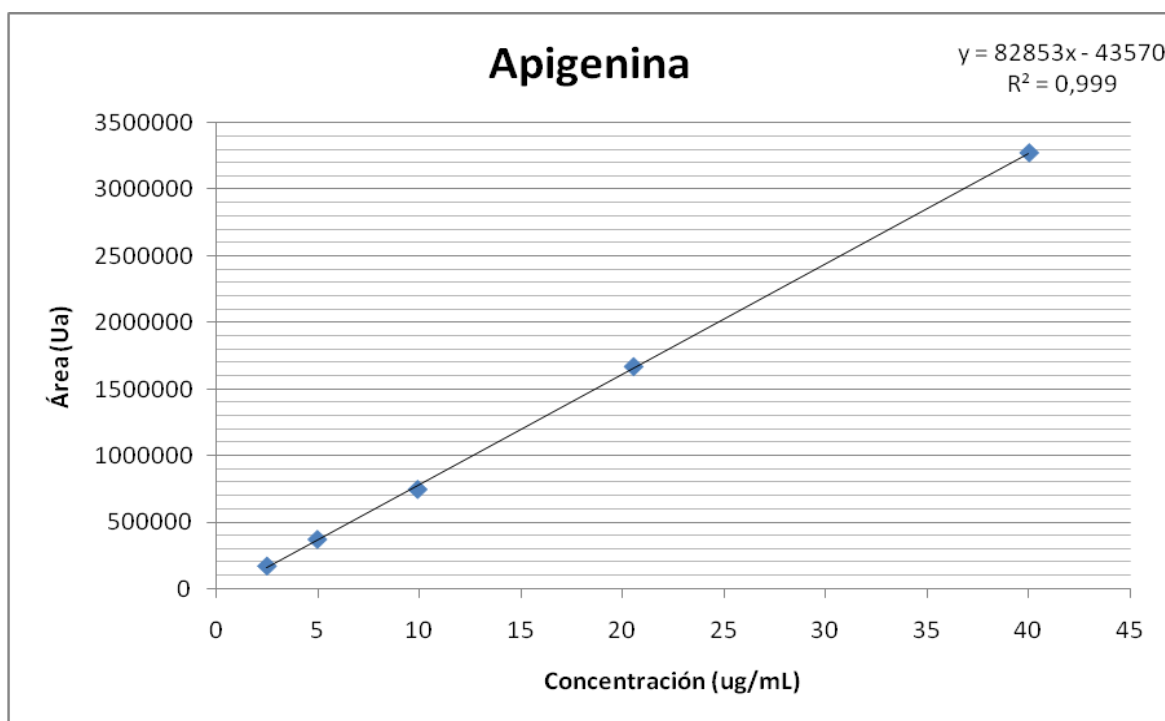
**10.2.- CURVA DE CALIBRADO PIROGALOL**

### 10.3.- CURVA DE CALIBRADO QUERCETINA



**10.4.- CURVAS DE CALIBRADO RUTINA HPLC**

**10.5.- CURVAS DE CALIBRADO QUERCETINA HPLC**

**10.6.- CURVAS DE CALIBRADO APIGENINA HPLC**

## 11. APÉNDICE

### 11.1.- FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS QUÍMICOS

#### **ENSAYOS FARMACOPEICOS GENERALES**

Pérdida por secado: Este ensayo se basa en la pérdida de agua y compuestos volátiles a través de un proceso de secado con aplicación de temperatura cercana a los 105 °C y una posterior determinación gravimétrica entre la muestra antes del proceso secado y luego de ser aplicado el proceso (Real Farmacopea Española, 2005).

Cenizas totales: Este ensayo se fundamenta en la destrucción de la materia orgánica por calcinación y la posterior determinación gravimétrica entre la muestra original y el calcinado (Real Farmacopea Española, 2005).

Cenizas insolubles en ácido: El ensayo tiene como principio la extracción de las cenizas solubles en ácido clorhídrico y la ulterior determinación gravimétrica entre las cenizas totales y el residuo de la extracción de las cenizas solubles (Real Farmacopea Española, 2005).

Materia extraíble: Esta ensayo se basa en la extracción de diferentes componentes de la matriz vegetal a través de la afinidad a un determinado solvente, ya sea por un proceso de maceración o con aplicación de temperatura (Tamayo et al, 2011).

Aceites esenciales: Este ensayo tiene como fundamento el arrastre de los aceites esenciales o volátiles a través de un corriente de vapor de agua (Real Farmacopea Española, 2005).

## **ENSAYOS QUÍMICOS CUALITATIVOS**

Cromatografía en capa fina: Este ensayo se basa en una separación física de los flavonoides, previa a su extracción, dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria o la fase móvil (Wagner y Bladt, 2009).

Tamizaje fitoquímico: Este ensayo se basa en la detección de los metabolitos secundarios de las plantas, a través de reacciones químicas cualitativas que generan un cambio de color, aparición de turbidez o aparición de un precipitado en un extracto de la materia vegetal (Hervet et al, 2006).

A. Ensayos para determinar presencia de alcaloides: El ensayo se basa en la extracción de los alcaloides a través de un medio ácido obteniendo la sal (en el caso del extracto acuoso y alcohólico) o la base (extracto n-hexánico), la que precipita al tomar contacto con metales pesados o yodo (Arango, 2002). Esto permite el reconocimiento de alcaloides.

B. Ensayo de Lieberman-Buchard: Este ensayo se fundamenta en una oxidación secuencial del grupo hidroxilo del anillo esteroidal por parte de un medio ácido, lo que genera un cromóforo el ácido colestá-hexaeno-sulfónico (Juárez, 2011). Esto permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides.

C. Ensayo de Baljet: El ensayo se basa en la formación de un complejo coloreado al reaccionar el núcleo lactónico con el ácido pícrico. Esto permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos, en particular cumarinas (Aguilar, 2001).

D. Ensayo de Sudan III: El ensayo se fundamenta en la afinidad del reactivo de Sudan III por los ácidos grasos en desmedro de los compuestos polares. Esto permite reconocer la presencia de compuestos grasos (Hervet et al, 2006).

E. Ensayo de Bortranger: El ensayo se basa en la reacción entre el grupo hidroxilo de los compuestos derivados del antraceno con el hidróxido de sodio, el cual genera una deslocalización de los electrones (Flores et al. 2001). Esto permite reconocer la presencia de antraquinonas libres.

F. Ensayo de espuma: El ensayo se basa en la capacidad de las saponinas para disminuir la tensión superficial. Esto permite reconocer la presencia de saponinas (Hervet et al. 2006).

G. Ensayo de cloruro férrico: El ensayo se fundamenta en la capacidad del hierro para formar complejos coloreados con compuesto fenólicos. Este ensayo permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos (Hervet et al. 2006).

H. Shinoda: El ensayo se basa en la formación de un complejo coloreado al reaccionar el grupo carbonilo de los flavonoides con el cloruro de magnesio obtenido por la reacción entre el magnesio y el ácido clorhídrico (Pajan et al. 2002).

I. Ensayo con ácido sulfúrico concentrado: El ensayo se fundamenta en la formación de color al reaccionar un ácido fuerte con los flavonoides por deslocalización de sus electrones (Pajan et al. 2002).

J. Ensayos con álcalis: El método se fundamenta en la formación de color al reaccionar una base fuerte con los flavonoide por deslocalización de sus electrones (Pajan et al. 2002).

K. Ensayo de taninos: El ensayo se basa en la presencia de un precipitado al reaccionar los taninos con las proteínas o el cloruro de sodio (Hervet et al. 2006).

L. Ensayo de Rosenheim: El ensayo se basa en la deshidratación del grupo hidroxilo de las antocianidinas o leucoantocianidinas por parte del ácido clorhídrico concentrado, favorecido además por el aumento de la temperatura, lo que produce la ruptura del anillo heterocíclico con la posterior deslocalización de los electrones causando un cambio de color (Ruiz et al. 2010).

## **ENSAYOS QUÍMICOS CUANTITATIVOS**

Cuantificación de compuestos fenólicos totales: Este ensayo es del tipo colorimétrico de punto final y se fundamenta en la formación de un complejo de color azul debido a que el reactivo de Folin-Ciocalteu, compuesto por sulfato de litio, ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, en presencia de compuestos fenólicos y en un ambiente básico, se reduce a óxidos de tungsteno y óxidos de molibdeno. Estos óxidos poseen una absorbancia máxima entre 760 y 765 nm y es proporcional a la cantidad de grupos fenólicos potencialmente oxidables (Madrid et al. 2003).

Cuantificación de taninos: Este ensayo es del tipo colorimétrico de punto final y se fundamenta en la formación de un complejo coloreado azul debido a que el reactivo de Folin-Denis, compuesto por ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, se reduce a óxidos de tungsteno y óxidos de molibdeno en presencia de compuestos fenólicos como los taninos en un ambiente básico. Estos óxidos poseen una absorbancia máxima entre los 760 y los 765 nm y es proporcional a la cantidad de grupos fenólicos potencialmente oxidables (Madrid et al. 2003). El resultado obtenido es preliminar, ya que luego se adsorben los taninos con polvos de piel y se determinan los compuestos fenólicos no adsorbibles de la misma manera que se cuantificó los compuestos fenólicos totales. Finalmente los taninos son determinados por la diferencia entre los compuestos fenólicos totales y los fenoles no adsorbibles.

Cuantificación de flavonoides totales: Es un ensayo colorimétrico de punto final, en el que tras una precipitación de los flavonoides con acetato de plomo se genera una reacción entre los grupos hidroxilos presentes en los flavonoides con el aluminio presente en solución de nitrato de aluminio al 10% en medio básico, generándose así un complejo de color amarillo al reaccionar. Este complejo posee una absorbancia máxima 415 nm y es proporcional a la cantidad de flavonoides (Andersen y Markham, 2006).

Cuantificación de rutina, quercetina y apigenina por HPLC: Este ensayo se fundamenta en la separación a diferentes tiempos de los compuestos que conforman una muestra según la

afinidad que tenga por el tipo de columna o por el tipo de fase móvil, generando tiempos de retención característicos. Los diferentes compuestos se detectan según su absorbancia a una determinada longitud de onda y se compara contra un cromatograma estándar (Waksmundzka y Sherma).

## 11.2.- PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL DESARROLLO DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

1. Reactivo de Wagner: Disolver 0,64 g de yodo y 1 g de yoduro de potasio en 2,5 mL agua destilada y aforar la solución a 50 mL con agua destilada.

2. Reactivo de Mayer: Disolver 0,68 g de dicloruro de mercurio en 30 mL de agua y 2,5 g de yoduro de potasio en 5 mL de agua destilada. Mezclar ambas soluciones y aforar a 50 mL con agua destilada.

3. Reactivo de Dragendorff: Disolver 1,7 g de nitrato de bismuto (III) y 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua destilada (solución a). En forma paralela disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua destilada (solución b). Mezclar 10 mL de la solución a con 10 mL de solución b generando así el reactivo de Dragendorff y refrigerar hasta el momento del ensayo. Al momento del ensayo mezclar esta solución con 50 mL de una solución de ácido tartárico 20% p/v.

4. Reactivo de Baljet: Disolver 1 g de ácido pícrico en 25 mL de etanol y 2,5 g de hidróxido de sodio en 25 mL de agua destilada. Mezclar ambas soluciones.

5. Reactivo de Sudán III: Disolver 0,5 g de Sudán III en un vaso precipitado con 50 mL de etanol al 70% y llevar a 50° C en baño termostático. Agitar vigorosamente hasta que se disuelva. Filtrar y recuperar el filtrado.

6. Reactivo de gelatina: Disolver en un vaso precipitado 1 g de gelatina en 100 mL de agua destilada previamente llevada a 60° C y agitar vigorosamente hasta que no se observe precipitado.

7. Reactivo gelatina-sal: Disolver en un vaso precipitado 1 g de gelatina y 10 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada, previamente llevada a 60° C y agitar vigorosamente hasta que no se observe precipitado.

### 11.3.- FUNDAMENTOS DIAFANIZACIÓN Y TINCIONES

Diafanización: Proceso que busca a través de solventes como el etanol, el hidróxido de sodio o el hidrato de cloral clarificar el tejido seccionado a observar al microscopio al remover pigmentos como la clorofila u otros compuestos que absorben la luz como el almidón, mucilagos, resinas entre otros (Upton et al. 2011)

Tinciones: Cumplen la función de mejorar la visibilidad de ciertas estructuras de los tejidos al resaltarlas sobre otras. Se destaca la floroglucina – HCl, la que reacciona con compuesto alcohólicos del tipo cinnamil, sinapil coniferil y cumaril que se encuentran formando la lignina (Chaparro y Rosas, 2006) que forma parte de estructuras como los tejidos vasculares de las plantas, mientras que la safranina es un colorante básico que reacciona con estructuras con cargas negativas como es el caso de las estructuras de tipo lipídica como la cutina (Sandoval, 2005).