

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

ESTANDARIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS

HIDROALCOHÓLICOS DE ISHPINK, *Ocotea quixos* (LAM.) KOSTERN.

AUTORES:

HÉCTOR IVAN FLOR OLIVO

MICHELLE JAZMÍN PARRA PEDRAZA

TUTORA:

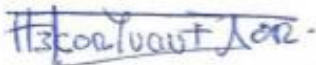
TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, abril del 2017

Cesión de derechos de autor

Nosotros, Héctor Ivan Flor Olivo, con documento de identificación N°1725403289, y Michelle Jazmín Parra Pedraza, con documento de identificación N°1724421662, respectivamente manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: “Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de *Ishpink, Ocotea quixos* (Lam.) Kostern”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....

Nombre: Héctor Ivan Flor Olivo
Cédula: 1725403289
Fecha: Abril 2017



.....

Nombre: Michelle Jazmín Parra Pedraza
Cédula: 1724421662
Fecha: Abril 2017

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de *Ishpink, Ocotea quixos* (Lam.) Kostern”, realizado por Héctor Ivan Flor Olivo y Michelle Jazmín Parra Pedraza, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, abril del 2017



Tatiana de los Ángeles Mosquera Tayupanta

CI: 171166801-0

Dedicatoria

Este trabajo de titulación lo dedico a mis padres Ivan Salomón Flor y Gladys Yolanda Olivo modelos de trabajo y superación, por su apoyo incondicional, entrega y lucha constante durante mi formación, sus enseñanzas, consejos y amor son parte esencial de este logro.

A mis hermanas, Geadira, Grace, Nadia, Eliza y Anabela por su inmenso apoyo y confianza sobre mí en todo momento.

A mi familia y amigos, personas muy valiosas e importantes en mi vida.

Héctor Ivan Flor Olivo

El presente trabajo de titulación lo dedico a mi madre, Olga Pedraza, quien me ha brindado todo su apoyo incondicional, amor, consejos, valores y me ha motivado a ser mejor cada día.

A mi padre, Bolívar Parra, quien ha sido el pilar fundamental durante mi formación como profesional, por todos sus consejos, amor y apoyo incondicional.

A mi hermano, Bolívar Gabriel Parra, quien con su ejemplo de perseverancia y superación supo enseñarme a seguir adelante hasta que cumpla mis ideales, por su amor y comprensión.

A mi abuelita Rosario Olalla y a mi madrina Lourdes Pedraza, quienes, con sus oraciones y cariño, me han acompañado a lo largo de toda mi vida.

Michelle Parra Pedraza

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana y a los docentes de la carrera, quienes me impartieron sus conocimientos.

A mis padres, hermano y familia por confiar en mí y compartir todos los logros en mi vida.

Al Grupo de Investigación “GIDCARB” a cargo del Dr. Paco Noriega, quien contribuyó con su experiencia en la realización de este proyecto.

A mi tutora, Ing. Tatiana Mosquera M.Sc, por guiarme a lo largo del proyecto, por su apoyo y confianza, ya que además de ser una excelente profesional es una magnífica persona y amiga.

A la Unidad Educativa “Santa Dorotea, donde me formé académica y espiritualmente durante 13 años de mi vida, en especial a Sor Rebeca Yáñez M.Sc. y a la Lic. Dolores Lovato por sus consejos y apoyo incondicional.

Michelle Parra Pedraza

A la Universidad Politécnica Salesiana por otorgarme las herramientas, conocimientos y valores necesarios para mi formación como profesional y persona, CIVABI por su ayuda y apoyo para la realización de esta tesis.

A mi excelente tutora Tatiana Mosquera por su conocimiento, persistencia, paciencia, confianza y cariño, aspectos fundamentales para la realización de esta tesis.

A cada uno de los profesores que a lo largo de la carrera no solo han brindado sus conocimientos, sino también sus experiencias y motivaciones para siempre pensar en construir nuestro propio futuro y en el bienestar propio y social.

A mi sobrino Ariel, por su colaboración y tiempo brindado a quien considero como un hermano.

Héctor Ivan Flor Olivo

Índice

Introducción	1
Capítulo I.....	4
1. Marco Teórico.....	4
1.1. Ishpink (<i>Ocotea quixos</i>)	4
1.1.1. Clasificación taxonómica.....	4
1.1.2. Descripción botánica.....	4
1.1.3. Distribución geográfica.....	4
1.1.4. Usos	5
1.1.5. Composición química	6
1.2. Control de calidad de la droga vegetal	7
1.3. Extractos vegetales	9
1.3.1. Tipos de extractos	9
1.3.2. Métodos de obtención de extractos vegetales:.....	10
1.3.3. Variables del proceso de percolación	12
1.3.4. Control de calidad de extractos vegetales.....	14
1.4. Tamizaje fitoquímico	14
1.5. Compuestos fenólicos.....	17
1.5.1. Clasificación de los compuestos fenólicos	17
1.5.2. Propiedades y aplicaciones de los compuestos fenólicos	21
1.5.3. Cuantificación de fenoles totales con el método de Folin – Ciocalteu.....	23
Capítulo II	25
2. Materiales y métodos	25
2.1. Diseño experimental.....	25

2.1.1. Ensayos organolépticos y físico-químicos de los solventes	25
2.2. Obtención e identificación del material vegetal	29
2.3. Control de calidad del material vegetal	30
2.3.1. Control físico-químico	30
2.3.2. Control microbiológico	33
2.4. Obtención de extractos fluidos	35
2.5. Control de calidad de los extractos fluidos	36
2.5.1. Ensayos organolépticos.....	36
2.5.2. Ensayos físico-químicos	36
2.6. Determinación microbiológica por conteo en placa.....	38
2.7. Tamizaje fitoquímico	38
2.7.1. Ensayo de Fenoles y Taninos.....	38
2.7.2. Ensayo de Catequinas	39
2.7.3. Ensayo de Saponinas	39
2.7.4. Ensayo de Quinonas.....	40
2.7.5. Ensayo de Cumarinas y Lactonas	40
2.7.6. Ensayo de Alcaloides.....	40
2.8. Cuantificación de compuestos fenólicos	42
2.8.1. Elaboración de la curva de calibración con ácido gálico.....	42
2.8.2. Cuantificación de fenoles en extractos fluidos	43
2.9. Análisis estadístico	43
Capítulo III.....	44
3. Resultados y Discusión	44
3.1. Diseño experimental.....	44

3.2. Variable 1: Solventes.....	45
3.2.1. Ensayos Organolépticos y Físico-Químicos de Solventes.....	46
3.3. Variable 2: Material Vegetal	46
3.4. Control de calidad del material vegetal	46
3.4.1 Control físico-químico	46
3.4.2. Control microbiológico.....	48
3.5. Obtención de extractos fluidos	48
3.6. Control de calidad de los extractos fluidos	49
3.6.1. Ensayos organolépticos.....	49
3.6.2. Ensayos físico-químicos	50
3.7. Determinación microbiológica	51
3.8. Tamizaje fitoquímico	52
3.9. Cuantificación de compuestos fenólicos	53
3.10 Análisis estadístico	54
Conclusiones	60
Bibliografía	61
Anexos	68

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Ocotea quixos</i>	4
Tabla 2. Límites de contaminación microbiana en extractos vegetales.	8
Tabla 3. Clasificación de compuestos fenólicos	19
Tabla 4. Diseño experimental	44
Tabla 5. Control de calidad físico-químico del material vegetal.....	47
Tabla 6. Control microbiológico del material vegetal.	48
Tabla 7. Ensayos organolépticos de los extractos fluidos de <i>Ocotea quixos</i>	49
Tabla 8. Determinación físico-química de los extractos.	50
Tabla 9. Análisis microbiológico de los extractos.	51
Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos.	52
Tabla 11. Curva de calibración para fenoles totales con ácido gálico.	53
Tabla 12. Estadística descriptiva de tratamientos.	55
Tabla 13. Análisis de varianza para las variables y sus interacciones.	55
Tabla 14. Análisis de Varianza por ANOVA para tratamientos.....	56
Tabla 15. Prueba pos – hoc de Tuckey (95%).	57

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de un percolador.....	11
Figura 2. Ruta de síntesis de compuestos fenólicos.....	17
Figura 3. Mecanismo de acción del reactivo Folin – Ciocalteu.....	24
Figura 4. Curva de calibración para fenoles totales con ácido gálico.....	54
Figura 5. Histograma de las medias de mg de ácido gálico por tratamiento	57

Índice de anexos

Anexo 1. Disolventes	68
Anexo 2. Parámetros físico-químicos de los solventes	69
Anexo 3. Control físico químico de material vegetal	71
Anexo 4. Análisis de control de calidad del material vegetal	73
Anexo 5. Obtención de extractos	75
Anexo 6. Control de calidad de los extractos fluidos.....	76
Anexo 7. pH de los extractos de <i>Ocotea quixos</i>	77
Anexo 8. Índice de refracción de los extractos de <i>Ocotea quixos</i>	78
Anexo 9. Densidades (g/cm ³) de los extractos de <i>Ocotea quixos</i>	79
Anexo 10. Porcentaje de sólidos totales de los extractos de <i>Ocotea quixos</i>	80
Anexo 11. Tamizaje fitoquímico	81
Anexo 12. Cuantificación de fenoles	84
Anexo 13. Absorbancias a 765nm de cada tratamiento	85
Anexo 14. Estadísticos descriptivos de las variables de experimentación.....	86
Anexo 15. Prueba de homogeneidad de varianzas.....	87
Anexo 16. Protocolo de obtención de extractos hidroalcohólicos de <i>Ocotea quixos</i>	88

Resumen

La estandarización fitoquímica de extractos hidroalcohólicos de ishpingo *Ocotea quixos* Lam. KOSTERN consistió en evaluar la influencia de tres variables experimentales: material vegetal (fresco y seco), disolvente (etanol potable y etanol de caña) y concentración de disolvente (90, 70, 50) % v/v mediante un diseño experimental factorial del cual se obtuvieron 12 extractos distintos y se realizaron 3 repeticiones de cada uno; mediante un tamizaje fitoquímico se evidenció la presencia de fenoles, taninos, catequinas, saponinas, quinonas, cumarinas, lactonas y alcaloides en los 36 extractos; se aplicó el método de Folin – Ciocalteu con el fin de determinar cuantitativamente la concentración de fenoles totales y mediante un análisis estadístico ANOVA (Tukey 95%) se demuestra que existe diferencia significativa entre los 12 tratamientos establecidos donde los extractos con mayor cantidad de fenoles totales son AMF50:50 (Alcohol, Material Fresco, Concentración 50% v/v) y CMF90:10 (Caña, Material Fresco, Concentración 90% v/v) con 12,538 y 13,298 mg de ácido gálico/mL de extracto respectivamente; concluyendo que esta última combinación permite obtener mayor cantidad de fenoles totales siguiendo el protocolo estandarizado establecido.

Palabras claves: *Ocotea quixos*, Ishpingo, extractos, fenoles, ácido gálico.

Abstract

The phytochemical standardization of hydroalcoholic extracts of Ishpingo *Ocotea quixos* Lam. KOSTERN consisted in evaluating the influence of three experimental variables: plant material (fresh and dry), solvent (ethanol and cane ethanol) and solvent concentration (90, 70, 50) % v/v through an experimental factorial design which one we obtained 12 different extracts with 3 repetitions of each of them. A phytochemical screening showed the presence of phenols, tannins, catechins, saponins, quinones, coumarins, lactones and alkaloids in the 36 extracts; we used the Folin - Ciocalteu method in order to quantitatively determine the total phenol concentration and by statistical analysis ANOVA (Tukey 95%) proves that there is significant difference between the 12 established treatments where the extracts with the mayor quantity of phenols are AMF50:50 (Alcohol, Fresh Material, Concentration 50% v/v) and CMF90:10 (Cane alcohol, Fresh Material, Concentration 90% v/v) with 12,538 and 13,298 mg of gallic acid / mL of extract respectively; concluding that, this last combination allows to obtain greater quantity of total phenols following the established standardized protocol.

Keywords: *Ocotea quixos*, Ishpingo, extracts, phenols, gallic acid.

Introducción

En los últimos años la información etnobotánica ha sido muy útil en la búsqueda de nuevos compuestos activos con posible actividad biológica presentes en las plantas silvestres y domesticadas. Además, existe un incremento en el interés por conocer y verificar las bondades de las plantas medicinales, esto se ha convertido en un reto actual que ha conducido al desarrollo de investigaciones para describir la cura de enfermedades (Cerón, 2006).

Ecuador posee una gran variedad de plantas con propiedades farmacológicas, las cuales pueden ser aprovechadas como materia prima para la elaboración de extractos; mediante la extracción, aislamiento y purificación de sustancias naturales. Además, una estandarización permite una mejor caracterización analítica de los compuestos de interés. (Sharapin, 2000).

Según el conocimiento etnobotánico, *Ocotea quixos*, puede ser utilizado para tratar afecciones gástricas e intestinales, gripes, resfriados, vómito, diarrea, cicatrizar heridas y como anestésico local. (Fundación Chankuap, 2014). Algunas investigaciones realizadas atribuyen estas propiedades terapéuticas a los componentes como: cinamaldehído, acetato de cinamilo, alcohol cinamílico y compuestos fenólicos (Montealegre, 2011).

Una reciente investigación demostró la presencia de compuestos fenólicos en extractos de *Ocotea quixos* mediante una prueba cualitativa (Cárdenas, Pozo, Roque, & Almirall, 2016). A estos metabolitos secundarios se les ha atribuido la capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, por lo que pudiera estar relacionado con

su actividad antibacteriana y antifúngica demostrada en la investigación realizada por Noriega & Decarro (2008).

Existen una gran cantidad de investigaciones realizadas con *Ocotea quixos* empleando aceites esenciales o extractos de diferentes partes de la planta, para evaluar sus propiedades terapéuticas. Sin embargo, para evaluar cualquier actividad biológica es importante contar con extractos estandarizados fitoquímicamente, ya que permiten reducir variables en la investigación de las diferentes actividades biológicas. Además, representa un cimiento para la obtención de un producto natural con efectividad probada y garantizando de esta manera la reproducibilidad de los resultados. La estandarización de un extracto genera especificaciones de porcentaje de grupos fitoquímicos de interés.

Considerando lo antes mencionado, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general estandarizar fitoquímicamente extractos hidroalcohólicos de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam.) Kostern y como objetivos específicos: definir las variables dependientes e independientes en el proceso de obtención de extractos hidroalcohólicos de *Ocotea quixos*, obtener extractos hidroalcohólicos a partir de hojas de *Ocotea quixos* utilizando la técnica de percolación, identificar cualitativamente grupos fitoquímicos de interés en los extractos obtenidos y cuantificar el contenido de fenoles totales en los extractos.

Como hipótesis se plantearon: La hipótesis de investigación (Hi) sostiene que existe diferencia significativa en la cantidad de fenoles totales entre los tratamientos evaluados, mientras que la hipótesis nula (Ho) sostiene que no existe diferencia significativa al cuantificar fenoles totales entre los tratamientos evaluados.

El presente trabajo de titulación se desarrolló en dos fases: la de campo, que empezó con la recolección de hojas de *Ocotea quixos* y posterior identificación morfológica; y la de laboratorio, en la cual se llevó a cabo la preparación de los extractos hidroalcohólicos mediante percolación, considerando las variables planteadas (tipo de disolvente, estado del material vegetal y concentración del disolvente), luego se realizó un tamizaje fitoquímico para evaluar la presencia de metabolitos secundarios de interés. Además, se evaluó el contenido de fenoles totales, los cuales sirven como referencia para estandarizar los extractos. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS 24.

Finalmente, se presentó una ficha con todos los parámetros óptimos considerados al momento de elaborar los extractos, para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Capítulo I

1. Marco Teórico

1.1. Ishpink (*Ocotea quixos*)

1.1.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Ocotea quixos.

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Lurales</i>
Familia:	<i>Lauraceae</i>
Género:	<i>Ocotea</i>
Especie:	<i>quixos</i>
Nombre común:	Ishpink, canela amazónica, ispingu, ishpingo o canelón.

Nota. Fuente: (Montealegre, 2011). **Elaborado por:** Los autores, 2017

1.1.2. Descripción botánica

Ocotea quixos es un árbol con una altura entre 10 a 30 m, tiene una copa grande y redonda con hojas simples, lobuladas, alternas y de color verde, sus dimensiones varían entre 10 a 15 cm de largo y 4 a 5 cm de ancho. Sus flores son axilares en forma de cápsula con cáliz de consistencia semi leñosa, mientras que su fruto es una drupa con semilla café de aproximadamente 2 cm de diámetro (Collahuazo, 2012).

1.1.3. Distribución geográfica

Los árboles de *Ocotea quixos* se encuentran distribuidos en Sur América, su hábitat es el bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana, que se encuentra entre 310 y 1250 m.s.n.m. (Cazorla, 2013).

En el Ecuador se tiene registros de la presencia de *Ocotea quixos* en la provincia de Morona Santiago, específicamente en el sector del Valle del Upano, la ciudad de Macas, las comunidades shuar de San Miguel de Ishpink, Jimiaraentsa y Shinkiatam, las comunidades achuar de Makusar y Juyukamentsa; y en el cantón Gualaquiza. También se registra en la provincia de Zamora Chinchipe en Palanda, a alturas entre los 200 a 1326 m.s.n.m. El ishpink en estado silvestre crece a alturas entre 1100 a 1250 m.s.n.m., en bosques localizados en las terrazas sobre suelos planos (Collahuazo, 2013).

1.1.4. Usos

Existen pocas publicaciones relacionados con las propiedades medicinales de *Ocotea quixos*, por lo que se puede mencionar el trabajo realizado por Bruni *et al.* (2004), en el cual comprueba que el aceite esencial de *Ocotea* presenta actividad antioxidante, antibacterial y antifúngica. Ballabeni *et al.* (2010) señala que el ishpingo tienen actividad antiinflamatoria y antiplaquetaria.

Otros usos para el ishpingo son como condimento en la elaboración de comidas, saborizante en la colada morada, bebida que se consume el día de los Difuntos en el Ecuador y preparación de aguas aromáticas (Veerle & Cueva, 2008).

En las comunidades amazónicas del Ecuador, el conocimiento etnobotánico se ha mantenido mediante tradición oral de generación en generación. Al recopilar este conocimiento Pérez, E (1996), menciona que se han utilizado las hojas y el cáliz del ishpingo para aliviar dolores de parto y combatir la anemia, artritis, catarro crónico y la hidropesía. Esta planta ha sido usada tradicionalmente con fines medicinales como eupéptico, antidiarreico, desinfectante y anestésico local (Naranjo, Kijos, & Giesbrecht, 1981). Además, otras publicaciones científicas han corroborado que

Ocotea quixos tiene las siguientes propiedades: antitrombótica, antiplaquetaria, vasorelajante y antiinflamatoria en los cálices (Ballabeni, Tognolini, & Bertoni, 2010) y antimicrobiana y antifúngica en las hojas (Noriega & Decarro, 2008).

El aceite esencial de *Ocotea quixos* presenta los niveles más altos de α -humuleno con respecto a otros, por lo que ayuda a equilibrar la respuesta a la irritación, estrés y reducir el hinchazón (Chávez, 2013).

1.1.5. Composición química

En el aceite esencial de las hojas de *Ocotea quixos*, se evidenció la presencia de 63 compuestos de los cuales los más sobresalientes fueron el cariofileno, humuleno y eremofileno. Sin embargo, existen también taninos, fenoles y flavonoides (Noriega & Decarro, 2008).

El aceite esencial obtenido a partir del cáliz de las flores presentó trans-cinamaldehído, metil cinamato, eucaliptol, benzaldehído y β -selineno. Además, se evidenció la actividad antibacterial contra Gram positivos (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y negativos (*Pseudomonas aeruginosa*) (Bruni *et al.*, 2004).

El aceite esencial obtenido a partir de hojas de *Ocotea quixos* presenta: α -pineno, β -pineno, eucaliptol, ciclohexano, cariofileno, α -cariofileno, metano azuleno y óxido de cariofileno (Carrasco & Simbaña, 2016).

Los extractos de ramas y hojas de *Ocotea quixos* contienen cinamaldehído, aldehído cinámico, saponinas, cumarinas, alcaloides y flavonas. Además, se destaca el uso de etanol analítico y etanol de caña, los cuales tuvieron mayor capacidad para extraer metabolitos secundarios, ya que facilitan la penetrabilidad en las estructuras lisígenas de los órganos de la planta (Cárdenas, Pozo, Roque, & Almirall, 2016).

1.2. Control de calidad de la droga vegetal

Según la Norma Ecuatoriana sobre “Fitoterápicos: Droga cruda. Métodos de ensayo y la OMS, los ensayos que deben realizarse a la droga vegetal antes de ser empleada para la elaboración de fitoproductos son:

- **Porcentaje de materia extraña:** las materias extrañas son las partes de la droga que no corresponden a las exigencias de la monografía (mezcla de otras partes de la planta u otras plantas, arena, piedras, minerales, polvo). El ensayo se realiza mediante análisis macroscópico visual de la droga vegetal (Meza & Geoconda, 2013).
- **Cenizas:** representan el contenido en sales minerales o en materia inorgánica de la droga. Dan una idea del contenido de materia mineral de la planta, generalmente alrededor del 5%. En el caso de presentar valores elevados puede ser un indicador de la contaminación del material vegetal con tierra o minerales (Admin, 2010).
 - **Cenizas totales:** consiste en calcinar la droga vegetal hasta que quede blanca. El residuo corresponde a las cenizas fisiológicas (tejido vegetal) y a las no fisiológicas (materia extraña) (Admin, 2010).
 - **Cenizas solubles en agua:** corresponde a la parte de las cenizas totales que se disuelven en agua (Meza & Geoconda, 2013).
 - **Cenizas insolubles en ácido clorhídrico:** se refiere al residuo que queda después de extraer las totales con HCl. La sílice es insoluble en HCl, por lo tanto, indica la presencia de arena o tierra (Admin, 2010).
- **Contenido de humedad:** este ensayo es de vital importancia para aquellas drogas vegetales que absorben la humedad con facilidad y se deterioran

rápidamente en presencia de la misma. Según la Farmacopea Española (2007) el límite de agua permitido en el material vegetal está entre el 8 y 14%. Para determinar el contenido de humedad se pueden emplear tres métodos: Gravimétrico (pérdida por desecación) y Azeotrópico o volumétrico y Karl-Fisher (para muestras con bajo contenido de humedad) (Meza & Geoconda, 2013).

- **Control microbiológico:** las drogas normalmente transportan bacterias y hongos del suelo, siendo predominantes las esporas aeróbicas. La práctica de cosechas, manipulación y producción también son causas de contaminación y crecimiento microbiano (Miranda & Cuéllar, 2001). Los límites establecidos para la contaminación microbiana están de acuerdo con el uso que se le va a dar al material vegetal.

Tabla 2.

Límites de contaminación microbiana en extractos vegetales.

Microorganismo	Extracto pulverizado	Extracto fluido	Infusiones
	Suplemento nutricional	Tinturas	Decocciones
Conteo aerobios totales	$\leq 10^4$ UFC/g/mL	$\leq 10^7$ UFC/g/mL	$\leq 10^2$ UFC/g/mL
Conteo de mohos y levaduras	$\leq 10^3$ UFC/g/mL	$\leq 10^3$ UFC/g/mL	$\leq 10^1$ UFC/g/mL
Conteo de coliformes totales	Ausente en 10 g/mL	$\leq 10^2$ UFC/g/mL	No especifica
Salmonella	Ausente en 10 g/mL	Ausencia	No especifica

Nota. Fuente: (OMS, 1998). **Elaborado por:** Los autores, 2017

Tal como se especifica en el Quality control Method for medicinal Plant Materials, establecido por la OMS (1998). Sin embargo, al someter al material vegetal a un

proceso de extracción se ha demostrado en investigaciones que existe una reducción de la carga microbiana.

1.3. Extractos vegetales

Los extractos corresponden a la fracción no volátil de los principios activos, es decir, aquellos que al no ser volatilizables o inestables a la temperatura, no pueden ser obtenidos por destilación, por lo que se deben emplear otros métodos para extraerlos (Admin, 2010).

1.3.1. Tipos de extractos

Oficialmente se reconocen tres tipos de extractos, considerando su forma física de presentación (Miranda & Cuéllar, 2001):

- Líquidos o semilíquidos con alta viscosidad.
- Masa plástica denominada extracto sólido.
- Extracto pulverizado o polvo seco.

Dentro de la clasificación de los extractos líquidos se reconocen desde el punto de vista farmacéutica dos tipos: extractos fluidos y tinturas, a partir de éstos por concentración pueden llegar a convertirse en extractos secos.

A continuación, se describen los tipos de extractos existentes:

- **Tinturas:** son preparaciones líquidas que se obtienen por la acción extractiva de un disolvente inerte alcohólico o hidroalcohólico sobre la droga vegetal, con una relación de 1:5 o 1:10 (Sharapin, 2000).
- **Extractos fluidos:** son preparaciones líquidas de drogas vegetales, donde se emplea generalmente alcohol como disolvente y conservante. el metanol, agua, hexano, entre otros también pueden ser utilizados como disolventes. Cada 1

mL de extracto contiene los componentes terapéuticos de 1 gramo de la droga estándar que se representa (Remington, 2000).

- **Extractos blandos:** consiste en concentrar al vacío al extracto fluido a temperaturas inferiores a 60°C. Su densidad relativa es de 1 a 1.1 g/mL (Ochoa & Marín, 2012).
- **Extractos secos:** se obtiene por evaporación total del disolvente hasta conseguir la textura de polvo (Álvarez & Bagué, 2012).
- **Crioextractos:** la droga vegetal debe estar completamente seca y molida para someterla a congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, posteriormente se adiciona alcohol etílico. Se utiliza para obtener enzimas y proteínas (Castillo & Martínez, 2007).

1.3.2. Métodos de obtención de extractos vegetales:

La extracción con disolventes permite separar los principios activos de la planta al ponerse en contacto con uno o más disolventes. Se deben considerar varios factores como: la naturaleza química de la materia vegetal, selección del disolvente, tamaño de partícula del sólido, temperatura, relación sólido: líquido, velocidad de agitación y tiempo de extracción (Pérez, 2009).

Los métodos de extracción sólido – líquido más utilizados son:

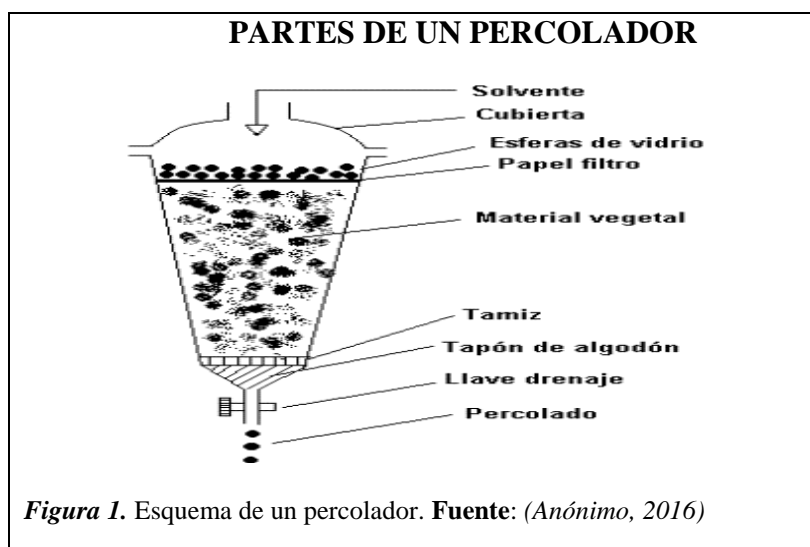
- **Extracción continua:** percolación, repercolación y soxhlet.
- **Extracción discontinua:** maceración, infusión, digestión y decocción.

Los extractos fluidos se preparan por percolación, ya que permite poner en contacto el disolvente con el material vegetal en una sola dirección y extraer más fácilmente los metabolitos de interés (USP 30, 2007).

1.3.2.1. Percolación

En este método el mensturo (alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la droga pulverizada en un solo sentido, la droga es bañada por nuevas proporciones de mensturo y cede todos sus componentes solubles (Miranda & Cuéllar, 2001).

Se lleva a cabo en percoladores que poseen una llave para permitir la carga y descarga del extracto (Figura 1), existen dos factores que deben considerarse al momento de llevar a cabo la extracción que son: el tiempo de contacto de la droga con el mensturo y la cantidad de disolvente. Además, previo al proceso de percolación es necesario llevar a cabo la humectación del material vegetal con el disolvente, con el fin de facilitar la entrada del mensturo a las membranas celulares de la planta (Carrión & García, 2010).



Las ventajas de emplear este método de extracción son:

- Al ser un método de extracción continua total agota completamente la droga vegetal.
- Aumenta el contacto con el material vegetal, facilita el paso del disolvente y hace más eficiente el sistema de extracción.
- No se produce saturación del disolvente.

- Se requiere menor tiempo para la extracción en comparación con la maceración.
- Es necesario humectar el material vegetal con el disolvente a emplear antes de colocar en el percolador, esto facilita el ingreso del disolvente por las paredes celulares de las hojas.

La desventaja que presenta este método es el alto consumo de disolvente.

Los extractos hidroalcohólicos fluidos de *Ocotea quixos* se obtendrán mediante el método de percolación, tal como se establece en la USP 30 (2007), ya que la percolación produce un agotamiento completo del material vegetal, esto significa que facilita la extracción total de los metabolitos de interés. Debido al diseño del percolador se recomienda trabajar con partes blandas de la planta, con el fin de introducirlas con facilidad, en este estudio se trabajará con hojas de *Ocotea quixos*.

Sin embargo, el proceso de percolación presenta múltiples variables relacionados con el material vegetal, el disolvente y condiciones ambientales, las cuales hay que considerar y controlar al momento de estandarizar los extractos, ya que se debe establecer las condiciones a las cuales se obtienen, con el fin de asegurar la reproducibilidad del proceso.

A continuación, se mencionan las principales variables en el proceso de percolación.

1.3.3. Variables del proceso de percolación

Las variables que interfieren en el proceso de extracción son (Sharapin, 2000):

- **Estado de división de la droga:** mientras menor es el tamaño de las partículas del material vegetal mayor es la eficiencia del proceso de extracción, debido a que existe una mayor área de contacto con el disolvente. En el caso de partículas demasiado finas dificultan el proceso de percolación ya que existe

gran compactación, en cambio, si las partículas son muy gruesas la penetración del disolvente es lenta y se extrae menor cantidad de metabolitos.

- **Naturaleza del disolvente:** los disolventes más utilizados son: alcoholes alifáticos de hasta 3 carbonos o mezclas de estos con agua, ya que extraen la mayoría de compuestos presentes en la planta como: alcaloides, polifenoles, glicósidos cardiotónicos y terpenos. Cuando se emplean hojas se recomienda una concentración de 1:1 alcohol -agua, ya que las concentraciones elevadas de alcohol extraen la clorofila y las sustancias polimerizadas sin actividad terapéutica.
- **Balance de concentraciones:** durante el proceso de extracción se debe asegurar que en el medio siempre haya menor concentración de las sustancias a extraer.
- **Tiempo de extracción:** a mayor tiempo de contacto del material vegetal con el disolvente, mayor será la capacidad que tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- **Viscosidad del solvente:** no se recomienda emplear disolventes con viscosidad relativamente alta.
- **Temperatura:** la disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el incremento de la temperatura, ya que contribuya al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, algunos principios activos pueden ser termolábiles y pueden destruirse.
- **Grado de absorción de agua o mensturo:** para mejorar la calidad del proceso de extracción se requiere restituir en la célula agua o mensturo en cantidad

suficiente para restablecer su volumen inicial y que el proceso de difusión ocurra con calidad. Existen algunos criterios para realizar el proceso de humectación. De forma general para hojas, hierbas, cortezas y flores se recomienda hidratar con 2 veces el peso de la droga.

- **Estandarización de la materia prima:** si la materia prima no cumple con los parámetros de calidad establecidos en las normas, la extracción no cumplirá con la calidad del proceso.

1.3.4. Control de calidad de extractos vegetales

Según la Norma Ecuatoriana “Fitoterápicos: Extractos vegetales. Métodos de ensayo” establece como obligatorios los siguientes métodos de ensayo para el control de calidad de los extractos fluidos vegetales que se emplearán para elaborar productos fitoterápicos (Dehesa, 2012):

- Determinación organoléptica.
- Determinación del pH.
- Determinación del índice de refracción.
- Determinación de la densidad relativa.
- Determinación de sólidos totales.
- Contenido alcohólico.
- Identificación de principios activos.
- Cuantificación de principios activos.

1.4. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico también conocido como screening fitoquímicos es la etapa inicial de la investigación que permite identificar los principales grupos de constituyentes químicos que se encuentran en la planta (Hurtado, 2015).

Consisten en identificar de forma rápida los metabolitos secundarios presentes en las plantas, utilizando los reactivos apropiados y observando la presencia de reacciones de color y precipitación (Sharapin, 2000).

Los principales metabolitos a obtenerse en los extractos de *Ocotea quixos* son: alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, catequinas y quinonas (Cárdenas, Pozo, Roque, & Almirall, 2016).

Los ensayos que se utilizan para determinar la presencia de estos metabolitos son los siguientes:

- **Ensayo de cloruro férrico:** los fenoles presentan una estructura enólica, que al reaccionar con el cloruro férrico producen una coloración roja o púrpura. La reacción se debe a la formación de un complejo del hierro con índice de coordinación VI, acompañada de una oxidación del fenol y reducción por parte del férrico a ferroso (Cardoso, 2016).
- **Ensayo de Dragendorff:** los alcaloides tienen la propiedad de combinarse con los metales pesados, tales como el bismuto y yodo, los cuales están presentes en el reactivo de Dragendorff (Tetrayodobismutato potásico) formando un precipitado de color anaranjado (Villagomez, 2007).
- **Ensayo de Mayer:** el reactivo de Mayer (Tetrayodomercuriato de potasio) reacciona con los alcaloides, debido a su propiedad de combinarse con el mercurio y el yodo. La prueba es positiva cuando aparece un precipitado color blanco crema (Villagomez, 2007).
- **Ensayo de Wagner:** el reactivo de Wagner (solución acuosa de yodo en yodato potásico) reacciona con los alcaloides, cuando la prueba es positiva se observa un precipitado de color marrón (Villagomez, 2007). Los tres ensayos para

identificar alcaloides se basan en un intercambio del anión voluminoso del reactivo en acción que reemplaza a los aniones pequeños de las sales de alcaloides (Vidaurre, Querevalú, De los Ríos, & Ruiz , 2007).

- **Ensayo de Shinoda:** el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H₂, que es eliminado en forma de gas y el MgCl₂, que es el que forma complejos con los flavonoides dando las siguientes coloraciones (Vidaurre, Querevalú, De los Ríos, & Ruiz , 2007):
 - **Flavonas:** color naranja a rojo.
 - **Flavonoles y flavonoides:** color rojo carmín.
 - **Flavononas:** color de carmín a magenta.
- **Ensayo de espuma:** reconoce la presencia de saponinas. Sin embargo, es una prueba presuntiva puesto que la presencia de otros metabolitos de interés pueden interferir con la estabilidad de la espuma (Orantes, 2008).
- **Ensayo de Baljet:** se basa en la formación de un complejo formado entre el ácido pícrico y la lactona α , β y γ insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo calor a oscuro (Orantes, 2008).
- **Ensayo de catequinas:** consiste en producir una coloración amarilla a la luz UV, cuando reaccionan las catequinas presentes en la muestra con la solución de carbonato de sodio (Caldas, 2012).
- **Ensayo de Borntranger:** se utiliza para evidenciar la presencia de principios antraquinónicos. La reacción consiste en agregar un reactivo alcalino como amoníaco, solución de hidróxido de sodio o de potasio directamente en el extracto y se evidenciará una coloración roja producida por los derivados antraquinónicos en medio alcalino (Delporte, 2010).

1.5. Compuestos fenólicos

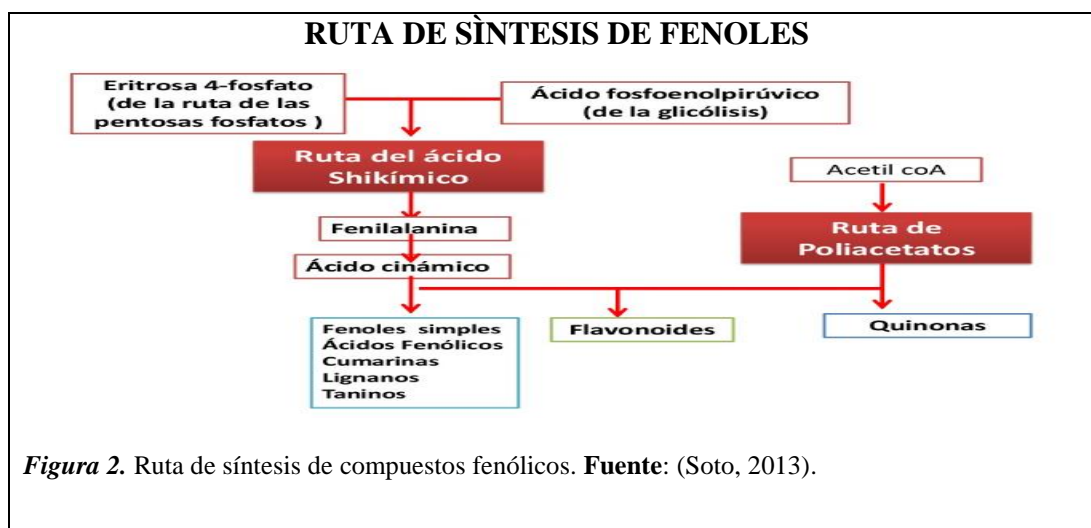
Los compuestos fenólicos forman parte de un gran grupo de metabolitos secundarios de las plantas, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Ludwing, 2014).

Su estructura presenta un anillo de benceno con, al menos, un grupo hidroxilo (fenólico), la síntesis del anillo aromático se realiza por la vía del ácido sikímico y la vía del acetato (Figura 2).

La vía del ácido sikímico conduce a la formación de ácidos benzoicos hidroxilados y aminados, a partir de estos compuestos se forman cumarinas y lignanos.

La vía del acetato da lugar a la formación de cadenas de poliacetato, que por ciclación, se forman compuestos policíclicos aromáticos como antraquinonas y floroglucinoles.

En el caso de los flavonoides, estilbenos y xantonas requieren de la participación conjunta de la vía del acetato y del ácido sikímico (Sharapin, 2000).



1.5.1. Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos más importantes se describen a continuación:

- **Ácidos fenólicos:** su estructura contiene un anillo aromático unido a un grupo carboxilo. Ampliamente distribuidos en la naturaleza. Existen dos grupos:

- Ácidos benzoicos (grupo carboxílico enlazado directamente al anillo aromático, C₆-C₁).
- Ácidos cinámicos (grupo carboxílico enlazado a partir de un sustituyente 2 – propanilo, C₆-C₃) (Castillo & Martínez, 2007).
- **Fenoles libres:** se encuentran raramente en las plantas en forma de heterósidos. (Carrión & García, 2010).
- **Cumarinas:** Son derivados de la benzo- α -pirona, muchas de ellos son fenólicas. Están ampliamente distribuidos en las plantas de las familias *Umbeliferae* y *Rutaceae*. (Pinol, 2001).
- **Cromonas:** presentan un anillo aromático unido a un anillo de pirano. Su ruta de síntesis no está definida por completo (Castillo & Martínez, 2007).
- **Benzofuranos:** estos compuestos aromáticos aparecen en hongos y líquenes. El núcleo del benzofurano está formado por la unión de un anillo bencénico y uno furánico (Castillo & Martínez, 2007).
- **Lignanós:** su estructura consta de dos unidades de fenilpropano (Carrión & García, 2010). Son dímeros formados por la condensación de alcoholes derivados del ácido cinámico, están ampliamente distribuidos en plantas vasculares de las familias *Pinaceae*, *Podofilaceae*, *Rutaceae* y *Lauraceae* (Palacios, 2015).
- **Xantonas:** son un grupo activo de moléculas (C₆C₁C₆) que poseen un anillo conjugado de seis carbonos con varios enlaces dobles de carbono que le da estabilidad (Morton, 1987).

- **Quinonas:** son compuestos carbonílicos cíclicos que por reducción se convierten en polifenoles. Se clasifican en: benzoquinonas, antroquinonas y naftoquinonas (Klages, 2005).
- **Flavonoides:** se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Para clasificarlos se considera el grado de oxidación del anillo central de pirano (C), los más importantes son: chalconas, flavonas, flaván-3-4-diol, flavonoles, flavanonas, isoflavonoides, antocianinas, auronas, flavandioles.


Los flavonoides se sintetizan a partir de la ruta del ácido sikímico y policétidos. Son difenilpropanos constituidos por dos anillos aromáticos unidos a través de tres carbonos que forman un heterociclo oxigenado (Naveda, 2010).

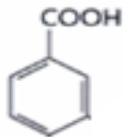
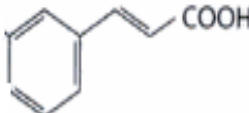
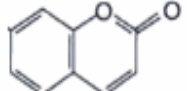
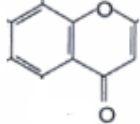
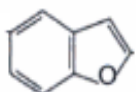
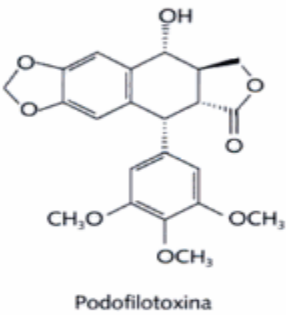
- **Taninos:** compuestos polifenólicos de naturaleza no nitrogenada solubles en agua, alcohol y acetona. Se caracterizan por su sabor astringente (Aillón, 2014).

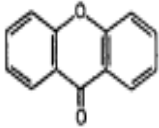
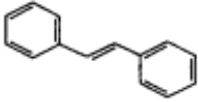
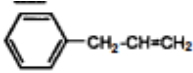
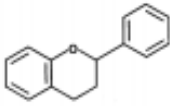
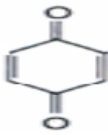

A continuación, se presenta una tabla con la clasificación de los compuestos fenólicos, su estructura química y algunos ejemplos:

Tabla 3.

Clasificación de compuestos fenólicos

Clase	Estructura	Ejemplos
Fenólicos sencillos		
Fenoles simples		Arbustósido, fenol, timol, catecol, pirogalol, resorcinol, florogucinol, hidroquinona, resorcinol.

Ácidos benzoicos		Ácido gálico, vainillina, <i>p</i> -hidroxibenzoico, Ácido vainillínico.
Ácidos cinámicos		Ácido cafeico, eugenol, clorogénico, ferúlico, miristicina, isoclorogénico,
Otros tipos de fenoles		
Cumarinas		Umbeliferona, esculetol, furanocumarinas, piranocumarinas, psoralenos, aflatoxinas.
Cromonas		Eugenina, kellingina.
Benzofuranos		Dehidrotrementona, Moracina A.
Lignanos	 Podofilotoxina	Alcohol cumarílico, sinapílico, coniferílico, podofilotoxina, silibina, eusiderina, galbacina.

Xantonas		Bellidifolina, mangostina, mangiferina.
Estilbenos		Transresveratrol.
Fenilpropanoides		Eugenol, miristicina.
Flavonoides		Kaenferol, quercetina, miricetina, abisinona, rutina, apigenina,
Quinonas		Benzoquinonas (primina y embelina), naftoquinonas (alkanín) y antraquinonas (1-8 hidroxiantroquinona).
Taninos		Ácido gálico, ácido hidroxidifénico (tanino elágico).

Nota. Fuente: (Castillo & Martínez, 2007). **Elaborado por:** Los autores, 2017

1.5.2. Propiedades y aplicaciones de los compuestos fenólicos

En las plantas, los fenoles actúan como fitoalexinas, ya que al momento de sufrir heridas las plantas secretan fenoles para poder defenderse de los ataques fúngicos y bacterianos. Además, en el caso de los antocianos, contribuyen a la pigmentación de

las partes de las plantas, proporcionando colores como rojo, naranja, azul, púrpura o violeta (Creus, 2004).

Los fenoles influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, puesto que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor y aromas. Algunos de los alimentos ricos en fenoles son: Cebolla (*Allium cepa*), vino tinto, cacao (*Theobroma cacao*), aceite de oliva virgen, etc (Creus, 2004).

Otra de las propiedades que se les atribuye a los fenoles son: actividad antibiótica, uso como pesticidas naturales, protectores de rayos UV (tratamientos para el vitíligo) y aislantes en las paredes celulares (Porras & López, 2009).

Una propiedad general de los fenoles es su actividad antimicrobiana, puesto que el propio fenol se empleó como primer antiséptico en las cirugías (Hill & Kolb, 1999).

Las cetonas polifenólicas se emplean como antihelmínticos y antifúngicos. En el caso de las cumarinas, se ha demostrado que presentan actividad venotónica, anticoagulantes y protectora vascular (Frédéric, Robert, Charlier, Ruyck, & Wouters, 2005). La furanocroma kellingina presente en *Ammi visnaga* es empleada como vasodilatador en el tratamiento de la angina de pecho (Campos, Orallo, F, & Santana, L, 2002). Algunos lignanos tienen gran interés farmacológico por su actividad antitumoral, antivírica y efecto hepatoprotector como el caso de la silibina presente en *Silybum marianum* (Carrier, Crowe, & Sokhansanj, 2002). La mangostina, una xantona, tiene propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y tuberculostáticas (Palakawon, 2010). Finalmente, los taninos por su capacidad astringente se utilizan en el tratamiento de heridas y quemaduras, favoreciendo la cicatrización de las mismas (Díaz, 2010).

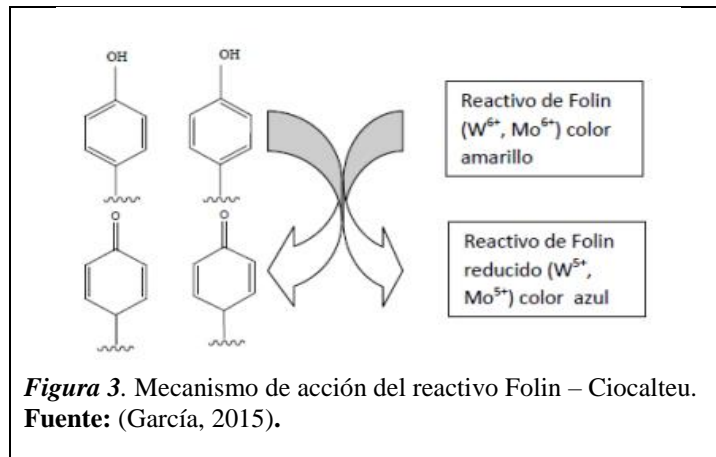
La propiedad antioxidante de los fenoles ayuda a prevenir el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. También existen sustancias como las isoflavonas, lignanos, estilbeno, resveratrol y otros que poseen propiedades antimicrobianas las cuales han sido ampliamente estudiadas (Creus, 2004).

Los fenoles son reconocidos por presentar propiedades antisépticas, plaguicidas y antiinflamatorias. En el caso de los fenilpropanoides, actúan como inhibidores enzimáticos y se utilizan en la medicina tradicional oriental para tratar enfermedades que causen alergias e inflamación. Muchos de estos compuestos también se caracterizan por ser antibacterianos y antifúngico (Cumarinas), sobretodo frente a microorganismos patógenos (Montealegre, 2011).

1.5.3. Cuantificación de fenoles totales con el método de Folin – Ciocalteu

El método más utilizado para la cuantificación de fenoles totales es el de Folin Ciocalteu, el cual mide la coloración azulada que se obtiene al momento en el que los fenoles presentes en la muestra reaccionan con el reactivo.

El reactivo de Folin Ciocalteu contiene una mezcla de tungstato de sodio dihidratado, ácido fosfomolibdico y ácido fosfórico al 85% y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo se reduce al reaccionar con los grupos fenólicos dando lugar a complejos fosfomolibdico – fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen & Tito, 1985). El mecanismo de reacción es una reacción Redox (Figura 3), por lo que se considera también, como un método para medir la actividad antioxidante total. El contenido de fenoles totales se lo expresa en equivalentes de ácido gálico (García, 2015).



Capítulo II

2. Materiales y métodos

2.1. Diseño experimental

La elaboración del diseño experimental de la investigación se basó en un modelo totalmente aleatorizado de diseño factorial para tres variables que son: “tipo de material vegetal” (seco y fresco), “tipo de disolvente” (etanol potable y etanol de caña) y “porcentaje alcohólico del disolvente” (50, 70 y 90%) v/v (para la obtención de las relaciones v/v de los disolventes se procederá a mezclar 50% del disolvente con 50% de agua, 70% del disolvente con 30% de agua y 90% del disolvente con 10% de agua, respectivamente); las mismas que forman parte para el proceso de obtención de un extracto fluido por percolación (Sharapin, 2000). Según datos reportados por (Cárdenas, Pozo, Roque, & Almirall, 2016) el etanol de caña posee un poder extractivo superior frente a otros disolventes; por lo cual se decidió emplearlo en el proceso de estandarización para compararlo con etanol potable.

2.1.1. Ensayos organolépticos y físico-químicos de los disolventes

Para el control organoléptico y físico-químico de ambos disolventes se realizaron ensayos propuestos por la OMS y la United States Pharmacopeia 30 and National Formulary 25.

a) Características de forma, color y olor

La forma o estado, el color y olor de los disolventes se realizó mediante un análisis sensorial, método que emplea los órganos de los sentidos del analista para describir las características propuestas; en dónde, se tomaron aproximadamente 50 mL de cada disolvente en un vaso de precipitación y se determinaron sus características por triplicado.

b) Grado alcohólico:

Para la determinación del grado alcohólico se realizaron mediciones con un alcoholímetro este instrumento permite determinar la gravedad específica y el porcentaje de volumen de alcohol de un líquido, por medio del diferencial entre la densidad del agua dentro del alcoholímetro y la densidad del líquido a medir por acción de un peso (Pliego, 2008).

- Se tomaron 100 mL de solvente (etanol potable o etanol de caña) en una probeta.
- Se colocó el alcoholímetro en el líquido y se registró el valor; esta valoración se realizó por triplicado y se promediaron los valores.

c) Punto de ebullición:

El punto de ebullición de los disolventes se establece mediante destilación, en donde se determina la temperatura de burbuja o temperatura en donde el disolvente pasa de fase líquida a fase gaseosa dentro del equipo de destilación USP30-NF25 /721.

- Se armó el equipo de destilación que incluye un matraz de 500 mL, refrigerante, plancha de calentamiento, termómetro y sistema de mangueras de entrada y salida de agua.
- En un matraz de 500 mL se colocaron 250 mL de disolvente, pequeños cristales de ebullición, se tapó por la parte superior con un tapón acoplado con termómetro; y se cerró el sistema de destilación.
- Una vez listo se colocó el matraz que contiene el disolvente sobre la plancha de calentamiento VELP SCIENTIFICA (HSC), y una vez que empezó el goteo se tomó la medida de temperatura que reporta el termómetro.

- Se registraron las mediciones por triplicado y se realizó un promedio de las mismas.

d) Densidad relativa:

Se empleó el método del picnómetro para la determinación de la densidad de los dos disolventes siguiendo la metodología de la USP30-NF25 /841.

- Se calentó el picnómetro en baño María SHEL LAB (W14M-2) hasta los 25°C, se secó y pesó, registrando su valor.
- Se llenó el picnómetro con agua destilada, se llevó a baño María SHEL LAB (W14M-2) hasta 25°C, se pesó y registró su valor.
- Se llenó el picnómetro con el disolvente, se llevó a baño María SHEL LAB (W14M-2) hasta 25°C, se pesó y registró su valor.
- El proceso se realizó por triplicado
- El valor de la densidad relativa se obtuvo mediante el siguiente cálculo, promediando los resultados.

$$d_{25} = \frac{w_m - w_v}{w_{H_2O} - w_v} \text{ (USP 30, 2007).}$$

DONDE:

d₂₅: densidad relativa a 25°C

W_v: peso del picnómetro vacío

W_m: peso del picnómetro + muestra

W_{H₂O}: peso del picnómetro + agua

e) Solubilidad en agua:

La determinación de la solubilidad en agua se realizó mediante un análisis visual donde.

- En un tubo de ensayo se añadió 5 mL de agua destilada y 1 mL del solvente.
- Se agitó durante un minuto y se evaluó la presencia de turbidez; el proceso se realizó por triplicado.

f) pH:

La determinación del pH de los solventes se realizó con la ayuda de un potenciómetro METTLER TOLEDO (Seven Multi) previamente calibrado.

- Se colocó una muestra del disolvente en un vaso de precipitación de 50 mL.
- Se colocó el electrodo en el vaso de precipitación con el disolvente y se ejecutó la lectura.
- Una vez estable se registró el valor; el proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio del mismo.

g) Grados Brix:

Los grados Brix permiten determinar la cantidad de sólidos solubles en los disolventes (etanol potable y etanol de caña), se realizó mediante un refractómetro ATAGO (NAR-1T).

- Se colocó sobre el cristal del refractómetro una gota de agua destilada para calibrar el equipo.
- Con la ayuda de un gotero se aplicó aproximadamente dos gotas del disolvente en el cristal cuidando que se cubra en su totalidad y se cerró el equipo.
- Se realizó el proceso por triplicado y se promediaron los valores.

h) Conductividad:

La determinación de la conductividad de los disolventes permite conocer la medida del flujo de electrones a través de ellos; este proceso se realizó según la USP30-NF25 /645 con la ayuda de un potenciómetro METTLER TOLEDO (Seven Multi)

- Se colocó una muestra del solvente en un vaso de precipitación de 50 mL.
- Se colocó el electrodo en el vaso de precipitación con el solvente y se ejecuta la lectura.

- Una vez estable el valor se registró; el proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio del mismo.

i) Índice de refracción:

La determinación del índice de refracción de los disolventes (etanol potable y etanol de caña) se realizó mediante un refractómetro ATAGO (NAR-1T), siguiendo la metodología de la USP30-NF25 /831.

- Se colocó sobre el cristal del refractómetro una gota de agua destilada para calibrar el equipo.
- Con la ayuda de un gotero se aplicó aproximadamente dos gotas del disolvente en el cristal cuidando que se cubra en su totalidad y se cerró el equipo para obtener el valor correspondiente.
- Se realizó el proceso por triplicado y con los valores obtenidos se obtuvo un valor promedio.

2.2. Obtención e identificación del material vegetal

- El material vegetal *Ocotea quixos* fue recolectado en la Provincia de Morona Santiago, cantón Morona, ciudad Macas, Parroquia Sevilla, el lugar comprende una superficie de 10 ha, se encuentra a 973 m.s.n.m., la temperatura del lugar oscila entre los 17°C a 25°C, la recolección se llevó a cabo en el mes de agosto del 2016.
- Se recolectaron hojas con las siguientes características físicas: hojas completas, de coloración verde y libres de insectos; estas fueron transportadas en sacos de yute después de su recolección.
- Comprobada la identidad del material vegetal se seleccionaron las hojas que mantuvieron sus características físicas, se pesaron y almacenaron en fundas

ZIPLOC y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su utilización en un lapso máximo de 72 horas.

2.3. Control de calidad del material vegetal

2.3.1. Control físico-químico

a) Control Macroscópico

El control de calidad a nivel macroscópico del material vegetal se realizó según (Miranda & Cuéllar, 2001), que consiste en determinar el porcentaje en peso de cualquier material distinto (material orgánico e inorgánico) al material vegetal:

- Se pesó todo material vegetal recolectado.
- Una vez clasificadas las hojas útiles, se separó todo material restante y se pesó.
- Se calculó el porcentaje de material extraño en base a la fórmula.

$$\%ME = \frac{W_{me}}{W_m} * 100\%$$

Donde:

%ME: Porcentaje de material extraño

W_{me}: peso material extraño

W_m: peso total del material

b) Determinación de humedad

La determinación de humedad del material vegetal se realizó mediante un analizador de humedad METTLER TOLEDO (HB43-S) siguiendo las especificaciones del fabricante, este método se basa en el principio termogravimétrico calentando la muestra vegetal por medio de una unidad de calentamiento halógena y calculando su variación de peso (Mettler-Toledo AG Laboratory & Weighing Technologies, 2011).

- Se trituró el material vegetal hasta un tamaño de aproximadamente 1,5cm².
- Se pesaron 5 g de material vegetal en el pocillo del analizador de humedad.

- Se inició el proceso de secado a 105°C, esperamos a que el equipo determine el pesaje final de la materia y se registran los datos.
- Se calculó el porcentaje de humedad en base a la fórmula.

$$\%H = \frac{W_f}{W_m} * 100\%$$

Donde:

%H: Porcentaje de humedad

W_f: Peso final de muestra

W_m: Peso inicial de muestra

- El proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio.

c) **Determinación de cenizas totales**

La determinación de cenizas se realizó mediante el método de calcinación descrito en la USP30-NF25 /561; en donde:

- Se pesó 2g de material vegetal previamente cortado finamente en un crisol tarado y se carbonizó en una plancha de calentamiento VELP SCIENTIFICA (HSC), posteriormente se incineró en una mufla Thermo a 700°C durante 2 horas.
- Se enfrió el crisol en un desecador durante 30 minutos y se pesó; reintroducimos en la mufla a 700°C durante 30 minutos, y se repitió el proceso anterior hasta obtener un peso constante y se registraron los valores.
- Se calculó el porcentaje de cenizas totales en base a la fórmula.

$$\%CT = \frac{W_f - W_c}{W_o - W_c} * 100\% \text{ (USP 30, 2007).}$$

Donde:

%CT: Porcentaje de cenizas totales

W_o: Peso de crisol + muestra

W_r: Peso de crisol + cenizas

W_c: Peso de crisol

- El proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio.

d) Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

La determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico se realizó mediante el método descrito en la USP30-NF25 /561; en donde:

- A partir de las cenizas totales, se añadió 25 mL de ácido clorhídrico 3N durante 5 minutos, transcurrido este tiempo con un papel filtro libre de cenizas se filtró y lavó con agua caliente.
- El filtro y residuo se transfirieron al crisol y se calcinaron en una plancha de calentamiento VELP SCIENTIFICA (HSC), seguidamente fueron incineradas en una mufla Thermo a 700°C durante 2 horas.
- Se enfrió el crisol en un desecador durante 30 minutos y pesamos; se reintrodujo en la mufla a 700°C durante 30 minutos, y se repitió el proceso anterior hasta obtener un peso constante y se registraron los valores.
- Se calculó el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base a:

$$\%CIA = \frac{w_f - w_{ci}}{w_o - w_c} * 100\% \text{ (USP 30, 2007).}$$

Donde:

%CIA: Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

W_{ci}: Peso crisol + cenizas insolubles

W_f: Peso de crisol + cenizas

W_o: Peso de crisol + muestra

W_c: Peso de crisol

- El proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio.

e) Determinación de cenizas solubles en agua

La determinación de cenizas solubles en agua se realizó mediante el método descrito en la USP30-NF25 /561; en donde:

- A partir de las cenizas totales, se añadió 15 mL de agua destilada a cada crisol y se hirvió durante 15 minutos en la plancha de calentamiento VELP SCIENTIFICA (HSC) y se filtró con papel libre de cenizas.
- El filtro y residuo se transfieren al crisol y se calcinaron en la plancha de calentamiento, se llevaron a incineración en una mufla Thermo a 700°C durante 2 horas
- Se enfrió el crisol en un desecador durante 30 minutos y pesamos, se reintrodujo en la mufla a 700°C durante 30 minutos, y se repitió el proceso anterior hasta obtener un peso constante de cenizas solubles en agua y se registraron los valores.
- Se calculó el porcentaje de cenizas solubles en agua en base a la fórmula.

$$\%CSA = \frac{w_f - w_{cs}}{w_o - w_c} * 100\% \text{ (USP 30, 2007).}$$

Donde:

%CSA: Porcentaje de cenizas solubles en agua

W_{cs}: Peso crisol + cenizas solubles

W_f: Peso de crisol + cenizas

W_o: Peso de crisol + muestra

W_c: Peso de crisol

- El proceso se realizó por triplicado y se obtuvo un promedio.

2.3.2. Control microbiológico

El control microbiológico se desarrolló mediante el empleo de placas Petrifilm 3M para aerobios totales AC, coliformes totales TC y mohos y levaduras YM, este método se basa en la coloración de las colonias mediante indicadores de pH específicos. El proceso se realizó según las especificaciones del fabricante.

a) Método de conteo de aerobios mesófilos totales en placa:

Las placas AC Petrifilm contienen nutrientes del Agar Standard Methods, gelificante y un indicador de color rojo Tetrafenil tetrasolium clorado TTC, las colonias se presentan de color rojo a rojizo-café y pueden presentarse asociada una burbuja de gas. El proceso se realizó según las especificaciones del fabricante.

- Se pesó 25 g de materia prima vegetal en un Erlenmeyer estéril a los que se añadieron 250 mL de agua peptonada al 01% estéril para obtener una dilución de 10^{-1} la cual se dejó en reposo por 1 hora.
- Con la ayuda de una micropipeta se adicionó 1 mL de la dilución en cajas Petrifilm y se incubó en una incubadora MEMMERT (BE-400) a 35 ± 2 °C por 48 horas.
- Se registraron el número de colonias desarrolladas con ayuda de un contador de colonias BOECO (CC-1) por triplicado.

b) Método de conteo de coliformes totales en placa.

Las placas Petrifilm 3M para coliformes totales TC contienen indicadores de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido y tricloruro de trifeniltetrazolio los mismos que reaccionan con subproductos de bacterias coliformes como beta-glucoronidasa y enzimas de la pared celular respectivamente, produciendo una coloración rojo – azul en la placa.

El procedimiento es el mismo al indicado en la determinación de aerobios totales.

c) Método de conteo de mohos - levaduras en placa.

El conteo de mohos y levaduras en placas Petrifilm 3M consiste en identificar por contraste mediante el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido el cual presenta una coloración verde-azulado la presencia de estos microorganismos.

Se realizó el mismo procedimiento indicado anteriormente, ampliando el tiempo de incubación a 5 días.

2.4. Obtención de extractos fluidos

La preparación de los extractos fluidos se realiza siguiendo el proceso descrito por la USP30-NF25 /565.

- Se colocó 4 kg de material vegetal en recipientes plásticos para introducirlos en una cámara climática BINDER (KBF 240) a 55°C y 0% de humedad por 24 horas.
- En una balanza semianalítica OHAUS (Scout Pro SP2001) se pesaron 100 g de material vegetal previamente triturado en una licuadora industrial SKYMSSEN (LAR-04); posteriormente se humectaron por un periodo de dos horas con 200 mL de disolvente a las tres concentraciones establecidas en el diseño experimental.
- El proceso de percolación se realizó en un percolador de 500 mL, en el que se incorporó y compactó el material vegetal humectado para posteriormente añadir 400 mL de disolvente; el primer mensturo se reincorporó al percolador y se mantuvo por 48 horas.
- Transcurrido el tiempo fijado, en un frasco ámbar se recolectó la primera fracción del extracto fluido correspondiente a 85 mL y el sobrante fue llevado a un proceso de concentración en un rotovapor IKA (RV-10 Basic) a presión reducida y 45°C hasta obtener la segunda fracción del extracto fluido correspondiente a 15 mL.

- Una vez obtenido el extracto fluido por completo 100 mL, se mantuvo en refrigeración a 4°C por 5 días, con el objetivo de asegurar la estabilidad de los metabolitos secundarios e inducir el precipitado de sólidos presentes.
- Los extractos fluidos fueron llevados a un proceso de clarificación doble que consiste en primer lugar en filtrar el extracto mediante papel filtro para atrapar sólidos compactos y de gran tamaño, y seguidamente se introdujeron en una centrífuga HERMLE (Z 400) a 750 rpm durante 8 minutos para separar sólidos que sobrepasaron el primer proceso.
- Se mantuvieron los extractos en refrigeración a 4°C para su posterior análisis y caracterización.

2.5. Control de calidad de los extractos fluidos

2.5.1. Ensayos organolépticos

El estado, color, olor y sabor de los extractos se realizó mediante un análisis sensorial, método que emplea los órganos de los sentidos del analista para describir las características propuestas en donde; se colocó el extracto en un tubo de ensayo y se determinaron sus características a temperatura ambiente (20°C-24°C).

2.5.2. Ensayos físico-químicos

a) Determinación de pH

La determinación del pH de los extractos se realizó con la ayuda de un potenciómetro METTLER TOLEDO (Seven Multi) previamente calibrado y a temperatura ambiente, las mediciones se realizaron para cada extracto, cuidando limpiar el electrodo antes de cada medición.

b) Determinación de índice de refracción

La determinación del índice de refracción de los extractos se realizó mediante un refractómetro ATAGO (NAR-1T) siguiendo la metodología de la USP30-NF25 /831, el cual consiste en colocar sobre el cristal del refractómetro una gota de cada extracto y obtener el valor correspondiente. El proceso se realizó para cada extracto cuidando limpiar el cristal del refractómetro con agua destilada antes de cada medición.

c) Determinación de densidad

El proceso para la determinación de densidad de los extractos se realizó mediante las especificaciones de un densímetro METTLER TOLEDO (DM40).

- Se calibró el equipo con agua, acetona y aire.
- Se colocó la manguera de succión dentro del recipiente con extracto para su medición.
- Se registraron los valores obtenidos y se obtuvo un promedio de los mismos.

d) Determinación de sólidos totales

El porcentaje de sólidos totales se realizó mediante la técnica de evaporación en base a la USP30-NF25 /565, donde:

- Se transfirieron 2 mL de extracto a una cápsula de porcelana previamente tarada y pesada.
- Se introdujo la cápsula en una estufa a $100\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas.
- Se colocó la capsula en un desecador por 15 minutos y se pesó.
- Reintroducimos la cápsula en la estufa a $100\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, se llevó a la desecadora y se pesó. El proceso se repitió hasta obtener un peso constante.
- El porcentaje de sólidos totales se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%ST = \frac{w_f - w_c}{V} * 100\% \text{ (USP 30, 2007).}$$

Donde:**%ST:** Porcentaje de sólidos totales**W_r:** Peso de cápsula + residuos**W_c:** Peso de cápsula**V:** Volumen empleado

El proceso se realizó para cada tratamiento y se promediaron los resultados.

2.6. Determinación microbiológica por conteo en placa

El proceso de determinación microbiológica consistió en evaluar la presencia de aerobios totales, coliformes totales y de mohos y levaduras por medio de placas Petrifilm, este método se basa en coloración de las colonias mediante indicadores de pH específicos, el proceso se realizó según las especificaciones del fabricante; en donde:

- En cámara de flujo previamente desinfectada con etanol potable y radiación UV; se colocó 1 mL de extracto en cada placa Petrifilm, estas se llevaron a una incubadora MEMMERT (BE-400) a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas para aerobios y coliformes totales, y de 5 a 7 días para mohos y levaduras.
- Con ayuda de un contador de colonias BOECO (CC1) se contaron el número de colonias desarrolladas en cada tipo de placa de acuerdo a su coloración específica (rojo para aerobios totales, rojo-azul para coliformes totales y verde-azul para mohos y levaduras).

2.7. Tamizaje fitoquímico**2.7.1. Ensayo de Fenoles y Taninos**

El ensayo para fenoles y taninos se realizó mediante la determinación de coloración con cloruro férrico, en donde:

- Se tomaron 2 mL de extracto en un tubo de ensayo.

- Se adicionaron 3 gotas de tricloruro férrico al 5% v/v con la ayuda de un gotero y se observa si se produce una coloración roja o púrpura.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.7.2. Ensayo de Catequinas

El ensayo de catequinas se realizó mediante la determinación colorimétrica con carbonato de sodio 20% v/v, en donde:

- Se tomó una pequeña cantidad de extracto con la ayuda de un capilar.
- Se colocó una gota sobre papel filtro.
- Se adicionó una gota de carbonato de sodio sobre la marca del extracto.
- Una vez seco, se observó con la ayuda de una cámara UV CAMAG a 366nm si se produjo una coloración amarilla.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.7.3. Ensayo de Saponinas

El ensayo de saponinas se realizó mediante la determinación del índice de espuma, en donde:

- En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto con la ayuda de un gotero.
- Se adicionó 5 mL de agua destilada.
- Se cerró el tubo de ensayo y se agitó fuertemente por 5 minutos, se midió la altura de la espuma generada.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.7.4. Ensayo de Quinonas

El ensayo de quinonas consiste en la coloración de la muestra mediante el reactivo Bornträger, en donde:

- Se colocó 1 mL de cada extracto en un tubo de ensayo.
- Se evaporó el solvente en el baño María SHEL LAB (W14M-2) a 55°C.
- En sorbona, se añadió 1 mL de cloroformo en el residuo del tubo de ensayo.
- Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio 5% v/v y se agitó fuertemente, el ensayo se considera positivo si se presenta una coloración rosa.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.7.5. Ensayo de Cumarinas y Lactonas

El ensayo de cumarinas y lactonas consiste en la coloración de la muestra mediante el reactivo Baljet, en donde:

- Se colocó 2 mL de cada extracto en un tubo de ensayo.
- Se evaporó el solvente en el baño María SHEL LAB (W14M-2) a 55°C.
- Se añadió 1 mL del reactivo de Baljet en el residuo del tubo de ensayo y se observó si se presenta coloración roja.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.7.6. Ensayo de Alcaloides

La presencia de alcaloides se determinó mediante tres tipos de ensayos: Dragendorff, Wagner y Mayer en donde:

a) Ensayo de Dragendorff

- Se colocó 1 mL de muestra de extracto en un tubo de ensayo.

- Se evaporó el solvente en baño María SHEL LAB (W14M-2) a 55°C.
- En la sorbona, se añadió 1 mL de ácido clorhídrico 1% v/v en el residuo del tubo de ensayo.
- Se adicionaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff y se observa si se presenta un precipitado anaranjado.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

b) Ensayo de Wagner

- Se colocó 1 mL de muestra de extracto en un tubo de ensayo.
- Se evaporó el solvente en baño María SHEL LAB (W14M-2) a 55°C.
- En la sorbona, se añadió 1 mL de ácido clorhídrico 1% v/v en el residuo del tubo de ensayo y se observa si se presenta un precipitado marrón.
- Se adicionaron 3 gotas del reactivo de Wagner.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

c) Ensayo de Mayer

- Se colocó 1 mL de muestra de extracto en un tubo de ensayo.
- Se evaporó el solvente en baño María SHEL LAB (W14M-2) a 55°C.
- En la Sorbona, se añadió 1 mL de ácido clorhídrico 1% v/v en el residuo del tubo de ensayo y se observa si se presenta un precipitado blanco-crema.
- Se adicionaron 3 gotas del reactivo de Mayer.
- El proceso se realizó para cada extracto y se obtuvo un promedio por tratamiento.

2.8. Cuantificación de compuestos fenólicos

La determinación de fenoles totales en los extractos fluidos de *Ocotea quixos* se realizó siguiendo el método colorimétrico con el reactivo de Folin – Ciocalteu, el cual permite medir la coloración azulada formada mediante espectrofotómetro a 765nm.

2.8.1. Elaboración de la curva de calibración con ácido gálico

- Se preparó 10 mL de una solución madre de ácido gálico en etanol potable con una concentración de 5 mg/mL a partir de la cual se obtuvieron cuatro soluciones de 10 mL a concentraciones de (2 – 1 – 0,2 y 0,1) mg/mL.
- Con la ayuda de una micropipeta se añadieron en un frasco ámbar 50 μ L de cada solución de ácido gálico, 3950 μ L de agua destilada, 250 μ L del reactivo de Folin – Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos, seguidamente se añadieron 750 μ L de carbonato de sodio (20%) v/v y se cerró con papel aluminio.
- Se preparó una solución blanco, añadiendo 4 mL de agua destilada, 250 μ L del reactivo de Folin – Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos; seguidamente se añadió 750 μ L de carbonato de sodio 20% v/v y se cerró con papel aluminio.
- Se sonicaron por 5 minutos en el ultrasonido BRANSON (1510) y se dejó reposar por un lapso de 2 horas a temperatura ambiente.
- En una celda de cuarzo para espectrofotometría se colocó una cantidad suficiente de cada solución preparada, pasamos al espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-730) donde se midieron las absorbancias a 765 nm.
- Con los datos obtenidos se elaboró un gráfico de la linealidad entre concentración de ácido gálico vs absorbancia.

2.8.2. Cuantificación de fenoles en extractos fluidos

- Con la ayuda de una micropipeta se añadieron en un frasco ámbar 5 μL de cada extracto, 3950 μL de agua destilada, 250 μL del reactivo Folin – Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos; seguidamente se añadieron 750 μL de carbonato de sodio (20%) v/v y se cerró con papel aluminio.
- Se preparó una solución blanco añadiendo, 4 mL de agua destilada, 250 μL del reactivo Folin – Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos; seguidamente se añadió 750 μL de carbonato de sodio 20% v/v y se cerró con papel aluminio.
- Se sonicaron por 5 minutos en el ultrasonido BRANSON (1510) y se dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente.
- En una celda de cuarzo para espectrofotometría se colocó una cantidad suficiente de cada solución preparada, con la ayuda de un espectrofotómetro UV-VIS (Jasco V-730) se obtuvieron correspondientes absorbancias a 765 nm.
- La concentración de fenoles totales se determinó mediante regresión lineal con de la ecuación de la curva de calibración con ácido gálico.

2.9. Análisis estadístico

Mediante el software SPSS 24 (Statistical Product and Service Solutions) se realizó un análisis estadístico descriptivo de los valores de absorbancia de cada uno de los extractos de *Ocotea quixos* para determinar diferencias significativas de los tratamientos en función de las variables experimentales: tipos de disolventes, tipo de material vegetal y concentración de disolvente; seguidamente se corrió un test HSD Tukey para determinar la presencia de subgrupos entre tratamientos.

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1. Diseño experimental

El diseño experimental se basa en las tres variables experimentales establecidas “tipo de material vegetal” (seco y fresco), “tipo de disolvente” (etanol potable y etanol de caña) y “porcentaje alcohólico del disolvente” (50, 70 y 90%) v/v obteniéndose un diseño factorial de tipo 2x2x3 que combina dichas variables en 12 tratamientos realizándose tres repeticiones de cada uno, con un total de 36 unidades experimentales o 36 extractos que se prepararan.

Tabla 4.

Diseño experimental

Material vegetal	Tipo de solvente	Porcentaje alcohólico	Tratamientos	Unidades Experimentales
Fresco	Etanol	50%	A	A1, A2, A3
		70%	B	B1, B2, B3
		90%	C	C1, C2, C3
	Etanol de caña	50%	D	D1, D2, D3
		70%	E	E1, E2, E3
		90%	F	F1, F2, F3
Seco	Etanol	50%	G	G1, G2, G3
		70%	H	H1, H2, H3
		90%	I	I1, I2, I3
	Etanol de caña	50%	J	J1, J2, J3
		70%	K	K1, K2, K3
		90%	L	L1, L2, L3

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.

Las variables consideradas en el diseño experimental se basan en investigaciones previas relacionadas con el proceso de extracción por percolación. En el caso del tipo de disolvente se presentan dos opciones: etanol de caña y etanol potable. Cárdenas, Pozo, Almirall & Roque (2016) concluyen que los disolventes que mejor extraen los

metabolitos secundarios son el etanol de caña y el etanol potable, al compararlos con otros disolventes como el agua y el hexano.

Otro de los factores a considerar en el proceso de extracción con disolventes es la característica del material vegetal (seco y fresco) (Pérez T. , 2009). Se recomienda emplear material vegetal seco en el proceso de extracción ya que facilita el proceso de molienda, el cual a su vez permite obtener tamaños de partículas más uniformes; también previene procesos de contaminación microbiana, ya que un contenido bajo de humedad dificulta el crecimiento de hongos y bacterias (Naveda, 2010). Sin embargo, el contenido de polifenoles suele verse afectado durante los procesos de secado, por lo que es necesario establecer una temperatura que no desnaturalice estos metabolitos secundarios de interés (Gil, 2012).

En el caso de la concentración del disolvente se seleccionaron los valores de 50, 70 y 90%, es decir son disolventes hidroalcohólicos, ya que el porcentaje restante de disolvente se completa con agua. Naveda (2010) manifiesta en su investigación que la cantidad de polifenoles extraídos está en función de la concentración de etanol, es decir el contenido de fenoles totales aumenta con la concentración del solvente pero hasta un punto máximo, después del cual el aumento en la solución hidroalcohólica disminuye dicha cantidad.

De lo mencionado anteriormente se puede suponer que la eficiencia de la extracción se podría ver afectada por diversos factores, ya que pueden tener una relación directa con la solubilidad de los componentes de interés que se desean extraer.

3.2. Variable 1: Disolventes

Se seleccionaron dos tipos de solventes para obtener los extractos hidroalcohólicos: etanol potable y etanol de caña, el primero se adquirió de un distribuidor de insumos

para laboratorio QUIMFAS de la ciudad de Quito, mientras que el etanol de caña se adquirió en la Provincia de Pichincha, cantón Pedro Vicente Maldonado de un productor artesanal. Las concentraciones de los disolventes para el proceso de percolación son: 90%, 70% y 50% v/v.

3.2.1. Ensayos Organolépticos y Físico-Químicos de Disolventes

El proceso de caracterización organoléptica y físico-química permitió generar una ficha técnica de control de calidad de los solventes, para asegurar su calidad durante el proceso de estandarización del extracto (Anexo 1).

Los parámetros físico-químicos evaluados tanto en el etanol de caña como en el potable proporcionan información de referencia, es decir, al momento de reproducir el ensayo se debe contar con disolventes que cumplan con las especificaciones de la ficha técnica elaborada de cada solvente, sobre todo en el caso del etanol de caña que se obtiene de forma artesanal, en el cual ciertas características, como el grado alcohólico, pueden variar.

3.3. Variable 2: Material Vegetal

La cantidad de material vegetal recolectado para la identificación morfológica y elaborar los extractos hidroalcohólicos fue de 5kg.

El mantenimiento a 4°C de las hojas de *Ocotea quixos* permitió mantener sus condiciones físicas hasta su utilización.

3.4. Control de calidad del material vegetal

3.4.1 Control físico-químico

La cantidad total de material extraño 0,24%, humedad 48,61%, cenizas totales 1,92%, cenizas solubles en agua 0,48% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 0,11% no

sobrepasan los valores máximos establecidos para drogas vegetales que serán empleadas como fitoquímicos.

Tabla 5.

Control de calidad físico-químico del material vegetal.

Parámetro	Valor medio reportado	Valor límite*
Material extraño	0,24%	10%
Humedad	48,61%	--
Cenizas	1,92%	12%
Cenizas solubles en agua	0,48%	7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0,11%	5%

Nota. El valor límite para el porcentaje de material extraño está establecido en la USP 33 (2007).
Elaborado por: Los autores, 2017.

Tal como se indica en la Tabla 5, los valores obtenidos en la evaluación del material vegetal no exceden los límites establecidos por la Farmacopea Americana 33. En el caso del porcentaje de material extraño se tiene un valor de 0,24% muy por debajo del valor límite, esto hace referencia a la presencia de material no perteneciente a la planta de estudio (arena, piedras, partes de otras plantas, pelos, etc.).

Además, se evidenció que las hojas de *Ocotea quixos* tienen un alto contenido de humedad, lo cual hay que considerar en el proceso de secado.

La determinación de ceniza ayuda a determinar adulteraciones en los vegetales, así como la presencia de materiales arenosos provenientes de la cosecha (Montesdeoca, 2010). En el caso de las cenizas, se obtuvieron valores de 1,92% para cenizas totales, que hace referencia al contenido de minerales presentes en la muestra, en cenizas solubles en agua se reportó 0,48% que corresponde al material de tipo orgánico presente en la muestra, y en cenizas insolubles en ácido se obtuvo 0.11% que indica que no existe presencia considerable de materia arenosa.

Las hojas recolectadas cumplieron con todos los parámetros de calidad por lo que pudieron ser utilizadas en el proceso de extracción.

3.4.2. Control microbiológico

En la Tabla 6 se observan los valores reportados en el control microbiológico del material vegetal de *Ocotea quixos*, en ninguna de las pruebas: para aerobios totales, coliformes totales y mohos y levaduras se obtuvieron valores por encima del valor límite establecido por la OMS (1998). Esto es un indicativo de la ausencia de contaminación microbiana y buena higiene del material vegetal.

Tabla 6.

Control microbiológico del material vegetal.

Test	Valor reportado	Valor de referencia*
Aerobios totales	1 UFC/g	100 UFC/g
Coliformes totales	1 NMP/g	100 – 400 NMP/g
Mohos y levaduras	2 NMP/g	<10 NMP/g

Nota. *Límites establecidos por la OMS (1998). **Elaborado por:** Los autores, 2017.

3.5. Obtención de extractos fluidos

Se obtuvo un total de 36 extractos fluidos, correspondientes a los 36 tratamientos del diseño experimental, tomando en cuenta las variables propuestas; tipo de material vegetal (fresco y seco), tipo de solvente (etanol potable y etanol de caña); porcentaje de solvente (50, 70, 90%) v/v.

Cada extracto se identificó mediante la siguiente codificación:

Tipo de solvente/material vegetal/ número de repetición / concentración de solvente.

Material vegetal: MS (Material Seco); MF (Material Fresco).

Tipo de solvente: A (Alcohol); C (Alcohol de caña).

Concentración de solvente: (90:10), (70:30) y (50:50).

Número de repetición: 1, 2, 3.

3.6. Control de calidad de los extractos fluidos

3.6.1. Ensayos organolépticos

Para llevar a cabo el ensayo organoléptico en cada uno de los extractos se consideró el estado, color, olor y sabor. Tal como se indica en la Tabla 7, los 36 extractos presentaron un estado líquido, lo cual coincide con la definición de extractos fluidos propuesta por la USP 33 (2007), donde menciona que son preparaciones líquidas de drogas de origen vegetal.

Tabla 7.

Ensayos organolépticos de los extractos fluidos de Ocotea quixos.

Tratamiento	Estado	Color	Olor	Sabor
AMF 90:10	Líquido	Marrón	Cetona intenso	Amargo ⁺
AMF 70:30	Líquido	Café claro	Cetona intenso	Amargo ⁺
AMF 50:50	Líquido	Canela	Cetona intenso	Amargo ⁺
AMS 90:10	Líquido	Marrón	Cetona intenso	Amargo ⁺
AMS 70:30	Líquido	Café claro	Cetona intenso	Amargo ⁺
AMS 50:50	Líquido	Canela	Cetona intenso	Amargo ⁺
CMF 90:10	Líquido	Café claro	Aguardiente	Amargo ⁻
CMF 70:30	Líquido	Café - anaranjado	Aguardiente	Amargo ⁻
CMF 50:50	Líquido	Café - rojizo	Aguardiente	Amargo ⁻
CMS 90:10	Líquido	Café claro	Aguardiente	Amargo ⁻
CMS 70:30	Líquido	Café - anaranjado	Aguardiente	Amargo ⁻
CMS 50:50	Líquido	Café - rojizo	Aguardiente	Amargo ⁻

Nota. (+) Amargura más intensa, (-) Amargura menos intensa. **Elaborado por:** Los autores, 2017.

En cuanto al color se pudo evidenciar que en los extractos con mayor concentración de alcohol tenían un color marrón, conforme la concentración de alcohol disminuía el color se tornaba café claro (etanol potable) y café rojizo (etanol de caña).

En el caso del olor fue característico al del disolvente que se empleó acompañado con un ligero aroma característico de *Ocotea quixos*, en los extractos en los que se empleó el etanol potable el olor fue más intenso, mientras que en los extractos con etanol de caña se percibió un olor más dulce.

Finalmente, los extractos presentaron un sabor amargo, el cual es característico de la presencia de taninos, saponinas y alcaloides (Atkins, 2007).

3.6.2. Ensayos físico-químicos

Los parámetros físico-químicos de los extractos hidroalcohólicos de *Ocotea quixos* determinados fueron pH, índice de refracción, densidad y sólidos totales en los 36 extractos.

Tabla 8.

Determinación físico-química de los extractos.

Parámetros	Valores promedio*
pH	6,61 ± 0,54
Índice de refracción	1,35 ± 0,007
Densidad (gm/cm ³)	0,95 ± 0,03
Sólidos totales (g)	1,99 ± 0,77

Nota. * Expresa los valores medios de los 36 extractos. **Elaborado por:** Los autores, 2017.

Tal como se indica en la Tabla 8, el pH promedio de los extractos fue de 6,61 ± 0,54, un valor cercano al pH neutro, lo cual es beneficioso porque en productos terapéuticos de uso externo se recomienda que tengan un pH similar al de la piel normal que oscila entre 5,5 a 5,9; esto indica que el extracto puede ser aplicado en la piel (Ferraro, Martino, & Bandoni, 2015).

En cuanto al índice de refracción fue de 1,35 ± 0,007 el cual es cercano al del agua 1.33, es decir existe presencia de compuestos extraídos por el disolvente (Urquiza,

2010). En el caso de la densidad se obtuvo un valor de $0,95 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$, el valor es inferior al del agua que es 1 g/cm^3 , pero superior al del etanol que es de $0,789 \text{ g/cm}^3$, lo cual es lógico ya que los disolventes están constituidos por una parte de etanol y otra de agua. En el caso de los sólidos totales se obtuvo el valor de $1,99 \pm 0,77 \text{ g}$, que hace referencia a la presencia de sales orgánicas (nonanoato de sodio, heptanoato de potasio y dihexanoato de calcio) y residuos orgánicos, lo cual produce un sabor amargo en el extracto.

3.7. Determinación microbiológica

Al evaluar la presencia de microorganismos (Aerobios totales, coliformes totales y mohos y levaduras) en los extractos fluidos se evidenció la ausencia total de estos en todos los tratamientos.

Tabla 9.

Análisis microbiológico de los extractos.

Test	UFC/mL reportado	UFC/mL límite*
Aerobios totales	0	100
Coliformes totales	0	100
Mohos y levaduras	0	100

Nota. *Límites para productos de uso fitoterápico establecidos por la OMS (1998).

Elaborado por: Los autores, 2017.

Los resultados del control de calidad tanto organoléptico, de características físicas, químicas y microbiológicas no difieren significativamente entre los diferentes extractos, es decir, el tipo de disolvente empleado y la concentración del mismo no influyeron en los resultados finales del control de calidad, esto se debe a que se realizó un control previo de los disolventes empleados, realizando una ficha técnica con cada uno de los parámetros físicos y químicos analizados (Anexo 2), de tal manera que se garantiza que los resultados de calidad no varíen considerablemente.

3.8. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó para identificar de forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios en cada uno de los extractos. Los ensayos que se realizaron se muestran en la Tabla 10, con sus respectivos resultados en cada uno de los tratamientos.

Tabla 10.

Tamizaje fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos.

Tratamiento \ Metabolito	AMF			AMS			CMF			CMS		
	90:10	70:30	50:50	90:10	70:30	50:50	90:10	70:30	50:50	90:10	70:30	50:50
Fenoles	**	**	***	*	*	*	**	*	*	***	**	***
Taninos	**	*	*	**	**	*	*	**	**	**	*	**
Catequinas	***	***	**	**	**	***	**	***	***	**	***	**
Saponinas	**	***	***	*	**	**	***	***	***	**	**	**
Quinonas	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Cumarinas	**	**	**	*	**	**	**	**	**	*	*	*
Alcaloides												
<i>(Dragendorff)</i>	***	**	**	**	***	**	***	**	**	**	***	**
<i>(Wagner)</i>	***	**	**	***	**	*	**	**	***	*	**	***
<i>(Mayer)</i>	***	***	***	**	***	**	***	**	***	*	*	***

Nota. (***) Alta presencia. (**) Presencia. (*) Baja presencia. (-) Ausencia.

Elaborado por: Los autores, 2017.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico evidencian que todos los extractos contienen fenoles, taninos, catequinas, saponinas, quinonas, cumarinas y alcaloides, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cárdenas, Pozo, Almirall & Roque (2016) el cual concluye mediante análisis cualitativo que el etanol de caña extrae por completo los metabolitos de interés a excepción de las cumarinas.

Dentro del grupo de los fenoles se encuentran los taninos, catequinas, quinonas y cumarinas, es decir, con el análisis cualitativo se puede asumir que al realizar el análisis cuantitativo existirá una abundante presencia de fenoles totales. *Ocotea quixos*

contiene componentes activos como alcohol cinámico, cinamaldehído y compuestos fenólicos (Naranjo, Kijos, & Giesbrecht, 1981).

3.9. Cuantificación de compuestos fenólicos

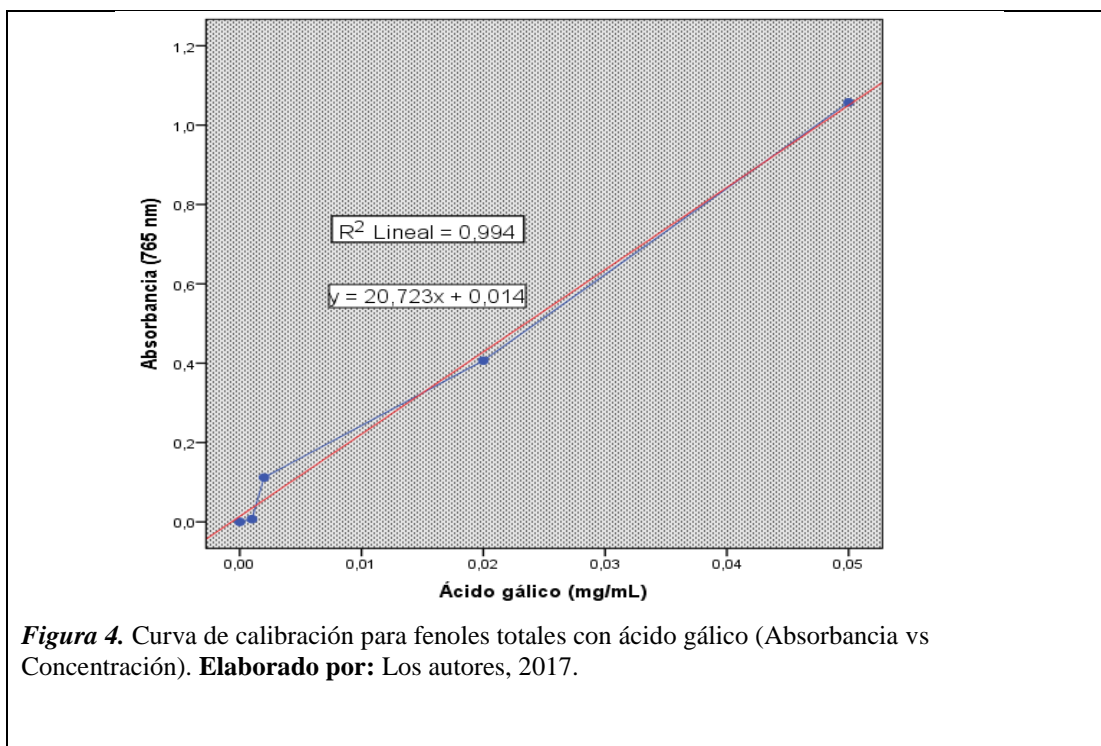
Tabla 11.

Curva de calibración para fenoles totales con ácido gálico.

Estándar	Concentración de ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia 765 nm
Blanco	0	0
C1	0,001	0,007
C2	0,002	0,112
C3	0,020	0,406
C4	0,050	1,057

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017

La curva de calibración con ácido gálico como estándar de referencia en la cuantificación de fenoles sirve como referencia para calcular las concentraciones de fenoles totales presentes en cada uno de los extractos. Los valores de absorbancia reportados en la Tabla 11 permitieron elaborar una gráfica de Absorbancia vs Concentración (Figura 4). La curva presenta un R de 0,994, el cual es aceptable.



La estandarización de productos a base de material vegetal consiste en prescribir estándares y parámetros constantes para asegurar la calidad y la presencia de valores cuantitativos y cualitativos de interés, que en nuestro caso se trata del contenido de fenoles totales (Comas, 2010).

3.10 Análisis estadístico

El análisis de varianza del diseño experimental permite determinar que no existe diferencia significativa entre las medias de ácido gálico/mL de extracto entre tipo de material vegetal, tipo de disolvente y concentración de disolvente, así como en función de las interacciones entre dos factores (tipo de material vegetal - tipo de disolvente; tipo de material vegetal – concentración; tipo de disolvente – concentración); mientras que, la interacción entre las tres variables si presenta diferencia significativa ($p < 0,05$), tal como se observa en la Tabla 12 y 13, estos resultados se confirman mediante el análisis de homogeneidad de varianza que permite establecer una distribución normal de los resultados.

Tabla 12.

Estadística descriptiva de tratamientos.

Variable dependiente: mg ácido gálico / mL extracto			
Tratamientos	Media	Desviación estándar	N
AMF90:10	11,546	0,744	3
AMF70:30	9,670	2,681	3
AMF50:50	12,538	2,798	3
AMS90:10	11,129	2,737	3
AMS70:30	11,803	0,495	3
AMS50:50	6,239	1,123	3
CMF90:10	13,298	0,513	3
CMF70:30	10,365	2,798	3
CMF50:50	8,009	1,163	3
CMS90:10	8,939	1,458	3
CMS70:30	9,511	2,480	3
CMS50:50	11,969	2,551	3
Total	10,418	2,590	36

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.

Tabla 13.

Análisis de varianza para las variables y sus interacciones.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig
Modelo corregido	137,186 ^a	11	12,471	3,067	0,010
Intersección	3907,331	1	3907,331	960,973	0,000
Material	8,514	1	8,514	2,094	0,161
Solvente	0,175	1	0,175	0,043	0,837
Concentración	14,327	2	7,164	1,762	0,193
Material *	2,772	1	2,772	0,682	0,417
Solvente					
Material *	13,920	2	6,960	1,712	0,202
Concentración					
Solvente *	2,963	2	1,482	0,364	0,698
Concentración					
Material *					
Solvente *	94,515	2	47,257	11,623	0,000
Concentración					
Error	97,584	24	4,066		
Total	4142,101	36			
Total corregido	234,770	35			

Nota. a en relación al R cuadrado. * indica las interacciones entre las variables.

Elaborado por: Los autores, 2017.

Mediante el test ANOVA se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los 12 tratamientos, resultado concordante con la significancia obtenida del análisis de la interacción de las tres variables (Tabla 14).

Tabla 14.

Análisis de Varianza por ANOVA para tratamientos

<i>Concentración (mg ácido gálico / mL extracto)</i>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	137,186	11	12,471	3,067	0,010
Dentro de grupos	97,584	24	4,066		
Total	234,770	35			

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.

El análisis de Tukey permite identificar la formación de tres subgrupos de tratamientos donde; el tratamiento con menor concentración de ácido gálico corresponde al tratamiento AMS50:50, se identifica un subgrupo de 10 tratamientos que comparten ambos subgrupos (1-2) y se determina como los mejores tratamientos a AMF50:50 y CMF90:10, que si bien comparten medias del subgrupo 2 se distingue su mayor potencialidad como tratamientos óptimos para obtener altas concentraciones de ácido gálico (Tabla 15).

Tabla 15.

Prueba pos – hoc de Tuckey (95%).

Tratamientos	N	mg ácido gálico / mL extracto	
		Subconjunto	
		1	2
AMS50:50	3	6,239	
CMF50:50	3	8,009	8,009
CMS90:10	3	8,939	8,939
CMS70:30	3	9,511	9,511
AMF70:30	3	9,670	9,670
CMF70:30	3	10,365	10,365
AMS90:10	3	11,129	11,129
AMF90:10	3	11,546	11,546
AMS70:30	3	11,803	11,803
CMS50:50	3	11,969	11,969
AMF50:50	3		12,538
CMF90:10	3		13,298
Sig.		0,065	0,113

Nota. HSD Tukey^{a,b}. Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,066. a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000. b. Alfa = .05. **Elaborado por:** Los autores, 2017.

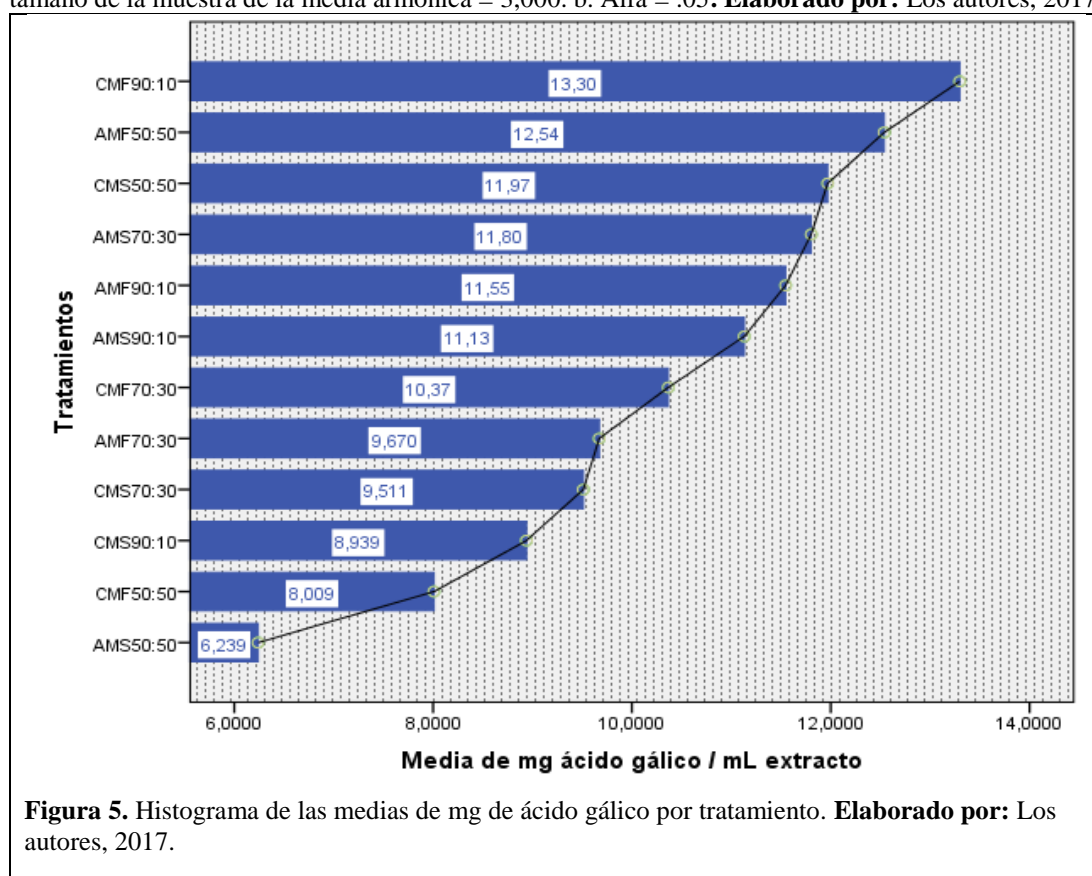


Figura 5. Histograma de las medias de mg de ácido gálico por tratamiento. **Elaborado por:** Los autores, 2017.

Como puede evidenciarse en el histograma de la figura 5, sobre las medias de concentración de mg de ácido gálico por tratamiento, los extractos codificados como CMF90:10 presentan mayor concentración de fenoles totales, lo cual concuerda con la investigación realizada por Cárdenas, Pozo, Almirall & Roque (2016) que concluyen que el etanol de caña fue el más eficiente en la extracción de los metabolitos secundarios de interés en *Ocotea quixos* y *Piper carpunya*, ya que mejora la penetrabilidad de las estructuras lisigénicas de los órganos de la planta y extraen con más facilidad los metabolitos de interés.

Es importante mencionar que el segundo tratamiento con mayor cantidad de fenoles totales es el AMF50:50, lo cual es un indicativo que la concentración pudo influir al momento de extraer los fenoles de las hojas. Tal como menciona Caldas (2012), cuando se emplea concentraciones elevadas del solvente puede extraer compuestos que inhiban la extracción del metabolito de interés; mientras que concentraciones demasiado bajas no logran extraer por complejo los metabolitos, esto se comprueba con los resultados de esta investigación en donde los tratamientos AMS50:50 y CMF50:50 obtienen los valores más bajos de concentración de fenoles totales.

Hay que considerar que el grado alcohólico del etanol potable fue de 96° GL mientras que el del etanol de caña fue de 58° GL, por lo que al combinar con el agua el grado alcohólico va disminuyendo.

Para el caso del material vegetal no existió diferencia significativa, es decir, se puede emplear material fresco o seco y el contenido final de fenoles totales no variará significativamente tal como se evidenció en las pruebas estadísticas de ANOVA. En este caso es recomendable el uso de material seco para facilitar los procesos de molienda y evitar contaminación microbiana (Pérez T. , 2009). A pesar de que una de

las grandes ventajas que presentan los extractos de *Ocotea quixos* es el alto contenido de fenoles y como se ha explicado anteriormente, los fenoles tienen actividad antimicrobiana y antifúngica comprobada (Noriega & Decarro, 2008). Además, de haber usado como solvente el etanol el cual es considerado como un agente inhibidor del crecimiento de microorganismos (Sánchez & Sáenz, 2005).

Finalmente, como se evidenció al realizar la prueba estadística de Tuckey, no existe diferencia significativa al analizar cada una de las variables de forma independiente, sino más bien al momento en el que las variables interactúan se pueden reportar cambios significativos en la concentración de fenoles totales.

Conclusiones

Los 36 extractos hidroalcohólicos preparados por el método de percolación obtuvieron cantidades significativas de fenoles totales. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico de los resultados se pudo concluir que la interacción entre las variables consideradas en el diseño experimental (tipo de solvente, estado del material vegetal y concentración del solvente) influyen en el resultado final de fenoles totales, permitiendo evidenciar que el mejor tratamiento fue el CMF9010 (Caña/Material fresco/Concentración 90:10) obteniendo un total de 13,298 mg de ácido gálico/mL de extracto; mientras que el tratamiento con menor concentración de fenoles totales fue el AMS5050 (Alcohol/Material seco/Concentración 50:50), en el cual se obtuvo 6,239 mg de ácido gálico/mL de extracto.

Es importante mencionar que no existe una diferencia significativa al analizar las variables de forma independiente, por el contrario cuando se analizan las interacciones de las variables se puede concluir mediante el análisis estadístico Tuckey que si existen diferencias significativas en el contenido de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales en los extractos fue el parámetro que permitió estandarizar cada uno de los extractos, ya que al final de la investigación se pudo establecer una ficha en la cual se establecen las condiciones óptimas en cada uno de los procesos para la obtención de los extractos (secado, molienda, percolación, concentración y clarificación). Es así, que se garantiza la reproducibilidad de los extractos hidroalcohólicos de *Ocotea quixos*, los cuales pueden ser empleados en futuras investigaciones como: evaluación de actividad antimicrobiana, antifúngica, aplicación en formulaciones cosméticas, etc.

Bibliografía

- Admin. (2010). Análisis Químico de PAM. *Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales*, 108 - 120. Obtenido de <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
- Aillón, C. (2014). *Estudios de actividad antioxidante en fracciones provenientes de dos plantas medicinales ecuatorianas: Extractos hidroalcohólicos de Mashua (Tropaeolum tuberosum (Ruíz y Pavón) Tropaeolaceae) y aceite esencial de congona (Peperomia inaequalifolia)*. . Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Álvarez, N., & Bagué, A. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. Alicante: Club Universitario.
- Anónimo. (2016). *Aceites esenciales y extractos*. Obtenido de Procesamiento de productos forestales no madereros en Chile: <http://www.pfnm.cl/procesos/txt/aceites.htm>
- Atkins, P. (2007). *Las moléculas de Atkins*. Madrid: AKAL.
- Ballabeni, V., Tognolini, M., & Bertoni, S. (2010). Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) cálices from Amazonian Ecuador. *Pharmacological Research*, 55, 23-30.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin , C., Muzzoli, M., Dehesa, M., . . . Sacchetti, G. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry. Elsevier*, 415-421.

- Caldas, A. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Campos, M., Orallo, F., & Santana, L. (2002). Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. *Med. Chem.*, 22.
- Cárdenas, C., Pozo, W., Roque, A., & Almirall, E. (2016). Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* (canela amazónica) y *Piper carpunya* (guaviduca, pinku) potenciales fungocontroladores. *Qualitas*, 56-83.
- Cardoso, F. (2016). Fenol. *Academia*, 3.
- Carrasco, O., & Simbaña, M. (2016). *Variación de la composición química del aceite esencial de hojas de Ishpink (Ocotea quixos) en función del tipo de suelo, el área geográfica, y de factores ambientales dentro de las zonas de cultivo de la especie vegetal en la región oriental del Ecuador*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Carrier, D., Crowe, T., & Sokhansanj, S. (2002). *Sylibum marianum* (L.) Gaertn., flower head development and associated marker compound profile. *J. Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 10(1), 65-74.
- Carrión, A., & García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Castillo, E., & Martínez, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Madrid: Elsevier.
- Cazorla, M. (2013). *Actividad fotoprotectora de la maracuyá (Passiflora edulis), Ishpingo (Ocotea quixos) en fototipos III (Homo sapiens) para elaboración de un protector solar*. Riobamba: ESPOCH.
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 285-293.

- Chávez, N. (2013). *Efecto leishmanicida in vitro e in vivo de extractos derivados de Ocotea macrophylla y Zanthoxylum monophyllum*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Collahuazo, P. (2012). *Plan de manejo de la especie Ishpink Ocotea quixos (Lam) Kostern en la comunidad Jimiaraentsa*. Macas: GEF.
- Collahuazo, P. (2013). *Plan de manejo de la especie Ishpink Ocotea quixos (Lam) Kostern en la comunidad de Wapu*. Macas: Fundación Chankuap.
- Comas, R. (2010). *Contribución a la estandarización del proceso de obtención a escala de laboratorio de un extracto de hojas de Psidium guajava L.* . Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. .
- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. . *OFFARM*, 80-84.
- Dehesa, M. (2012). Control de calidad de los fitofármacos: Ecuador uso y comercio de plantas medicinales. Situación actual y aspectos importantes para su conservación. *Universitas*, 139 - 152.
- Delporte, C. (2010). *Farmacognosia*. Santiago de Chile: Universidad de Chile.
- Díaz, G. (2010). *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Ferraro, G., Martino, V., & Bandoni, A. (2015). *Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales*. Buenos Aires: Eudeba.
- Fréderick, R., Robert, S., Charlier, C., Ruyck, J., & Wouters, J. (2005). 3,6-disubstituted coumarins as mechanism-based inhibitors of thrombin and factor Xa. *Med. Chem.*, 63.

- Fundación Chankuap. (2014). *Manual de buenas prácticas de recolección Ishpink (Ocotea quixos)*. Macas.
- García, E. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Gil, J. (2012). *Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombianos durante los procesos de pre e industrialización*. . Medellín: Universidad de Antioquía.
- Hill, W., & Kolb, D. (1999). *Química para el nuevo milenio*. México D.F.: Pearson.
- Hurtado, M. (2015). *Caracterización fitoquímica de dos extractos alelopáticos obtenidos de Cinnamon canella y Ppiper angustifolium, mediante cromatografía y/o espectrofotometría*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Julkunen, & Tito, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 213 - 217.
- Klages, F. (2005). *Tratado de química orgánica: Química orgánica sistemática*. Zaragoza: Reverté.
- Ludwing, J. (2014). *Fenoles*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.
- Meza, K., & Geoconda, G. (2013). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus (DC) STAPF, Poacea en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Miranda, M., & Cuéllar, A. (2001). *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: Félix Varela.

- Montealegre, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del Espíngo (Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.) en la medicina tradicional indígena Inga, pruebas fotoquímicas y evaluación de la actividad antimicrobiana*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Montesdeoca, G. (2010). *Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de ajeno (Artemisia absinthium L.), romero (Rosmarinus officinalis L.) y manzanilla (Matricaria chamomilla L.) para combatir la menstruación dolorosa*. Riobamba: Escuela Politécnica Superior de Chimborazo.
- Morton, J. (1987). Mangosteen. Fruits of warm climates Miami. . *Med. Chem.*, 301-304 .
- Naranjo, P., Kijos, A., & Giesbrecht, A. (1981). Ocotea quixos, Ammerican cinnamon. *Journal of ethnopharmacology*, 4, 233 - 236.
- Naveda, G. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (Ruta graveolens), con alto contenido de polifenoles*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.
- Naveda, G. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de Ruda (Ruta graveolens), con alto contenido de polifenoles*. Quito: Escuela Politécnica Nacional.
- Noriega, P., & Decarro, C. (2008). Aceite foliar de Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La Granja*, 3-8.
- Ochoa, A., & Marín, J. (2012). *Caracterización física y química de extractps totales de Petiveria alliacea L. con acción antimicrobiana*. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente.

- OMS. (1998). *Quality control method for medicinal plant materials*.
- Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*". Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Palacios, J. (2015). Clasificación de los compuestos fenólicos simples. *Academia*, 5.
- Palakawon, G. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) parts and some essential oils. *International Food Research Journal*, 17, 583-589.
- Pérez, E. (1996). *Plantas útiles de Colombia*. Bogotá: Fondo Fen Colombia editores.
- Pérez, T. (2009). *Obtención de extractos a partir de plantas medicinales*. CENSA.
- Pérez, T. (2009). *Obtención de extractos a partir de plantas medicinales*. La Habana: Academia.
- Pinol, M. (2001). Introducción al metabolismo secundario. En J. Azcón, & M. Talón, *Fundamentos I Fisiología Vegetal* (págs. 261-274). Madrid: Mc Graw Hill.
- Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* , 121-134.
- Remington, A. (2000). *Farmacia de Remington* (Vol. I). Montevideo: Panamericana.
- Sánchez, L., & Sáenz, E. (2005). *Antisépticos y Desinfectantes*. Lima: Dermatología Peruana.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá: Azucena Martínez.
- Sharapin, N. (2000). *Qualidade da materia prima para produtos*. Guatemala: Conferencia en el I Curso Iberoamericano de Fitoterapia Clínica y III Reunión

de Coordinación Internacional de RIPROFITO (Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos).

Soto, M. (2013). *Metabolitos secundarios y ruta del ácido shikímico*. Lima: Universidad Nacional de Trujillo.

Urquiza, F. (2010). *Comparación del efecto adelgazante de las hojas de Pata de vaca (Bauhinia sp.) en extracto hidroalcohólico, medicamento homeopático y microdosis en personas con sobrepeso*. . Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

USP 30. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos de América* (30 ed.). Convention Knoxville.

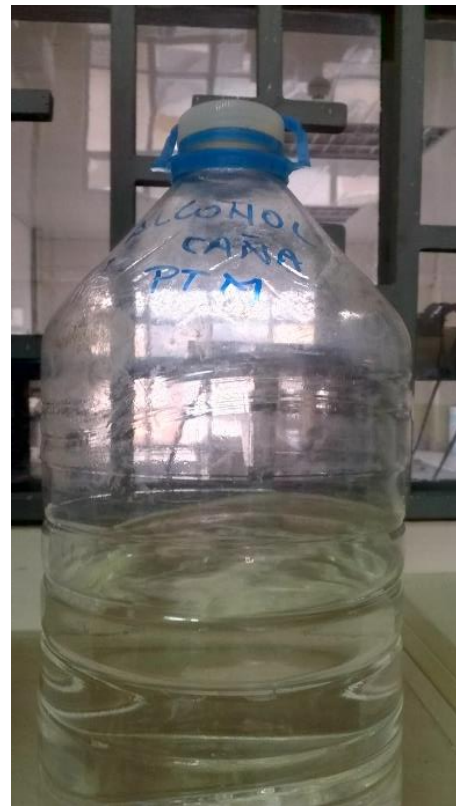
Veerle, E., & Cueva, E. (2008). Uso de plantas como aditivos en la alimentación. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*, 67-70.

Vidaurre, M., Querevalú, L., De los Ríos, E., & Ruiz, S. (2007). Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana*, 4(2), 122 - 131.

Villagomez, A. (2007). *Efectos inhibidores de los extractos de hojas de Morus sp. en la actividad de alfa-glucosidasa*. Quito: Escuela Politécnica del Ejército.

Anexos

Anexo 1. Disolventes



Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 2. Parámetros físico-químicos de los solventes

Etanol potable

Parámetro	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Resultado
Forma	Líquida	Líquida	Líquida	Líquida
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Solubilidad en agua	Miscible	Miscible	Miscible	Miscible
Grado alcohólico	96°GL	97°GL	96°GL	96°GL
Punto de ebullición				79°C
Densidad relativa	0,841	0,833	0,833	0,836
pH	7,585	7,590	7,588	7,587
Índice de refracción	1,365	1,364	1,365	1,365
Grados BRIX	20,5	20	20,5	20,33
Conductividad	34,5 mV	34,0 mV	34,4 mV	34,3 mV

Elaborado por: Los autores, 2017.

Etanol de caña

Parámetro	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Resultado
Forma	Líquida	Líquida	Líquida	Líquida
Color	Incoloro	Incoloro	Incoloro	Incoloro
Olor	Característico alcohol dulce	Característico alcohol dulce	Característico alcohol dulce	Característico alcohol dulce
Solubilidad en agua	Miscible	Miscible	Miscible	Miscible
Grado alcohólico	58°GL	57°GL	58°GL	58° G.L.
Punto de ebullición				-
Densidad relativa	0,9494	0.9575	0,9443	0,9504
pH	4,301	4,019	4,310	4,21
Índice de refracción	1,364	1,365	1,358	1,362
Grados BRIX	20	20,5	17,5	19,33
Conductividad	27,8 mV	28,0 mV	28,1 mV	27,97 mV

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 3. Control físico químico de material vegetal





Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 4. Análisis de control de calidad del material vegetal

Porcentaje material extraño.

Peso muestra	Peso material	Porcentaje ME
3400g	8g	0,2353
2500g	6g	0,2400
5900g	14g	0,2373
TOTAL		0,2375

Elaborado por: Los autores, 2017.

Porcentaje de humedad.

Muestra	Peso inicial	Peso final	% Humedad
1	5,001g	2,326g	46,511
2	5,002g	2,426g	48,501
3	5,019g	2,550g	50,807
TOTAL			48,606

Elaborado por: Los autores, 2017.

Porcentaje de cenizas totales.

Peso muestra	Cápsula vacía	Cápsula + cenizas	% Cenizas totales
3,0091g	44,0065g	44,0643g	1,9208
3,0062g	46,5637g	46,6214g	1,9194
3,0070g	47,6255g	47,6832g	1,9189
TOTAL			1,9197

Elaborado por: Los autores, 2017.

Porcentaje de cenizas solubles en agua.

Peso muestra	Cápsula vacía	Cápsula + cenizas	Cápsula + cenizas solubles	% CSA
3,0091g	44,0065g	44,0643g	44,0501g	0,4719
3,0062g	46,5637g	46,6214g	46,6071g	0,4757
3,0070g	47,6255g	47,6832g	47,6688g	0,4789
TOTAL				0,4755

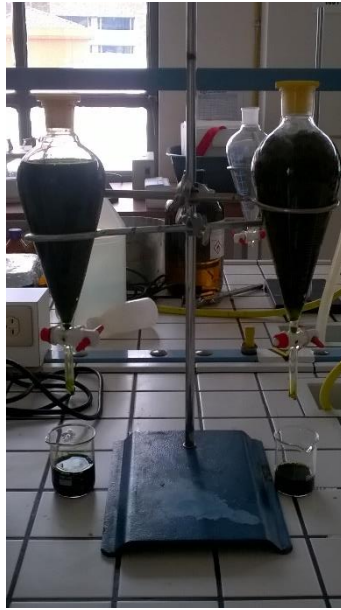
Elaborado por: Los autores, 2017.

Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Peso muestra	Cápsula vacía	Cápsula + cenizas	Cápsula + cenizas solubles	% CIA
3,0091g	44,0065g	44,0643g	44,0609g	0,1130
3,0062g	46,5637g	46,6214g	46,6181g	0,1098
3,0070g	47,6255g	47,6832g	47,6799g	0,1097
TOTAL				0,1108

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 5. Obtención de extractos



Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 6. Control de calidad de los extractos fluidos



Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 7. pH de los extractos de *Ocotea quixos*

Código del extracto	Valores pH	pH promedio	Código del extracto	Valores pH	pH promedio
AMF1 (90:10)	7,220		AMS1 (90:10)	7,085	
AMF2 (90:10)	7,436	7,019	AMS2 (90:10)	7,164	7,023
AMF3 (90:10)	6,401		AMS3 (90:10)	6,819	
AMF1 (70:30)	7,324		AMS1 (70:30)	7,122	
AMF2 (70:30)	7,005	6,914	AMS2 (70:30)	7,562	7,342
AMF3 (70:30)	6,414		AMS3 (70:30)	7,135	
AMF1 (50:50)	6,998		AMS1 (50:50)	7,089	
AMF2 (50:50)	7,271	6,831	AMS2 (50:50)	7,192	7,139
AMF3 (50:50)	6,223		AMS3 (50:50)	7,163	
CMF1 (90:10)	6,099		CMS1 (90:10)	6,322	
CMF2 (90:10)	6,370	6,035	CMS2 (90:10)	6,510	6,665
CMF3 (90:10)	5,635		CMS3 (90:10)	6,263	
CMF1 (70:30)	5,931		CMS1 (70:30)	6,622	
CMF2 (70:30)	6,278	5,972	CMS2 (70:30)	6,543	6,583
CMF3 (70:30)	5,708		CMS3 (70:30)	6,176	
CMF1 (50:50)	6,288		CMS1 (50:50)	6,062	
CMF2 (50:50)	6,127	6,017	CMS2 (50:50)	6,480	6,228
CMF3 (50:50)	5,636		CMS3 (50:50)	6,141	

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 8. Índice de refracción de los extractos de *Ocotea quixos*

Código del extracto	Valores IR	IR promedio	Código del extracto	Valores IR	IR promedio
AMF1 (90:10)	1,347		AMS1 (90:10)	1,347	
AMF2 (90:10)	1,346	1,352	AMS2 (90:10)	1,367	1,358
AMF3 (90:10)	1,364		AMS3 (90:10)	1,360	
AMF1 (70:30)	1,346		AMS1 (70:30)	1,346	
AMF2 (70:30)	1,345	1,352	AMS2 (70:30)	1,356	1,351
AMF3 (70:30)	1,366		AMS3 (70:30)	1,359	
AMF1 (50:50)	1,343		AMS1 (50:50)	1,343	
AMF2 (50:50)	1,346	1,348	AMS2 (50:50)	1,350	1,351
AMF3 (50:50)	1,354		AMS3 (50:50)	1,355	
CMF1 (90:10)	1,356		CMS1 (90:10)	1,355	
CMF2 (90:10)	1,357	1,356	CMS2 (90:10)	1,359	1,356
CMF3 (90:10)	1,354		CMS3 (90:10)	1,364	
CMF1 (70:30)	1,350		CMS1 (70:30)	1,354	
CMF2 (70:30)	1,348	1,349	CMS2 (70:30)	1,350	1,352
CMF3 (70:30)	1,349		CMS3 (70:30)	1,359	
CMF1 (50:50)	1,346		CMS1 (50:50)	1,350	
CMF2 (50:50)	1,346	1,346	CMS2 (50:50)	1,345	1,349
CMF3 (50:50)	1,345		CMS3 (50:50)	1,353	

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 9. Densidades (g/cm³) de los extractos de *Ocotea quixos*

Código del extracto	Valores densidad (g/cm ³)	Densidad Promedio (g/cm ³)	Código del extracto	Valores densidad (g/cm ³)	Densidad Promedio (g/cm ³)
AMF1 (90:10)	0.9139		AMS1 (90:10)	0.8811	
AMF2 (90:10)	0.9016	0.9084	AMS2 (90:10)	0.8881	0.8806
AMF3 (90:10)	0.9096		AMS3 (90:10)	0.8725	
AMF1 (70:30)	0.9391		AMS1 (70:30)	0.9212	
AMF2 (70:30)	0.9561	0.9458	AMS2 (70:30)	0.9279	0.9246
AMF3 (70:30)	0.9423		AMS3 (70:30)	0.9245	
AMF1 (50:50)	0.9647		AMS1 (50:50)	0.9488	
AMF2 (50:50)	0.9480	0.9589	AMS2 (50:50)	0.9482	0.9405
AMF3 (50:50)	0.9641		AMS3 (50:50)	0.9518	
CMF1 (90:10)	0.9647		CMS1 (90:10)	0.9602	
CMF2 (90:10)	0.9646	0.9657	CMS2 (90:10)	0.9536	0.9552
CMF3 (90:10)	0.9677		CMS3 (90:10)	0.9570	
CMF1 (70:30)	0.9727		CMS1 (70:30)	0.9755	
CMF2 (70:30)	0.9751	0.9742	CMS2 (70:30)	0.9843	0.9799
CMF3 (70:30)	0.9747		CMS3 (70:30)	0.9778	
CMF1 (50:50)	0.9805		CMS1 (50:50)	0.9776	
CMF2 (50:50)	0.9868	0.9830	CMS2 (50:50)	0.9825	0.9796
CMF3 (50:50)	0.9816		CMS3 (50:50)	0.9787	

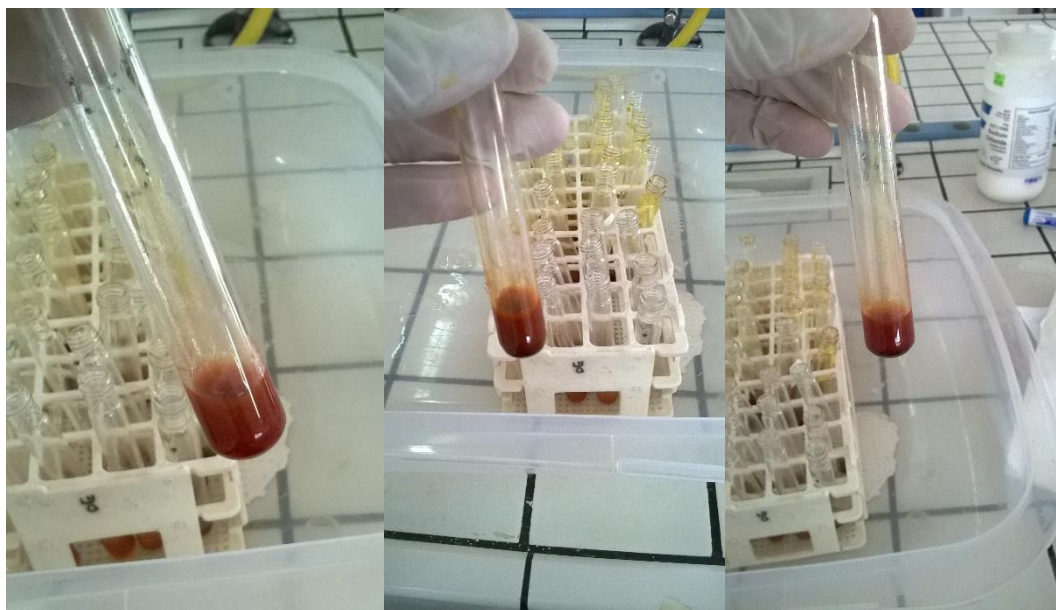
Elaborado por: Los autores, 2017.

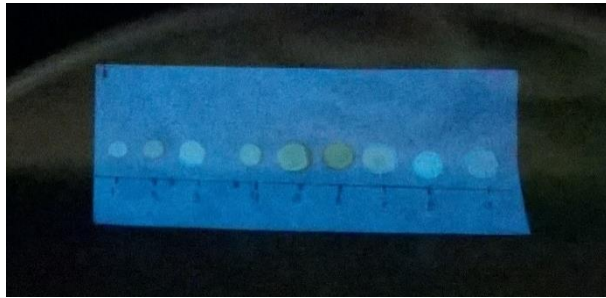
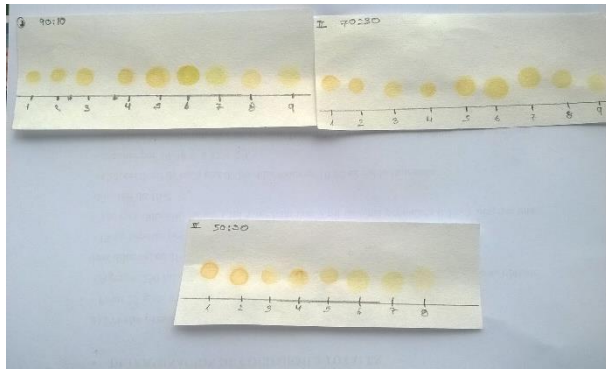
Anexo 10. Porcentaje de sólidos totales de los extractos de *Ocotea quixos*

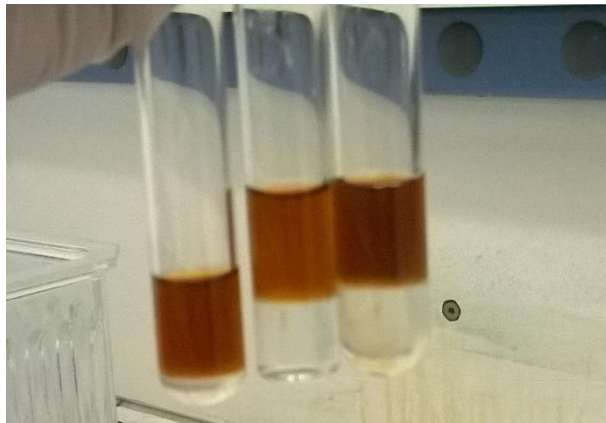
Código del extracto	Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula muestra (g)	% Sólidos Totales
AMF1 (90:10)	22,0870	22,1978	2,2160
AMF2 (90:10)	21,3560	21,5040	2,9600
AMF3 (90:10)	22,0654	22,1773	2,2380
AMF1 (70:30)	22,3669	22,4712	2,0860
AMF2 (70:30)	22,4585	22,5597	2,0240
AMF3 (70:30)	22,2860	22,3911	2,1020
AMF1 (50:50)	16,3651	16,4306	1,3100
AMF2 (50:50)	16,4267	16,4909	1,2840
AMF3 (50:50)	16,4088	16,4784	1,3920
CMF1 (90:10)	22,7881	22,8954	2,1460
CMF2 (90:10)	21,9856	22,0965	2,2180
CMF3 (90:10)	22,9962	23,0973	2,0220
CMF1 (70:30)	22,8166	22,9085	1,8380
CMF2 (70:30)	22,9011	22,9895	1,7680
CMF3 (70:30)	22,7556	22,8504	1,8960
CMF1 (50:50)	22,8615	22,9289	1,3480
CMF2 (50:50)	22,8895	22,9602	1,4140
CMF3 (50:50)	22,8568	22,9251	1,3660
AMS1 (90:10)	21,6776	21,8436	3,3200
AMS2 (90:10)	21,7025	21,8654	3,2580
AMS3 (90:10)	21,6963	21,8664	3,4020
AMS1 (70:30)	23,7584	23,9344	3,5200
AMS2 (70:30)	23,7941	23,9784	3,6860
AMS3 (70:30)	23,7541	23,9341	3,6000
AMS1 (50:50)	19,4780	19,5337	1,1140
AMS2 (50:50)	19,5248	19,5845	1,1940
AMS3 (50:50)	19,4654	19,5196	1,0840
CMS1 (90:10)	23,3703	23,4455	1,5040
CMS2 (90:10)	23,3654	23,4398	1,4880
CMS3 (90:10)	23,3841	23,4640	1,5980
CMS1 (70:30)	15,9023	16,0048	2,0500
CMS2 (70:30)	15,8012	15,9102	2,1800
CMS3 (70:30)	15,8821	15,9699	1,7560
CMS1 (50:50)	20,6391	20,7087	1,3920
CMS2 (50:50)	20,6451	20,7213	1,5240
CMS3 (50:50)	20,6384	20,7078	1,3880

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 11. Tamizaje fitoquímico







Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 12. Cuantificación de fenoles



Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 13. Absorbancias a 765nm de cada tratamiento

TRATAMIENTOS	ABSORBANCIA				mg Ácido gálico/mL de extracto
	REP 1	REP 2	REP 3	PROMEDIO	
AMF9010	0,1243	0,1052	0,1249	0,1181	0,9978
AMF7030	0,1110	0,1010	0,1389	0,1170	0,9883
AMF5050	0,0918	0,0705	0,0816	0,0813	0,6962
AMS9010	0,1257	0,1176	0,1239	0,1224	1,0328
AMS7030	0,1189	0,1023	0,1034	0,1082	0,9165
AMS5050	0,0816	0,0881	0,0745	0,0814	0,6970
CMF9010	0,1058	0,1156	0,1073	0,1096	0,9277
CMF7030	0,1237	0,1190	0,1205	0,1211	1,0218
CMF5050	0,1452	0,1207	0,1387	0,1349	1,1349
CMS9010	0,1239	0,1198	0,1170	0,1202	1,0150
CMS7030	0,1237	0,1278	0,1189	0,1235	1,0415
CMS5050	0,1211	0,1289	0,1224	0,1241	1,0470

Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 14. Estadísticos descriptivos de las variables de experimentación.

Variable dependiente: mg ácido gálico / mL extracto						
Material Vegetal	Tipo de solvente	Concentración de solvente	Media	Desviación estándar	N	
Fresco	Etanol potable	90:10	11,546	0,744	3	
		70:30	9,670	2,680	3	
		50:50	12,538	2,798	3	
		Total	11,252	2,342	9	
	Etanol de caña	90:10	13,298	0,513	3	
		70:30	10,365	2,798	3	
		50:50	8,009	1,163	3	
		Total	10,557	2,762	9	
	Total	90:10	12,422	1,117	6	
		70:30	10,018	2,480	6	
		50:50	10,274	3,135	6	
		Total	10,904	2,509	18	
	Seco	Etanol potable	90:10	11,129	2,737	3
			70:30	11,803	0,495	3
			50:50	6,239	1,123	3
Total			9,724	3,027	9	
Etanol de caña		90:10	8,939	1,458	3	
		70:30	9,511	2,480	3	
		50:50	11,969	2,551	3	
		Total	10,140	2,375	9	
Total		90:10	10,034	2,299	6	
		70:30	10,657	2,033	6	
		50:50	9,104	3,600	6	
		Total	9,931	2,648	18	
Total		Etanol potable	90:10	11,338	1,808	6
			70:30	10,737	2,082	6
			50:50	9,389	3,942	6
	Total		10,487	2,741	18	
	Etanol de caña	90:10	11,118	2,580	6	
		70:30	9,938	2,411	6	
		50:50	9,989	2,802	6	
		Total	10,348	2,508	18	
	Total	90:10	11,228	2,127	12	
		70:30	10,338	2,188	12	
		50:50	9,689	3,276	12	
		Total	10,418	2,590	36	

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 15. Prueba de homogeneidad de varianzas

Concentración (mg ácido gálico / mL extracto)			
Estadístico de	gl1	gl2	Sig.
Levene			
2,039	11	24	0,070

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.

Anexo 16. Protocolo de obtención de extractos hidroalcohólicos de *Ocotea quixos*

PROCESO	ESPECIFICACIONES	DURACIÓN
LIMPIEZA MATERIAL VEGETAL	Sumergir el material vegetal en agua con hipoclorito de sodio al 0,5 %. Enjuagar.	15 minutos en contacto con el hipoclorito.
SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	Condiciones: 45°C.	24 horas
TRITURADO DEL MATERIAL	Licuada industrial, obtener un tamaño de entre 1 a 2,5 cm.	Indeterminado
HUMECTACIÓN	Pesar 100 g de material vegetal y humectar con el doble de solvente.	2 horas
PERCOLACIÓN	Introducir el material vegetal y 400 ml de solvente.	48 horas
CONCENTRACIÓN	Emplear rotovapor en las siguientes condiciones. 45°C y 80 rpm.	Aproximadamente 2 horas
CLARIFICACIÓN	Filtrar empleando papel filtro. Centrifugación a 750 rpm.	Filtración: 1 – 2 horas Centrifugación: 8 minutos
MANTENIMIENTO	Mantener en refrigeración a 4°C.	Indeterminado

Nota. Elaborado por: Los autores, 2017.