

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN –DIGI-
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN DESARROLLO
INDUSTRIAL –PUIDI-**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS –IIQB-**

**Análisis químico y cuantificación de hernandulcina en orozús (*Phyla dulcis* Trev.)
proveniente de diferentes regiones de Guatemala aplicados como parámetros de
calidad fitoquímica del material vegetal silvestre o cultivado**

COORDINADOR

MA. Christian Daniel Farfán Barrera

INVESTIGADORES

**Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
MSc. José Vicente Martínez**

AUXILIARES DE INVESTIGACIÓN

**Br. Jorge Luis Samayoa Toledo
Br. Max Samuel Mérida Reyes**

**Inicio de Investigación: Enero de 2011
Conclusión de Investigación: Marzo 2012**

Guatemala, 29 de marzo de 2012

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	3
A. <i>Phyla dulcis</i> (Trevir) Moldenke	3
B. La hernandulcina	3
C. Estudios de <i>Phyla dulcis</i>	5
D. Dificultades en el análisis de hernandulcina por CG-EM	6
E. Teoría Molecular del sabor dulce	7
F. Aceites esenciales	9
G. Fenoles	10
1. Flavonoides	10
IV. JUSTIFICACIÓN	12
V. OBJETIVOS	13
VI. HIPÓTESIS	14
VII. METODOLOGÍA	15
A. Universo y Colecta	15
B. Preparación de la muestra	15
C. Determinación de Humedad	15
D. Determinación de contenido de cenizas	15
E. Aislamiento de la hernandulcina	16
1. Método de Souto-Bachiller <i>et al.</i> (1997)	16
2. Propuesta de aislamiento de la hernandulcina por formación de sales cuaternarias con dimetilamina	16
3. Propuestas para la derivatización de la hernandulcina	16
3.1 Acetilación de la hernandulcina (Compadre <i>et al.</i> , 1987)	17
3.2 Reducción de la hernandulcina (Compadre <i>et al.</i> , 1987)	17
F. Cromatografía Flash	17
G. Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger	18
H. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales y de hernandulcina aislada	18
I. Análisis de las sustancias aisladas (hernandulcina y posibles isómeros) por Resonancia Magnética Nuclear	18
J. Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales de Orozús	19
K. Cuantificación de Fenoles Totales	19
VIII. RESULTADOS	20
A. COLECTA	20
B. HUMEDAD	20
C. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	20
D. CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA	23
E. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES	26
IX. DISCUSIÓN	30
A. COLECTA Y HUMEDAD	30

B. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES	30
C. CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA	31
D. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES	32
E. CROMATOGRAFÍA FLASH Y EXTRACTOS DICLOROMETÁNICOS	32
X. CONCLUSIONES	33
XI. RECOMENDACIONES	34
XII. REFERENCIAS	35
XIII. ANEXOS	38
Anexo 1. Ubicación y humedad muestras colectadas y cultivadas	38
Anexo 2. Rendimiento Aceites Esenciales y Composición de Hernandulcina	39
Anexo 3. Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano	40
Anexo 4. Contenido de Fenoles Totales	40
Anexo 5. Fraccionamiento de Extractos y Aceites Esenciales por Cromatografía Preparativa y Cromatografía Flash	41
Anexo 6. Actividad Comunitaria en El Chico para la Difusión de Resultados	43

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

TABLAS

	Página
Tabla 1. Puntos de Colecta	20
Tabla 2. Humedad Muestras Colectadas y Cultivadas	20
Tabla 3. Rendimiento Promedio de Aceites Esenciales Muestras Colectadas	20
Tabla 4. Rendimiento Promedio de Aceites Esenciales Muestras Cultivadas	21
Tabla 5. Coeficiente de Correlación de Pearson para Aceites Esenciales Colectados y Altura de las Poblaciones	23
Tabla 6. Composición Porcentual de Hernandulcina en Aceites Esenciales	23
Tabla 7. Prueba de Pearson para Porcentaje de Hernandulcina y Altura del Punto de Colecta	26
Tabla 8. Fenoles Totales en Muestras	26
Tabla 9. Coeficiente de Correlación de Pearson para Concentración de Fenoles y Altura de la Muestras Colectadas	30
Tabla 10. Información GPS de Colecta	38
Tabla 11. Información GPS de Cultivo	38
Tabla 12. Humedad Muestras Colectadas	38
Tabla 13. Humedad Muestras Cultivadas	38
Tabla 14. Rendimiento Aceites Esenciales Muestras Colectadas	39
Tabla 15. Rendimiento Aceites Esenciales Muestras Cultivadas	39
Tabla 16. Composición de Hernandulcina en Aceite Esencial de Muestras Colectadas	39
Tabla 17. Composición de Hernandulcina en Aceite Esencial de Muestras Cultivadas	39
Tabla 18. Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano de Muestras Colectadas	40
Tabla 19. Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano de Muestras Cultivadas	40
Tabla 20. Fenoles Totales en Muestras Colectadas	40
Tabla 21. Fenoles Totales en Muestras Cultivadas	40

CUADROS

Cuadro 1. Resultados previos de hernandulcina en aceite esencial de <i>P. dulcis</i>	6
Cuadro 2. Composición del aceite esencial de <i>P. dulcis</i> da Guatemala (% de área)	7
Cuadro 3. Distancias interatómicas de sistemas AH, B en compuestos dulces representativos (Shallenberger y Acree, 1967)	9

ESQUEMAS

Esquema 1. Hernandulcina	4
Esquema 2. 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona	4
Esquema 3. Espectro de masas de hernandulcina obtenido del análisis por DG-EM del aceite esencial de orozús de Guatemala (Pérez, 2008)	5
Esquema 4. Patrón de fragmentación de la hernandulcina (Compadre <i>et al.</i> , 1987)	5
Esquema 5. Representación de los grupos OH glicol (Shallenberger e Acree, 1967)	8
Esquema 6. Algunas sustancias dulces (Shallenberger y Acree, 1967)	8
Esquema 7. Esqueleto de flavonoides, catequinas y teaflavinas	11
Esquema 8. Esqueletos de antocianinas, chalconas, antraquinonas y dos polifenoles simples (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos)	11
Esquema 9. Estructuras de las principales clases de flavonoides	11
Esquema 10. Hernandulcina acetilada (R= Ac)	17
Esquema 11. Hernandulcina reducida	17

GRÁFICAS

Gráfica 1. Cajas de Tuckey del Porcentaje de Rendimiento de Aceites Esenciales Muestras Cultivadas y Colectadas	21
Gráfica 2. Cajas de Tuckey del Porcentaje de Rendimiento de Aceites Esenciales en Muestras según su Procedencia	22
Gráfica 3. Cajas de Tuckey de la Composición Porcentual de Hernandulcina	24
Gráfica 4. Cajas de Tuckey de la Composición Porcentual de Hernandulcina según la Procedencia de la Muestra	25
Gráfica 5. Cajas de Tuckey de la Concentración de Fenoles en Muestras Cultivadas y Colectadas	27
Gráfica 6. Cajas de Tuckey de la Concentración de Fenoles en Muestras según su Procedencia	28

IMÁGENES

Imagen 1. Desarrollo de la Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús	41
Imagen 2. Revelación de Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús con Luz UV de Onda Corta	41
Imagen 3. Revelación de Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús con Luz UV de Onda Corta	42
Imagen 4. Separación de Compuestos por Cromatografía Flash	42
Imagen 5. Asistentes a la Actividad	43
Imagen 6. Expositor en la Actividad	43

I. RESUMEN

El proyecto consistió en la profundización de dos estudios realizados por esta unidad académica de la sustancia sesquiterpenoide hernandulcina y de otros metabolitos secundarios en la planta orozú (*Phyla dulcis* Trev.), nativa de Guatemala. En el proyecto coordinado por Pérez (2009) fue posible identificar plenamente la presencia de hernandulcina en muestras de orozú provenientes de diferentes regiones del país. De igual manera, Farfán (2009) encontró una relación entre la altitud a la que las muestras son colectadas y la cantidad de fenoles y aceites esenciales presentes en las mismas. En esta ocasión se plantea el cultivo de la planta en un campo experimental en la Universidad de San Carlos, para establecer si existen variaciones quimiótípicas. La hernandulcina es un principio dulce de la planta que ha sido clasificada como 1000 veces más dulce que la sacarosa, por lo que podría presentar potencial económico y de investigación para su obtención a partir del orozú, como fuente edulcorante de productos aromáticos y antisépticos. Por su parte, los aceites esenciales de la familia Verbenaceae son conocidos por su alta actividad biocida; mientras que los fenoles por su actividad antioxidante.

El material vegetal fue colectado en cuatro poblaciones de orozú en los departamentos de Santa Rosa, Guatemala y Zacapa. Durante las colectas fue evidente el riesgo que corre Orozú al igual que otras plantas nativas, ya que sus poblaciones se encuentran cada vez más disminuidas debido al uso extensivo de herbicidas. El material fue trasladado para su cultivo en el Campus Central de la USAC. Cuando las plantas llegaron a la madurez necesaria, se tomaron muestras tanto de los cultivos en el Campus Central como de los sitios de origen. De tal manera, se compararon los rendimientos de aceite esencial, contenido de hernandulcina, extracto diclorometánico y fenoles totales de los cuatro cultivos como de los cuatro sitios de colecta.

La extracción de aceites esenciales se llevó a cabo utilizando la técnica de hidrodestilación y colectados en n-pentano. Este método requiere de un tiempo prolongado de trabajo pero presente mejores rendimientos y menor consumo de disolventes orgánicos; además de ser más reproducible. La cuantificación de hernandulcina se realizó utilizando un equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de llama a partir de su compuesto de descomposición térmica 6-metil-5-hepten-2-ona el cual es producido por choque térmico al entrar el aceite esencial en contacto con el inyector del equipo a alta temperatura. También se realizó la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, extracciones por maceración con diclorometano y técnicas de cromatografía flash y preparativa.

Al cuantificar los aceites esenciales, se observó una variación entre 0.14% y 0.36% (p/p). El contenido de hernandulcina en dichos aceites se encontró entre 2.92% y 6.57%. Por su parte, los fenoles totales se ubicaron entre 21.00 y 43.72 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal. En todos los casos se observó una mayor dispersión en los resultados de las muestras colectadas que en las cultivadas. En algunos casos inclusive se observa una relación estadísticamente significativa entre la altura de la colecta y el contenido fitoquímico de la muestra.

II. INTRODUCCIÓN

En Guatemala existe una gran variedad de plantas nativas utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades tales como las respiratorias. Sin embargo, varias de estas plantas como orozús, no son aprovechadas en todo su potencial como remedios caseros o productos fitoterapéuticos, en gran parte debido al poco conocimiento científico que hay acerca de las mismas.

Esta subutilización de los recursos naturales conlleva varias consecuencias negativas tales como la gradual desaparición de los mismos y la pérdida del conocimiento tradicional relacionado. Esto se observa claramente en el caso de orozús, la cual se distribuía ampliamente en varios departamentos de Guatemala hace tan sólo 17 años cuando Fischer realizó un estudio extensivo de la misma (1997). Hoy en día, la planta ya no se encuentra en varios de los sitios que fueron reportados por dicho estudio debido a que se considera en muchos lugares como maleza y es eliminada con herbicidas, a pesar de su utilidad como remedio para enfermedades del tracto respiratorio.

Para solucionar esta situación se requiere de un conocimiento científico del orozús que permita demostrar su utilidad como remedio o alimento casero al igual que como droga cruda para la elaboración de productos de interés comercial. Esto requiere de la investigación de diferentes poblaciones y el establecimiento de parámetros químicos indicativos de la calidad de la planta, el cual fue el objetivo de este estudio.

III. Antecedentes

A. *Phyla dulcis* (Trevir) Moldenke

Es una especie perteneciente a la familia Verbenaceae. Cuenta con varios sinónimos entre los que se encuentran *Lippia dulcis* Trev., *Lippia scaberrima* Mold., *Phyla scaberrima* (Juss.) Moldenke, *Zapcinia scaberrima* Juss. ex Pers. (Enda-caribe, 1996), *Lippia asperifolia* Benth., *L. asperifolia* Reichemb, *L. dulcis* var. *mexicana* Wehmer, *Zapania scaberrima* Juss. ex Pers. (Fischer, 1997). Se trata de una planta herbácea pero a veces ligeramente leñosas en la base, decumbente o postrada, enraizando en los nudos, o erectas, aromáticas. Los tallos jóvenes cuentan con tricomas simples diminutos, rápidamente glabros. Mientras que las hojas son ovadas (lanceoladas), con un ancho de 1.5 a 4 cm y una longitud de 3 a 7 cm. Los ápices de las hojas son agudos, márgenes gruesamente crenados en los $\frac{3}{4}$ apicales o más, haces con tricomas simples adpresos, dispersos a abundantes, con bases agrandadas con la edad, envés puberulento. (Stevens 2001; Núñez 1978; Morton *et al.* 1981; Ministerio de Salud de Nicaragua 1986)

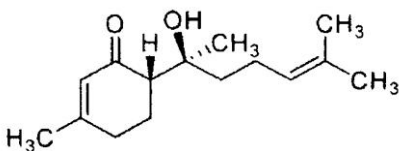
Especie ampliamente distribuida entre México y Panamá, también se encuentra presente en las islas del mar Caribe. (Williams 1981) Entre los países que menciona Fischer (1997) se incluyen a Estados Unidos (Arizona), Cuba, República Dominicana, Puerto Rico, Colombia, Chile, Venezuela e India. En Guatemala se encuentra entre los 0 y 1800 msnm principalmente en lugares muy húmedos como orillas de cuerpos acuíferos. Se ha encontrado en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Guatemala, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa y Sololá (Gibson 1970). Otros departamentos donde ha sido reportado son Jalapa, Jutiapa, Chimaltenango, Quetzaltenango, Escuintla y Baja Verapaz (Fischer, 1997)

B. La hernandulcina

La (6S, 1'S)-(+)-hernandulcina (Esquema 1) es reconocida como el principio dulce de la planta *Phyla dulcis*, Verbenaceae, antes conocida como *Lippia dulcis*. El nombre de la molécula fue dado en honor al conquistador español Francisco Hernández, quien escribió una monografía titulada "*Historia Natural de la Nueva España*", entre 1570 y 1576, en la cual describía una planta intensamente dulce conocida con el nombre azteca de Tzompelic xihuitl, que significa "hierba dulce" y que es la planta actualmente conocida como "orozús" o *P. Dulcis* (Compadre *et al.*, 1985). El compuesto, es un sesquiterpeno tipo bisabolano aislado por primera vez de las hojas y flores de la planta *P. Dulcis* en México. Fue catalogada como 1000 veces más dulce que la sacarosa bajo una base molar, en ensayos de expertos (Kaneda, 1992). La forma racémica del compuesto ha sido sintetizada por condensación aldólica partiendo de dos cetonas comercialmente disponibles, la 6-metil-5-hepten-2-ona y la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (Esquema 2), que son también sus productos de degradación térmica. La (+)-hernandulcina no es tóxica para ratones en dosis simples de hasta 2 g/kg de masa corporal (Kaneda, 1992).

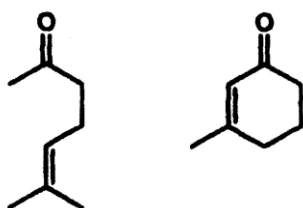
La hernandulcina ha sido descrita en el aceite esencial de *P. Dulcis* de México. Estudios posteriores en México, indicaron que la hernandulcina no fue encontrada en el aceite esencial de *P. Dulcis*, mientras que el monoterpenoide alcanfor fue el componente principal. En Puerto Rico, la hernandulcina fue encontrada como el componente principal de extractos de diclorometano de la planta *P. Dulcis*. En el análisis del aceite esencial de *P. dulcis* de plantas de Guatemala, no había sido encontrada la hernandulcina, mientras que las cetonas 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, productos de la degradación térmica, fueron encontradas en concentraciones importantes (Jayes, 2007) (Cuadro 2). En un estudio reciente y en la primera fase del proyecto, la hernandulcina ha sido identificada por Cromatografía de Gases con Detector de Espectrometría de Masas (CG-EM) (Pérez, 2008). Fueron identificados también sus productos de degradación 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona. El espectro de masas de la sustancia obtenido en dicho experimento se presenta en el esquema 3 así como el patrón de fragmentación de masas (esquema 4). En el espectro pueden observarse los picos de la eliminación de agua en 218 m/z, su posterior fragmentación (137m/z), y otros picos importantes en la identificación de la sustancia (153, 110, 95, 82 e 69 m/z). (Pérez, 2008).

Los métodos de aislamiento y derivatización propuestos en este proyecto se basan en trabajos previos con hernandulcina y con moléculas con estructura análoga, como as α,β -insaturadas (Lima *et al.*, 1985).

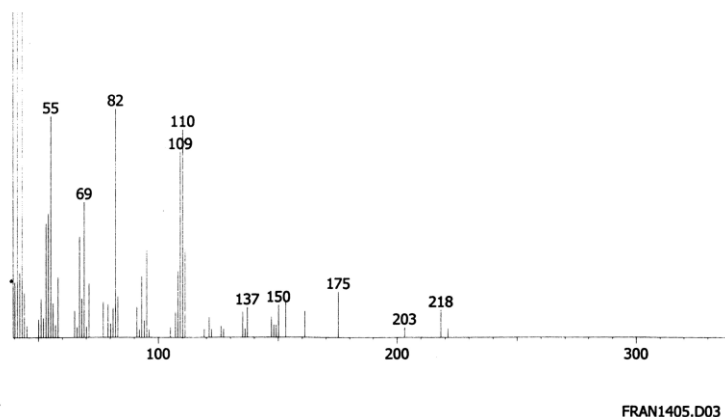


(6S,1'S)-(+)-Hernandulcin (1)

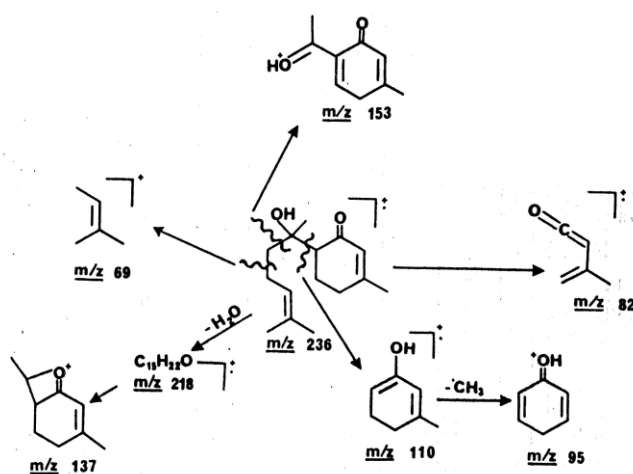
Esquema 1. Hernandulcina



Esquema 2. 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona



Esquema 3. Espectro de masas de hernandulcina obtenido del análisis por DG-EM del aceite esencial de orozú de Guatemala (Pérez, 2008)



Esquema 4. Patrón de fragmentación de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

C. Estudios de *Phyla dulcis*

En el estudio de Souto-Bachiller *et al* (1997), con *P. dulcis* de Puerto Rico, fue encontrado que *P. dulcis* presentaba alta proporción de sesquiterpenoides (79%), siendo los principales: el sesquiterpenoide intensamente dulce (+)-hernandulcina (36%) y su epímero (-)-epi-hernandulcina (22%). En ese estudio no fue encontrado alcanfor (<<0.01%). En un trabajo previo en México, *P. dulcis*, presentó solo cantidades traza de hernandulcina (40 ppm peso/peso seco), mientras que el aceite esencial aislado por destilación, presentó principalmente monoterpenoides (86%), con alcanfor como principal componente (53%). Es importante mencionar que Souto-Bachiller y colaboradores, aislaron la hernandulcina partiendo de extractos con solventes orgánicos, analizando después la molécula por CG-EM, experimentando dificultades que se describen en sección Dificultades analíticas. En México, la hernandulcina no fue detectada en el aceite esencial extraído por hidrodestilación, en el análisis por CG-EM. Souto-Bachiller y colaboradores sugieren que posiblemente la planta analizada en México no era *P. dulcis* o en otro caso, correspondía a otro quimiotipo de la misma especie. El Cuadro 1 presenta los resultados relevantes sobre la composición del

aceite esencial de *P. Dulcis* obtenidos en México y en Puerto Rico. La metodología de extracción diferente también podría ser una causa para no haber encontrado la hernandulcina en la planta de México.

Cuadro 1

Resultados previos de hernandulcina en aceite esencial de *P. dulcis*

Sustancia	México	Puerto Rico
Alcanfor	53.24	0.00
Canfeno	15.99	0.12
(+)-hernandulcina	0.00	36.00
(-)-epi-hernandulcina	0.00	22.00

Kaneda *et al.* (1992), identificaron un nuevo sesquiterpeno dulce, de las flores y hojas de *P. dulcis* colectadas en Panamá, la (+)-4-beta-hidroxihernandulcina, que fue aislada con (+)-hernandulcina, (-)-epi hernandulcina, y 6-metil-5-hepten-2-ona. Acteoside (verbascoside), un glicosido fenilpropanoide fue aislado de las flores de *P. dulcis*. La estructura de la (+)-4-beta-hidroxihernandulcina fue establecida por la interpretación de los datos espectrales. Cáceres (1998) indica que la composición del aceite esencial de *P. dulcis* de Guatemala, presenta los componentes principales: lipiol, monoterpenos (alcanfor, borneol, canfeno, limoneno, linalol, mirceno, pineno, terpinoleno, a-terpineol); sesquiterpenos: cadineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, copaeno, b-cariofileno y otros desconocidos), no mencionando la hernandulcina.

El análisis del aceite esencial de *P. dulcis* de una población de Guatemala, colectada en tres meses de 2006, mostró resultados donde los componentes principales fueron 6-metil-5-hepten-2-ona (18.8-21.4%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (9.6-11.1%) y a-bisabolol (8.0-14.6%), no siendo encontrada la hernandulcina (Cuadro 2). El rendimiento de extracción del aceite por hidrodestilación fue de 0.54% (abril), 0.50% (junio) y 0.60% (octubre). Las cetonas 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, son los fragmentos térmicos de la hernandulcina, por lo cual es interesante aislar y cuantificar la hernandulcina en plantas de Guatemala (Jayes *et al.*, 2008). La hernandulcina fue detectada en la primera fase del presente proyecto, en Análisis efectuados por Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases con Detector de Masas.

D. Dificultades en el análisis de hernandulcina por CG-EM

Souto-Bachiller *et al.* (1997), encontraron que las condiciones utilizadas en México para el análisis de hernandulcina no eran adecuadas, ya que la molécula es relativamente no volátil y térmicamente degradable. Los autores utilizaron inicialmente las condiciones publicadas por Kinghorn y colaboradores, que consistían en la aplicación de temperaturas de inyección bajas (70-80°C) para preservar la hernandulcina térmicamente sensible y usando división de flujos en relación 17:1 para concentrar la muestra. Los autores utilizaron un inserto de división típico, en el puerto de inyección. Las muestras de aceite fueron analizadas usando columnas HP Ultra de 25 m y SPB5

Supelco de 60 m, con división de flujos de 40:1 e 15:1 respectivamente. La rampa de temperatura fue establecida desde 35°C (4 min) hasta 300°C (4°C/min). Esas condiciones no fueron satisfactorias para el análisis de la hernandulcina, ya que la hernandulcina no se evaporaba completamente.

Cuadro 2

Composición del aceite esencial de *P. dulcis* de Guatemala (% de área).

Sustancia	04/06	06/06	10/06
6-metil-5-hepten-2-ona	19.6	21.4	18.8
3-metil-2-ciclohexen-1-ona	10.7	11.1	9.6
α -copaeno	3.4	6.7	4.8
β -cariofileno	6.1	7.6	7.5
γ -farneseno	4.9	5.2	6.0
Germacreno D	2.7	1.1	3.4
Biciclogermacreno	4.8	2.1	5.7
ϕ -cadineno	5.4	5.3	5.6
Espatulanol	2.4	5.1	2.3
α -bisabolol	14.6	8.0	11.9

Souto-Bachiller *et al.* (1997) lograron mejores resultados, utilizando un inserto menor (1.3 mm d.i., 140 μ L) con capacidad para transferir la muestra a la columna muy rápidamente usando pequeñas cantidades (0.1-0.2 μ L). Así, la muestra fue vaporizada en el inyector a alta temperatura (220°C) y transferida directamente a la columna durante el tiempo isotérmico (30-60s). Para mejorar la eficiencia de la columna la muestra fue reconcentrada en la cabeza de la columna antes de la separación siendo fijada la temperatura inicial a 60-70°C por 2-4 min para alcanzar un mejor efecto de solvente, con lo cual se logró la transferencia cuantitativa de la muestra en 30 s.

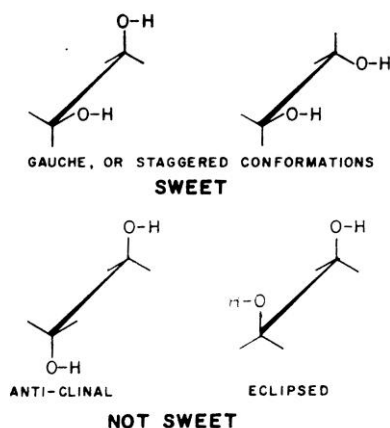
E. Teoría Molecular del sabor dulce

Shallenberger y Acree describieron la teoría del sabor dulce en 1967 (Shallenberger y Acree, 1967). Según esa teoría, el grupo glicol es la unidad dulce de los azúcares y la intensidad del sabor dulce varía inversamente con el grado en el cual los grupos OH-glicol están enlazados intermolecularmente por enlaces de hidrógeno. Los grupos OH vecinos en la unidad glicol necesitan estar orientados aproximadamente en conformación "Gauche", o estar en conformación alterna. Los grupos OH vecinos que están en conformación anti aparentemente están muy separados para causar sabor dulce. Los grupos OH glicol que se encuentran eclipsados probablemente participan en un enlace de hidrógeno intramolecular que inhibe competitivamente la interacción del glicol con el sitio receptor.

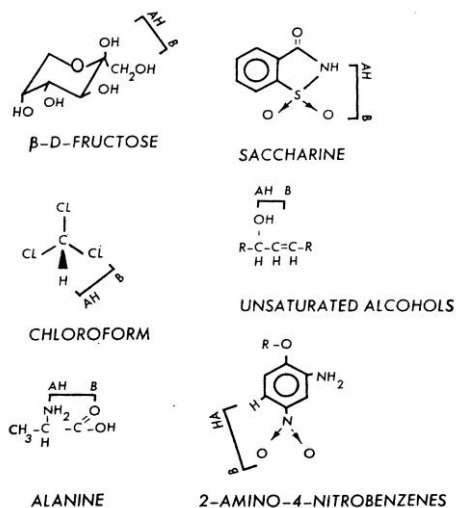
Estas características estéricas de las unidades de azúcar dulce y no dulce se muestran en perspectiva en el Esquema 5. Los parámetros conformacionales del glicol y su conformación gruesa de anillos de piranosa y furanosa han sido utilizados para explicar

a la variación en la intensidad del sabor dulce de los azúcares. El mecanismo primario de la respuesta del sabor dulce es el enlace de hidrógeno intermolecular entre la unidad glicol y el sitio receptor de sabor. La unidad dulce de los azúcares, que es la unidad glicol, puede ser catalogada como una entidad bifuncional con un componente *AH* y otro *B*.

Esquema 5. Representación de los grupos OH glicol (Shallenberger e Acree, 1967)



Así, se reconoce una característica común en muchas sustancias que presentan sabor dulce. En el sistema *AH,B*, *A* y *B* son átomos electronegativos separados por una distancia mayor que 2.5 Armstrongs (*A* en este trabajo), aunque menor que 4 Å. *H* es un átomo de hidrógeno enlazado a uno de los átomos electronegativos por un enlace covalente. Así, las sustancias de sabor dulce deben tener un protón ligeramente ácido a una distancia específica de un orbital electronegativo. Normalmente *A* y *B* son oxígeno o nitrógeno, pero en algunos casos uno de ellos podría ser un átomo de carbono o cloro o un centro de insaturación. *AH* es un donador de protones y *B* es un aceptor de protones. Ejemplos de sustancias con sabor dulce son mostrados en el Esquema 6. Las características que confieren el sabor dulce a esas moléculas son resumidas en el Cuadro 3.


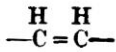


Esquema 6. Algunas sustancias dulces (Shallenberger y Acree, 1967).

Cuadro 3

Distancias interatómicas de sistemas AH, B en compuestos dulces representativos (Shallenberger y Acree, 1967)

Table 1. INTERATOMIC DISTANCES OF AH, B SYSTEMS IN REPRESENTATIVE SWEET COMPOUNDS

Compound	AH	B	A-B distance (Å)	AH proton-B orbital distance (Å)
β -D-Fructopyranose	—OH	—O—	3.5	2-4
Saccharine		→O	2.5	3.0
Chloroform	—CH	—Cl	1.9	2.8-3.2
1-Octene-3-ol (unsaturated alcohol)	—OH		3.0	2-4
Alanine	—NH ₃ ⁺	—COO ⁻	3.0	2-4
1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzene	ArH	→O	2.7	-

En el caso de la hernandulcina, dos posibles sitios de enlace son los grupos carbonilo C-1 e hidroxilo C-1' (ver esquema 1), debido a que el sabor dulce de la sustancia es perdido cuando estos grupos son modificados. Ya que estos dos grupos funcionales están localizados a 2.6 Å en la conformación principal, la molécula encaja en el modelo de Shallenberger para sustancias dulces, por lo que esto explicaría el sabor intensamente dulce de esta molécula.

F. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son usados en muchas ramas de la industria para proporcionar aromas y olores especiales a productos como perfumes, cosméticos, jabones, condimentos, dulces. Otros usos consisten en enmascarar olores desagradables en ambientes de trabajo e instalaciones sanitarias, así como su uso como solventes y como insumos en productos de las industrias de plásticos, tintas, caucho, insecticidas y otras. Los aceites esenciales son la mezcla de sustancias volátiles obtenidas por arrastre con vapor de agua. En general el término fracción volátil es usado para definir una mezcla de compuestos volátiles que pueden recuperarse debido a sus características de evaporización espontánea y /o a través de técnicas disponibles. La fracción volátil es de esta forma un marco que abarca los extractos de headspace, aceites esenciales, sabores, fragancias, aromas y extractos obtenidos por técnicas específicas (Bicchi *et al.*, 2006).

Muchos aceites constituyen compuestos de partida para síntesis de otras sustancias útiles en las industrias química y farmacéutica. Otros componentes tienen propiedades farmacológicas y son usados como antibacterianos, analgésicos, sedantes, expectorantes, estimulantes y estomáquicos en la composición de medicamentos. Para que un aceite esencial nuevo sea introducido en el mercado internacional, presenta diferentes niveles de dificultad, según la industria para la que se destine, así por ejemplo, para su aceptación en la industria de aromas debe cumplir con patrones complejos y rígidos, exigiendo una calidad uniforme. Por esta razón, generalmente

existe un gran interés en esta industria por la investigación de nuevas fuentes de aceites esenciales. En el caso de la industria química, en la cual los aceites esenciales son utilizados como solventes, o bien, como insumos, la aceptación del nuevo producto no presenta las mismas restricciones.

Craveiro *et al* (1981), seleccionaron varias plantas con posibilidades económicas en cuanto a su cultivo, basándose en los siguientes criterios:

- a) abundancia de la planta en la región
- b) rendimiento de aceite esencial elevado, igual o mayor que 0.5%
- c) un componente principal económicamente importante en concentración superior a 30%
- d) un componente secundario de alto valor económico

En cuanto a las técnicas de extracción, las más conocidas son el arrastre con vapor de agua, la hidrodestilación y la extracción con solventes. Para propósitos analíticos es la hidrodestilación con aparato tipo Clevenger la más utilizada (Pereira, *et al*, 2000), sin embargo, esta técnica provoca reacciones de oxidación en varios componentes del aceite esencial, debido a la presencia de agua y la alta temperatura, por lo que la composición del aceite se altera antes del análisis cromatográfico. Por esta razón, se ha utilizado recientemente la técnica de destilación-extracción por tres horas, utilizando el aparato de Likens-Nickerson, para la extracción del aceite con fines puramente analíticos (Pereira *et al.*, 2003).

G. Fenoles

Los fenoles se dividen en dos grupos principales, los policíclicos y los simples. Entre los primeros encontramos a los flavonoides, antraquinonas, taninos y otros polifenoles policíclicos.

1. Flavonoides

Éste es el grupo más ampliamente estudiado. Cuentan con dos anillos de benzo-1-pirano-4-quinoína (anillos A y C) y un anillo B. De acuerdo a la posición de los grupos hidroxilo y demás grupos funcionales, se subclasifican de la siguiente manera (Sun *et al.* 2000:1373):

Flavonas: Estructura básica.

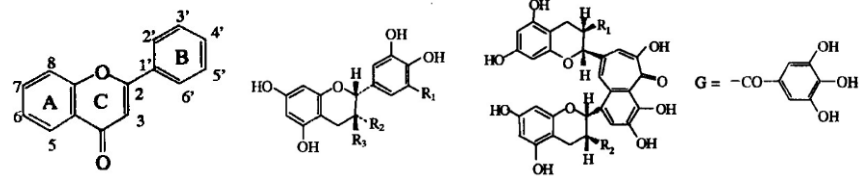
Flavonoides: Presenta un grupo hidroxilo en la posición 3.

Flavanonas: El enlace 2-3 se encuentra saturado.

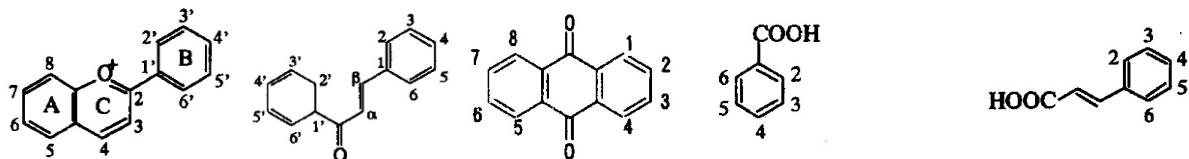
Catequinas: El anillo C es un 1-pirano.

Chalconas: Presentan un anillo C abierto.

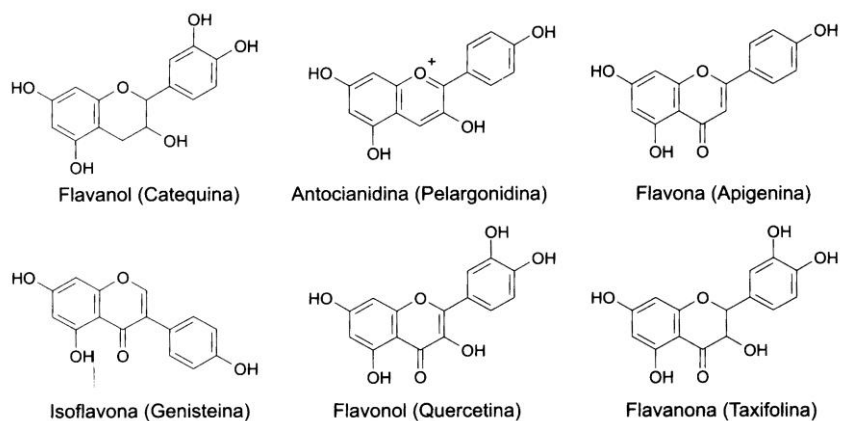
Antocianidinas: El anillo C es un 1-pirano, enlaces 1-2 y 3-4 insaturados.



Esquema 7. Esqueleto de flavonoides, catequinas y teaflavinas



Esquema 8. Esqueletos de antocianinas, chalconas, antraquinonas y dos polifenoles simples (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos)



Esquema 9. Estructuras de las principales clases de flavonoides

IV. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo a nivel nacional de los productos fitoterápicos y naturales requiere de un respaldo científico que certifique la calidad y contenido de estos productos iniciando por la droga cruda a partir de la cual se manufactura. A pesar de haber una gran cantidad de plantas utilizadas en Guatemala con diferentes propósitos, pocas de ellas han sido investigadas desde un punto de vista químico; el cual es actualmente un requerimiento a nivel internacional para su aceptación y comercio. Esto evita que las personas que tienen acceso a estas plantas de una manera rutinaria se puedan beneficiar de su cultivo, colecta, secado y preparación artesanal.

La comparación del aceite esencial y fenoles totales de diferentes poblaciones de orozú constituye uno de los primeros pasos necesarios para la determinación de las características fitoquímicas que son reproducibles entre cada población y las que no lo son. Dichas características son fundamentales para la explicación de otras propiedades que se puedan observar en la planta o en sus extractos tales como actividad farmacológica o toxicidad.

De igual manera, esta información ayuda a determinar algunos parámetros químicos relevantes para establecer la calidad de la droga cruda o extractos de orozú. Estos parámetros incluirían en este caso la cantidad de fenoles totales, además del porcentaje de rendimiento, perfil cromatográfico. La identificación y cuantificación de su compuesto químico más característico, la hernandulcina como marcador químico o bien de sus precursores a través de nuevos métodos de investigación aportaría otros elementos para su caracterización química.

Debido a que el orozú crece frecuentemente cerca de cultivos de mayor interés tales como la caña de azúcar, en muchos lugares se ha optado por eliminarlo haciendo uso de herbicidas. Las poblaciones de orozú se han reducido significativamente desde los estudios etnobotánicos realizados por Fischer (1997) hasta el punto que es prácticamente inexistente en el departamento de Escuintla; donde antes se encontraba en un gran número de poblaciones. La generación de conocimiento que de un valor agregado al cuidado y mejor aprovechamiento del orozú podría revertir dicha tendencia no sólo para esta sino también para otras plantas.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar el contenido de hernandulcina en orozús (*Phyla dulcis*) de cuatro procedencias, en las mismas condiciones de cultivo y su aplicabilidad como marcador químico.

Específicos

Determinar la concentración de hernandulcina en material vegetal de orozús de cuatro procedencias cultivada en la Ciudad de Guatemala.

Aislar la hernandulcina y posibles isómeros de orozús de Guatemala e identificarlas por técnicas cromatográficas, espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear.

Determinar la hernandulcina en el aceite esencial de orozús extraída por hidrodestilación y por Extracción con Fluidos Supercríticos.

Comparar el contenido de metabolitos secundarios en orozús de diferentes poblaciones cultivadas en las mismas condiciones en el departamento de Guatemala.

Elucidar la estructura de otras moléculas que puedan ser aisladas a partir de los extractos de cromatografía Flash de *P. dulcis*, por Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear.

VI. HIPÓTESIS

La planta *P. dulcis* de Guatemala contiene hernandulcina en concentraciones que permiten su aislamiento y su caracterización por técnicas cromatográficas y de Resonancia Magnética Nuclear.

VII. METODOLOGÍA

A. Universo y Colecta

Con base en la información de la Flora Guatemalteca, se realizarán viajes de campo para la localización de *P. dulcis*. Se buscarán por lo menos seis procedencias distintas, contándose a la fecha con dos poblaciones localizadas en Barberena y en la ciudad de Guatemala. Se realizarán dos colectas en cada población durante el desarrollo del proyecto. Dos ejemplares de cada población serán colectados para ser herborizados, depositándose una en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. A cada muestra se le asignará un código, iniciando por dos letras que identifiquen la localidad seguido de seis dígitos correspondientes a la fecha de muestreo. Se realizará una lectura con un sistema de posicionamiento geográfico (GPS) para referenciar el lugar de colecta.

Se coleccionará por lo menos 1 Kg de partes aéreas en cada población de la planta y el material será transportado a la ciudad de Guatemala para su procesamiento.

B. Preparación de la muestra

Las hojas y troncos suaves del material vegetal serán separados y el resto será eliminado. Luego, el material vegetal será mezclado y secado a temperatura ambiente, dejando una fracción de 25 g para determinaciones de humedad. Dos ejemplares serán herborizados para depositar en herbario.

Una mitad de cada muestra será separada para el aislamiento de la hernandulcina.

La otra mitad de la muestra será dividida en tres submuestras de masa aproximadamente igual.

A partir de cada submuestra serán realizadas las determinaciones que se explican a continuación.

C. Determinación de Humedad

Pesar con exactitud 10.00 g de material vegetal recién cortado (submuestra 1) y colocarla en una cápsula de porcelana.

Colocar la muestra en el horno de convección y dejarla a 95°C por 20 h.

Pesar la muestra en balanza analítica, determinando el contenido de humedad por diferencia con el peso original.

D. Determinación de contenido de cenizas

Pesar con exactitud en una balanza analítica, 4 g de material vegetal húmedo en un crisol de porcelana.

Calcinar la muestra en una mufla a 550°C por 14 horas, o hasta obtener cenizas blancas.

Pesar las cenizas en balanza analítica luego de la calcinación.

Obtener el contenido de cenizas, relacionando el peso de las cenizas con el peso original de la muestra.

E. Aislamiento de la hernandulcina

1. Método de Souto-Bachiller *et al.* (1997)

- 1) 10 g de planta seca y molida son extraídos en aparato Soxhlet con pentano (100 mL) por 4 h. Hacer una segunda extracción con CH_2Cl_2 .
- 2) Concentrar los extractos en rotavapor
- 3) Disolver los residuos en 1-3 mL de cloroformo
- 4) Separar a hernandulcina por CCD preparativa usando hexano- Me_2CO (17:3)
- 5) Rf hernandulcina = 0.5

2. Propuesta de aislamiento de la hernandulcina por formación de sales cuaternarias con dimetilamina:

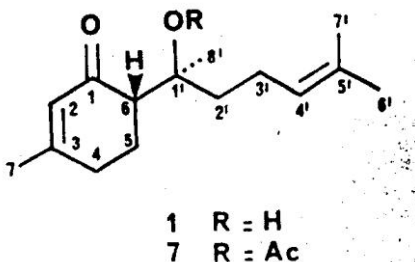
- 1) Extraer 20 g de hojas secas y molidas de *P. dulcis*, con hexano.
- 2) Extraer posteriormente el material vegetal residual de con etanol
- 3) Extraer el extracto etanólico con hexano formando así el extracto hexánico del etanólico.
- 4) Aplicar separadamente el proceso selectivo de aislamiento a los extractos hexánico y hexánico del etanólico.
- 5) Concentrar los extractos hexánicos y disolver en acetato de etilo.
- 6) Adicionar dimetilamina en exceso para formación de los productos de adición a la insaturación en alfa.
- 7) Extraer el exceso de dimetilamina con agua.
- 8) Adicionar ácido acético para separar los productos aminados bajo la forma de acetatos solubles en agua de otras sustancias presentes en la fase orgánica.
- 9) Después de neutralizar la fase acuosa y extraer con acetato de etilo, es obtenida una mezcla de los productos de adición de dimetilamina, entre los cuales debe estar el derivado de la hernandulcina
- 10) Adicionar yoduro de metilo, para formar la sal de amonio
- 11) Eliminar el grupo trimetilamina adicionando solución básica con carbonato de sodio
- 12) Extraer con acetato de etilo y concentrar en rotavapor
- 13) Separar la hernandulcina por cromatografía en columna Flash usando hexano- Me_2CO (17:3)
Rf hernandulcina = 0.5
- 14) Derivatizar y realizar pruebas de identificación por CG-EM, espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear en el Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro.

3. Propuestas para la derivatización da hernandulcina

Después de aislar la hernandulcina, se propone derivatizarla para mejorar el análisis cromatográfico, para lo cual son propuestos tres procedimientos:

3.1 Acetilación de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

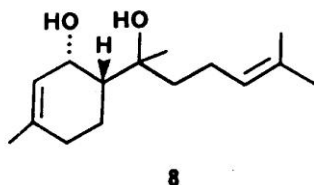
- 1) Mezclar 118 mg de hernandulcina aislada (0.5 mmol) con 0.4 mL de trietilamina e 0.4 mL (CH₃CO)₂O, en presencia de 150 g 4-(dimetilamino)piridina.
- 2) Agitar por 36 h.
- 3) Purificar por CCF preparativa.
- 4) Analizar por CG-EM. Picos de la hernandulcina acetilada (esquema 7): (m/z 278 (M⁺, 0.4%), 236 (1), 218 (34), 150 (17), 109 (100), 82 (25), 43 (70); UV (λ max 235 nm; log e 4.32).



Esquema 10. Hernandulcina acetilada (R= Ac)

3.2 Reducción de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

- 1) Mezclar 200 mg de hernandulcina (0.85 mmol) con una cantidad equimolar de NaBH₄ en presencia de cloruro de samario hexahidratado (0,85 mmol) en metanol (0.5 mL)
- 2) Purificar por CCD preparativa em éter petróleo-acetona (17:3).
- 3) Analizar por UV (λmax = 210 nm; log e 3.69). (Esquema 8)



Esquema 11. Hernandulcina reducida

Después de la derivatización la hernandulcina puede ser analizada por CG-EM y RMN.

F. Cromatografía Flash

Empacar la columna Flash en seco, con sílica gel seca y en la parte superior se coloca la pasta formada por la muestra y el solvente orgánico. Luego, adicionar una capa de 1 cm de sílica gel y con la llave de salida cerrada, adicionar el solvente orgánico (el de menor polaridad a utilizar en el experimento), cerrar por encima el sistema y se abrir la llave de salida, aplicando presión por encima de la columna con un compresor. Colectar las diferentes fracciones y concentrar en rotavapor. Utilizar hexano:acetona (17:3) como fase móvil. Colectar las fracciones y realizar pruebas con placas de

cromatografía en capa fina (CCF) para detectar las fracciones en que es eluida la hernandulcina.

G. Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger

En vista que existen trabajos que indican que la hernandulcina se encuentra en el aceite esencial de orozú, en este trabajo se pretende evaluar el grado de extracción de hernandulcina que se logra por el método de obtención tradicional de aceites esenciales, la hidrodestilación, así como evaluar si existe descomposición de la sustancia durante el proceso, para lo cual se realizará también la extracción con por extracción-destilación simultáneas con el sistema Likens-Nickerson detallado en la siguiente sección.

Pesar 30 g de material vegetal en un balón de 250 mL, 24/40.

Agregar agua hasta pasar levemente el nivel de la mitad del balón.

Acoplar el balón con el aparato de extracción, y encender la estufa y la circulación del agua a través del refrigerante del aparato de destilación.

Destilar el aceite esencial por 3 h, contadas a partir de la hora en que se inicia la destilación. Apagar el aparato.

Colectar en n-pentano y concentrar en rotavapor. Medir luego la masa del aceite destilado y almacenar en un vial de 2 mL bajo refrigeración.

Almacenar la muestra en la refrigeradora, para su posterior análisis cromatográfico.

H. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales y de hernandulcina aislada

Para la determinación de la composición de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, utilizar las condiciones cromatográficas publicadas por Adams (2002): Columna cromatográfica: J&W DB-5, 0,25mm d.i. x 30 m, 0.25 μ m de espesor de fase. Temperatura del Inyector: 220°C. Línea de transferencia: 240°C; programación de la temperatura del horno: 60°C a 246°C, a una tasa de incremento de 3°C/min. Gas acarreador: He a 34,96 cm/s o 1.02 mL/min. Inyección: 0.1 μ L (solución al 10%). Split: 1/20.

La hernandulcina aislada será analizada por cromatografía de gasea con detector de masas con las mismas condiciones que el aceite esencial, pero usando temperatura de inyector de 200°C y rampa de 10°C/min.

I. Análisis de las sustancias aisladas (hernandulcina y posibles isómeros) por Resonancia Magnética Nuclear

Las sustancias aisladas serán transportadas al Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales, donde serán determinados los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 para confirmación de la estructura de la hernandulcina y elucidación estructural de otras sustancias aisladas.

J. Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales de orozús

Como parte de la caracterización del aceite esencial del orozús de diferentes procedencias, se realizará la determinación de su índice de refracción, por medio de la aplicación de 0.2 mL de aceite en el refractómetro.

K. Cuantificación de Fenoles Totales

Para la determinación del contenido de fenoles totales se utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con las metodologías de Waterhouse (2001) o Singleton (1999). Se extraen 200 mg de muestra por 2 h con 10 mL de metanol al 80% conteniendo 1% de ácido clorhídrico, a temperatura ambiente en un agitador mecánico. Se centrifuga la muestra a 1000 rpm por 15 min y decanta el sobrenadante en balones aforados de 25 mL. Se afora el balón haciendo uso del metanol al 80% con 1% de ácido clorhídrico. Se adicionan los reactivos en el siguiente orden:

20 µl Muestra

4.58 ml agua

200 µL Folin-Ciocalteu

Se espera entre ½ y 8 min.

600 µL solución de carbonato de sodio

Deja en baño maría a 40 °C por 30 min.

Finalmente se lee en un espectrofotómetro *uv-vis* a 765 nm. Se utiliza como estándar ácido gálico en concentraciones entre 0 y 500 ppm.

VIII. RESULTADOS

A. COLECTA

Tabla 1
Puntos de Colecta*

Localidad	msnm	Municipio
CEDA	1465	Guatemala, Guatemala
EL JUNQUILLO	1380	Barberena, Santa Rosa
EL CHICO	929	El Chico, Zacapa
GUAZACAPAN	258	Guazacapán, Santa Rosa

*Datos completos de GPS en el Anexo 1

B. HUMEDAD

Tabla 2
Humedad Muestras Colectadas y Cultivadas

Procedencia	% Humedad
CEDACOLECTA	12.62
JUNQUILLOCOLECTA	11.70
CHICOCOLECTA	11.49
GUAZACAPANCOLECTA	11.55
CEDACULTIVO	11.38
JUNQUILLOCULTIVO	11.11
CHICOCULTIVO	11.44
GUAZACAPAN CULTIVO	11.92

C. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Tabla 3
Rendimiento Promedio de Aceites Esenciales Muestras Colectadas*

Colecta	Rendimiento (%)
CEDACOLECTA	0.36
JUNQUILLOCOLECTA	0.21
CHICOCOLECTA	0.15
GUAZACAPANCOLECTA	0.14

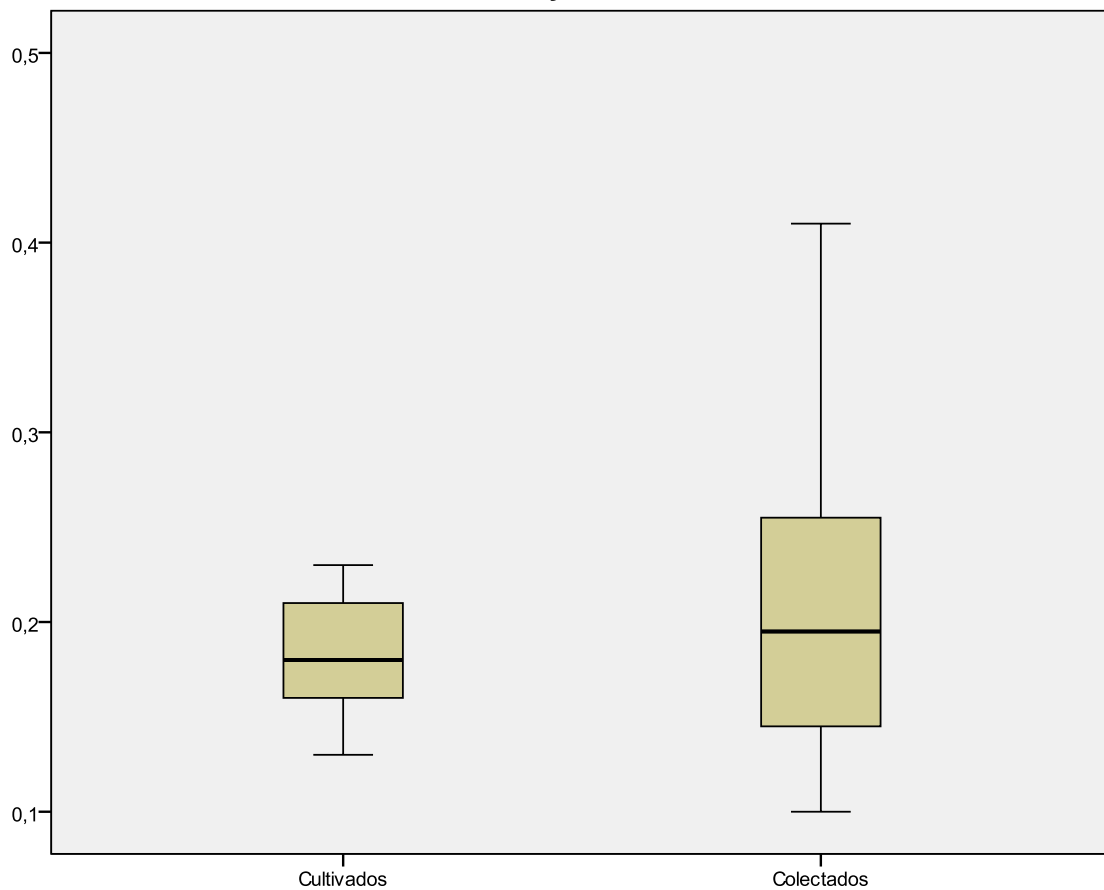
*Tabla con datos completos de las repeticiones en Anexo 2

Tabla 4
Rendimiento Promedio de Aceites Esenciales Muestras Cultivadas*

Cultivo	Rendimiento (%)
CEDACULTIVO	0.15
JUNQUILLOCULTIVO	0.18
CHICOCULTIVO	0.22
GUAZACAPAN CULTIVO	0.18

*Tabla con datos completos de las repeticiones en Anexo 2

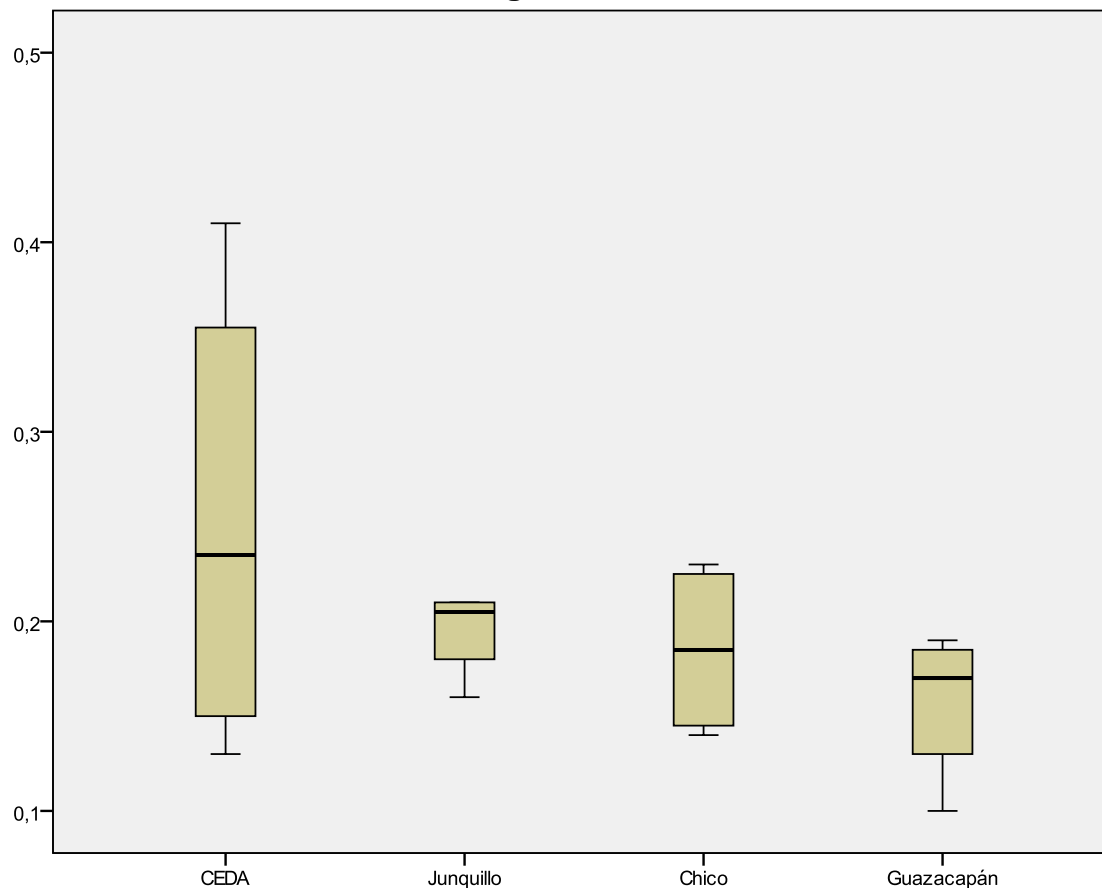
Gráfica 1
Cajas de Tuckey del Porcentaje de Rendimiento de Aceites Esenciales Muestras Cultivadas y Colectadas



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: Es notable la mayor dispersión del porcentaje de rendimiento de aceites esenciales entre plantas colectadas. Sin embargo, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de rendimiento de aceites esenciales de plantas cultivadas y colectadas con un valor para Asymp. Sig. (2-tailed) de 0.833 y Z de -0.210.

Gráfica 2
Cajas de Tuckey del Porcentaje de Rendimiento de Aceites Esenciales en Muestras según su Procedencia



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: en la muestra del estudio se observa diferencia en el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales entre las muestras cultivadas y colectadas de la misma procedencia. Obsérvese la que el mayor rendimiento (y dispersión) corresponde a las muestras cuyo origen es CEDA. Al aplicar la prueba de Kruskal Wallis de dos colas se obtiene un Chi-cuadrado de 9.639 y un valor p de 0.022 indicando las diferencias son estadísticamente significativas.

Tabla 5
Coeficiente de Correlación de Pearson para Aceites Esenciales Colectados y
Altura de las Poblaciones

Correlaciones

		Aceites Colecta	Alturas Colecta
Aceites Colecta	Pearson Correlation	1	0.694
	Valor p. (2 colas)		0.056
	N	8	8

Análisis en SPSS 19.0®

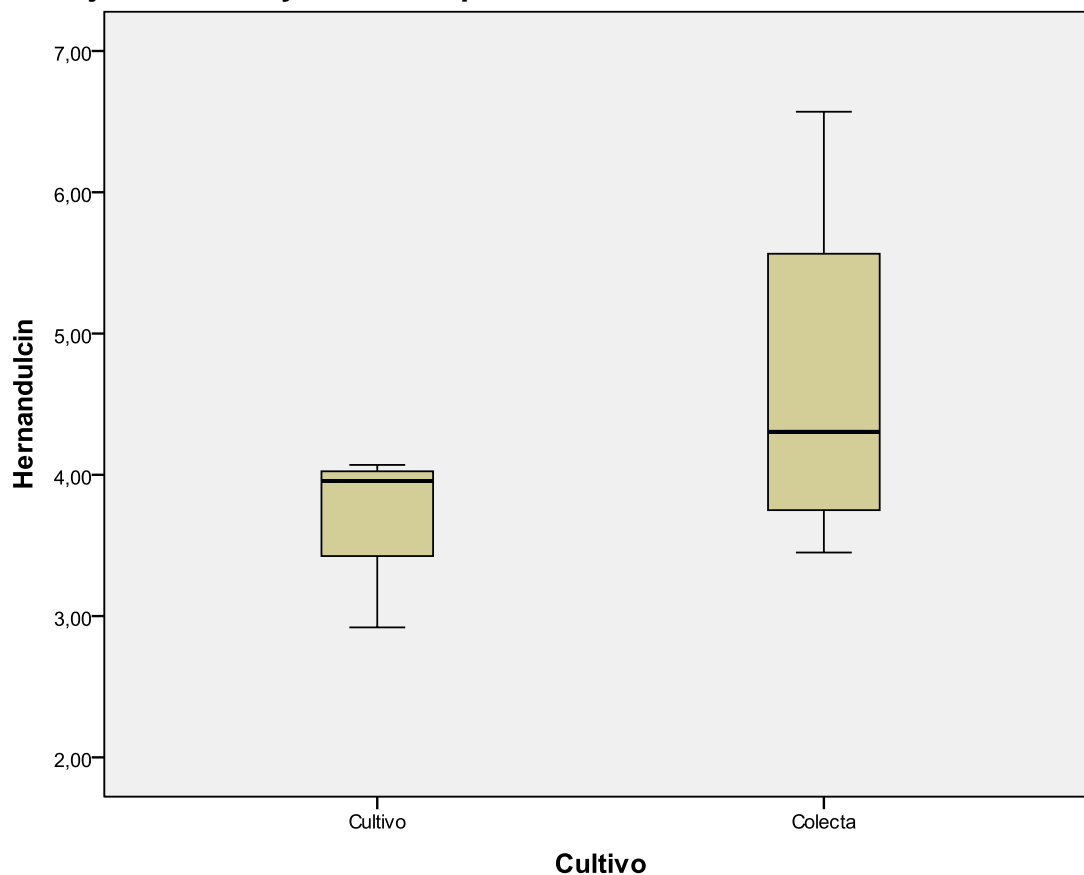
Interpretación: Los resultados indican que en la población de la que se extrajo la muestra no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis que indica que el coeficiente de correlación entre las variables altura y el porcentaje de rendimiento de aceites esenciales es igual a cero. Sin embargo, en la muestra el coeficiente de correlación es bueno | 0.694 |.

D. CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA

Tabla 6
Composición Porcentual de Hernandulcina en Aceite Esenciales

Procedencia	Hernandulcina (%)
CEDACOLECTA	3.45
JUNQUILLOCOLECTA	4.56
CHICOCOLECTA	4.05
GUAZACAPANCOLECTA	6.57
CEDACULTIVO	3.93
JUNQUILLOCULTIVO	3.98
CHICOCULTIVO	4.07
GUAZACAPANCULTIVO	2.92

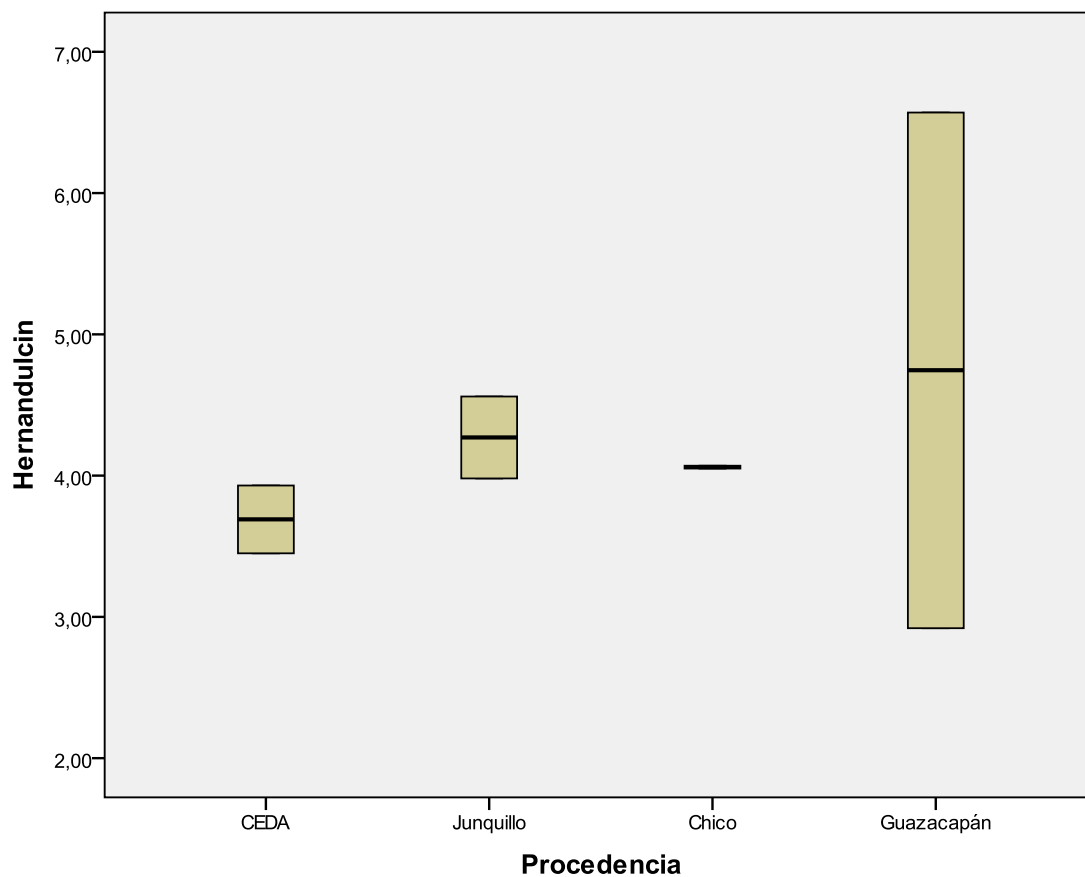
Gráfica 3
Cajas de Tuckey de la Composición Porcentual de Hernandulcina



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: en la muestra del estudio se observa cierta diferencia en las medianas del porcentaje de Hernandulcina entre los aceites esenciales de plantas cultivadas y colectadas. Es notable la mayor dispersión del porcentaje de Hernandulcina entre plantas colectadas.

Gráfica 4
Cajas de Tuckey de la Composición Porcentual de Hernandulcina según la Procedencia de la Muestra



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: en la muestra del estudio se observa diferencia el porcentaje de Hernandulcina en relación a los sitios de procedencia al comparar cada muestra cultivada con su respectiva muestra colectada. Obsérvese la que el mayor rendimiento (y dispersión) corresponde a las muestras cuyo origen es Guazacapán .

Tabla 7
Prueba de Pearson para Porcentaje de Hernandulcina y
Altura del Punto de Colecta
Correlaciones

	Hernandulcina	Altura
Hernandulcina Pearson Correlation	1	-0.880
Valor p (dos colas)		0.120
N	4	4

Análisis en SPSS 19.0®

Interpretación: Utilizando el coeficiente de correlación de Pearson de la muestra y prueba de T en ambas variables en la población de la que se extrajo la muestra en la población no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis que indica que el coeficiente de correlación entre las variables altura y porcentaje de Hernandulcina es igual a cero. Sin embargo, en la muestra el coeficiente de correlación es muy bueno $|0.880|$ sugiriendo que efectivamente hay una relación entre la altura y contenido de hernandulcina.

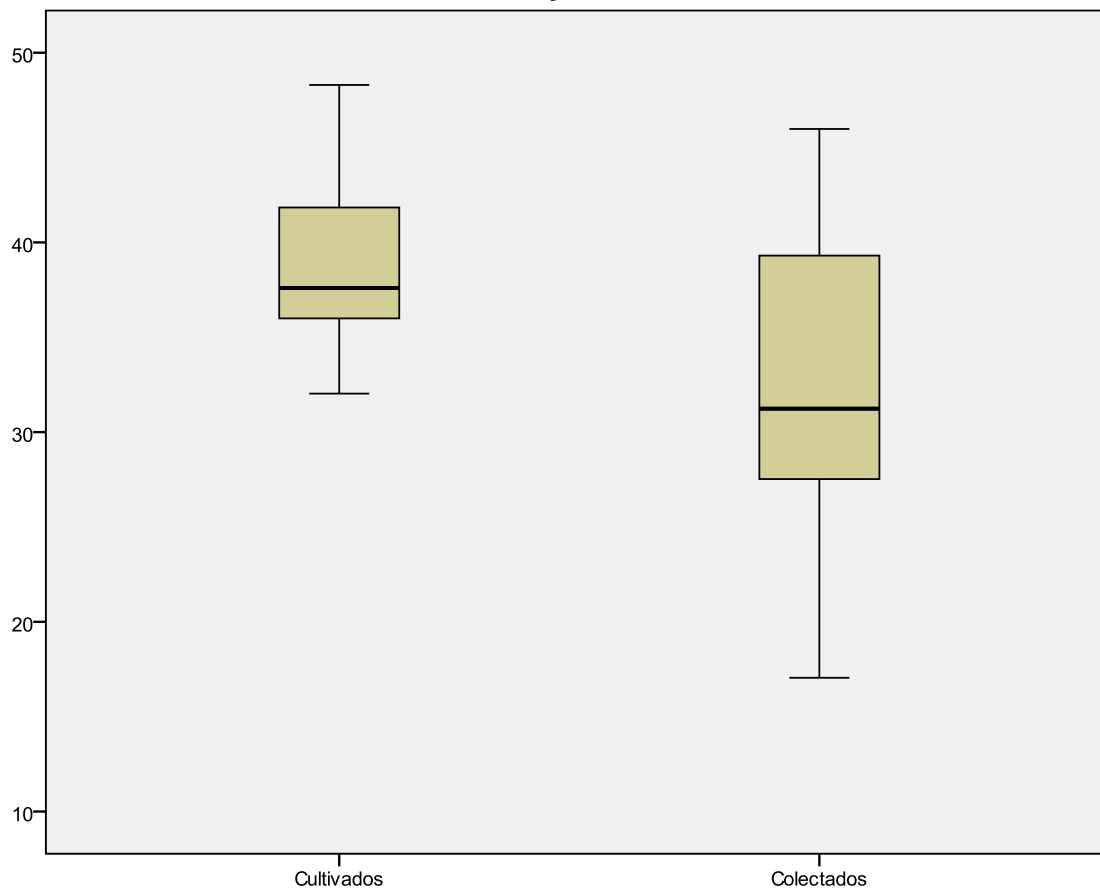
E. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Tabla 8
Fenoles Totales en Muestras

Procedencia	mg/g*
CEDACOLECTA	21.00
JUNQUILLOCOLECTA	30.69
CHICOCOLECTA	33.92
GUAZACAPANCOLECTA	43.48
CEDACULTIVO	38.78
JUNQUILLOCULTIVO	39.02
CHICOCULTIVO	34.52
GUAZACAPANCULTIVO	43.72

*mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal

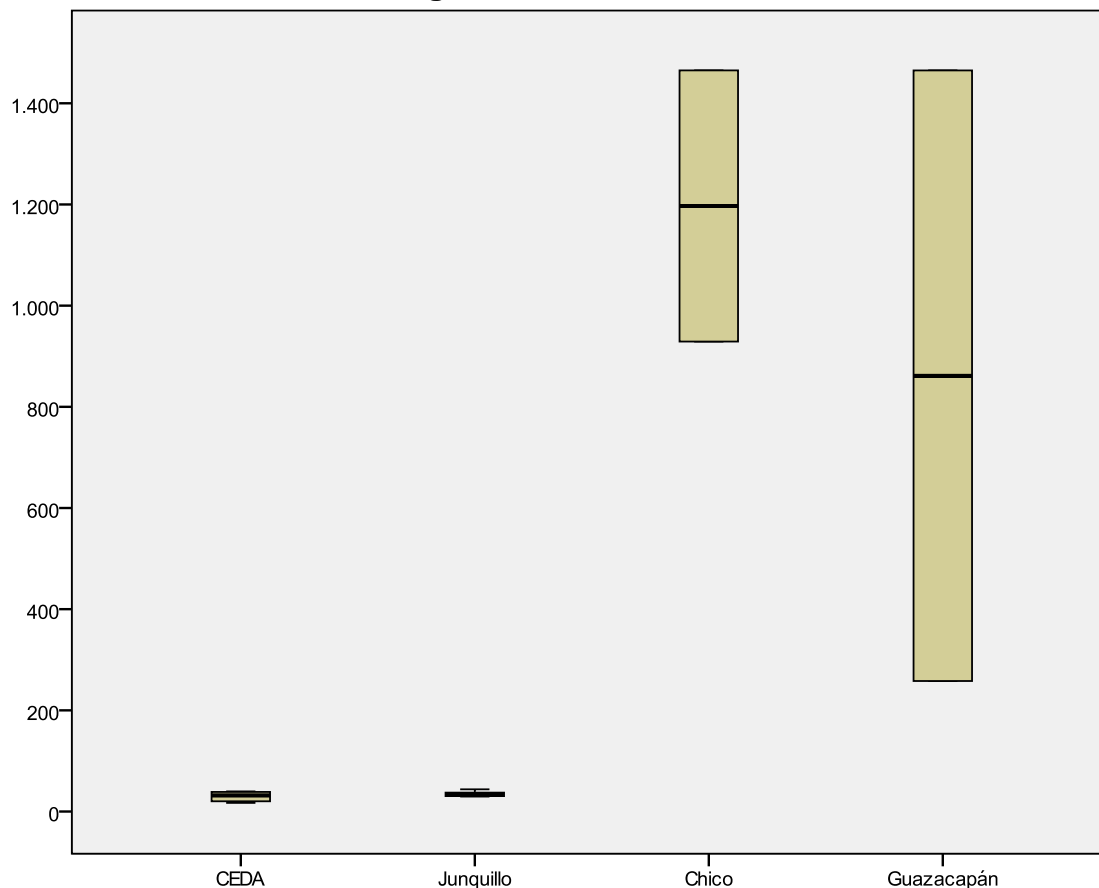
Gráfica 5
Cajas de Tuckey de la Concentración de Fenoles en Muestras Cultivadas y Colectadas



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: En la muestra del estudio se observa diferencia en la concentración de fenoles entre plantas cultivadas y colectadas. Hay mayor dispersión en la concentración de fenoles en plantas colectadas. De igual manera, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon indica que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de fenoles de plantas cultivadas y colectadas con un valor para p de 0.015 y Z de -2.432.

Gráfica 6
Cajas de Tuckey de la Concentración de Fenoles en Muestras
según su Procedencia



Análisis en SPSS 19.0 ®

Interpretación: En la muestra del estudio se observa diferencia en la concentración de fenoles en relación a los sitios de procedencia. Obsérvense las medianas más grandes. Las plantas cuya procedencia es Guazacapán presentaron mayor variabilidad en relación a la concentración de fenoles. Al aplicar la prueba de Kruskal Wallis de dos colas se obtiene un Chi-cuadrado de 9.5473 y un valor p de 0.023 indicando las diferencias son estadísticamente significativas.

Tabla 9
Coeficiente de Correlación de Pearson para Concentración de Fenoles y Altura de
la Muestras Colectadas

Correlaciones

		Altura	Fenoles
Altura	Pearson Correlation	1	-0,881**
	Valor p (dos colas)		0,000
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Análisis en SPSS 19.0®

Interpretación: En la población de la que se extrajo la muestra no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis que indica que el coeficiente de correlación entre las variables altura y concentración de fenoles es diferente de cero. Además en la muestra el coeficiente de correlación es muy bueno | 0.881 | .

IX. DISCUSIÓN

A. COLECTA Y HUMEDAD

Los sitios de colecta fueron elegidos de acuerdo a su altura sobre el nivel del mar. Ya se había sugerido en estudios anteriores (Farfán, 2009) la relación entre la altura a la que se toma la muestra y el rendimiento de aceites esenciales y concentración de fenoles totales en la misma. Todas las localidades donde se colectaron las muestras y las estacas trasplantadas se trataron de pueblos pequeños excepto por la localidad de CEDA. En este caso, CEDA se refiere al Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía ubicado en el Campus Universitario donde existe una pequeña población de Orozús. Los tres rangos de altura que se utilizaron fueron de 0 a 600 msnm donde se ubica la población de Guazacapán; 601 a 1200 msnm donde se ubica la de El Chico y 1201 a 1800 msnm para las poblaciones de El Junquillo y CEDA (ver Tabla 1).

Se realizaron colectas en los meses de marzo, agosto y noviembre 2011. Originalmente las colectas del mes de marzo tenían la intención de obtener únicamente el material vegetal necesario para ser trasplantado al sarán de cultivo y las otras dos colectas tenían por objeto la comparación de las muestras colectadas con las cultivadas. Sin embargo, el material vegetal trasplantado en el mes de marzo 2011 no se desarrolló y fue necesario utilizar el material colectado en el mes de agosto con dicho propósito. Debido a ello, únicamente se comparó el material colectado en el mes de noviembre con su contraparte cultivada en la misma época. Se considera que el estrés al que está sujeto el material vegetal en el mes de marzo, que es la época seca fue lo que motivó el desarrollo inadecuado del mismo en el sarán de cultivo. El sarán de cultivo se ubicó a una altura de 1465 msnm.

Se considera adecuado que el material vegetal que se almacena se haga con una humedad del 10%. Como se puede observar en la Tabla 2, las humedades a las que se llevaron las muestras trabajadas fueron muy cercanas a dicho valor. En todo caso, los resultados obtenidos para rendimiento de aceites esenciales, fenoles totales y extractos diclorometánicos fueron corregidos a dicha humedad para poder llevar a cabo una comparación de resultados más precisa.

B. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los rendimientos para todas las muestras colectadas o cultivadas oscilaron entre 0.14% y 0.36% (p/p). Las cajas de Tuckey son particularmente útiles para comparar la dispersión y diferencias estadísticas entre las medianas de diferentes grupos de datos. En la Gráfica 1 se puede observar que efectivamente las muestras colectadas exhibieron una mayor dispersión que las muestras cultivadas. Sin embargo, también se observó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los grupos de datos. Esto indica que los rendimientos de los aceites esenciales obtenidos a partir de muestras cultivadas son más reproducibles y predecibles que los colectados.

Al comparar la homocedasticidad de las muestras de acuerdo a su origen se encuentran diferencias estadísticamente significativas. En este caso, la comparación de acuerdo a su origen se refiere a comparar la muestra colectada en El Chico, por ejemplo, con la muestra cultivada en el Sarán que se trasplantó de El Chico. Al realizar la prueba de Kruskal Wallis de dos colas se obtiene un Chi-cuadrado de 9.639 y un valor p de 0.022 indicando que efectivamente las diferencias son estadísticamente significativas. Éste dato al igual que la reproducibilidad de los rendimientos de las muestras cultivadas ya sugieren que las diferencias en los aceites esenciales de diferentes poblaciones de Orozús son de origen fenotípico y no genotípico.

Para el caso de las muestras colectadas también se realizó la Prueba de Correlación de Pearson (Tabla 5). Se comparó la altura a la cual se tomó la muestra con el rendimiento del aceite esencial obtenido. Los resultados obtenidos indican que el coeficiente de correlación es de 0.694, lo cual efectivamente apoya dicha noción. Sin embargo, hubiera sido necesario un n mayor para poder asegurarlo sin lugar a dudas.

C. CUANTIFICACIÓN DE HERNANDULCINA

La cuantificación de hernandulcina se realizó en las muestras de aceite esencial haciendo uso del compuesto de descomposición térmica 6-metil-5-hepten-2-ona el cual se forma durante el choque térmico que sufre la muestra al entrar en contacto a las altas temperaturas del inyector del equipo de cromatografía de gases. Se utilizó la relación de pesos moleculares hernandulcina:6-metil-5-hepten-2-ona para así determinar la composición porcentual. Los resultados obtenidos variaron para las muestras colectadas y cultivadas entre un 2.92% y 6.57% pero la mayoría se encontraron entre un 3% y 5% (ver Tabla 6).

Una vez más, al comparar la presencia de hernandulcina entre las muestras colectadas y cultivadas se encuentra que las primeras tienen una mayor dispersión. Aunque a diferencia del caso de los aceites esenciales, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los grupos de datos. De igual manera, al comparar la homocedasticidad de las muestras de acuerdo a su origen se encontró una variación significativa, especialmente para las muestras originadas de Guazacapán (ver Gráficas 3 y 4).

Al igual que con los aceites esenciales, se realizó la Prueba de Correlación de Pearson para las muestras colectadas. La misma arrojó resultados muy interesantes, los cuales indican fuertemente una relación entre la altura de colecta y la composición de hernandulcina en el aceite esencial. El valor de correlación obtenido fue de 0.880, aunque el valor p fue muy alto (0.12) y requiere de un mayor n para ser corregido (ver Tabla 7).

D. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES

Los resultados más interesantes fueron obtenidos en los análisis de fenoles. En la Tabla 8 se encuentran los resultados expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal. A simple vista se puede observar una fuerte relación entre las concentraciones obtenidas y altura para las muestras colectadas al igual que una mayor similitud entre las muestras cultivadas.

Al realizar el análisis con Cajas de Tuckey se confirma que efectivamente la dispersión de las muestras colectadas es mayor que la de las cultivadas. De igual manera, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon indica que sí hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de fenoles de plantas cultivadas y colectadas con un valor para p de 0.015 y Z de -2.432 (ver Gráfica 5).

Al comparar las muestras según su origen se confirman estas diferencias, con la misma prueba de Kruskal Wallis de dos colas se obtiene un Chi-cuadrado de 9.5473 y un valor p de 0.023 indicando las diferencias son estadísticamente significativas. Las diferencias son una vez más evidentes para las muestras originarias de Guazacapán. Esta tendencia observada para la hernandulcina y fenoles totales tiene mucho sentido si uno toma en cuenta que la mayor diferencia de alturas entre el sitio de origen y sitio de cultivo es para esta población (1207 metros).

Al realizar la Prueba de Correlación de Pearson para la concentración de fenoles y la altura de las muestras colectadas se encontró evidencia de la existencia de la misma. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.881 con un valor p menor a 0.01. Una vez más, evidencia de la variación fenotípica en la composición química de las diferentes muestras de Orozús (ver Tabla 9).

E. CROMATOGRAFÍA FLASH Y EXTRACTOS DICLOROMETÁNICOS

Se realizó cromatografía flash al igual que cromatografía preparativa de capa fina y espectrometría de masas con la intención de aislar hernandulcina. Los resultados se muestran únicamente en el Anexo 5 debido a que esta metodología resultó impráctica para el propósito final de evaluar contenido de hernandulcina y otros metabolitos. El método desarrollado para la cuantificación de hernandulcina a partir de su producto de descomposición (6-metil-5-hepten-2-ona) discutida anteriormente resultó ser más práctico y requerir de instrumentación que se encuentra más frecuentemente en un laboratorio de análisis químico o fitoquímico.

Los extractos diclorometánicos obtenidos por maceración presentaron rendimientos entre 1.25% y 2.76% (ver Tablas 18 y 19). Debido al poco material vegetal colectado en Guazacapán, no fue posible hacer extracciones de dicha población evitando así poder hacer un análisis estadístico relevante de los resultados obtenidos. Aun así, los resultados sugieren que los parámetros a tomar en cuenta para el análisis de la calidad de la droga cruda de Orozús son el rendimiento de aceites esenciales, composición porcentual de hernandulcina en el mismo y concentración de fenoles totales.

X. CONCLUSIONES

1. El contenido de hernandulcina en los aceites esenciales de las muestras varió entre 2.92% y 6.57%.
2. El contenido de hernandulcina se puede evaluar a través de la cuantificación de su compuesto de descomposición térmica 6-metil-5-hepten-2-ona por cromatografía de gases.
3. Los rendimientos de aceites esenciales de las muestras varió entre un 0.14% y 0.36% (p/p) y se correlacionan a la altura a la que se colecta la muestra.
4. La concentración de fenoles totales varió entre 21.00 y 43.72 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal y se correlaciona a la altura en que se colecta la muestra.
5. Los rendimientos de extracción por maceración con diclorometano variaron entre 1.25% y 2.76% (p/p).
6. Las diferencias en la composición química de las diferentes poblaciones son de origen fenotípico y no a la existencia de diferentes quimiotipos para la misma especie.

XI. RECOMENDACIONES

1. Al evaluar la calidad de la droga cruda de Orozús se debe tomar en cuenta el efecto que la ubicación de la población de origen tendrá sobre su composición química.
2. De acuerdo a los resultados y conclusiones obtenidos un rendimiento de aceite esencial de 0.15%, composición porcentual de hernandulcina de 3% y fenoles totales de 20.00 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal pueden ser utilizados como parámetros fitoquímicos para determinar la calidad de la droga cruda de Orozús.
3. Realizar esfuerzos conjuntos con instituciones como el CONAP y Defensores de la Naturaleza para la protección del Orozús en sus sitios de origen. En lugares como Guazacapán las poblaciones han sido diezmadas debido al uso extensivo de herbicidas.

XII. REFERENCIAS

Adams, R.P. (2001) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL 456 p.

Bandoni, A. (2003). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires, CYTED. pp31.

Bicchi, C., Rubiolo, P., Cordero, Ch. (2006) Separation science in perfume analysis. Anal. Bioanal. Chem. 384:53-56.

Cáceres, A. (1998) *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Colección Monografías, Vol. 1 Editorial Universitaria, Guatemala, 1996.

Compadre C.M., L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D., Kamath, S.K. (1985) Hernandulcin: An intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature.

Compadre C.M., Hussain, R.A., López de Compadre, L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D. (1987) The intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcine: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation. J. Agric. Food Chem. 35:273-279.

Craveiro, A.A., Fernandes, A.G., Andrade, C.H., Matos, F.J., Alencar, J.W., Machado, M.I. (1981) Oleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza, Brasil, Edicoes UFC. 209 p.

Enda-caribe *et al.* 1996. Borrador Tramil 8: *Lippia dulcis* Trev. 4 p.

Farfán, C. 2009. Composición del aceite esencial y fenoles totales de diferentes poblaciones de orozú (*Phyla dulcis* Trevir) Moldenke.

Fischer, U. 1997. Untersuchungen zur Domestikation von Guatemaltekkischen Arzneipflanzen. Tesis Licenciatura. Viena, AT: Österreichischen Akademie der Wissenschaften. 235 p.

Gibson, D *et al.* 1970. Verbenaceae. Flora de Guatemala. US. Fieldana Botany. 24(9):209-211.

Guenther, E. (1948). *The Essential Oils*. New York, Van Nostrand Company Vol. 1. P.189-200.

Gutiérrez, H. y De la Vara, R. 2008. Diseño de Experimentos. México: Mc Graw Hill.: Análisis Pareado. 545 p.

Hostettmann, K, Queiroz, E, Vieira, P. (2003). *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. Sao Carlos, Brasil, Edufscar.

Jayes, P, de León, J, Navas, R, Pérez, J, Mérida, M, Farfán, C. (2007) *Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, Familias Verbenaceae y Lauraceae*. Informe Final Proyecto Investigación. Fac. Farmacia/DIGI/USAC.

Kaneda, N., Lee, I.S., Gupta, M.P., Soejarto, D.D., Kinghorn, D. (1992) (+)-4b-Hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *J. Nat. Prod.* 55: 1136-1141

Kim, J.H., Lim, H.J., Cheon, S.H. (2003) A facile synthesis of (6S,1'S)-(+)-hernandulcin and (6S,1'R)-(+)-epihernandulcin. *Tetrahedron* 59:7501-7507.

Knapp, D.R. (1979) *Handbook of analytical Derivatization Reactions*. John Wiley and Sons. New York. Pp. 32-33.

Kubeczka, K.H., Formáček, V. (2002) *Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 2nd. ed.; Wiley: New York.

Lima, P. D.D.B. (1983) *Desenvolvimento de um novo método específico para o isolamento de lactonas-metilênicas*. Reinvestigação de *Vanillosmopsis erythropappa* Sch.-Bip. Tese de mestrado. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. UFRJ.153 p.

Lima, P. D.D.B., Garcia, M., Rabi, J.A. (1985) Selective extraction of α -methylene-g-lactones. Reinvestigation of *Vanillosmopsis erythropappa*. *J. Nat. Prod.* 48:986-988.

Lopes, C.C. (1983) *Utilização de Alilbenzenos naturais como matéria prima na síntese orgânica*. Parte A. Preparação de derivados C6-C2. Parte B. Síntese de 6,7-metilenodoxi-3-alkil-2-hidroxi-1,4-naftoquinonas a partir do safrol. Tese de mestrado. Núcleo de Pesquisas Naturais, UFRJ. P. 493-494.

Marriot, P.J., Shellie, R., Cornwell, Ch. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. ff Chromatogr. A.* 936:1-22.

Ministerio de Salud de Nicaragua. 1986. *Rescate de la Medicina Popular*. Managua, NI. 147 p.

Morton, J; *et al.* 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. 746-747.

Núñez, E. 1978. *Plantas medicinales de Puerto Rico y su folklore*. San Juan, PR: Universidad Central de Puerto Rico. 260 p.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001). *Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology*. *J. of Ethnopharm.* 76:201-214

Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2003). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). *Phytochemical Analysis*, 14, 228-231

Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2000). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry*, 55, 241-246.

Pérez, J.F., (2008) Investigación Química de aceites esenciales de plantas nativas da Guatemala. Tesis doctoral. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 254 p.

Shallenberger R.S., Acree, T.E., (1967), Molecular Theory of Sweet Taste. *Nature* 216:480-482

Siegel, S. (1978). *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. México: Editorial Trillas.

SoutoBachiller, F.A., De Jesús Echeverría, M., Cárdenas González, O.E., Acuña-Rodríguez, M.F., Meléndez, P.A., Romero-Ramsey, L. (1997)Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochem* 44 (6): 1077-1086

Standley, P. Steyermark, 1970. Flora de Guatemala, part IX. Fieldiana: Botany, USA. 1970, vol. 24. 209-211

Stevens, WD; *et al.* 2001. Flora de Nicaragua: Angiospermas. St. Louis, US: Missouri Botanical Garden Press. Tomo III. 2517-2519.

Williams, L. 1981. The useful plants of Central America. *Ceiba*. 24: 332-333.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación y humedad muestras colectadas y cultivadas

Tabla 10
Información GPS de Colecta

Colecta	msnm	Latitud	Longitud	Localidad
CEDACOLECTA	1465	N14° 34.811'	O 90° 33.220'	Guatemala, Guatemala
JUNQUILLOCOLECTA	1380	N 14°20.283'	O 90°20.717'	Barberena, Santa Rosa
CHICOCOLECTA	929	N 15° 01.020'	O 89° 50.468'	El Chico, Zacapa
GUAZACAPANCOLECTA	258	N 14°04.249'	O 90°26.279'	Guazacapan, Santa Rosa

Tabla 11
Información GPS de Cultivo

Cultivo	Msnm	Latitud	Longitud	Localidad
CEDACULTIVO	1465	N14° 34.811'	O 90° 33.220'	Guatemala, Guatemala
JUNQUILLOCULTIVO	1465	N14° 34.811'	O 90° 33.220'	Guatemala, Guatemala
CHICOCULTIVO	1465	N14° 34.811'	O 90° 33.220'	Guatemala, Guatemala
GUAZACAPANCULTIVO	1465	N14° 34.811'	O 90° 33.220'	Guatemala, Guatemala

Tabla 12
Humedad Muestras Colectadas

Colecta	% Humedad
CEDACOLECTA	12.62
JUNQUILLOCOLECTA	11.70
CHICOCOLECTA	11.49
GUAZACAPANCOLECTA	11.55

Tabla 13
Humedad Muestras Cultivadas

Cultivo	% Humedad
CEDACULTIVO	11.38
JUNQUILLOCULTIVO	11.11
CHICOCULTIVO	11.44
GUAZACAPANCULTIVO	11.92

Anexo 2. Rendimiento Aceites Esenciales y Composición de Hernandulcina

Tabla 14
Rendimiento Aceites Esenciales Muestras Colectadas

Colecta	Rendimiento Rep 1 (%)	Rendimiento Rep 2 (%)	Promedio
CEDACOLECTA	0.30	0.41	0.36
JUNQUILLOCOLECTA	0.21	0.21	0.21
CHICOCOLECTA	0.15	0.14	0.15
GUAZACAPANCOLECTA	0.10	0.18	0.14

Tabla 15
Rendimiento Aceites Esenciales Muestras Cultivadas

Cultivo	Rendimiento Rep 1 (%)	Rendimiento Rep 2 (%)	Promedio
CEDACULTIVO	0.13	0.17	0.15
JUNQUILLOCULTIVO	0.20	0.16	0.18
CHICOCULTIVO	0.22	0.23	0.22
GUAZACAPANCULTIVO	0.16	0.19	0.18

Tabla 16
Composición de Hernandulcina en Aceite Esencial de Muestras Colectadas

Colecta	Hernandulcina (%)
CEDACOLECTA	3.45
JUNQUILLOCOLECTA	4.56
CHICOCOLECTA	4.05
GUAZACAPANCOLECTA	6.57

Tabla 17
Composición de Hernandulcina en Aceite Esencial de Muestras Cultivadas

Cultivo	Hernandulcina (%)
CEDACULTIVO	3.93
JUNQUILLOCULTIVO	3.98
CHICOCULTIVO	4.07
GUAZACAPANCULTIVO	2.92

Anexo 3. Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano

Tabla 18
Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano de Muestras Colectadas

Colecta*	Rend (% p/p)
CEDACOLECTA	2.10
JUNQUILLOCOLECTA	2.69
CHICOCOLECTA	1.46

*Debido a la escasez de material vegetal de Guazacapán, dicha extracción no se realizó.

Tabla 19
Rendimiento Extracción de Metabolitos por Maceración con Diclorometano de Muestras Cultivadas

Cultivo	Rend (% p/p)
CEDACULTIVO	2.55
JUNQUILLOCULTIVO	2.76
CHICOCULTIVO	2.19
GUAZACAPANCULTIVO	1.25

Anexo 4. Contenido de Fenoles Totales

Tabla 20
Fenoles Totales en Muestras Colectadas

Colecta	Rep 1*	Rep 2*	Rep 3*	Promedio*
CEDACOLECTA	20.24	25.72	17.05	21.00
JUNQUILLOCOLECTA	30.48	32.00	29.58	30.69
CHICOCOLECTA	35.09	29.33	37.35	33.92
GUAZACAPANCOLECTA	41.26	45.98	43.19	43.48

*Todas las concentraciones expresadas como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal

Tabla 21
Fenoles Totales en Muestras Cultivadas

Cultivo	Rep 1*	Rep 2*	Rep 3*	Promedio*
CEDACULTIVO	37.81	38.75	39.78	38.78
JUNQUILLOCULTIVO	37.38	43.90	35.77	39.02
CHICOCULTIVO	36.22	32.03	35.30	34.52
GUAZACAPANCULTIVO	45.53	48.30	37.33	43.72

*Todas las concentraciones expresadas como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de material vegetal

Anexo 5. Fraccionamiento de Extractos y Aceites Esenciales por Cromatografía Preparativa y Cromatografía Flash

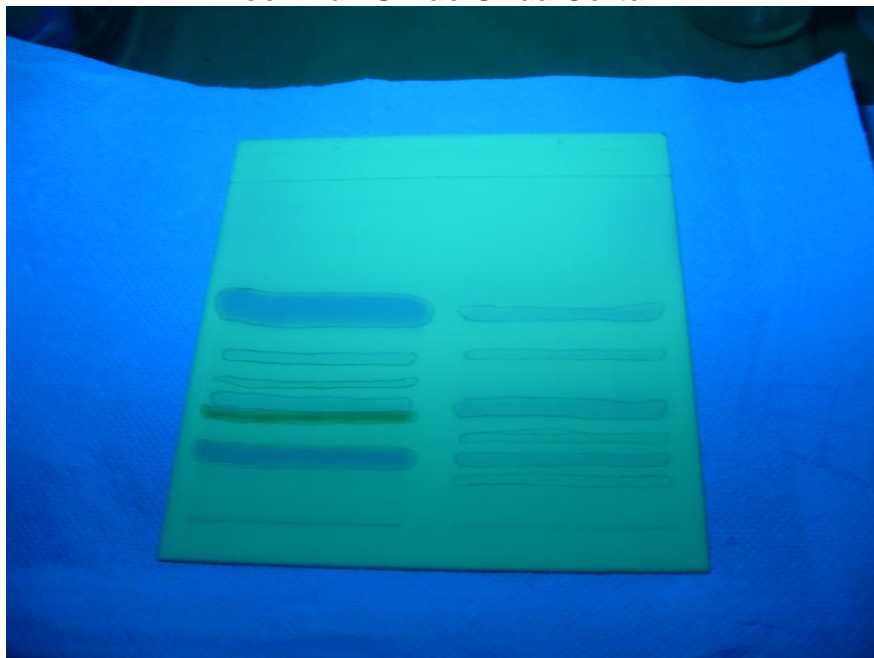
Imagen 1

Desarrollo de la Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús



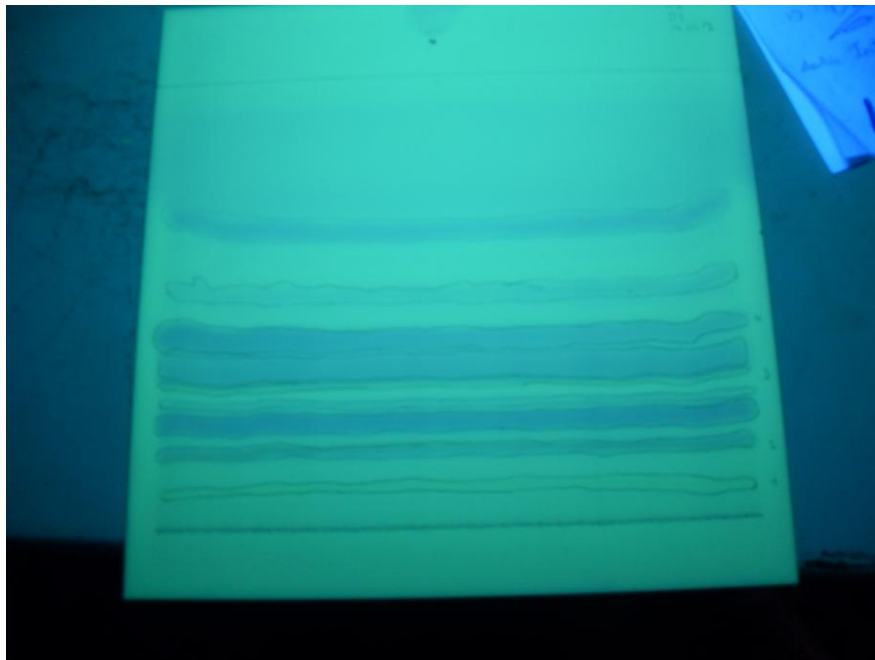
Imagen 2

Revelación de Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús con Luz UV de Onda Corta



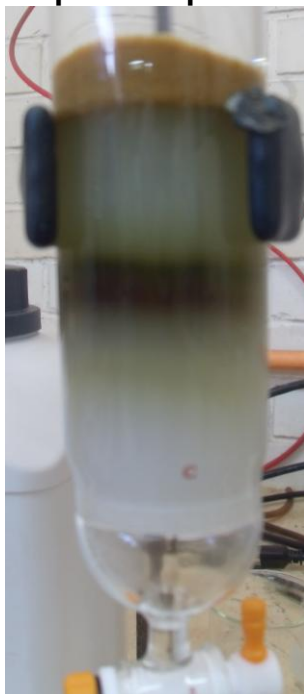
Cada una de las manchas coloreadas que se observan corresponden a compuestos separados a partir del extracto con el fitocomplejo original.

Imagen 3
Revelación de Cromatografía Preparativa para un Extracto de Orozús
con Luz UV de Onda Corta



Cada una de las manchas coloreadas que se observan corresponden a compuestos separados a partir del aceite esencial con el fitocomplejo original.

Imagen 4
Separación de Compuestos por Cromatografía Flash



Cada banda que se observa separándose en la columna corresponde a un compuesto o un grupo reducido de compuestos relacionados.

Anexo 6
Actividad Comunitaria en El Chico para la Difusión de Resultados

Imagen 5
Asistentes a la Actividad



Imagen 6
Expositor en la Actividad*



*La actividad realizada en conjunto con la DIGI, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC), CONAP y Defensores de la Naturaleza en noviembre 2011.