

CUANTIFICACION DEL PRINCIPIO ANTIESPASMODICO
Y ANTIBACTERIAL, 7-METOXICUMARINA,
EN EL PERICON (Tagetes lúcida)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
Departamento de Química

CUANTIFICACION DEL PRINCIPIO ANTIESPASMÓDICO
Y ANTIBACTERIAL, 7-METOXICUMARINA,
EN EL PERICON (Tagetes lúcida)

GUILLERMO ANTONIO ALVAREZ MONZON

Tesis presentada para optar
al grado académico de licenciado en química

Guatemala

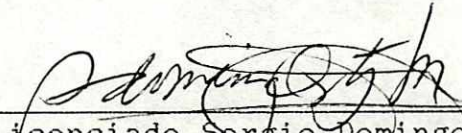
1989

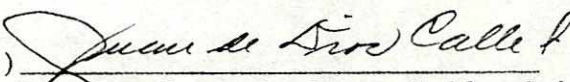
BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

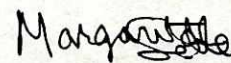
Vo. Bo. :

(f) 
Licenciado Sergio Domingo Ortiz
Asesor

Tribunal:

(f) 
Licenciado Sergio Domingo Ortiz

(f) 
Doctor Juan de Dios Calle Schlesinger

(f) 
Margarita Selle, M.Sc.

Fecha de Aprobación: 15 de Noviembre de 1989

Cho'k ere laj K'ekchi', Xban xnauom
eb lexeeton chirix li pim li ne-
que'quirtasink.

Al pueblo Kekchi (con quien convivi
año y medio), en memoria a sus
ancestros, quienes legaron el cono-
cimiento de plantas medicinales.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que me ayudaron en la realización del presente trabajo, en particular a:

Lic. Sergio Domingo Ortiz, mi asesor y un gran investigador del pericón.

Dr. Juan de Dios Calle y Licda. Margarita Selle, quienes me ayudaron en la revisión del trabajo.

Ing. Miguel Angel Canga A. (de la Universidad del Valle de Guatemala), Lic. Byron Molina T. y Sr. Alfonso Comparini (de Bayer de Guatemala S.A.), Armando Cáceres (del Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropriada 'CEMAT' y Empresa Rural de Plantas Medicinales 'ERPLAM') y Pablo Gálvez, por su valiosa ayuda sin la cual hubiera sido imposible realizar este trabajo.

Humberto Yoc, Abel Bac (de la Universidad del Valle de Guatemala), David Hernandez, Lorenza Batz, Petronila Seneya y Feliciano Tenaj (del Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropriada 'CEMAT' y Empresa Rural de Plantas Medicinales 'ERPLAM'), quienes me ayudaron proporcionándome el material para el trabajo.

Y en especial a Edna Graciela Monzón (mi madre) y Angela Patricia Pineda de Alvarez (mi esposa), por su ayuda y gran apoyo.

RESUMEN

Por medio de cromatografía de gases se cuantificó 7-metoxicumarina presente en hojas, tallos y flores de pericón (Tagetes lúcida) recolectado en seis lugares diferentes de la República de Guatemala. Se encontró una concentración (porcentaje peso/peso en base seca) de 1.0 a 3.4 % en hojas, de 0.58 a 1.6 % en flores y de 0.13 a 0.28 % en tallos.

Se encontró variación en la concentración de 7-metoxicumarina en las diferentes partes del pericón debido al lugar de donde éste se produce.

También se cuantificó la 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones de planta entera de pericón, encontrándose una dosis no mayor de 10 mg. por taza. Por lo que al hacer una cocción de pericón por el método tradicional, se extrae hasta el 38% p/p de la 7-metoxicumarina presente en la planta entera secada bajo condiciones ambientales.

Para poder cuantificar la 7-metoxicumarina en las distintas partes de las plantas de pericón se separaron las partes ya secas; se molieron; se les determinó la humedad a las muestras por el método Karl Fisher, encontrándose ente 6 y 11% p/p; se extrajeron las muestras con soxhlet durante (por lo menos) ocho horas usando metanol industrial tridestilado como solvente; se concentraron los extractos usando rotavapor y se analizó por cromatografía de gases una solución hecha de cada extracto.

La cuantificación de la 7-metoxicumarina por cromatografía de gases se hizo usando ftalato de dibutilo como patrón interno. Se usó una columna capilar HP1 de 25 m de largo, un detector de ionización de llama, nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 4.43 ml/min; y una temperatura del horno programada en dos rampas continuas de 10.0 °C/min. y 30.0 °C/min., con una temperatura inicial de 150 °C y una final de 230 °C la cual se mantuvo por 2.70 min antes de finalizar cada análisis. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 200 y 250 °C respectivamente.

CONTENIDO

	páginas
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS E IMPORTANCIA	2
III. ANTECEDENTES	4
A. El Pericón, <u>Tagetes lúcida</u>	4
1. Descripción	4
2. Composición fitoquímica de <u>Tagetes lúcida</u>	8
3. Uso como medicina tradicional y otros usos	12
B. Actividad antiespasmódica y antibacterial del pericón	16
1. Espasmos y antiespasmódicos	16
2. El principio antiespasmódico y antibacterial del pericón, 7-metoxicumarina	17
a. Estudio farmacológico del pericón	17
b. Aislamiento y caracterización	18
c. Descripción	19
i. Cumarinas	19
ii. <u>7-metoxicumarina</u>	20
C. Cuantificación de 7-metoxicumarina	23
IV. PLANTEAMIENTO DEL EXPERIMENTO	26
A. Diseño del experimento	26
1. Factores	26
a. Lugar de recolección	26
b. Partes de la planta	28
2. Tratamientos	28

	páginas
B. Metodología	29
1. Recolección de la planta	29
2. Secado de la planta	29
3. Separación de tallos, hojas y flores	29
4. Pesado de las partes separadas	31
5. Molido de las partes separadas	31
6. Pesado de las muestras de las partes molidas	31
7. Determinación de la humedad de las muestras	31
8. Extracción de las muestras	32
9. Concentración y pesado de los extractos	32
10. Selección del método cromatográfico	32
11. Dilución de los extractos para su cuantificación	34
12. Identificación del material a ser utilizado como referencia	34
13. Determinación de la pureza del patrón	34
14. Cuantificación de la 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones de plantas completas	35
V. RESULTADOS	36
A. Identificación y determinación de la pureza del material a ser utilizado como referencia	36
1. Identificación	36
2. Determinación de la pureza	44
B. Partes de la planta	47
C. Cuantificación de la 7-metoxicumarina	48
1. Determinación de la humedad	48
2. Determinación del rendimiento de la extracción de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	50
3. Determinación de la 7-metoxicumarina en cada muestra	53

	páginas
D. Cuantificación de la 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones de plantas completas	53
VI. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION	59
A. Contenido de 7-metoxicumarina en las muestras de diferentes partes de las plantas	59
1. Análisis de varianza	59
2. Promedio de resultados	64
3. Relación entre la concentración y el lugar de recolección	68
B. 7-Metoxicumarina en las infusiones y cocciones	73
1. Análisis de varianza	73
2. Eficiencia de la extracción en las cocciones	77
C. Compuestos en los cromatogramas	78
D. Humedad de las plantas	81
1. Análisis de varianza	81
VII. CONCLUSIONES	82
VIII. SUGERENCIAS DE ESTUDIO	85
IX. BIBLIOGRAFIA	86
AFENDICES	89
A. Fórmulas y programas de análisis de varianza utilizados	90
B. Cromatogramas que se hicieron al implementar el método de análisis	116
C. Datos de cromatogramas y método de calibración	135

LISTA DE CUADROS

CUADRO	página
1 Usos comunes del pericón	15
2 Dosis efectivas medias (en miligramos) de varios extractos de pericón contra dos agentes espasmódicos	18
3 Lugares de recolección de las plantas de pericón	26
4 Tratamientos del diseño	28
5 Condiciones espectrométricas utilizadas en la identificación del material de referencia utilizado como patrón	37
6 Implementación del método de cuantificación de 7-metoxicumarina por cromatografía de gases	45
7 Determinación de la pureza del material de referencia de 7-metoxicumarina (por cromatografía de gases)	47
8 Peso de las partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	48
9 Porcentaje del peso de las partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	48
10 Factor Karl Fischer de la solución titulante usada en la determinación de humedad	50
11 Datos de la determinación de la humedad residual de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	51
12 Humedad residual de las muestras (porcentaje(p/p)) de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	51
13 Pesos de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales y de sus extractos concentrados (en base húmeda).	54
14 Rendimiento de la extracción de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales (en base húmeda).	55
15 Concentración de la 7-metoxicumarina en los extractos concentrados (a partir del cálculo del integrador y en base húmeda)	56

CUADRO	página	
16	Contenido de la 7-metoxicumarina en las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales (a partir del cálculo del integrador y en base seca)	57
17	Concentración de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones	58
18	Análisis de varianza bifactorial, con bloques al azar y con submuestreo de la 7-metoxicumarina en las muestras de las plantas (del cuadro 16) (nivel de 95% de confianza)	60
19	Análisis de varianza bifactorial con submuestreo desigual de la 7-metoxicumarina en muestras de las plantas (del cuadro 16) (nivel de 95% de confianza)	61
20	Resumen de Anovas considerandolos como experimentos independientes de un factor	62
21	Resumen de pruebas Tukey de los experimentos del cuadro 20	63
22	Promedios del contenido de la 7-metoxicumarina en las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales (a partir del cálculo del integrador y en base seca)	65
23	Resumen de promedios del contenido de la 7-metoxicumarina en las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales (a partir del cálculo del integrador y en base seca)	68
24	Análisis de varianza del contenido de la 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones (del cuadro 17) (a un 95% de confianza)	74
25	Análisis de varianza del contenido de la 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones (del cuadro 17, menos Tecpán) (a un 95% de confianza)	74
26	Contrastes ortogonales de las infusiones y cocciones	75
27	Contenido de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones	77
28	Eficiencia de la extracción de la 7-metoxicumarina en las infusiones de pericón	78
29	Análisis de varianza bifactorial con número de réplicas iguales, para la humedad de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	página
1. El pericón, <u>T. lúcida</u>	5
2. Area donde se ha reportado que se encuentra el pericón	6
3. Compuestos encontrados en <u>T. lúcida</u>	10
4. Reacción de formación de las cumarinas	19
5. Compuestos cumarínicos que producen eritemas en la piel al ser irradiados con luz ultravioleta (fototóxicos)	20
6. Lugares de recolección de las plantas de pericón	27
7. Diagrama de flujo de la metodología	30
8. Espectro infrarrojo de la muestra de referencia; suspensión en Nujol	38
9. Espectro infrarrojo de la muestra de referencia; en pastilla de KBr	39
10. Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; solución en metanol	40
11. Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; en metanol con NaOH .1 N.	41
12. Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; en metanol con NaOH .9 N.	42
13. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la muestra de referencia	43
14. Ejemplo de cromatogramas de la determinación de la 7-metoxi-cumarina	46
15. Porcentaje de las partes de la planta secadas bajo condiciones ambientales	49
16. Porcentaje de humedad de las partes de la planta secadas bajo condiciones ambientales	52
17. Concentración de la 7-metoxicumarina en el pericón	66
18. Efecto del lugar y la parte de la planta en la concentración de 7-metoxicumarina	67

FIGURA	página
19. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en la planta con la humedad del lugar de recolección	69
20. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en las hojas con la humedad del lugar de recolección	69
21. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en las flores con la humedad del lugar de recolección	69
22. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en los tallos con la humedad del lugar de recolección	69
23. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en la planta con la altura del lugar de recolección	69
24. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en las hojas con la altura del lugar de recolección	69
25. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en las flores con la altura del lugar de recolección	69
26. Variación de la concentración de 7-metoxicumarina en los tallos con la altura del lugar de recolección	69
27. Contenido de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones	76
28. Cromatogramas de extractos de hojas, flores y tallos de plantas de pericón de Chichoy Bajo, Patzún	79

I INTRODUCCION

El uso del pericón, Tagetes lúcida, es muy extendido en toda América Latina, tanto en rituales y ceremonias religiosas como en el tratamiento de muchas afecciones, tales como espasmos, catarros, tos, paludismo y otras (Diaz, 1976).

Dentro de los componentes de T. lúcida en Guatemala se ha aislado un principio con acción antiespasmódica (Ortiz, 1987) y antibacterial (Gándara, 1988), la 7-metoxicumarina, que tiene propiedades fototóxicas comprobadas y posibles propiedades cancerígenas (CAS. 93:89729k, Gros, 1985).

En Guatemala aún no se han hecho estudios para determinar el contenido de 7-metoxicumarina en T. lúcida. Ahora que se cuenta en Guatemala con 7-metoxicumarina aislada y recristalizada varias veces (Ortiz, 1987), es posible usarla como patrón en la cuantificación de este compuesto en la planta y en las infusiones o cocciones que se usan para el tratamiento de enfermedades; el método de análisis más conveniente para este caso es el de cromatografía de gases teniendo como métodos alternos la cromatografía líquida de alta resolución (CAS 99:15830p, 96:100352s, 93:217352w) y la polarografía (CAS 88:15571c, 73:115774e).

II OBJETIVOS E IMPORTANCIA

En Guatemala existen muchas plantas medicinales que se usan desde tiempos precolombinos y de las cuales poco o nada se ha estudiado seriamente. El estudiar los principios activos y cuantificarlos en los medicamentos tradicionales podrá dar una gran variedad de nuevos compuestos a la farmacopea.

El pericón, Tagetes lúcida, es una planta medicinal de uso muy difundido, contiene un compuesto con propiedades antiespasmódicas (Salguero, 1989) y antibacteriales (Cano, 1985; Alvarez, 1987; Gándara, 1988) comprobadas. Es de hacer resaltar su efecto antibacterial contra Shigella dysenteriae que produce la disentería, enfermedad que aunque se combate efectivamente en 24 horas con tetramicina, cloranfenicol o ampicilina, es muy común y mortal en nuestro medio, por no estar estos antibióticos al alcance de todos.

Aunque ya se han hecho estudios fitoquímicos y farmacológicos del pericón, incluyendo aislar y caracterizar el principio activo; aún falta estudiar su toxicidad, efectos secundarios y la dosificación que tradicionalmente se ingiere.

Debido a las propiedades de este compuesto, llamado 7-metoxicumarina, es importante cuantificarlo en los tallos, flores y hojas secas de la planta y determinar la dosificación que se está ingiriendo al tomar una infusión o una cocción de los tallos y hojas secas del pericón.

Los objetivos del presente trabajo son cuantificar la 7-metoxicumarina en hojas, tallos y flores secas de plantas de pericón recolectadas en diferentes lugares de Guatemala. Debido a que las cocciones de pericón que tradicionalmente se ingieren son preparadas utilizando toda la planta sin extraer todo el principio activo de ella, se pretende cuantificar la 7-metoxicumarina en cocciones preparadas de la manera tradicional a partir de las plantas recolectadas, así como también en tes que se preparan a partir de bolsitas de material disponibles en el mercado bajo diferentes marcas comerciales.

Se tiene como hipótesis que la 7-metoxicumarina no está presente en una concentración uniforme en las distintas partes de la planta, sino que está presente en mayor concentración en las hojas. Además, que las características del lugar de producción del pericón (altura, clima, suelo,...) influyen en la concentración de este principio activo en las diferentes partes de la planta.

III. ANTECEDENTES

A. El Pericón, Tagetes lúcida

1. Descripción

El pericón es un arbusto de 30 a 70 cm. de altura, natural de clima templado, tiene hojas compuestas, lanceoladas y aserradas e inflorescencias en forma de capítulos o cabezuelas; se caracteriza por un fuerte olor similar al del anís (Ortiz, 1977). Ver Figura 1.

En su mayoría, el pericón se encuentra silvestre en campos abiertos, en bosques de cedro y algunas veces en laderas de colinas rocosas secas; a una altitud entre 1,000 y 2,000 m. SNM (sobre el nivel del mar). Se ha reportado que en Guatemala se encuentra en los departamentos de Petén, Jalapa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, El Quiché, Huehuetenango y San Marcos (Williams, 1976). En México es especialmente abundante en los estados de Nayarit y Jalisco (Evans Schultes, 1980, 1982), México, Veracruz, Hidalgo, Michoacán, Durango, Chihuahua, Zacatecas y el valle de México (Martínez, 1969). También se encuentra en El Salvador y Honduras. (Williams, 1976). Ver Figura 2.

La planta crece en forma abundante durante los meses húmedos pero escasamente en cuanto paran las lluvias. No florece durante la estación seca; es en julio cuando empieza a florecer y en octubre cuando hay mayor abundancia de flores (Siegel, 1977). Según los indígenas, las plantas deben cortarse antes del 24 de junio, Día de San Juan, porque después de ese día "les entra el demonio" (Wi-

lliams, 1976). En muchas comunidades en México, se celebra la "Fiesta del Pericón" el 28 y 29 de septiembre, cuando éste se encuentra en el pico máximo de su ciclo de floración, el primer día, las mujeres y los niños recolectan la planta. (Siegel, 1977).

La clasificación taxonómica del pericón es la siguiente:

Reino: Plantae
División: Espermafrodita
Subdivisión: Angiosperma
Clase: Dicotiledonea
Subclase: Gamopetalae
Orden: Sinandreae
Familia: Compositae
Género: Tagetes
Especie: Tagetes lúcida (Cav.) o
Tagetes florida *

Figura 1

El pericón, T. lúcida

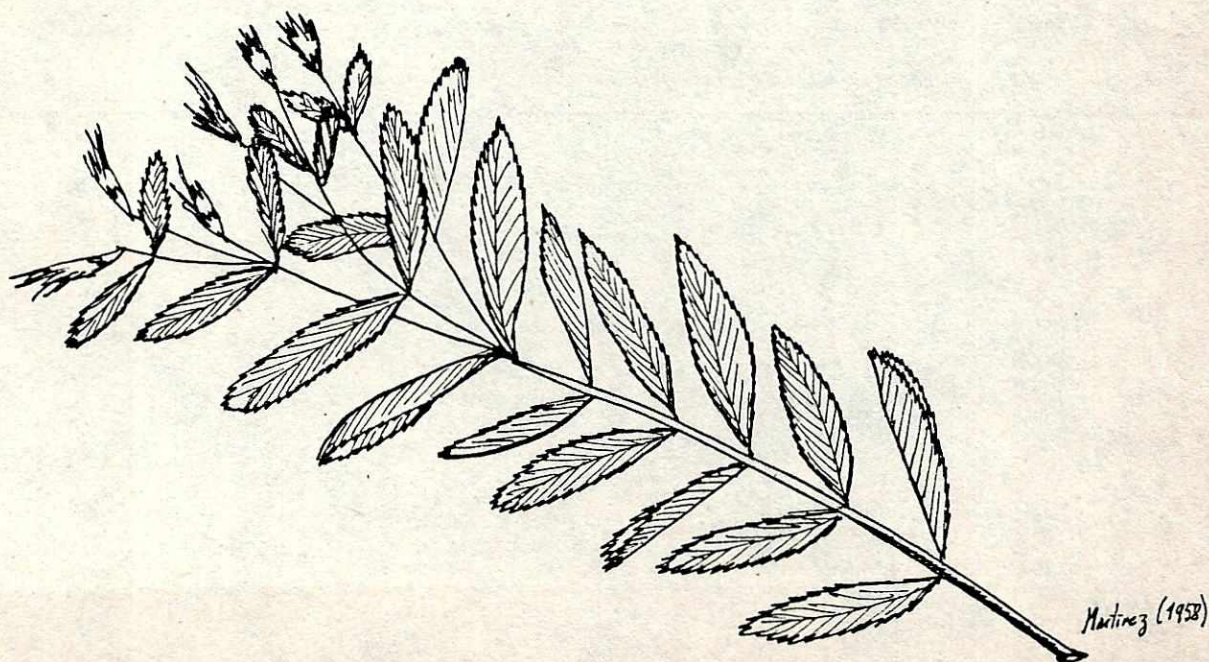


Figura 2

Area donde se ha reportado que se encuentra el pericón T. lúcida(E-
vans Schultes, 1980, 1982; Martínez, 1969; Williams, 1976).



El nombre "pericón" está bien establecido en Guatemala; hay aldeas que llevan el nombre de "El Pericón" en El Quiché y Huehuetenango. En Totonicapán se le conoce también como "liya" y en Quezaltenango como "Hierba de San Juan", nombre que corresponde al utilizado en la lengua inglesa "Saint John's wort". El nombre más común que se le ha dado a *T. lúcida* en México es "pericón" que significa que éste se adopta para todos los usos. Otros nombres que se le dan son clavo de difunto, curucumín (en Michoacán), flor de Santa María, flor de tierra dentro, guía laga zaa, hierbanis, hierba de San Juan, hierba de Santa María, hipericón, iya, jolomocox, liya, pericón amarillo, periquillo, Santa María, Sweet Maze (en horticultura), tumutsali, uca, hierba nil, anisillo (en el valle de México), hierba anís (en San Luis Potosí). (Martínez, 1969; Morton, 1981).

El género *Tagetes* es diverso y está compuesto por especies de olores muy fuertes, algunas de las cuales son conocidas como "maravillas". Se extienden desde el sudoeste de los Estados Unidos hasta Argentina, y el área donde hay gran diversidad es en el centro y sur de México (Neher, 1968).

Algunas especies del género *Tagetes* han quedado establecidas en la horticultura y hay evidencia de su cultivo y uso extensivo por las tribus indígenas mexicanas y de Sudamérica desde mucho tiempo antes de la llegada de los conquistadores. Los indígenas precolombinos creían que muchas de las "maravillas" más aromáticas tenían propiedades mágicas y de salvar vidas. De hecho, estas plantas, ya sea de fuentes cultivadas o no, tenían gran variedad de usos religiosos y mundanos. (Neher, 1968).

Las "maravillas" están entre las plantas más comunes a la orilla de los caminos de Guatemala en los meses de julio y agosto . Hay gran controversia acerca de donde se originó Tagetes. Todas las regiones donde se encuentra tienen puertos que hace mucho tiempo fueron lugar de atraque para barcos españoles: el este de la India, el norte de Africa, Portugal, Centro América y también España. Una razón para la confusión ha sido que en todas estas áreas hay ritos religiosos muy antiguos en los cuales se usa Tagetes. El botánico alemán Leonhard Fuchs que nombró este género en el siglo XVI dijo que el lugar de origen era el Nuevo Mundo; este nombre fue luego adoptado por Linneo. Dos puntos que apoyan la teoría de que Tagetes se originó en América son el hecho que estas especies de Tagetes se muestran en esculturas mayas hechas alrededor del año 1000 A.C. y el hecho de que en México los indígenas conocen una especie del género con un nombre original azteca, "cempoalxochitl" (Chickering, 1973).

2. Composición fitoquímica de Tagetes lúcida

En las especies del género Tagetes se ha encontrado diversidad de compuestos. En general, las plantas de este género contienen grasas, tres resinas ácidas, aceites volátiles, clorofila, caucho, ácido gálico, tanino, glucosa, dextrina, materias pécticas, una sustancia con algunas reacciones de alcaloides, sustancias leñosas y sales minerales. (Martínez, 1969). Se han estudiado los componentes volátiles en el género Tagetes y se ha encontrado que éstos incluyen monoterpenos, aromáticos y sesquiterpenos (Rodríguez y Mabry 1977). Dentro de los carotenoides mencionados para el género, los más abundantes en las flores son las xantofilas y de estos la luteína (Guzman, 1987).

Con respecto a Tagetes lúcida en sí, se tienen datos reportados del contenido de alcaloides y taninos (Ortiz,S, 1977; Alvarez, 1986). Los alcaloides no son cuaternarios ni oxiaminas (Alvarez, 1986). Contiene además flavonas o flavonoles y compuestos fenólicos; y también esteroides o compuestos esteroidales, posiblemente con enlaces dobles conjugados (Alvarez, 1986).

En un estudio realizado mediante el uso de la cromatografía gaseosa, se separaron cuatro fracciones diferentes, a partir de aceite esencial obtenido por arrastre por vapor de material vegetal, sin raíz y colectado en los meses de octubre y diciembre. De las cuatro fracciones obtenidas, únicamente dos de ellas fueron identificadas. Las sustancias identificadas fueron el esdragol (4-propenilo,-1-metoxi-benceno), y el éter metílico del eugenol (4-propenil,-1,2-dimetoxi-benceno). Ver Figura 3. Se determinó la ausencia de compuestos carbonilos como la tagetona (5,7-octadien-4-ona-2,6-dimetil) en base a la ausencia de bandas de absorción en el espectro infrarrojo del aceite esencial (Guzmán, 1962).

En otro estudio (Rodríguez y Mabry, 1977) se reporta la caracterización de los tiofenos encontrados en Tagetes: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo, 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo, 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo, 2,2':5'2"-tertienilo. Ver Figura 3.

En otro estudio (Ríos y Flores, 1976) se aislaron de T. florida (sinónimo de T. lúcida Cav.) e identificaron por sus espectros infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de protones cuatro compuestos cuyas estructuras coinciden con la 7-metoxicumarina, 6,7-

dimetoxicumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina y 7-hidroxycumarina éter dimetilalílico (CAS, 86:174252). Ver Figura 3.

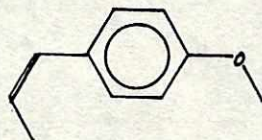
Posteriormente (Ortiz, 1977) se determinó la presencia de N-fenilacetamida en pericón. Ver Figura 3.

Se ha analizado el extracto etereo de *T. lúcida* por medio de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas y se han caracterizado los siguientes compuestos: 1-metoxi-4-(2-propenil)benzeno, 1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno, 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)benzeno, 7-metoxi-cumarina, 7-isoprenoxi-cumarina, 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol. Ver Figura 3 (Guzman, 1987).

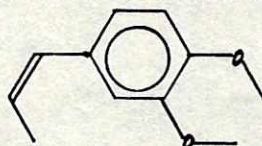
Figura 3

Compuestos encontrados en *T. lúcida* (Guzmán, 1962; Martínez, 1969; Ríos y Flores, 1976; Rodríguez y Mabry, 1977; Ortiz, 1977; Guzmán, 1987).

1-metoxi-4-(1-propenil)benzeno (anetol):



1,2-dimetoxi-4-(1-propenil)benzeno (Eter metílico del isoeugenol):



7-metoxi-cumarina:

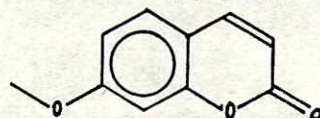
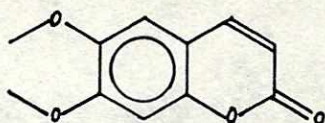


Figura 3 (cont.) Compuestos encontrados en *T. lúcida*:

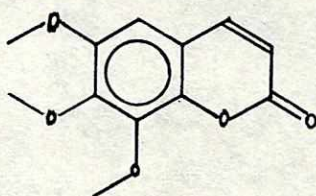
3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalool):



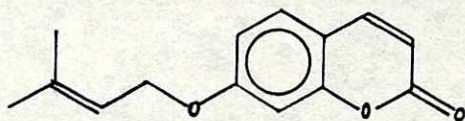
6,7-dimetoxicumarina:



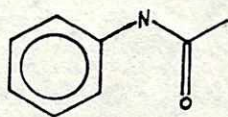
6,7,8-trimetoxicumarina:



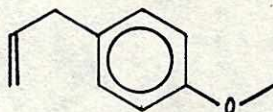
7-hidroxicumarina éter dimetilalílico (7isoprenoxicumarina):



N-fenilacetamida:



esdragol (4-propenil,-1-metoxi-benceno):



éter metílico del eugenol (4-propenil,-1,2-dimetoxi-benceno):

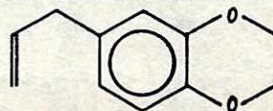
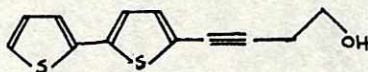


Figura 3 (cont.) Compuestos encontrados en *T. lúcida*:

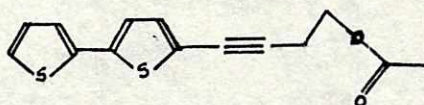
5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienilo:



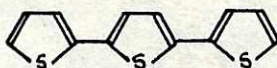
5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo:



5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitienilo:



2,2':5'2"-tertienilo:



3.- Uso como medicina tradicional y otros usos

Las plantas del género *Tagetes* son muy usadas en Mesoamérica durante los ritos indígenas del Día de los Santos y el de los Muertos, 1o. y 2o. de noviembre, respectivamente; esto es lo que queda de su uso precolombino en rituales. (Chickering, 1973; Kaplan, 1960). Aunque éstas celebraciones son parte del calendario religioso católico, las costumbres se deben al sincretismo con la religión indígena. (Kaplan, 1960). Muchos indígenas aún las emplean de modo similar al de sus ancestros, sin embargo, la educación y el efecto de ésta sobre la superstición ha disminuído notablemente su uso en la actualidad (Neher, 1968).

Las partes de la planta más útiles son la cabeza de las flores y las hojas; estas dos partes tienen grandes cantidades de glándulas que son la fuente de los aceites, ésteres y fenoles. Las infusiones (reposo en agua caliente sin que ésta hierva) y cocciones (con ebullición) se hacen de todas las partes de la planta; se hacen cataplasmas (medicamento externo de consistencia suave usado para aliviar los dolores) de las hojas y en algunos casos la planta se pulveriza entera (Neher, 1968).

Los atributos extraordinarios, casi "mágicos" que se dan a estas plantas son evidentes por el amplio y variado uso que se le da popularmente. Se ha reportado que alrededor de 1899 Tagetes lúcida era una de las plantas medicinales más usadas en el oeste de México. (Neher, 1968).

En los mercados públicos de muchas localidades de América Latina pueden adquirirse pequeños manojos de T. lúcida. Los indígenas colectan las plantas enteras, las hacen manojos, secan y las guardan para ser empleadas posteriormente. Con la planta seca se prepara un té para tratamiento de picaduras de alacrán, fiebre y malaria, y también para ser usado como afrodisíaco. El té, de sabor dulce y olor similar al del anís, es una bebida refrescante y sabrosa; se han comprobado científicamente algunas de las propiedades que le son popularmente atribuidas. (Neher, 1968). Esta planta tiene gran reputación como remedio para desórdenes digestivos. Se usan los tallos secos para preparar té cuando hay problemas serios del estómago o los intestinos. (Williams, 1976).

T. lúcida no faltaba en las ceremonias de los antiguos ritos aztecas, se utilizaba en forma pulverizada y se les lanzaba a los prisioneros de guerra en la cara para inhibirles sus sentidos antes de ser quemados en una gran hoguera; se le atribuían efectos analgésicos a la planta (Neher, 1968).

La tribu de los huicholes de México fuman una mezcla de Nicotiana rústica (tabaco) y T. lúcida para provocarse visiones. Se mezcla T. lúcida con tabaco porque se dice que reduce la aspereza del tabaco y que facilita inhalaciones profundas y la intoxicación; ésta intoxicación se caracteriza porque las personas se muestran quietos, se acuestan y pasan periodos muy largos con los ojos cerrados. (Siegel, 1977). Frecuentemente beben el tesguino o cai de maíz fermentado, a la vez que fuman "para producirse visiones más claras". T. lúcida ocasionalmente se fuma sola, para obtener efectos alucinógenos. (Evans Schultes, 1980).

T. lúcida se ha usado por mucho tiempo en la purificación ritual para limpiar el aire. (Siegel, 1977). En el contexto religioso se le conoce como "hierba de la Virgen María". La esencia es adecuada para mezclarla con licor o chocolate. En la corte de Moctezuma era uno de los aditivos de la bebida ritual de cacao. Es difícil afirmar o negar los reportes de que ésta planta es efectiva como narcótico, pues éstos son muy variados y los análisis químicos están incompletos. (Emboden, 1979).

En la actualidad, T. lúcida se quema frecuentemente en los ritos religiosos y en el hogar en lugar de incienso, ya que es un material ideal para quemar porque es fácilmente disponible, barato y tiene un

CUADRO 1

Usos comunes del pericón

Uso	Evaluación		Vía de Administración	Parte Usada
	F	V		
Afrodisíaco	0	2	Oral	Hoja
Anticatarral	0	3	"	PE
Antidisentérico	2	3	"	"
Antídoto	0	3	NHI	"
Antiespasmódico	0	2	Oral	Hoja, flor
Antipalúdico	0	2	Local	" , PE
Antiparasitario	0	3	NHI	NHI
Antipirético	0	3	Oral	PE
Antiséptico	0	3	NHI	NHI
Antitumoral	0	3	"	"
Antitusígeno	0	3	"	PE
Aperitivo	0	3	"	NHI
Arroja cálculos	0	3	"	"
Caquexia	0	2	Oral	Hoja
Carminativo	0	2	"	" , flor
Cefalalgias	0	3	NHI	PE
Cicatricial y regenerativo	0	3	"	"
Dermatosis	0	3	Oral	"
Diaforético	0	2	"	Hoja
Diurético	0	2	" , varios	" , PE
Emenagogo	0	2	" , "	" , "
Emético	0	2	"	"
Estimulante	0	3	NHI	NHI
Galactógeno	0	3	"	PE
Gastroenteritis	0	2	Oral	Hoja, flor
Humores	0	3	NHI	NHI
Insecticida	0	3	"	"
Locura	0	3	"	PE
Oxitocico	0	3	Varios	"
Pectoral	0	3	NHI	"
Refrescante	0	3	"	"
Relajante	0	2	Oral	Hoja
Resolutivo	0	3	NHI	NHI
Espujo de sangre	0	3	Oral	"

CLAVE:

Uso Vulgar (V):

- 0) No hay información.
- 1) Uso reportado en varias regiones.
Referencias independientes del uso.
Observación directa por persona calificada.
Autoexperiencia.
- 2) Identificación de persona o lugares.
Observación directa por persona no calificada.
Información oral de un observador directo o un curandero.
- 3) Información oral de terceras personas.
Revisión.
Dicho popular.
Anónimo.

Evaluación Farmacológica (F):

- 0) No hay información.
- 1) Se confirma en preparaciones animales el uso farmacológico.
- 2) No se confirma el uso en una preparación animal adecuada.
- 3) Se presenta una acción farmacológica diferente del uso vulgar o de efectos clínicos.

NHI = no hay información.

PE = planta entera.

(Díaz, J.L., 1976)

olor muy agradable. (Neher, 1968). Las cabezuelas y hojas son usadas para aromatizar el agua con que se baña a los niños y para aliviar el reumatismo (Siegel, 1977). En infusión, se utiliza para curar los dolores del vientre que revisten aspecto de cólicos (Martínez, 1969). La planta también se quema para ahuyentar los mosquitos, lo mismo que las hojas secas pulverizadas se usan con el propósito anterior y como remedio para la malaria y otras enfermedades (Williams, 1976), y para aromatizar los elotes, poniéndolas en el agua en que estos se cuecen. (Martínez, 1959).

En Nayarit usan el agua de cocimiento de éste vegetal contra el paludismo, sin embargo el Instituto Médico Nacional de México obtuvo resultados negativos al estudiar posibles efectos de este material como antipalúdico y antidiarréico (Martínez, 1969).

En el Cuadro 1 se presentan los distintos usos que se le dan a *T. lúcida*, la evaluación vulgar y farmacológica, la vía de administración y la parte de la planta usada (Diaz, 1976).

B. Actividad antiespasmódica y antibacterial del pericón

1. Espasmos y antiespasmódicos

Los espasmos estomacales e intestinales son contracciones de los músculos lisos causadas por el sistema nervioso y van acompañadas de dolores característicos de crisis gástricas, localizados profundamente en el epigastrium y abdomen superior (Sodeman, 1950).

Ya que el impulso nervioso pasa a través de la sinapsis por medio de un agente estimulante (neurotransmisor) que sale por exocitosis de unas vesículas en las sinapsis nerviosas, es posible blo-

quear la señal. Se les llama agentes bloqueadores a las sustancias que interrumpen la transmisión del impulso nervioso en la unión neuromuscular esquelética; pueden ser agentes "competitivos o estabilizadores" si su mecanismo de acción consiste en combinarse con los sitios receptores colinérgicos en la membrana postsináptica, o agentes despolarizantes si su mecanismo de acción es despolarizar la membrana postsináptica (Goodman, 1982). Los antiespasmódicos no son más que agentes bloqueadores; como ejemplos tenemos d-tubocurarina, alcuronio, beta-eritroidina, galamina, pancuronio, decametonio, succinilcolina, y benzoquinonio (Goodman, 1982).

2. El principio antiespasmódico y antibacterial del pericón, 7-metoxicumarina

a. Estudio farmacológico del pericón:

Además de tener el conocimiento popular de que el pericón sirve como antiespasmódico, se ha comprobado la acción antiespasmódica de los extractos de pericón en benceno, n-hexano, cloroforno, éter etílico, etanol y agua en una preparación del duodeno de ratas blancas (Salguero, 1989). Las dosis efectivas medias, DE_{50} , contra acetilcolina y cloruro de bario, como agentes espasmódicos, se presentan en el Cuadro 2.

En cuanto al efecto antibiótico del pericón, se comprobó que su extracto etanólico tiene un efecto de inhibición en el crecimiento de cultivos de Shigella sp. (Alvarez, 1986); mientras que su extracto metanólico lo tiene contra Shigella dysenteriae, S. flexnerii, Salmonella typhi, Salmonella enteritidis, Escherichia coli (Cano, 1985) y Staphilococcus aureus (Gándara, 1988).

CUADRO 2

Dosis efectivas medias (en miligramos) de varios extractos de pericón contra dos agentes espasmódicos (Salguero, 1989)

Solvente donde se extrajo	agentes espasmódicos	
	Acetilcolina	Cloruro de Bario
N-hexano	3.125	3.7
Benceno	1.875	9.0
Cloroformo	5.05	6.0
Eter etílico	7.5	2.17
Etanol	10	10.0
Agua	34.5	42.5

b. Aislamiento y caracterización

Recientemente se aisló el principio antiespasmódico del pericón, y se encontró al caracterizarlo que corresponde a la 7-metoxicumarina, faltando aún caracterizar otras tres cumarinas ya aisladas (Ortiz,1987), aunque ya se tienen referencias de 4 cumarinas presentes en Tagetes florida: 7-metoxicumarina, 6,7-dimetoxicumarina, 6,7,8-trimetoxicumarina y el éter dimetilalílico de la 7-hidroxycumarina (Rios, T.,1976).

Además se comprobó que la acción antibacterial del pericón con Escherichia coli y Sataphilocus aureus se debe a la 7-metoxicumarina; teniendo también un efecto fungistático con Cándida albicans (Gándara,1988). Se tienen referencias de su actividad antibacteriana (CAS,74: 29247z,76:95155k,91:187194z), fungistática(CAS,70:35321c), fungicida(CAS,81:134855p), antimicrobiana (CAS,89:158478j) y antiespasmódica (CAS,93:107287),

c. Descripción

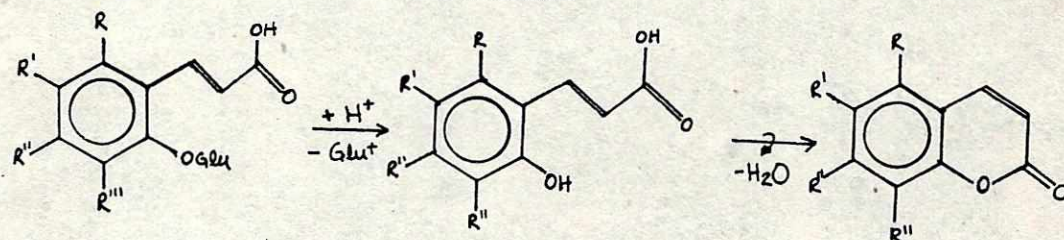
i. Cumarinas

Las cumarinas son benzo- α -pironas, lactonas de los ácidos o-hidroxicinámicos. El nombre de cumarina proviene de "coumarouna", *Dipterix odorata*, árbol nativo de la Guyana del cual se extrajo y cristalizó la primera benzo- α -pirona no sustituida (Gros, 1985).

Las cumarinas no sustituidas no se encuentran presentes en las plantas frescas, sino solamente su precursor, el o-glucósido del ácido o-hidroxi-trans(o cis)-cinámico (melilotósido) sustancia que es inodora. A partir de éste, al secarse el material vegetal, se forma la cumarina (ver Figura 4).

Figura 4

Reacción de formación de las cumarinas



Las cumarinas, generalmente, dan una intensa fluorescencia azul o azul-verdosa, debido a la alta conjugación del anillo lactona y por esta propiedad es fácil identificarlas en separaciones cromatográficas. Se encuentran en las familias de plantas: Apiaceae, Papilionaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae, Compositae y Gramineae (Gros, 1985).

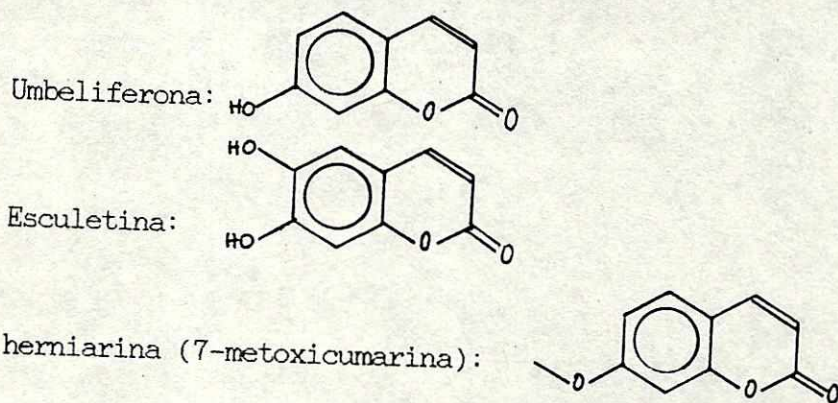
Se han encontrado propiedades antitumorales y antimicrobianas en algunas cumarinas. La cumarina se usó durante mucho tiempo como

corrector de olor y sabor en productos farmacéuticos y alimenticios. Actualmente su uso en estos productos es prohibido, debido a que en experimentos con animales se observaron lesiones hepáticas y efectos cancerígenos posiblemente relacionados con la cumarina, 2H-Benzopirán-2-ona (Gros,1985).

La umbeliferona, esculetina y herniarina (7-metoxicumarina) (Ver Figura 5) se agregaban a ciertos preparados de protección solar ya que absorben en la región ultravioleta; al saberse que la radiación sobre la piel con estas cumarinas causa la formación de eritemas, se dejaron de usar en dichos preparados (Gros,1985).

Figura 5

Compuestos cumarínicos que producen eritemas en la piel al ser irradiados con luz ultravioleta (fototóxicos).



ii) 7-metoxicumarina

La 7-metoxicumarina también es conocida como 7-metoxi-2H-benzopirán-2-ona, herniarina, éter metílico de umbeliferona y con número de la Amer. Chem. Soc. [531-54-9]). La 7-metoxicumarina tiene peso molecular de 179.18, es soluble en etanol y dietiléter y se descompone en agua; tiene punto de fusión entre 117-8 °C. Su espectro en la región ultravioleta muestra máximos de absorción a

290 y 323 nm. con un log. de absorptividad molar de 3.85 y 4.17 respectivamente (Weast,1977. Buckingham, 1982). Ver estructura en las Figuras 3 y 5.

La presencia de 7-metoxi-cumarina se ha comprobado en las siguientes plantas:

Artemisia diffusa (CAS, 72:87157)

Artemisia lactiflora (CAS, 75:31294, 96:11555, 98:1578396)

Matricaria chamomilla (CAS, 72:35705, 75:112796, 79:70268, 85:68173, 88:78956, 91:171653, 92:7270, 92:203402, 95:202137, 96:1000352, 85:166551k)

Matricaria matricarioides (CAS, 73:69725)

Ficus sp. (CAS, 79:400005)

Artemisa pseudocotala (CAS, 81:35526)

Lepidium ruderales (CAS, 166395)

Artemisia sp. (CAS, 85:30626)

Herniaria sp. (CAS, 85:174257)

Saussurea glasislis (CAS, 85: 174252)

Tagetes florida (CAS, 17061)

Rutaceae (CAS 87:117191)

Dalea tintorea (CAS, 89:87142)

Artemisia monosperma (CAS, 89:176382, 92:37740)

Lavandula dentata (CAS, 87:50192, 92:90951)

Athanasia sps. (CAS, 91:57194)

Seseli tortuosum (CAS, 91:52715)

Trichogonia sp. (CAS, 95:204176)

Artemisia apiacea (CAS, 92:177384)

Artemisia stellerias (CAS, 92:175646)

Artemisia feddei (CAS, 93:110597, 95:183944)

Herniaria glaba (CAS, 96:149036)

Chromolaema pseudoinsignis (CAS, 97:69241)

Se le ha encontrado actividad antibacteriana (CAS, 74:29247z, 76:95155k, 91:187194z,), fungistática (CAS,70: 35321c), fungicida (CAS,81:134855p), antimicrobiana (CAS, 89:158478j), antiespasmódica (CAS,93:107287), antihipertensivo (CAS,88:163896e), reguladores de la planta (CAS, 68:104039). También se le han encontrado propiedades relacionadas con la fototoxicidad: Reacción con guanidinas (CAS, 90:38865), actividad mutagénica (CAS, 95:162878), actividad de inhibición sobre el hígado por la acción en el citocromo p45 (CAS 95:145399, 92:71632) y reacción fotoquímica con los ácidos nucleicos (CAS, 76:71718) fototóxica en ensayo humano (CAS,93:89729k).

La actividad antiespasmódica de la 7-metoxicumarina se ha estudiado en ileo de cerdo de Guinea. Esta actividad se estudió en los extractos de manzanilla, Matricaria chamomilla, y al compararla con la actividad de la papaverina se mostró una actividad relativa (con base a peso) de 0.07 (Achtterrath,1980).

La actividad fototóxica se ha estudiado en piel humana exponiéndola a dosis común y radiación en la región ultravioleta, comprobándose que produce eritemas en la piel (CAS,93:89729k).

Actualmente se esta estudiando la dosis letal media de la 7-metoxicumarina en ratas; aún no se tienen resultados de este estudio (Ortiz,1987).

C. Cuantificación de 7-metoxicumarina

La 7-metoxicumarina se ha separado de otros componentes de extractos de materiales por diversos métodos: cromatografía líquida (CAS,67:84909x), cromatografía en capa fina (CAS,81:57977c, 83:143875p, 89 :17296c, 93:155896r.), cromatografía gaseosa del extracto de las flores de Chamomilla sp. (CAS,82:149030k, 84:169712d, 95:202137x), y por cromatografía líquida de alta resolución (CAS,99:15830p, 96:100352s, 93:217352w.).

Los métodos de detección que se han utilizado para hacer determinaciones de 7-metoxicumarina son: fluorimetría de rayo laser (CAS,99:154810v), espectroscopía ultravioleta (CAS, 89:204275), polarografía, la cual es un método de determinación cuantitativa específica, posible gracias a que se tiene referencia de los potenciales de media onda de 21 cumarinas diferentes (CAS, 88:15571, 73:115774) y separación termoquímica, basada en las temperaturas de sublimación (CAS, 80:137209, 79:70252).

En una cuantificación de cumarinas realizada en extracto de Matricaria chamomilla, se encontró de 10 a 15 mg de 7-metoxicumarina. La separación fué lograda por cromatografía líquida de alta resolución con 15% acetonitrilo-agua conteniendo 2% ácido acético (CAS, 96:100352).

En otro estudio se separaron compuestos fenólicos y cumarinas con cromatografía líquida de alta resolución fase invertida ; se usó como solvente A: agua-ácido metanólico (95:5) y como solvente B: Metanol. Se usó tanto métodos isocráticos, como de elución con gradiente. La columna utilizada fué una Lichrosorb RP-18 10um a una

temperatura de 35°C (CAS, 93:217352).

Se ha reportado también la separación de cumarinas de extractos de plantas por cromatografía líquida de alta resolución con detección por absorción a 350 nm y con acoplamiento a un espectrómetro de masas. Se usó columna Lichrosorb RP-8 a una temperatura de 45°C y se usó elución con gradiente desde 5% a 80% de acetonitrilo en una solución acuosa de ácido fosfórico con pH 2.8 (CAS, 99:15830).

Se tienen varias referencias sobre la separación de cumarinas por medio de cromatografía gaseosa Glasl, H, et. al., 1976, separaron 7-metoxicumarina del extracto de flores de *M. chamomilla* por medio de cromatografía de gases y evaluaron distintos medios de extracción (CAS, 84:169712d).

Guzmán, N., 1987, separó 7-metoxicumarina por medio de cromatografía de gases utilizando tres sistemas distintos: 1) temperatura de inyector y detector de 250 °C, temperatura del horno programada desde 100 °C hasta 300 °C con un gradiente de 4 °C/min., columna capilar de dimetilsilicona en sílica fundida de 12m. de largo y 0.2mm de d.i. con 4800 platos/m., helio como gas portador. división del volumen de inyección (de 1 µl) de 1:3, detector de ionización de llama . 2) Temperatura de inyector de 250 °C, temperatura del horno programada desde 80 hasta 300 °C a 4°C/min, columna capilar DB-5 de 15 metros de largo y 0.32" de d. i. con helio como gas portador, volumen de inyección de 1 µl, con un espectrómetro de masas como detector, a una temperatura de 300 °C con un barrido de 50 a 500 UMA en 0.6 segundos. 3) Temperatura de inyector a 300 °C y de detector a 350 °C, temperatura del horno programada desde 120 a 300 °C a 10

°C/min., columna empacada con fase estacionaria OV-17 al 3%p/p y Chromosorb WHP de 80-100 mesh como soporte, nitrógeno como gas portador y detector de ionización de llama (Guzmán, N., 1987).

BIBLIOTECA
DE LA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

IV PLANTEAMIENTO DEL EXPERIMENTO

A. Diseño del experimento

1. Factores

Los factores que influyen en la cantidad de los principios activos en las plantas son: la parte de la planta analizada, la edad de la planta (época en que se analiza), los factores externos o características del lugar donde se produjo la planta, tales como altura, clima, tipo de suelo y otros (Gross, 1985).

En el presente trabajo se pretendió cuantificar el principio activo en el pericón y como la concentración de éste depende de varios factores, se tomaran en cuenta los siguientes:

a. Lugar de recolección

Se tomaron muestras de seis diversos lugares de la república de Guatemala para tener una muestra más representativa de la influencia de los factores externos (ver Figura 6 y Cuadro 3).

CUADRO 3

Lugares de recolección de las plantas de pericón

Lugar de Recolección	CLIMA Y ALTURA DEL LUGAR			Recolector
	temper.	humedad	altura (mSNM)	
San José Poaquil, Chimaltenango	templa.	humedo	2000	CENAT/ERPLAM
Chichoy Bajo, Patzún, Chimaltenango	templa.	humedo	2213	CENAT/ERPLAM
San Juan Sacatepéquez, Guatemala	templa.	humedo	1845	G. Alvarez
Cabricán, Quetzaltenango	templa.	humedo	2890	CENAT/ERPLAM
San José Pinula, Guatemala	templa.	muy hume.	1850	G. Alvarez
Tecpán Guatemala, Chimaltenango	templa.	humedo	2287	G. Alvarez

templa.= templado, temperatura promedio entre 14.9 y 18.7 C (y variacion entre 35 y 49 %).

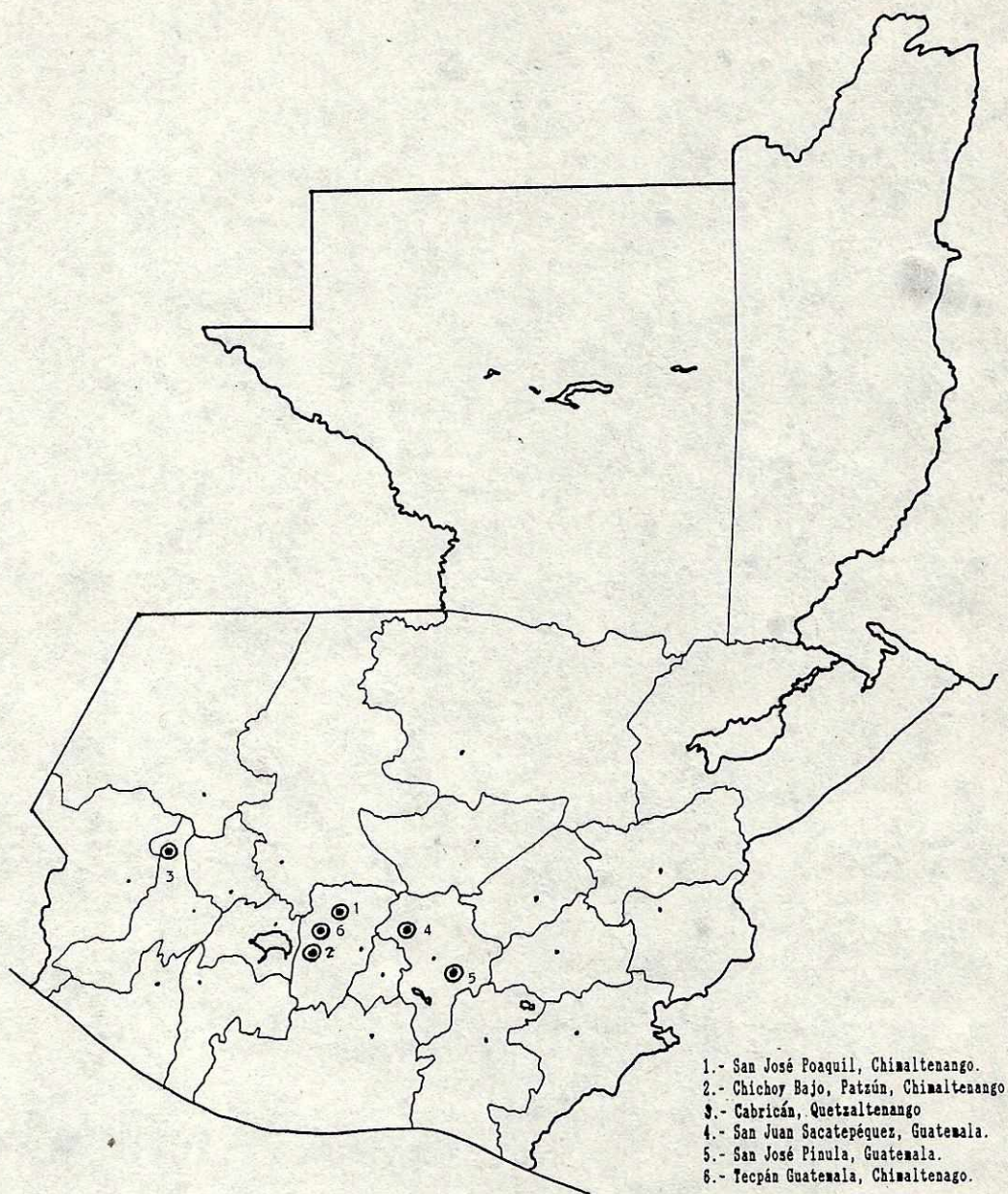
humedo = 64 a 127 días de lluvia por año

muy humedo = más de 128 días de lluvia por año

sistema según THORNTHWAITE fuente: Atlas Nacional de Guatemala

Figura 6

Lugares de recolección de las plantas de pericón



b. Partes de la planta

Se separaron las hojas, tallos y flores de las plantas recolectadas y se trabajaron por aparte; para averiguar en que parte de la planta es más abundante el principio activo.

c. Madurez o edad de la planta

Se trató de anular el efecto de la edad de la planta, recolectando todas las plantas en el mes de septiembre, cuando ya florecieron.

2. Tratamientos:

CUADRO 4

Tratamientos del diseño:

Factor 1: parte de la planta (letra) Factor 2: lugar de recolección (número) Variable de bloqueo: tiempo de extracción (subíndice: 1= 8hrs, 2= 12hrs, 3=16hrs).			
NIVELES DEL FACTOR 2	NIVELES DEL FACTOR 1		
	(A) hojas	(B) flores	(C) tallos
(1) San José Poaquil	1A ₁ , 1A ₂ , 1A ₃	— — —	— — —
(2) Chichoy B., Patzún	2A ₁ , 2A ₂ , 2A ₃	2B ₁ , 2B ₂ , —	2C ₁ , 2C ₂ , 2C ₃
(3) Cabricán	3A ₁ , 3A ₂ , 3A ₃	3B ₁ , 3B ₂ , 3B ₃	3C ₁ , 3C ₂ , 3C ₃
(4) San Juan Sacate.	4A ₁ , 4A ₂ , 4A ₃	4B ₁ , 4B ₂ , 4B ₃	4C ₁ , 4C ₂ , 4C ₃
(5) San Jose Pinula	5A ₁ , 5A ₂ , —	5B ₁ , 5B ₂ , 5B ₃	5C ₁ , 5C ₂ , 5C ₃
(6) Tecpán Guatemala	6A ₁ , 6A ₂ , 6A ₃	6B ₁ , 6B ₂ , 6B ₃	6C ₁ , 6C ₂ , 6C ₃

Nota: En el caso de las plantas de San José poaquil, los proveedores de ese lugar dieron sólo hojas y no la planta completa. Las flores de Patzún no alcanzaron para hacer una tercera extracción. En el caso de San José Pinula, al realizar las extracciones, se perdió la muestra por falta de reflujo.

Tomando en cuenta los dos factores y los distintos niveles de cada factor, nos da un total de dieciseis tratamientos, haciéndole a

cada tratamiento tres extracciones, bloqueando la variación que pueda dar el tiempo de extracción, siguiendo las mismas condiciones de extracción para cada conjunto de los dieciseis tratamientos. Para cada extracción se hicieron tres mediciones.

Se tiene entonces un diseño bifactorial por bloques al azar con submuestreo (Winer, 1971) (ver Cuadro 4).

B. Metodología.

Para poder alcanzar los objetivos del presente trabajo se siguieron los pasos detallados a continuación (Fig. 7).

1. Recolección de la planta

Fué realizada por los proveedores de CEMAT/ ERPLAM en San José Poaquil, Patzún y Cabricán y por Guillermo Alvarez en los tres lugares restantes. Se cortó la planta completa a una altura de dos a cinco centímetros sobre el suelo, entre el 14 y el 26 de septiembre de 1987, cuando la planta ya floreció.

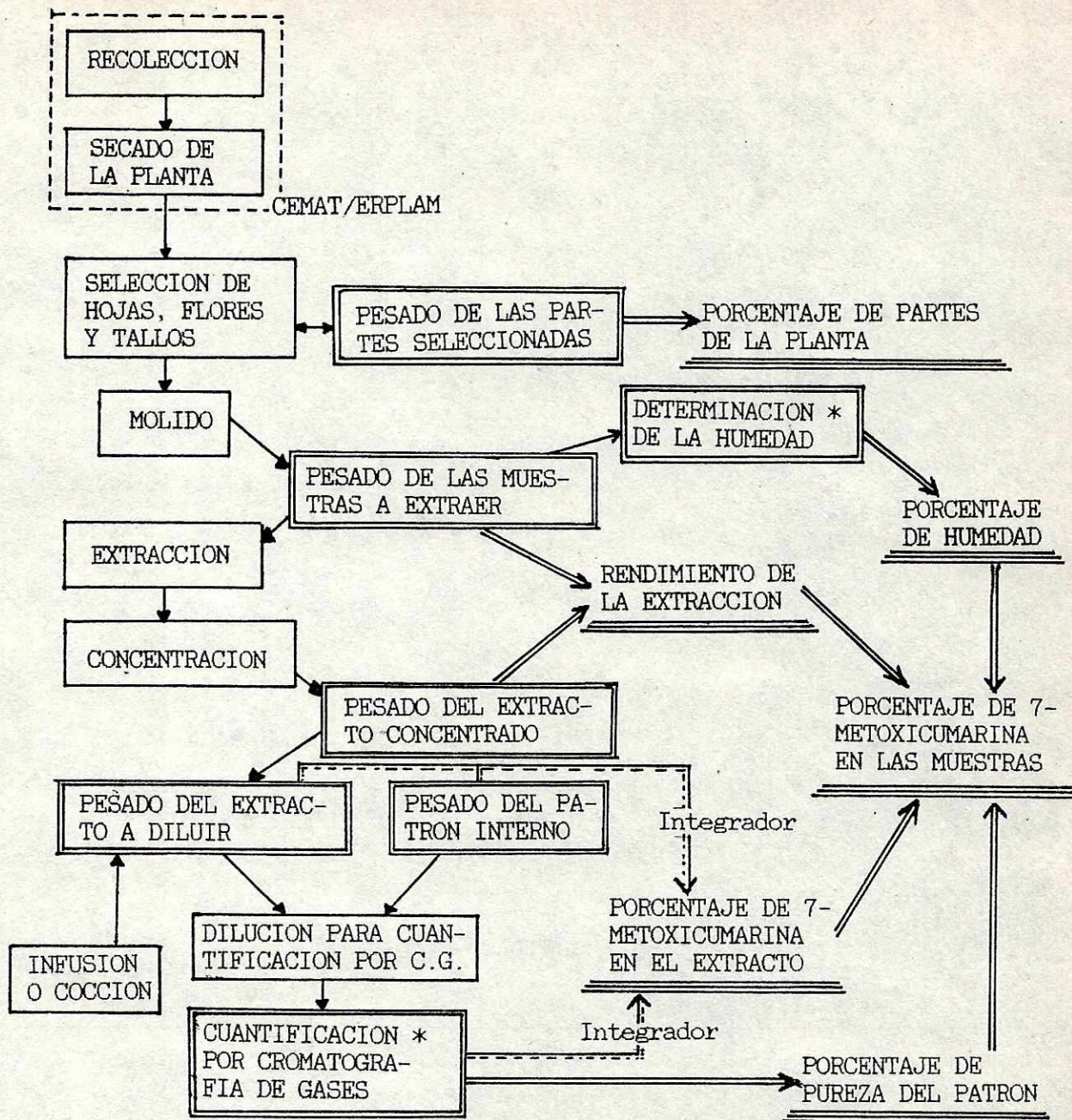
2. Secado de la planta

Las plantas recolectadas fueron puestas al sol sobre un "plastico" (polietileno) hasta quedar "secas" (cuando el material es quebradizo); para lo cual se tarda una semana aproximadamente. Este es el método mas común y tradicional de secado de la planta.

3. Separación de tallos, hojas y flores

Se separaron las tres partes (hojas, flores y tallos) de las plantas de cada uno de los lugares de recolección, quitándoles las hojas y flores a los tallos. El término "flor" se utiliza aquí para la flor compuesta.

FIGURA 7
Diagrama de flujo de la metodología



SIMBOLOGIA:

□ OPERACIONES DE PREPARACION DE LA MUESTRA

▣ OPERACIONES QUE PRODUCEN DATOS PARA LA CUANTIFICACION

→ MANEJO DE MUESTRAS

⇒ MANEJO DE DATOS (CALCULOS)

⇨ MANEJO DE DATOS POR EL INTEGRADOR

≡ RESULTADOS DE LOS CALCULOS.

4. Pesado de las partes separadas.

Se pesaron cada una de las partes separadas en una balanza con 0.01 g de precisión para así poder calcular los porcentajes de las partes de la planta.

5. Molido de las partes separadas

Se molieron las hojas y flores con licuadora; para los tallos se usó un molino de martillos y luego un molino de discos dentados. Estos molinos son para uso industrial y no para trabajo de laboratorio, por lo que se perdió mucho material al moler los tallos.

6. Pesado de las muestras de las partes molidas

Se pesaron alrededor de 10 gramos de las muestras molidas para extraer. Además que se pesaron en una balanza analítica cuatro muestras de cada tratamiento para hacer las extracciones (la cuarta muestra se pesó previniendo que se perdiera alguna de las tres anteriores en la extracción), se pesó una quinta muestra adicional para determinar la humedad. Esta muestra quedo sellada en una ampoya de vidrio hasta el momento de su análisis.

7. Determinación de la humedad de las muestras

Se determinó la humedad de las muestras por el método de Karl Fisher, el cual se basa en la titulación del agua con yodo en presencia de dióxido de azufre. Se utilizó solución Karl Fisher Merck 9248 y un Aquameter Beckman KF4, el cual es una bureta automatizada con detección del punto final por método electrométrico. La relación titulante/agua se calculó por medio de agua destilada.

8. Extracción de las muestras

Se extrajeron tres muestras de cada tratamiento por medio de Soxhlets usando metanol industrial destilado como solvente para la extracción; ya que en éste es soluble la 7-metoxicumarina sin descomposición. La variante entre cada una de las extracciones de un mismo tratamiento fué la del tiempo de extracción. Los tiempos de extracción fueron de 8, 12 y 16 horas. Se obtuvo aproximadamente 60 ml de extracto.

9. Concentración y pesado de los extractos

Se concentraron los extractos usando dos rotavapores Büchi RE y RE-111 destilando a presión reducida con una temperatura no mayor de 60°C hasta que ya no se recolectó solvente destilado. Luego se hizo correr nitrógeno en el recipiente de la muestra, se pesó y guardó en refrigeración.

10. Selección del método cromatográfico

La cuantificación se realizó haciendo separación por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo HP 5890 con un integrador HP 3392A y una columna capilar HP1 de 25 metros de largo, 0.32 mm de diámetro interno y una fase líquida de 100% dimetilpolysiloxano. La cuantificación se hizo con un detector de ionización de llama, usando ftalato de dibutilo como patrón interno; cuya función es tener un compuesto con cantidad conocida dentro de la muestra y no depender así de la exactitud del volumen de inyección, el cual es poco reproducible.

Para poder realizar la cuantificación por cromatografía de gases fué necesario optimizar la separación de los picos, su forma, el

tiempo empleado en una corrida y en que llegue a estabilizarse la temperatura, la relación entre áreas de los picos del patrón interno y el compuesto a determinar. Las condiciones del cromatógrafo, ya optimizadas, fueron:

temperatura del detector: 250 °C
temperatura del inyector: 200 °C
temperatura del horno (programada):
150 °C (0.0 min), 10.0 °C/min, 170 °C (0.0 min)
30.0 °C/min, 230 °C (2.70 min)
temperatura máxima del horno: 300°C
Flujo total : 100.0 ml/min
Purga: 2.81 ml/min
División de caudal: 92.8 ml/min
Columna: 4.43 ml/min
Detector de ionización de llama
Flujo de aire: 350.7 ml/min
Flujo de hidrógeno: 32.88 ml/min
Rango: 16
Atenuación: 1

Las condiciones del integrador para el análisis fueron:

Zero: 10
Atenuación: 32
Velocidad del papel: 1.0 cm/min.
Ancho de pico: 0.04
Límite de rechazo: 2
Area de rechazo: 0

11. Dilución de los extractos para su cuantificación

Se pesaron aproximadamente 0.5 gramos del extracto concentrado junto con 0.03 gramos de una solución metanólica de ftalato de dibutilo (1:1), usado como patrón interno. Se aforó con metanol p.a. a 10 ml y luego se puso a disolver durante tres minutos en un baño de ultrasonidos Haver USC 200T de 35 KHz y 120 W .

12. Identificación del material a ser utilizado como referencia.

Cuando se logró aislar e indentificar el principio activo del pericón (Ortiz, 1987), se separaron por cromatografía líquida y tres recristalizaciones aproximadamente 3 gramos de un compuesto identificado como 7-metoxicumarina. Este fué el material que se utilizó como referencia.

Para verificar la identidad del material disponible para ser utilizado como patrón de 7-metoxicumarina, se obtuvieron sus espectros de absorción ultravioleta e infrarojo en espectrofotómetros PE lamda 5 y PE 339 B respectivamente; También se obtuvo el de resonancia magnética nuclear de protones en un espectrómetro Varian EM-360 de 60 MHz.

13. Determinación de la pureza del patrón

La pureza del patrón se determinó por medio de cromatografía de gases. Debido al método de purificación, las impurezas que puede tener son compuestos de estructuras parecidas a la 7-metoxicumarina. Se asumió que el detector de ionización de llama tiene igual respuesta ante las impurezas y el componente principal y por ello se pudo calcular la pureza del patrón de acuerdo con el porcentaje del

área del compuesto en relación al área de todos los picos del cromatograma, excepto el del solvente y del patrón interno. El método cromatográfico fué el mismo que se usó para la cuantificación en las muestras (ver página 32).

14. Cuantificación de la 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones de plantas completas.

Con algunas de las plantas recolectadas, se prepararon cocciones de la manera tradicional: poniendo una ramita de unos 1.75 gramos (teniendo tallos hojas y flores) en una taza (125 mililitros) de agua hirviendo, dejándola hervir por 3 minutos. Las plantas enteras usadas, provenían del mismo lote de plantas que aquellas que se separaron en sus partes para hacer la cuantificación de la 7-metoxicumarina.

Además se prepararon infusiones con bolsitas de "té de pericón" disponibles en el mercado (Té cun, y Té Tender Leaf), poniendo una bolsita de 1.00 - 1.75 gramos en una taza de agua hirviendo y dejándola adentro, ya sin que hierva, durante 3 minutos.

Cada infusión y cocción se evaporó de la misma forma en que se concentraron los extractos de las plantas que se analizaron y al residuo se le agregaron aproximadamente 30 mg. de la solución metanólica de patrón interno, se disolvió con metanol a 10 ml. y se cuantificó la 7-metoxicumarina presente por cromatografía de gases.

V RESULTADOS

A. Identificación y determinación de la pureza del material a ser utilizado como referencia.

1. Identificación.

Para verificar la identidad del material disponible para ser utilizado como patrón de 7-metoxicumarina, se obtuvieron sus espectros infrarrojo en nujol, con una concentración de 1 a 5 % aproximadamente, y en pastillas de KBr, a una concentración de 1% (Figs. 8 y 9 y Cuadro 5); ultravioleta en metanol y en metanol con NaOH 0.9 y 0,1N a una concentración de .012% p/v (Figs. 10, 11 y 12 y Cuadro 5) y de resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$) en CDCl_3 (Fig. 13 y Cuadro 5).

Analizando los distintos espectros obtenidos para el material en cuestión, junto con los espectros encontrados en la literatura para moléculas similares, se ve que según los espectros IR y UV, el material estudiado tiene un anillo lactona. Esto dado que aparece la absorción de un éster en el espectro IR (dos picos alrededor de 1650 y 1735 cm^{-1} en Nujol y KBr respectivamente) y el espectro UV cambia al hidrolizar el éster, por lo que el éster interviene junto con el anillo en la conjugación de electrones.

Según el espectro $^1\text{H-NMR}$, el material estudiado es una cumarina con un metilo (probablemente de un grupo metoxi) en la posición 7, ya que el espectro coincide con el de la 7-hidroxycumarina, excepto por el singlete (3.8 ppm) del metilo no acoplado (Cooper, 1980). si

CUADRO 5

Condiciones espectrométricas utilizadas en la identificación del material de referencia utilizado como patrón

ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO UTILIZADO	CONDICIONES DE OPERACION DEL EQUIPO	NUMERO DE FIGURA Y SU DESCRIPCION	OBSERVACIONES:
Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer 399B Rango: 4000 - 400 cm^{-1} Exactitud: $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ Precisión: $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ Exactitud Ord: $\pm 1\%$ Precisión Ord: $\pm 0.75\%$ Resolución: 3.5-0.5cm Ruido: menos 0.5% Luz extraña: menos 1%	Modo: Transmitancia Slit: Normal Constante de tiempo: 1 Expansión de ordenada: 1 Expansión de abscisa: 1 Tiempo de barrido: 12'	Figura 8: Espectro infrarrojo de la muestra de referencia: suspensión en Nujol	Se reconocen las bandas de absorción de un ester conjugado
		Figura 9: Espectro infrarrojo de la muestra de referencia: en pastilla de KBr	Se reconocen las bandas de absorción de un ester conjugado, anillo bencénico con sustitución orto y metilo enlazado a un oxígeno (eter).
Espectrofotómetro ultravioleta visible Perkin Elmer lambda 5 Rango: 190 - 900 nm Exactitud: $\pm .3\text{nm}$ Precisión: $\pm .1 \text{ nm}$ Exactitud Fot: $\pm .003 \text{ A}$ Precisión Fot: $\pm .001 \text{ A}$ Resolución: 4 - .25 nm Ruido: menos .0002 A Luz extraña: $< .001\%$	Modo: Absorbancia Slit: 2 nm Vel. barrido: 60 nm/min Respuesta: 0.5 seg Lámpara: Auto (332.8nm) Ciclos: 1 Supresión de pico: .02 A Registrador: Serial Ordenada min: 0.000 A Ordenada max: 1.2, 1.4 A Abscisa min: 200 nm Abscisa max: 400, 500 nm	Figura 10: Espectro ultravioleta de la muestra de referencia: Solucion en metanol	λ_{max} coinciden con los de la literatura de la 7-metoxicumarina.
		Figura 11: Espectro ultravioleta de la muestra de referencia: En metanol con NaOH .1 N	No hay cambio batocrómico respecto a la figura 10; El compuesto no tiene un grupo ácido
		Figura 12: Espectro ultravioleta de la muestra de referencia: En metanol con NaOH .9 N	Hay cambio batocrómico y aparece otro pico; el compuesto se hidroliza
Espectrómetro de resonancia magnética nuclear de protones Varian EM 360 Nucleo: H Ho = 14.092 KGaus H1 = 60.0 MHz Resolución: .3 Hz Estabilidad: .5Hz/8hrs. línea base 5% sensibilidad: 30: 1 s/n bandas laterales: 2% Integración: $< 1.5 \%$ Registrador: linealidad: 0.5% Exactitud: ± 1 a 600Hz	Pos. Anclaje: 0. ppm Poder Anclaje: .01 mG Desacoplamiento: no Amplitud Espectro: 2000 Filtro: 0.05 seg Poder RF: 0.05 mG Tiempo de barrido: 5 min Ancho de barrido: 10 ppm Final del Barrido: 0 ppm Nucleo: H Referencia de cero: TMS Temp muestra: 25 % Solvente: CDCl	Figura 13: Espectro de resonancia magnética nuclear de protones de la muestra de referencia	Aparecen multipletes de aromáticos con patrón de intensidades igual al de la 7-hidroxicumarina; y un singlete de metilo (que no aparece en el espectro de la literatura de la 7-hidroxicumarina). La relación de áreas de los picos es de 76:45 = 5.067:3 = 5:3.

FIGURA 8
Espectro infrarrojo de la muestra de referencia; suspensión en Nujol

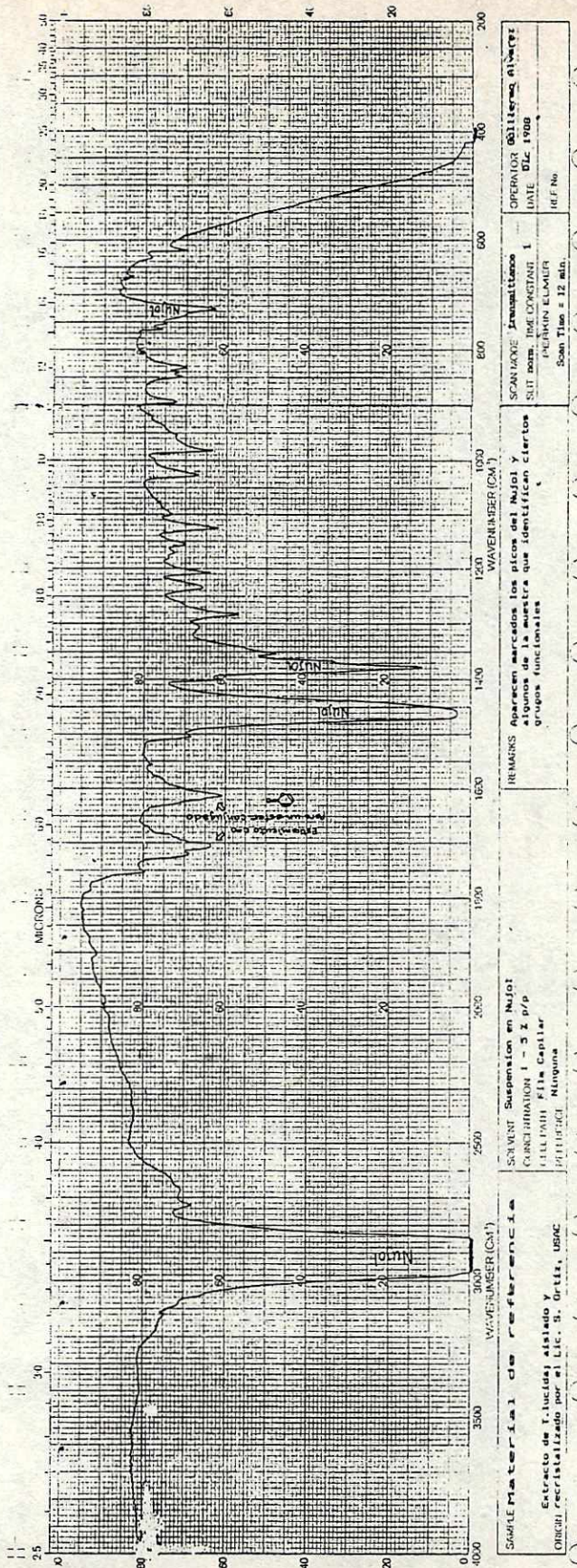


FIGURA 9
Espectro infrarrojo de la muestra de referencia; en pastilla de KBr

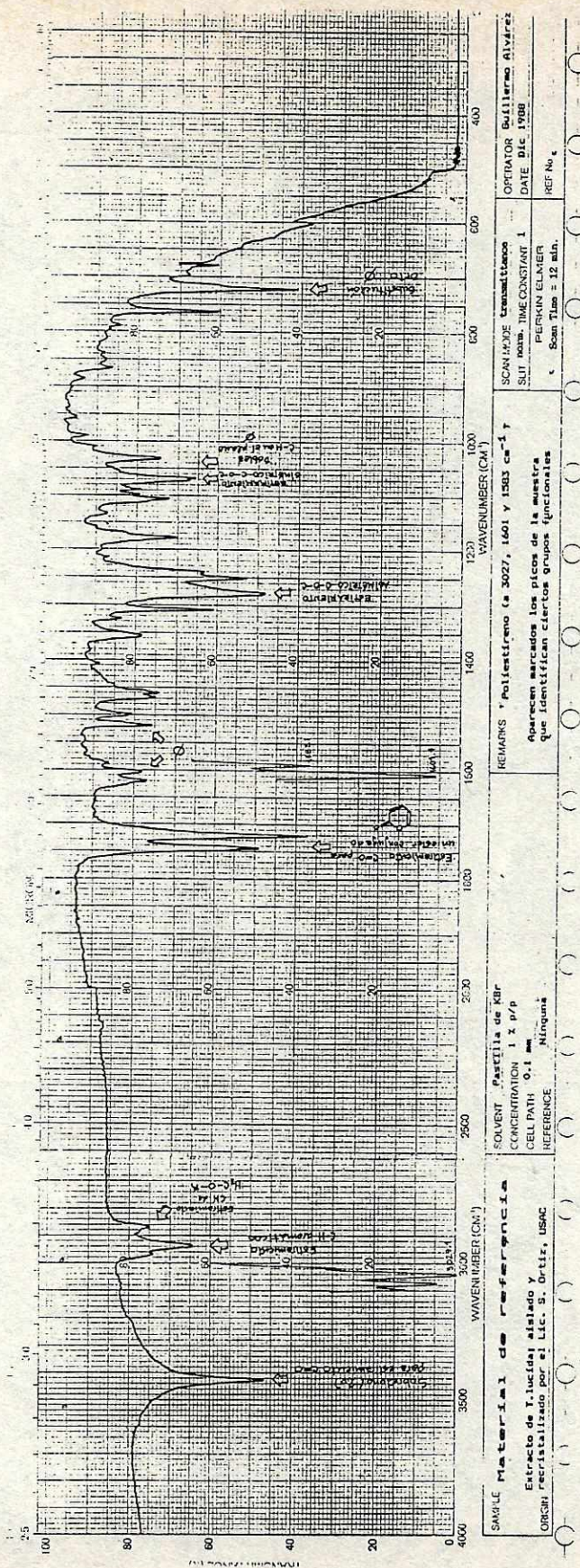


FIGURA 10
Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; solución en metanol

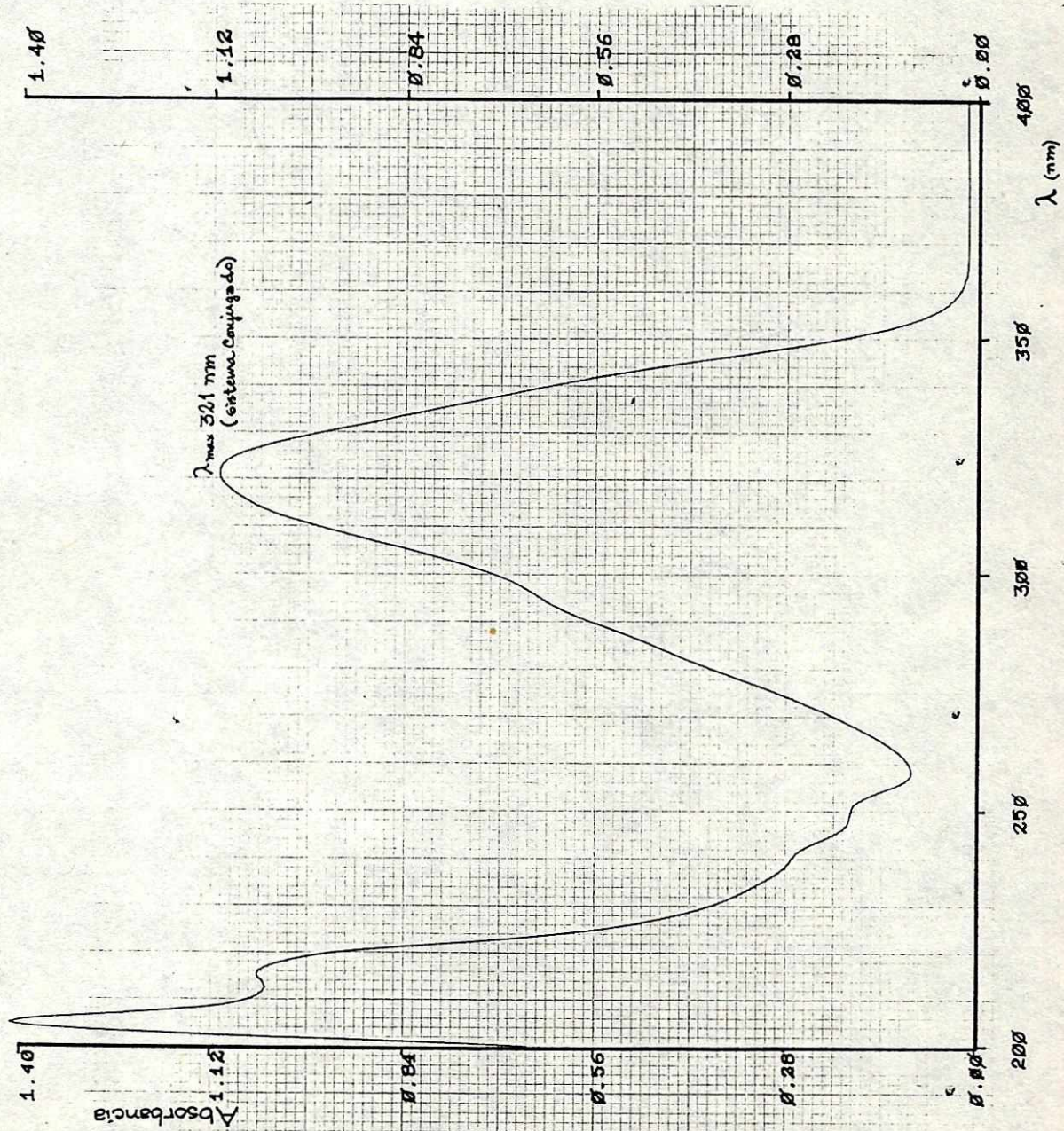


FIGURA 11
Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; en metanol con NaOH 0.1 N.

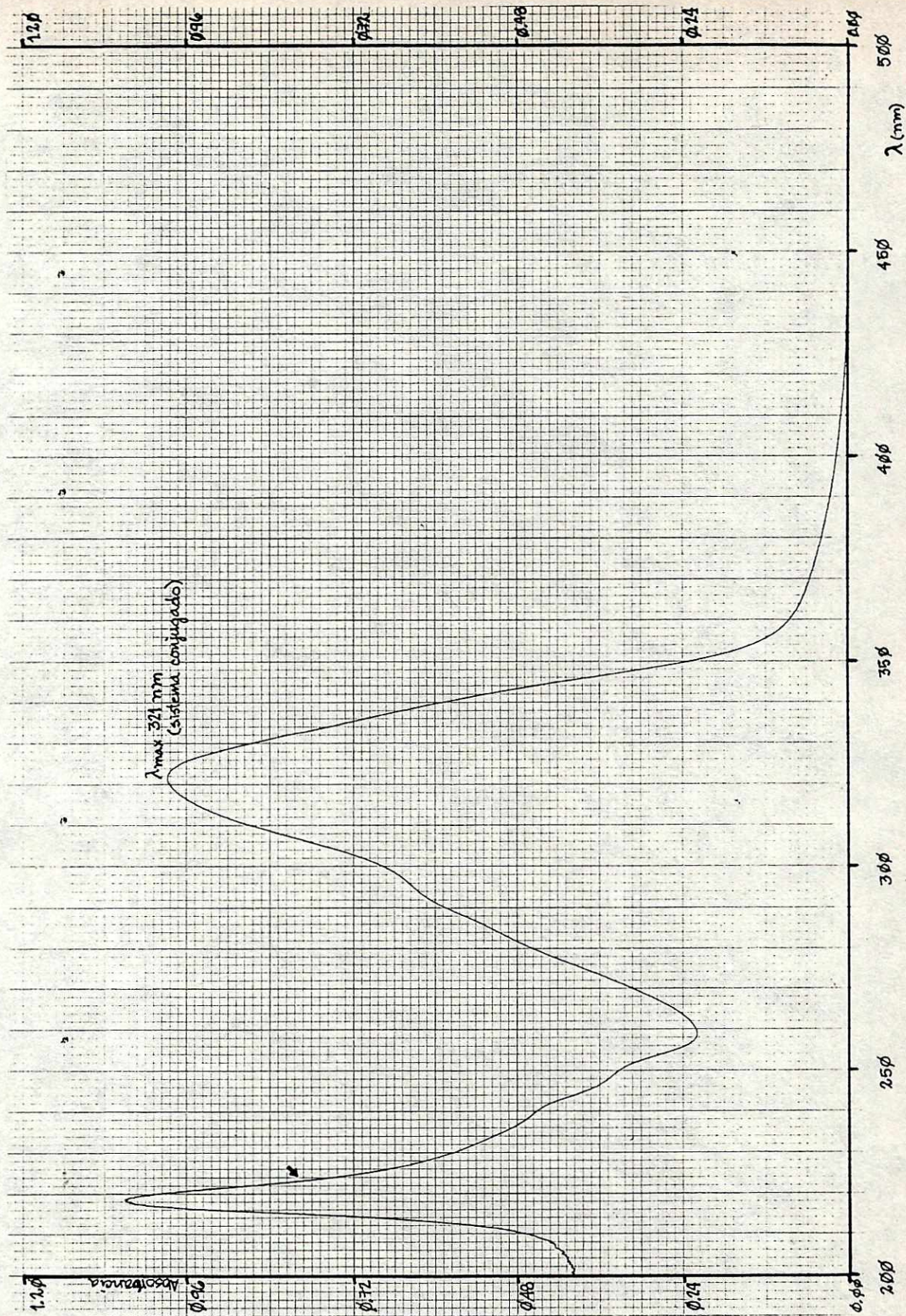
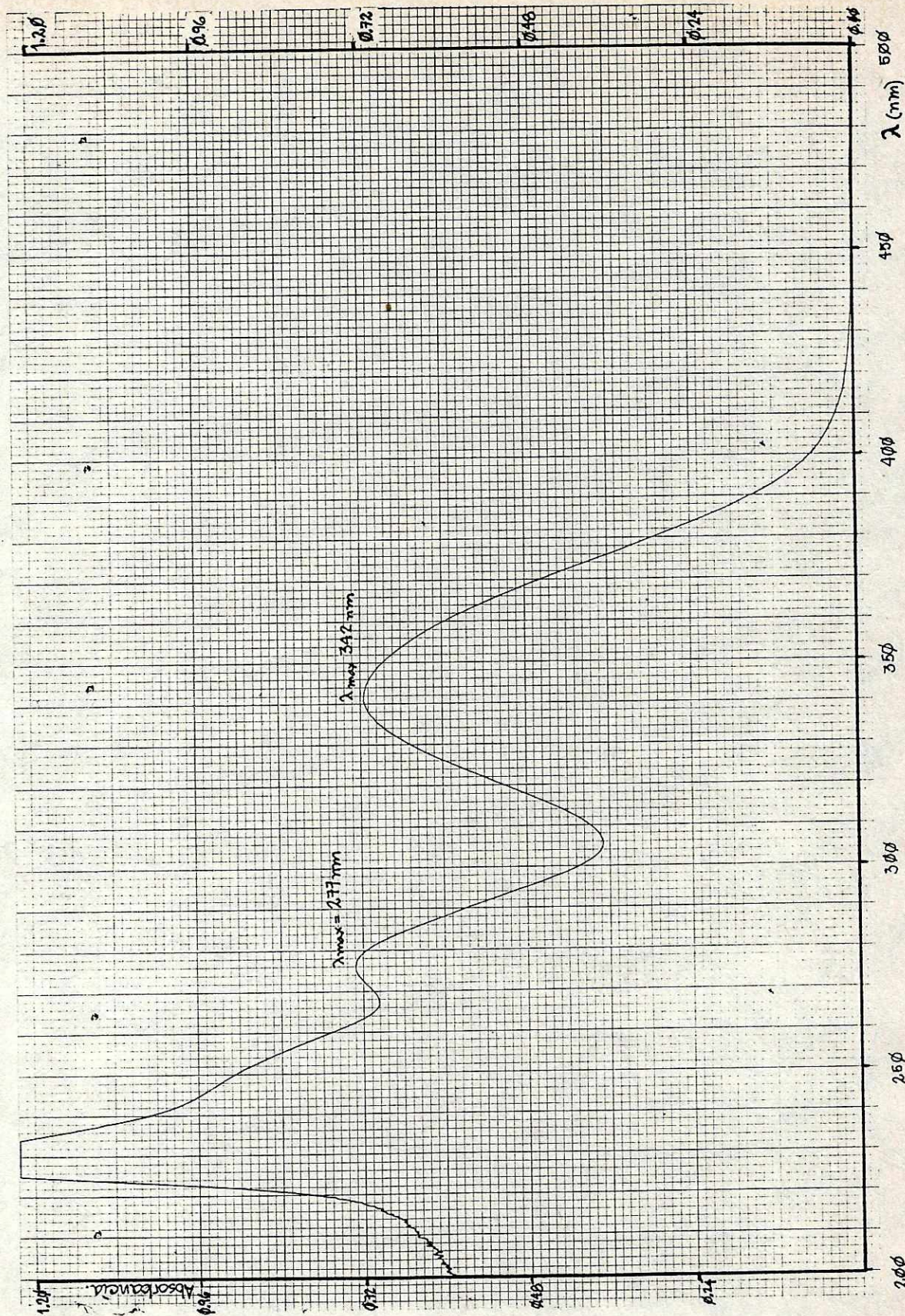


FIGURA 12
Espectro ultravioleta de la muestra de referencia; en metanol con NaOH 0.9 N.



se compara el área debajo de cada uno de los picos, se ve que coinciden con la relación de $^1\text{H}'\text{s}$ en la molécula (3 metilos :5 aromáticos); ver Fig. 13.

Comparando el espectro IR obtenido para el material de referencia con el dado en la literatura (Pouchert, 1985) para la 7-metoxicumarina, se ve que coinciden, lo mismo que las λ_{max} del espectro UV (Weast, 1977).

2. Determinación de la pureza

La determinación de la pureza del material de referencia de 7-metoxicumarina se hizo por el mismo método que se hizo la cuantificación en las muestras: cromatografía de gases. Para esto se implementó el método de análisis según aparece en el Cuadro 6 y el Apéndice B. El método optimizado se presenta en la página 32. En el Apéndice C y la Figura 14 se presentan cromatogramas de ejemplo de la calibración y las muestras.

Dado que el material de referencia fué purificado por cromatografía de columna y luego recristalizado varias veces, las impurezas son compuestos similares o con estructura parecida a la 7-metoxicumarina. Se puede entonces asumir que ante el detector de ionización de llama el compuesto y sus impurezas causan igual tipo de respuesta. En base a lo anterior, la pureza del material de referencia, corresponde con el porcentaje de área del pico de la 7-metoxicumarina. En el Cuadro 7 se presentan los datos y los resultados obtenidos a partir de considerar el área bajo el pico de la 7-metoxicumarina y la suma de las áreas bajo los picos de todas las cumarinas en el cromatograma (i.e. el área total bajo el cromatograma sin considerar el pico del solvente ni del patrón interno).

CUADRO 6:
Implementación del método de cuantificación de 7-metoxicumarina por cromatografía de gases

Cromatograma	Atenuación	Muestra	Volumen inyectado (µl)	Presión de Colum. (psi)	Temperaturas (°C)		
					Injector	Detector	Horno
1	2.4	C1	1	14	150	250	150 (0min) - 100C/min - 280 (5min)
2	2.4	C4	1	14	150	250	150 (0min) - 100C/min - 280 (5min)
3	2.4	Extrac.	1	14	150	250	150 (0min) - 100C/min - 280 (5min)
4	2.0	Extrac.	4	14	150	250	150 (0min) - 100C/min - 280 (5min)
5	2.0	Extrac.	1	14	200	250	180 Isoterma
6	2.0	Extrac.	1	14	200	250	180 (0min) - 500C/min - 280 (4min)
7	2.0	Extrac.	1	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 200C/min - 220 (3min)
8	2.5	Extrac.	1	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 200C/min - 220 (3min)
9	2.5	Extrac.	1	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)
10	2.5	C1	10	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)
11	2.5	C4	10	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)
12	2.5	Metanol	10	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)
13	2.5	Est. Internos	10	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)
14	2.5	Rel. Est/Mue	10	14	200	250	150 (0min) - 100C/min - 170 (0min) - 300C/min - 230 (2min)

NOTA: LOS CROMATOGRAMAS APARECEN EN EL APENDICE B.

C1= material de referencia usado como patrón de 7-metoxicumarina (Supuestamente con un compuesto)

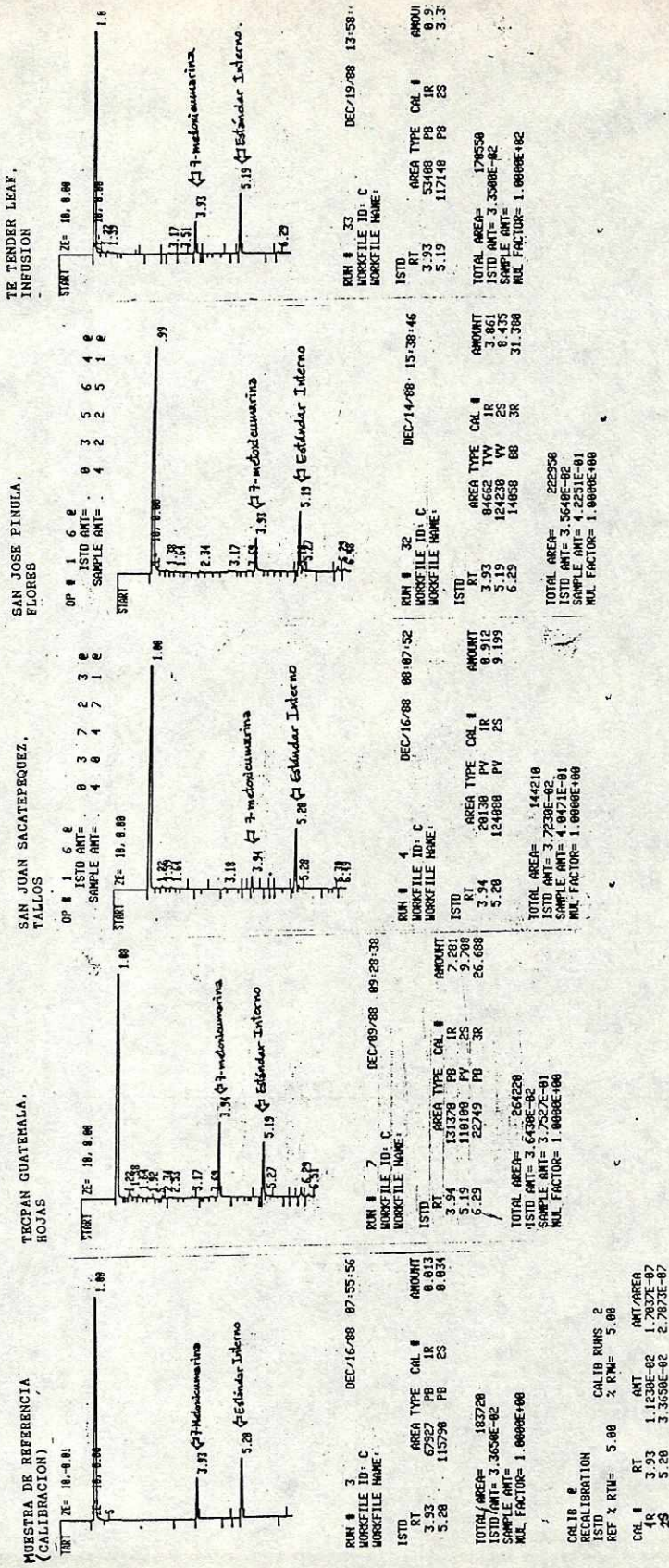
C4= material purificado de extracto de pericón, pero no tanto como C1

Extrac.= Extracto de hojas de pericón, se corrió para optimizar separación de picos que aparecen sólo en las muestras

Est. Internos.= Ftalatos de dibutilo, dietilo y dimetilo y trifenilfosfato; compuestos entre los que se seleccionó el patrón interno

Rel. Est/Mues= corrida que se hizo para establecer la relación de pesos entre el patrón interno y muestra para que den áreas iguales

FIGURA 14
Ejemplo de cromatogramas de la determinación de la 7-metoxicumarina



CUADRO 7:

Determinación de la pureza del material de referencia de 7-metoxicumarina (por cromatografía de gases)

Fecha	Replica	Area absoluta		% del area total de las cumarinas	
		x-cuma	7-metoxi	x-cuma	7-metoxi
6-12-88	1	20673	3193700	0.64	99.36
6-12-88	2	8600	1202000	0.71	99.29
6-12-88	3	9735	1006800	0.96	99.04
6-12-88	4	11835	888840	1.31	98.69
8-12-88	1	3354	212130	1.56	98.44
8-12-88	2	3418	264810	1.27	98.73
8-12-88	3	4447	353210	1.24	98.76
8-12-88	4	3111	260980	1.18	98.82
14-12-88	1	1371	70945	1.90	98.10
16-12-88	1	3310	210770	1.55	98.45
		media		1.23	98.77
		desv.st.		0.37	0.37

Notas: 7-metoxi.: 7-metoxicumarina.

x-cuma.: Compuesto cuyo pico aparece en el cromatograma del material usado como patrón. Se cree que sea una cumarina.

$$\%7\text{-metoxicumarina} = \frac{\text{Area de 7-metoxicumarina} * 100\%}{\text{Area de 7-metoxicumarina} + \text{x-cumarina}}$$

B. Partes de la planta.

Quando se separaron las partes de las plantas se pesó cada parte (ver Cuadro 8) con el fin de calcular el porcentaje en peso de cada una de ellas con respecto al peso total de la planta. Esto se hizo para tener un parámetro de comparación que esté relacionado con la edad o madurez de la planta; ya que la cantidad relativa de hojas y flores depende del estado de la planta ('joven', Floreciendo o madura). Se calculó el porcentaje en peso de las partes de la planta (ver Cuadro 9 y Figura 15).

CUADRO 8:

Peso de las partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales

LUGAR DE RECOLECCION	PARTE DE LA PLANTA (g)			
	hojas	tallos	flores	residuos
San José Poaquil	98.77			
Chichoy Bajo, Patzún	49.83	62.11	20.78	6.59*
Cabricán	268.22	290.64	91.6	
San Juan Sacatepéquez	168.26	232.72	82.91	
San José Pinula	191.48	227.18	51.1	
Tecpán	240.29	241.24	48.58	

*residuos que no se clasificaron

CUADRO 9

Porcentaje del peso de las partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales

LUGAR DE RECOLECCION	PARTE DE LA PLANTA		
	hojas	tallos	flores
San José Poaquil	---	---	---
Chichoy Bajo, Patzún	35.77	44.58	14.92
Cabricán	41.24	44.68	14.08
San Juan Sacatepéquez	34.77	48.09	17.13
San José Pinula	40.76	48.36	10.88
Tecpán	45.33	45.51	9.16
promedio	39.57	46.25	13.23
desviación estandar	3.87	1.65	2.86

$$\% \text{ parte} = \frac{\text{peso parte}}{\text{peso total planta}} * 100$$

C. Cuantificación de la 7-metoxicumarina:

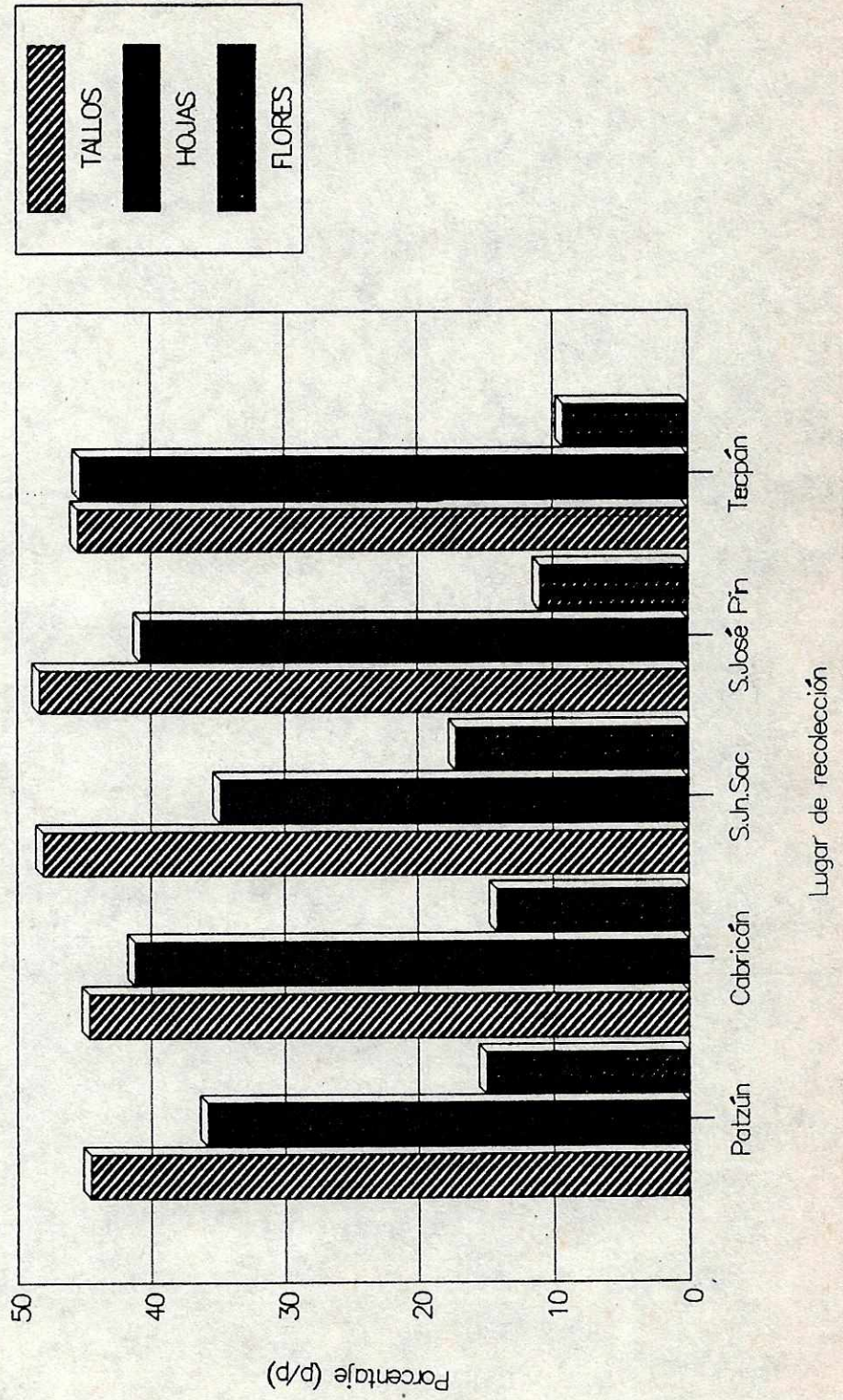
La determinación de la concentración de la 7-metoxicumarina en las diversas partes de la planta se hizo por cromatografía de gases. Cada muestra se extrajo; el extracto se concentró y luego se preparó una dilución del extracto para analizar. Para calcular la concentración en las muestras analizadas fué necesario determinar también la humedad de las muestras y el rendimiento de la extracción.

1. Determinación de la humedad.

Se determinó la humedad de cada una de las muestras secadas bajo condiciones ambientales para poder presentar los resultados del

FIGURA 15

Porcentaje p/p de las partes de planta secada bajo condiciones ambientales



contenido de 7-metoxicumarina en base seca. Se utilizó el método de Karl Fisher determinando para ello el título de la solución titulante antes de realizar la serie de análisis de muestras (ver Cuadro 10). Para determinar el título, o factor Karl Fisher, se pesaron 5mg de agua y se titularon con solución Karl Fisher encontrándose los mg. de agua que reaccionan con 1 ml de la solución K.F. (i.e. título de la solución).

CUADRO 10:
Factor Karl Fisher de la Solución titulante
usada en la determinación de humedad

Día	mg. agua	ml. sol. KF	factor K.F. mg. ag. /mlSol	promedio mg. ag. /mlSol	Des. Est. mg. ag. /mlSol
1	5.4	1.485	3.636	3.70	0.06
1	5.1	1.390	3.669		
1	5.3	1.400	3.786		
2	5.4	1.390	3.885	3.80	0.08
2	5.4	1.410	3.830		
2	5.2	1.410	3.688		

$$\text{Factor K.F.} = \frac{\text{mg. de agua titulada}}{\text{ml. sol. K.F. gastada}}$$

Se trabajó en triplicado; para las muestras 4 y 5 se utilizó el factor K.F. = 3.697 mg agua/ml Sol K.F. y para las restantes el factor K.F. = 3.801 mg agua/ml Sol K.F.; ya que se trabajaron en diferente día. Los datos y resultados aparecen en los Cuadros 11 y 12 en la Figura 16.

2. Determinación del rendimiento de la extracción de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales.

Es necesario determinar que porcentaje (p/p) es el extracto concentrado obtenido con respecto a la muestra, para así poder

CUADRO 11:

Datos de la determinación de humedad residual en las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales (en triplicado)

muestra	Identificación de la muestra	Peso de la muestra (g)			Gasto de Sol. K. F. (ml)		
		1	2	3	1	2	3
4a	San Juan Sacatepéquez, hojas	53.3	51.5	56.3	0.970	1.000	1.220
4b	San Juan Sacatepéquez, flores	48.9	53.4	56.0	0.960	1.070	1.150
4c	San Juan Sacatepéquez, tallos	53.2	53.2	54.1	1.130	0.940	0.890
5a	San José Pinula, hojas	48.1	41.4	52.6	0.890	0.675	1.200
5b	San José Pinula, flores	46.5	45.7	38.1	0.995	0.995	0.910
5c	San José Pinula, tallos	48.3	54.7	51.4	0.940	1.075	0.930
6a	Tecpán, hojas	52.9	52.2	50.4	0.950	1.070	1.040
6b	Tecpán, flores	47.8	52.0	51.9	1.050	1.210	1.000
6c	Tecpán, tallos	53.1	41.0	46.6	1.140	0.950	0.840
1a	San José Poaquil, Hojas	50.2	51.8	50.3	1.300	1.410	1.450
2a	Chichoy Bajo, Patzún, hojas	49.7	49.1	49.9	1.250	1.200	1.170
2b	Chichoy Bajo, Patzún, flores	47.7	45.9	54.4	1.140	1.200	1.310
2c	Chichoy Bajo, Patzún, tallos	59.2	46.2	53.4	1.230	1.010	1.010
3a	Cabricán, hojas	64.2	47.5	51.8	1.420	1.140	1.220
3b	Cabricán, flores	56.8	60.4	55.4	1.300	1.560	1.300
3c	Cabricán, tallos	61.9	45.7	47.4	1.130	0.880	0.910

CUADRO 12

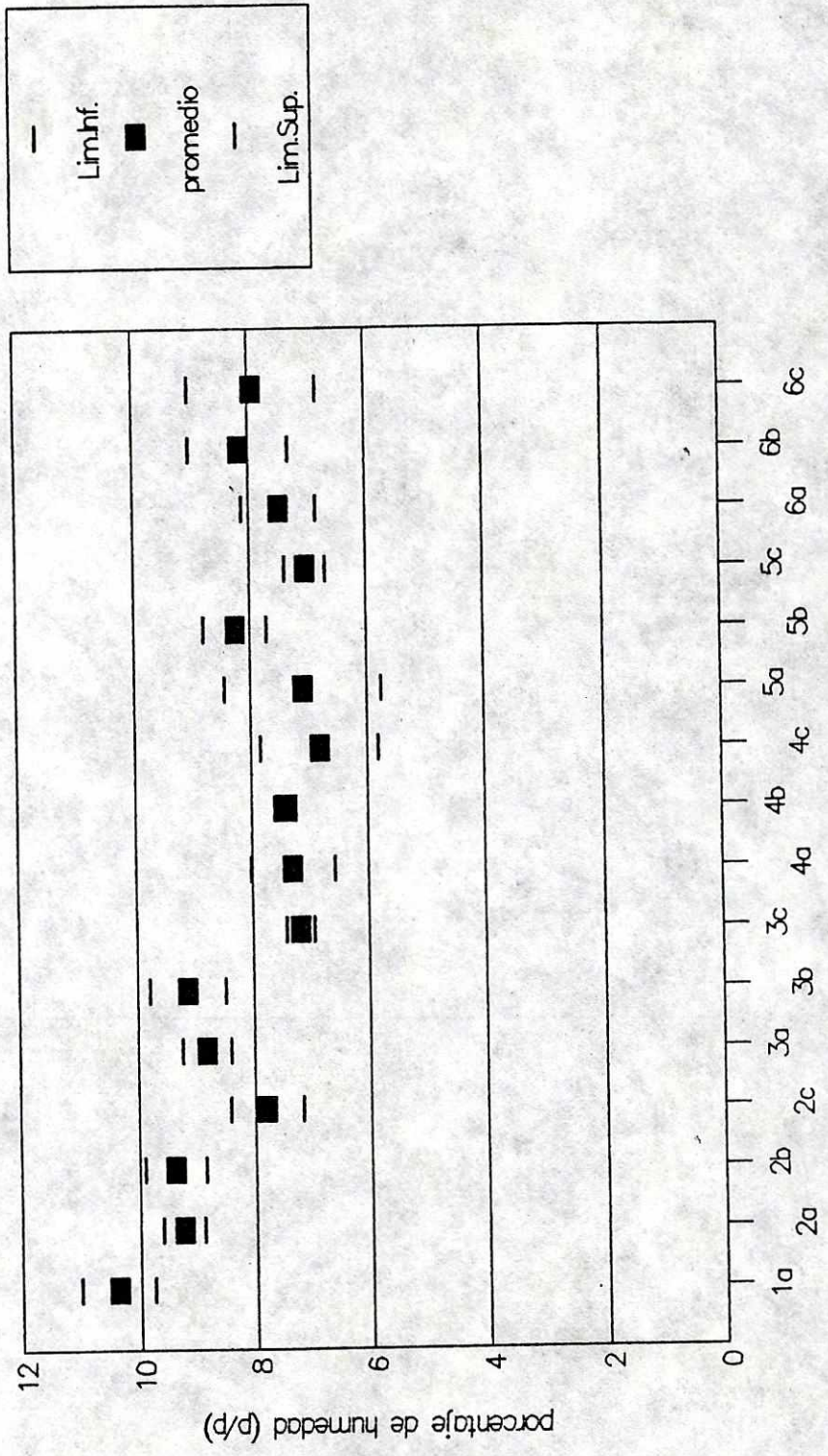
Humedad residual de las muestras (%(p/p)) de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales

muestra	Identificación de la muestra	repetición			promedio	desv. est.	lim. conf 95 %
		1	2	3			
1a	San José Poaquil, Hojas	9.84	10.35	10.96	10.4	0.5	0.6
2a	Chichoy Bajo, Patzún, hojas	9.56	9.29	8.91	9.3	0.3	0.4
2b	Chichoy Bajo, Patzún, flores	9.08	9.94	9.15	9.4	0.4	0.5
2c	Chichoy Bajo, Patzún, tallos	7.90	8.31	7.19	7.8	0.5	0.6
3a	Cabricán, hojas	8.41	9.12	8.95	8.8	0.3	0.4
3b	Cabricán, flores	8.70	9.82	8.92	9.1	0.5	0.7
3c	Cabricán, tallos	6.94	7.32	7.30	7.2	0.2	0.2
4a	San Juan Sacatepéquez, hojas	6.73	7.18	8.01	7.3	0.5	0.7
4b	San Juan Sacatepéquez, flores	7.26	7.41	7.59	7.4	0.1	0.2
4c	San Juan Sacatepéquez, tallos	7.85	6.53	6.08	7	0.8	1.0
5a	San José Pinula, hojas	6.84	6.03	8.43	7	1.0	1.4
5b	San José Pinula, flores	7.91	8.05	8.83	8.3	0.4	0.5
5c	San José Pinula, tallos	7.19	7.27	6.69	7.0	0.3	0.3
6a	Tecpán, hojas	6.83	7.79	7.84	7.5	0.5	0.6
6b	Tecpán, flores	8.35	8.84	7.32	8.2	0.6	0.9
6c	Tecpán, tallos	8.16	8.81	6.85	8	0.8	1.1

$$\%(p/p) \text{ Humedad} = \text{Factor K.F.} \left(\frac{\text{mg agua}}{\text{ml Sol KF}} \right) * \frac{\text{ml sol K.F. gastados}}{\text{mg muestra titulada}} * 100\%$$

FIGURA 16

Porcentaje de humedad en las partes de las plantas secadas bajo Cond. Ambient.



Codigo de muestra (ver cuadro 12)

relacionar la concentración de la 7-metoxicumarina en los extractos, con la concentración en las muestras de donde éstos se obtuvieron.

Los datos y los resultados de rendimientos obtenidos se muestran en los Cuadros 13 y 14.

3. Determinación de la 7-metoxicumarina en cada muestra

En el Cuadro 15 se muestran los resultados de porcentaje de 7-metoxicumarina en los extractos concentrados, tal como los reportó el integrador. Esto es sin tomar en cuenta la pureza del patrón (98.77 %), la humedad de las muestras (Cuadro 12) y el rendimiento de la extracción (Cuadro 14).

El cálculo del contenido de 7-metoxicumarina en las muestras, en base seca, se hizo según:

$$\%CuMu = (\%CuEx) * \left(\frac{\%Est}{100} \right) * \left(\frac{\%Ex}{100} \right) * \left(\frac{100}{(100 - \%H)} \right) \quad (1)$$

Donde:

$\%CuMu$ = porcentaje de 7-metoxicumarina en la muestra en base seca.

$\%CuEx$ = porcentaje de 7-metoxicumarina en el extracto (Cuadro 15)

$\%Est$ = pureza del patrón (98.77 %)

$\%Ex$ = rendimiento de la extracción (Cuadro 14)

$\%H$ = porcentaje de humedad de la muestra (Cuadro 12)

Los resultados se muestran en el Cuadro 16.

D. Cuantificación de la 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones de plantas completas

Con algunas de las plantas recolectadas, se prepararon cocciones de la manera tradicional: poniendo una ramita de unos 1.75 gramos

CUADRO 13

Peso de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales y de sus extractos concentrados (en base humeda)

Lugar de Recoleccion	Parte de la planta	Peso de la muestra (g)	Peso del extracto (g)
San Jose Poaquil	Hojas	7.5258	3.2246
San Jose Poaquil	Hojas	8.0664	2.8400
San Jose Poaquil	Hojas	10.0887	3.5898
Chichoy Bajo, Patzun	Hojas	10.1122	2.8910
Chichoy Bajo, Patzun	Hojas	9.8642	3.3620
Chichoy Bajo, Patzun	Hojas	10.1339	3.4429
Chichoy Bajo, Patzun	Flores	10.0438	2.7931
Chichoy Bajo, Patzun	Flores	9.6672	3.4373
Chichoy Bajo, Patzun	Tallos	9.7728	1.9592
Chichoy Bajo, Patzun	Tallos	9.8912	1.6652
Chichoy Bajo, Patzun	Tallos	9.5148	1.5051
Cabrican	Hojas	9.7682	1.9594
Cabrican	Hojas	9.9188	3.2945
Cabrican	Hojas	10.1378	2.5642
Cabrican	Flores	9.8026	3.0840
Cabrican	Flores	9.3087	3.0058
Cabrican	Flores	9.7209	3.2944
Cabrican	Tallos	10.1423	1.4238
Cabrican	Tallos	8.6236	1.5753
Cabrican	Tallos	10.1573	1.5315
San Juan Sacatepequez	Hojas	10.2074	4.3756
San Juan Sacatepequez	Hojas	10.2759	3.8264
San Juan Sacatepequez	Hojas	10.0310	3.0065
San Juan Sacatepequez	Flores	10.0672	3.9260
San Juan Sacatepequez	Flores	10.1303	3.3993
San Juan Sacatepequez	Flores	10.0393	4.2000
San Juan Sacatepequez	Tallos	10.2942	1.9300
San Juan Sacatepequez	Tallos	10.0032	2.3438
San Juan Sacatepequez	Tallos	10.2440	1.8741
San Jose Pinula	Hojas	10.4175	3.6550
San Jose Pinula	Hojas	10.2775	3.1649
San Jose Pinula	Flores	10.1202	5.0571
San Jose Pinula	Flores	10.0250	4.3664
San Jose Pinula	Flores	10.2194	3.9668
San Jose Pinula	Tallos	10.2783	2.4183
San Jose Pinula	Tallos	10.3077	2.1755
San Jose Pinula	Tallos	10.5213	1.8715
Tecpan	Hojas	10.1158	2.8644
Tecpan	Hojas	10.6616	3.4643
Tecpan	Hojas	10.5459	3.3555
Tecpan	Flores	10.0219	3.6223
Tecpan	Flores	10.0999	4.5098
Tecpan	Flores	8.1448	3.6068
Tecpan	Tallos	10.2947	2.1468
Tecpan	Tallos	10.7061	2.3143
Tecpan	Tallos	10.2130	2.0311

CUADRO 14

Rendimiento de la extracción de las muestras de las diferentes partes de las plantas secadas bajo condiciones ambientales

Lugar de Recolección	Parte de la planta	Porcentaje (p/p)
San José Poaquil	Hojas	42.847
San José Poaquil	Hojas	35.208
San José Poaquil	Hojas	35.582
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	28.589
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	34.083
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	33.974
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	27.809
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	35.556
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	20.047
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	16.835
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	15.819
Cabricán	Hojas	20.059
Cabricán	Hojas	33.215
Cabricán	Hojas	25.293
Cabricán	Flores	31.461
Cabricán	Flores	32.290
Cabricán	Flores	33.890
Cabricán	Tallos	14.038
Cabricán	Tallos	18.267
Cabricán	Tallos	15.078
San Juan Sacatepéquez	Hojas	42.867
San Juan Sacatepéquez	Hojas	37.237
San Juan Sacatepéquez	Hojas	29.972
San Juan Sacatepéquez	Flores	38.998
San Juan Sacatepéquez	Flores	33.556
San Juan Sacatepéquez	Flores	41.836
San Juan Sacatepéquez	Tallos	18.748
San Juan Sacatepéquez	Tallos	23.431
San Juan Sacatepéquez	Tallos	18.295
San José Pinula	Hojas	35.085
San José Pinula	Hojas	30.794
San José Pinula	Flores	49.970
San José Pinula	Flores	43.555
San José Pinula	Flores	38.816
San José Pinula	Tallos	23.528
San José Pinula	Tallos	21.106
San José Pinula	Tallos	17.788
Tecpán	Hojas	28.316
Tecpán	Hojas	32.493
Tecpán	Hojas	31.818
Tecpán	Flores	36.144
Tecpán	Flores	44.652
Tecpán	Flores	44.283
Tecpán	Tallos	20.853
Tecpán	Tallos	21.617
Tecpán	Tallos	19.887

$$\% \text{rendimiento} = \frac{\text{gr. extracto concentrado}}{\text{gr. de muestra extraída}} * 100$$

CUADRO 15

Concentración de la 7-metoxicumarina en los extractos concentrados
(a partir del calculo del integrador y en base humeda)

Lugar de Recolección	Parte de la planta	Porcentaje (p/p) de la 7-metoxicumarina en el extracto concentrado (triplicado de inyecciones)		
San José Poaquil	Hojas	5.245	5.299	5.473
San José Poaquil	Hojas	6.238	6.622	6.359
San José Poaquil	Hojas	6.259	6.065	6.179
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	3.035	3.153	3.023
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	2.650	2.558	2.689
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	2.925	2.892	2.790
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	1.908	1.926	1.898
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	1.421	1.346	1.431
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.539	0.607	0.590
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.635	0.488	0.605
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	1.046	0.901	1.067
Cabricán	Hojas	5.638	5.796	5.792
Cabricán	Hojas	7.555	7.387	7.428
Cabricán	Hojas	5.870	6.308	6.152
Cabricán	Flores	3.705	4.525	3.789
Cabricán	Flores	2.354	2.532	2.499
Cabricán	Flores	2.794	2.468	2.375
Cabricán	Tallos	1.358	1.326	1.330
Cabricán	Tallos	1.616	1.696	1.719
Cabricán	Tallos	2.146	2.007	2.034
San Juan Sacatepéquez	Hojas	7.430	7.660	7.530
San Juan Sacatepéquez	Hojas	8.080	8.491	7.977
San Juan Sacatepéquez	Hojas	9.176	10.321	10.488
San Juan Sacatepéquez	Flores	3.385	3.720	3.387
San Juan Sacatepéquez	Flores	2.413	2.388	2.450
San Juan Sacatepéquez	Flores	2.993	2.939	3.642
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.912	0.900	0.917
San Juan Sacatepéquez	Tallos	1.033	1.132	1.017
San Juan Sacatepéquez	Tallos	1.117	1.134	1.129
San José Pinula	Hojas	7.530	7.316	7.111
San José Pinula	Hojas	4.417	4.213	4.270
San José Pinula	Flores	3.023	2.993	2.552
San José Pinula	Flores	2.970	2.882	2.941
San José Pinula	Flores	2.606	2.977	3.401
San José Pinula	Tallos	0.932	0.947	0.963
San José Pinula	Tallos	1.217	1.246	1.197
San José Pinula	Tallos	1.418	1.296	1.355
Tecpán	Hojas	7.715	7.954	8.524
Tecpán	Hojas	6.723	7.180	7.747
Tecpán	Hojas	7.779	7.588	6.244
Tecpán	Flores	4.226	3.321	3.503
Tecpán	Flores	3.414	2.950	3.395
Tecpán	Flores	3.213	3.241	3.489
Tecpán	Tallos	1.236	1.339	1.211
Tecpán	Tallos	1.221	1.317	1.300
Tecpán	Tallos	1.351	1.297	1.296

CUADRO 16

Contenido de la 7-metoxicumarina en muestras

(a partir del cálculo del integrador y en base seca)

Lugar de Recolección	Parte de la planta	Porcentaje (p/p) de la 7-metoxicumarina en la muestra (triplicado de inyecciones)		
San José Poaquil	Hojas	2.48	2.50	2.58
San José Poaquil	Hojas	2.42	2.57	2.47
San José Poaquil	Hojas	2.45	2.38	2.42
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	0.94	0.98	0.94
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	0.98	0.95	1.00
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	1.08	1.07	1.03
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	0.58	0.58	0.58
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	0.55	0.52	0.55
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.12	0.13	0.13
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.11	0.09	0.11
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.18	0.15	0.18
Cabricán	Hojas	1.23	1.26	1.26
Cabricán	Hojas	2.72	2.66	2.67
Cabricán	Hojas	1.61	1.73	1.69
Cabricán	Flores	1.27	1.55	1.30
Cabricán	Flores	0.83	0.89	0.88
Cabricán	Flores	1.03	0.91	0.88
Cabricán	Tallos	0.20	0.20	0.20
Cabricán	Tallos	0.31	0.33	0.33
Cabricán	Tallos	0.34	0.32	0.33
San Juan Sacatepéquez	Hojas	3.39	3.50	3.44
San Juan Sacatepéquez	Hojas	3.21	3.37	3.17
San Juan Sacatepéquez	Hojas	2.93	3.30	3.35
San Juan Sacatepéquez	Flores	1.41	1.55	1.41
San Juan Sacatepéquez	Flores	0.86	0.85	0.88
San Juan Sacatepéquez	Flores	1.34	1.31	1.63
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.18	0.18	0.18
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.26	0.28	0.25
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.22	0.22	0.22
San José Pinula	Hojas	2.81	2.73	2.65
San José Pinula	Hojas	1.45	1.38	1.40
San José Pinula	Flores	1.63	1.61	1.37
San José Pinula	Flores	1.39	1.35	1.38
San José Pinula	Flores	1.09	1.24	1.42
San José Pinula	Tallos	0.23	0.24	0.24
San José Pinula	Tallos	0.27	0.28	0.27
San José Pinula	Tallos	0.27	0.24	0.26
Tecpán	Hojas	2.33	2.40	2.58
Tecpán	Hojas	2.33	2.49	2.69
Tecpán	Hojas	2.64	2.58	2.12
Tecpán	Flores	1.64	1.29	1.36
Tecpán	Flores	1.64	1.42	1.63
Tecpán	Flores	1.53	1.54	1.66
Tecpán	Tallos	0.28	0.30	0.27
Tecpán	Tallos	0.28	0.31	0.30
Tecpán	Tallos	0.29	0.28	0.28

(teniendo tallos hojas y flores) en una taza (125 mililitros) de agua hirviendo, dejándola hervir por 3 minutos. Las plantas enteras usadas, provenían del mismo lote de plantas que aquellas que se separaron en sus partes para hacer la cuantificación de la 7-metoxicumarina.

Además se prepararon infusiones con bolsitas de "té de pericón" disponibles en el mercado (Té cun, y Té Tender Leaf), poniendo una bolsita de 1.00 - 1.75 gramos en una taza de agua hirviendo y dejándola adentro, ya sin que hierva, durante 3 minutos.

Cada infusión y cocción se evaporó de la misma forma en que se concentraron los extractos de las plantas que se analizaron y al residuo se le agregaron aproximadamente 30 mg. de la solución metanólica de patrón interno, se disolvió con metanol a 10 ml. y se cuantificó la 7-metoxicumarina presente por cromatografía de gases. Los resultados tal como los dió el integrador se encuentran en el Cuadro 17.

CUADRO 17
Concentración de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones

Identificación de la muestra (lugar o marca)	mgs. de 7-metoxicumarina/taza			
	(triplicado de inyecciones)			(media)
Té Cun	10.57	9.23	9.63	9.81
Té Tender Leaf	8.88	9.18	9.07	9.04
San Juan Sacatepéquez	7.89	8.52	7.84	8.08
Tecpán	3.79	3.95	3.89	3.88
San José Pinula	7.89	7.81	9.44	8.38

VI ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

A. Contenido de 7-metoxicumarina en las muestras de diferentes partes de las plantas

1. Análisis de varianza

Debido a problemas diversos, se perdieron dos muestras, una de flores de Chichoy Bajo, Patzún y otra de hojas de San José Pinula, en estos casos no alcanzó el material para tener el dato de una tercera extracción. Por otra parte, de San José Poaquil sólo se recolectaron hojas, y por ello no se tienen datos para flores y tallos. En base a lo anterior no se puede hacer el análisis de varianza con todos los datos disponibles; ya que al hacer cálculos para estimar los datos faltantes, se estaría perdiendo la variación del submuestreo, pues para cada tratamiento y bloque se tiene 3 mediciones (inyecciones).

Lo que se hizo fué el análisis de varianza a un nivel de 95% de confianza, tomando únicamente los tres lugares para los cuales se tienen todos los datos (bloques), Así se pudo ver que no hay diferencia significativa introducida por el tiempo de extracción de la muestra. Los resultados se presentan en el Cuadro 18 (para cálculos del anova ver el Apéndice A):

Ya que no hay variación significativa ($F = 3.19$ al 95%) introducida por los bloques (tiempo de extracción) en sí, podemos, como un recurso para analizar todos los casos donde hay datos para las

CUADRO 18

Análisis de varianza bifactorial, con bloques al azar y con submuestreo de la 7-metoxicumarina en las muestras de las plantas (del Cuadro 16) (Nivel de 95% de confianza)

Fuente Var.	Sum.Cuad.	Grad.Lib.	Sum.Cu.Med.	F
Lugar	3.769	2	1.885	155.68*
Parte Planta	70.351	2	35.175	2905.10*
Tiempo Ext.	.06507	2	.0325	2.69NS
Lug. y Part.	6.464	4	1.616	133.46*
Part. y Tiem.	1.446	4	.3615	29.86*
Lug. y Tiem.	.8738	4	.2184	18.04*
Lug,Part,Tiem	2.178	8	.2723	22.49*
Error	.6539	54	.012108	
Total	85.8024	80		

* = fuente de variación significativa ($F_{crit} = 3.19, 2.57, 2.14$ de 2, 4 y 8 grados de libertad en el numerador, respectivamente).
 NS = fuente de variación no significativa ($F_{crit} = 3.19$)

tres partes de la planta, tomar cada medición como un submuestreo, sin importar que se hizo con diferente extracción. Aquí se estaría perdiendo fineza en el análisis ya que no se tomaría en cuenta la variación introducida por el tiempo de extracción y sus interacciones con los demás factores, pero se estarían tomando en cuenta más tratamientos. El análisis de varianza es bifactorial con número de réplicas desiguales y aparece en el Cuadro 19 hecho sólo con el lugar de origen, la parte de la planta y la combinación de éstos como fuente de variación. Para los cálculos ver el Apéndice A.

Puede verse que a un 95% de confianza hay diferencia significativa introducida por el lugar de recolección de la planta, por la parte de la planta y la interacción de ambos.

CUADRO 19:

Análisis de varianza bifactorial, con submuestreo desigual de la 7-metoxicumarina en las muestras de las plantas (del Cuadro 16) (Nivel de 95% de confianza)

Fuente Var.	Sum.Cuad.	Grad.Lib.	Sum.Cu.Med.	F
Lugar	15.743	4	3.936	55.437*
Parte Planta	76.373	2	38.187	537.845*
Lug. y Part.	12.957	8	1.620	22.817*
Error	8.104	114	.071	

* = fuente de variación significativa ($F_{crit} = 3.07, 2.45, 2.02$ para 2, 4 y 8 grados de libertad en el numerador, respectivamente).

Para poder saber qué lugares son significativamente diferentes dentro de los contenidos de una misma parte de la planta; y , dentro de los contenidos de la planta de un mismo lugar, cuáles partes son significativamente diferentes; es necesario, primeramente, separar los factores (i.e. hacer análisis de varianza por separado de cada factor; como experimentos separados). Aquí se pierde la contribución de las interacciones de los factores entre la variación del error. Un resumen de los anovas se presenta en el Cuadro 20.

Después de ver que hay diferencias significativas en todos los experimentos, se utiliza la prueba de Tukey (ver Apéndice A) , para ver entre cuáles factores hay diferencias significativas en cada experimento. Un resumen de todas las pruebas de Tukey se muestra en el Cuadro 21.

CUADRO 20

Resumen de anovas considerandolos como experimentos independientes y de un factor

Experimento	tratamientos	Fuente de variacion	Suma de Cuadrados	grados de libertad	Cuadrado medio	F
Hojas	Lugares de recoleccion	Error	2.01	11	0.18	9.56 Fcrit= 3.20
		Tratami.	8.73	5	1.75	
		Total	10.74	16		
Flores	Lugares de recoleccion	Error	0.42	9	0.05	6.92 Fcrit= 3.63
		Tratami.	1.31	4	0.33	
		Total	1.73	13		
Tallos	Lugares de recoleccion	Error	0.02	10	0.0018	6.99 Fcrit= 3.38
		Tratami.	0.05	4	0.01	
		Total	0.07	14		
Chichoy Bajo, Patzun, Chimaltenango	Partes de la planta	Error	0.01	5	0.0019	302.26 Fcrit= 5.79
		Tratami.	1.12	2	0.56	
		Total	1.13	7		
Cabrican, Quetzaltenago	Partes de la planta	Error	1.25	6	0.21	9.04 Fcrit= 5.14
		Tratami.	3.76	2	1.88	
		Total	5.00	8		
San Juan Sacatepequez, Guatemala	Partes de la planta	Error	0.26	6	0.04	170.16 Fcrit= 5.14
		Tratami.	14.69	2	7.35	
		Total	14.95	8		
San Jose Pinula, Guatemala	Partes de la planta	Error	0.92	5	0.18	11.62 Fcrit= 5.79
		Tratami.	4.26	2	2.13	
		Total	5.17	7		
Tecpan Guatemala, Chimaltenango	Partes de la planta	Error	0.02	6	0.0026	1370.01 Fcrit= 5.14
		Tratami.	7.15	2	3.57	
		Total	7.16	8		

Por lo que en todos los experimentos existe por lo menos un tratamiento significativamente diferente

CUADRO 21

Resumen de pruebas Tukey de los experimentos del Cuadro 20

Pruebas Tukey para las Hojas. W= 0.53						
Tratamiento (lugar rec.)	medias	2.458	2.456	1.649	1.623	0.993
S. Juan Sac.	3.397	0.94	0.94	1.75	1.77	2.40
Tecpan	2.458		0.00NS	0.81	0.84	1.47
S. Jose Poa.	2.456			0.81	0.83	1.46
Cabrican	1.649				0.03NS	0.66
S. Jose Pin.	1.623					0.63
Chichaj Bajo	0.993					
Pruebas Tukey para las flores W = 0.27						
Tratamiento (lugar rec.)	medias	1.376	0.894	0.879	0.577	
Tecpan	1.560	0.18NS	0.67	0.68	0.98	
S. Jose Pin.	1.376		0.48	0.50	0.80	
Cabrican	0.894			0.02NS	0.32	
S. Juan Sac.	0.879				0.30	
Chichaj Bajo	0.577					
Pruebas Tukey para los tallos W = 0.05						
Tratamiento (lugar rec.)	medias	0.249	0.213	0.200	0.128	
Tecpan	0.284	0.03NS	0.07	0.08	0.16	
S. Jose Pin.	0.249		0.04NS	0.05	0.12	
Cabrican	0.213			0.01NS	0.08	
S. Juan Sac.	0.200				0.07	
Chichaj Bajo	0.128					
NS = diferencias de medias de tratamientos no significativas						

En el cuadro 21 vemos que en los diferentes experimentos para:

Hojas: la de San Juan Sacatepéquez es significativamente mayor que las demás. No hay diferencia significativa entre Tecpán y San José Poaquil ni entre Cabricán y San José Pinula.

Flores: No hay diferencia significativa entre Tecpán y San José Pinula ni entre Cabricán y San Juan Sacatepéquez.

Tallos: No hay diferencia significativa entre Tecpán y San José Pinula, ni entre Cabricán y San Juan Sacatepéquez, ni entre San José Pinula y Cabricán.

2. Promedio de resultados

Al analizar los resultados de la concentración de la 7-metoxicumarina en el pericón se observa lo siguiente:

Por una parte, no influye el tiempo de extracción en la determinación (i.e. son suficiente 8 horas de extracción), por lo que las distintas extracciones se pueden tomar como réplicas. Por otra parte, existen diferencias significativas en la concentración de la 7-metoxicumarina entre las partes de la planta estudiada, entre los lugares de recolección estudiados, y la interacción de ambos.

En base a lo anterior, se puede sacar promedio y desviación estándar de los contenidos de 7-metoxicumarina en cada muestra para cada extracción (Datos en el Cuadro 16 y promedios en el Cuadro 22 y Figura 17).

Ver la Figura 18 con relación a la interacción del lugar con la parte de la planta y su influencia sobre la concentración de la 7-metoxicumarina. En tal gráfica puede verse cierta interacción de los factores (porque se cruzan las líneas). Por el diseño del experimento no se puede saber qué característica del lugar es la que afecta la concentración de la 7-metoxicumarina: la altura, el tipo de suelo, la fertilidad del mismo, la humedad, etc. Lo que se presenta en la Figura 18 son valores promedio de la concentración del principio activo en las diferentes partes de la planta de cada lugar. Estos valores promedio aparecen en el Cuadro 22, y se obtuvieron de los datos de las dos o tres extracciones hechas durante diferentes tiempos para cada muestra. En el Cuadro 23 se repota el contenido de 7-metoxicumarina en el pericón (resumen del Cuadro 22).

CUADRO 22

Porcentaje de la 7-metoxicumarina en muestras

(a partir del cálculo del integrador y en base seca)

Lugar de Recolección	Parte de la planta	Porcentaje de la 7-metoxicumarina en la muestra			
		media de inyecciones	desv. std.	media de muestras	desv. std.
San José Poaquil	Hojas	2.52	0.05		
San José Poaquil	Hojas	2.49	0.06		
San José Poaquil	Hojas	2.42	0.03	2.46	0.02
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	0.96	0.02		
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	0.98	0.02		
Chichoy Bajo, Patzún	Hojas	1.06	0.02	0.99	0.01
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	0.579	0.004		
Chichoy Bajo, Patzún	Flores	0.54	0.01	0.577	0.003
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.124	0.006		
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.10	0.01		
Chichoy Bajo, Patzún	Tallos	0.17	0.01	0.128	0.005
Cabricán	Hojas	1.25	0.02		
Cabricán	Hojas	2.68	0.03		
Cabricán	Hojas	1.67	0.05	1.65	0.01
Cabricán	Flores	1.4	0.1		
Cabricán	Flores	0.86	0.03		
Cabricán	Flores	0.94	0.07	0.89	0.02
Cabricán	Tallos	0.200	0.002		
Cabricán	Tallos	0.326	0.009		
Cabricán	Tallos	0.33	0.01	0.213	0.002
San Juan Sacatepéquez	Hojas	3.44	0.04		
San Juan Sacatepéquez	Hojas	3.25	0.09		
San Juan Sacatepéquez	Hojas	3.2	0.2	3.40	0.04
San Juan Sacatepéquez	Flores	1.46	0.07		
San Juan Sacatepéquez	Flores	0.865	0.009		
San Juan Sacatepéquez	Flores	1.4	0.1	0.879	0.009
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.181	0.001		
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.26	0.01		
San Juan Sacatepéquez	Tallos	0.218	0.001	0.200	0.001
San José Pinula	Hojas	2.73	0.06		
San José Pinula	Hojas	1.41	0.03	1.62	0.03
San José Pinula	Flores	1.5	0.1		
San José Pinula	Flores	1.37	0.02		
San José Pinula	Flores	1.3	0.1	1.38	0.02
San José Pinula	Tallos	0.237	0.003		
San José Pinula	Tallos	0.274	0.005		
San José Pinula	Tallos	0.256	0.009	0.249	0.002
Tecpán	Hojas	2.4	0.1		
Tecpán	Hojas	2.5	0.1		
Tecpán	Hojas	2.4	0.2	2.46	0.08
Tecpán	Flores	1.4	0.2		
Tecpán	Flores	1.6	0.1		
Tecpán	Flores	1.58	0.06	1.56	0.05
Tecpán	Tallos	0.28	0.01		
Tecpán	Tallos	0.30	0.01		
Tecpán	Tallos	0.281	0.005	0.284	0.004

límite de confianza = $\frac{\text{desviación estándar} * t \text{ de student}}{\text{numero de casos}}$

FIGURA 17

Concentración de 7-metoxicumarina en el Pericón

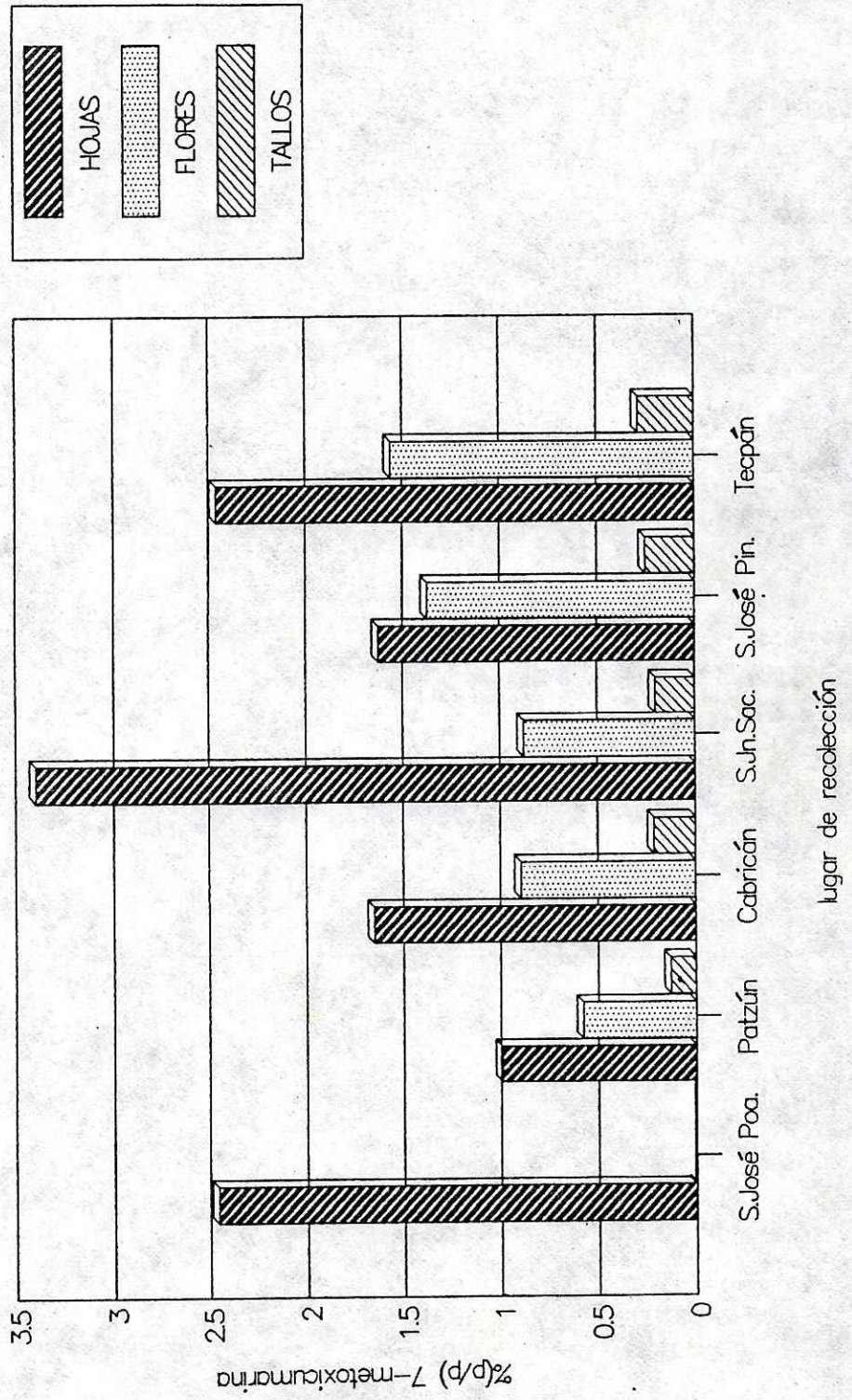
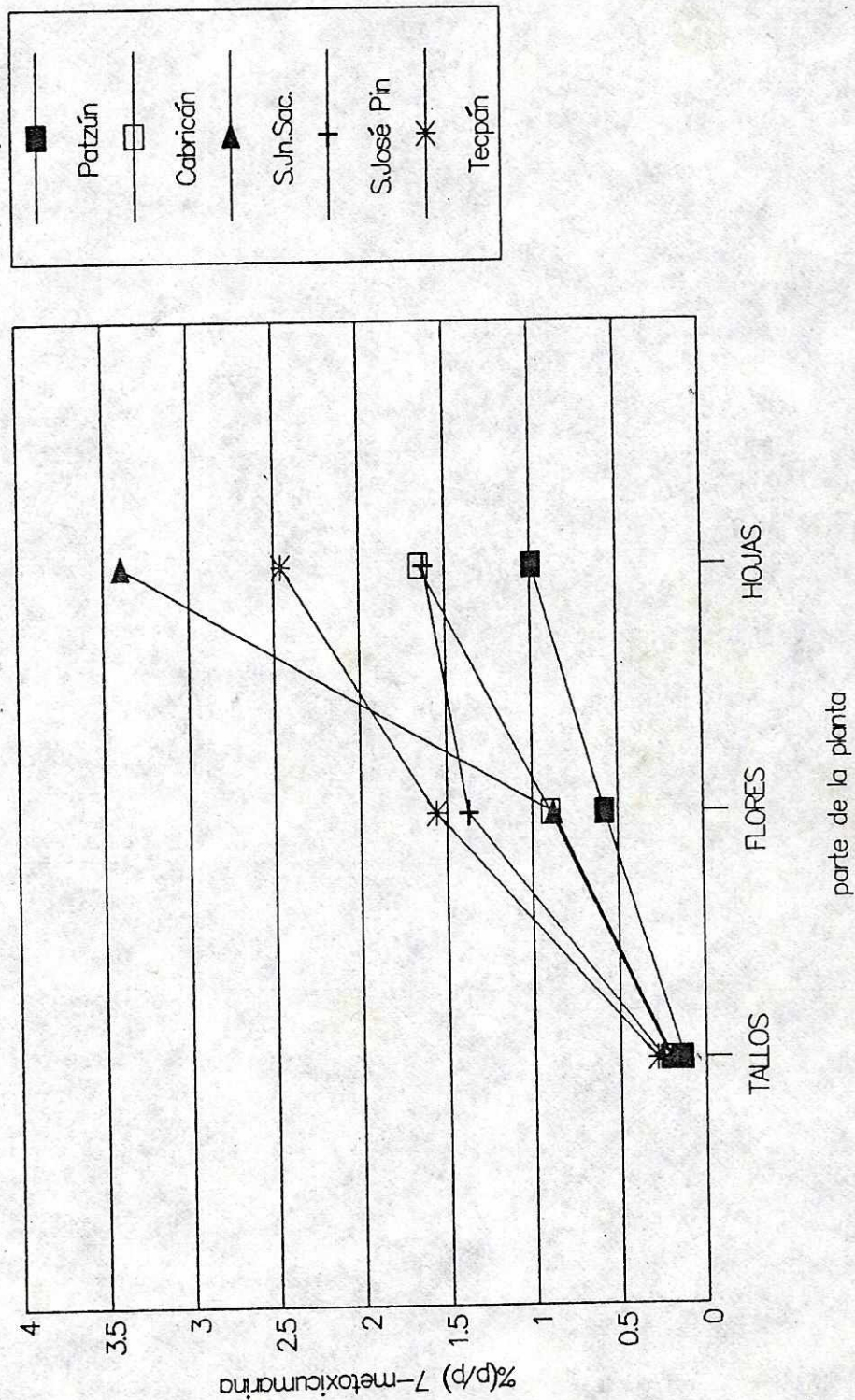


FIGURA 18

Efecto del lugar y parte de la planta en la concentración de 7-metoxicumarina



CUADRO 23

Contenido de 7-metoxicumarina en el Pericón

(a partir del calculo del integrador y en base seca)

Lugar de Recolección	HOJAS %(p/p)		TALLOS %(p/p)		FLORES %(p/p)	
San José Poaquil	2.46	0.01	---	---	---	---
Chichoy Bajo, Patzún	0.993	0.007	0.577	0.002	0.128	0.003
Cabricán	1.649	0.008	0.89	0.02	0.213	0.001
San Juan Sacatepéquez	3.40	0.02	0.879	0.005	0.200	0.001
San José Pinula	1.62	0.02	1.38	0.01	0.249	0.002
Tecpán	2.46	0.05	1.56	0.03	0.284	0.003

(1) Los valores presentados a continuación de los promedios son límites de confianza al 95% = $\pm St/\sqrt{N}$ considerando la desviación estándar, S, de los N valores tomados en cuenta.

3. Relación entre la concentración y el lugar de recolección

Con el fin de determinar en cierta medida a que se debe la variación en la concentración de 7-metoxicumarina en las diferentes plantas recolectadas, se tomaron en cuenta las características de cada lugar de recolección descritas en el Cuadro 3.

Para analizar dicha relación, no sólo se encuentra la dificultad de multiples datos relacionados con el clima: temperatura, variación de la temperatura, humedad, régimen de lluvias, tipo de vegetación natural, etc.; sino con múltiples variables "respuesta" o "medibles", como la concentración de la 7-metoxicumarina en hojas, tallos, flores y en la planta.

En las Figuras 19 a 26 se busca alguna relación entre la concentración de 7-metoxicumarina en las partes de la planta y la humedad y la altura del lugar de recolección (todos los lugares están dentro del mismo rango de temperaturas).

FIGURA 19

Variación de la concentración en las plantas con la humedad del lugar

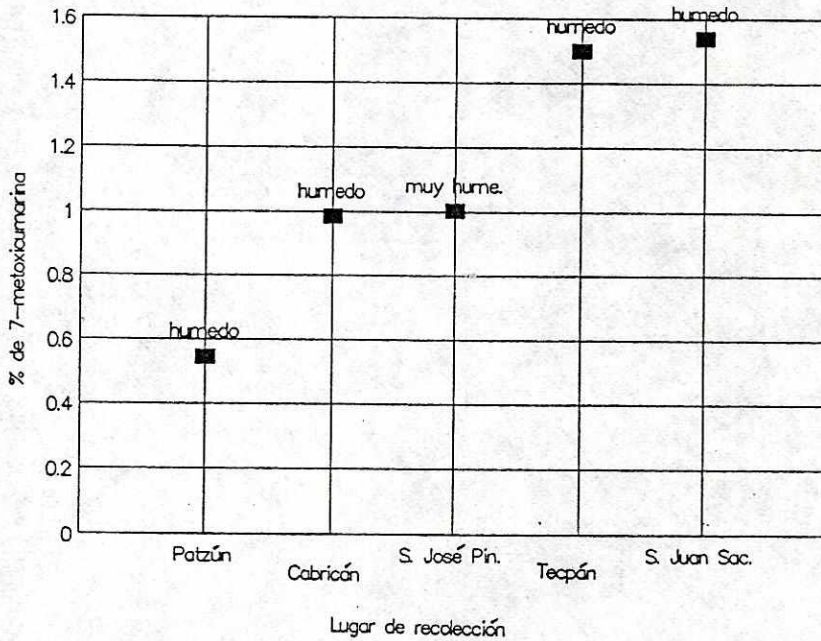


FIGURA 20

Variación de la concentración en las hojas con la humedad del lugar

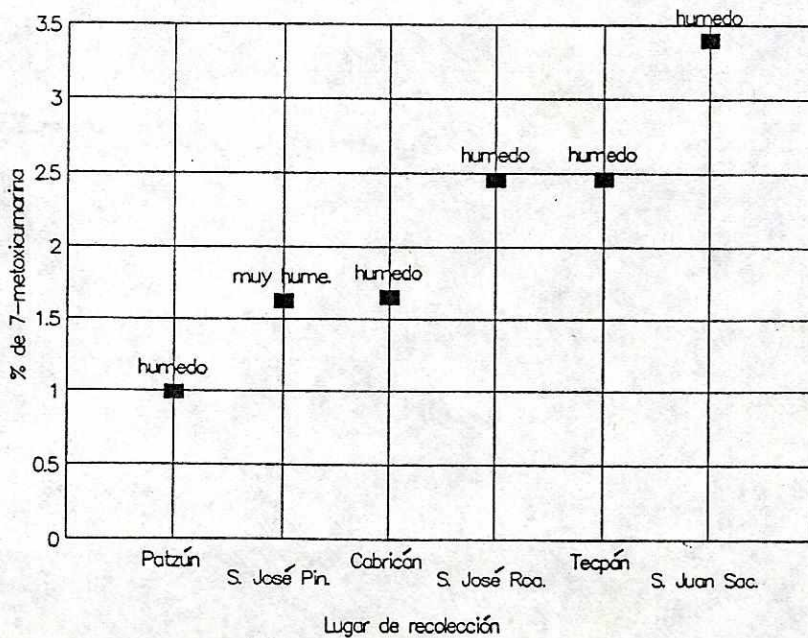


FIGURA 21

Variación de la concentración en las flores con la humedad del lugar

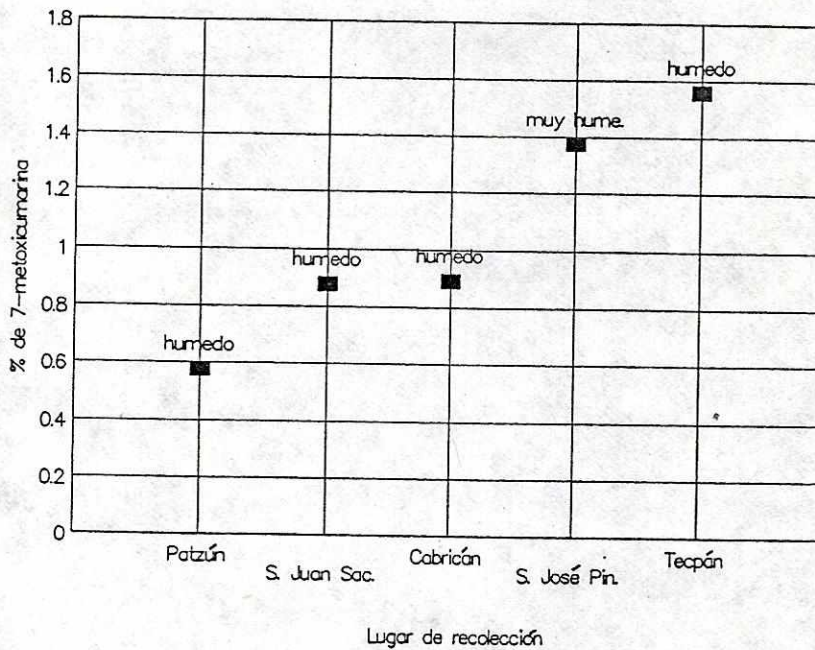


FIGURA 22

Variación de la concentración en los tallos con la humedad del lugar

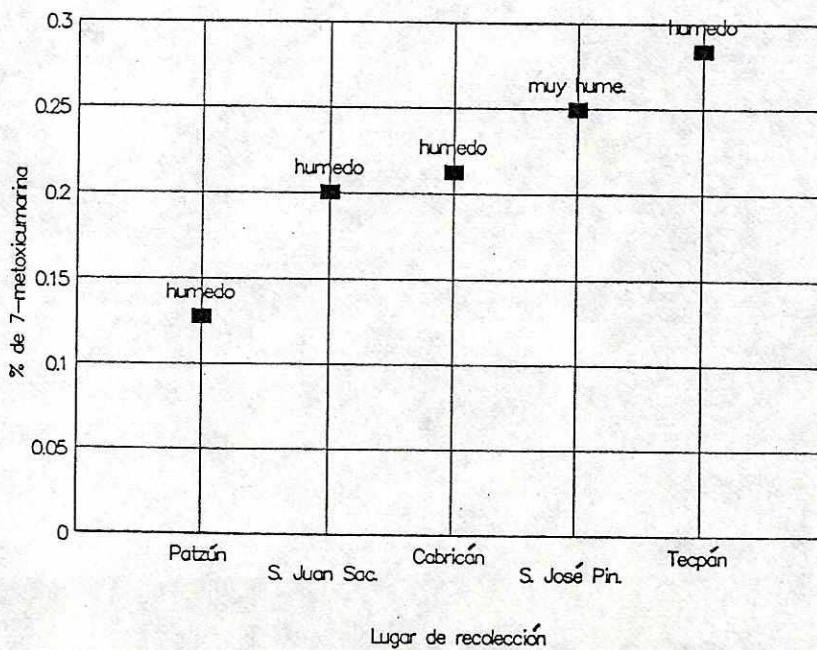


FIGURA 23

Variación de la concentración en las plantas con la altura del lugar

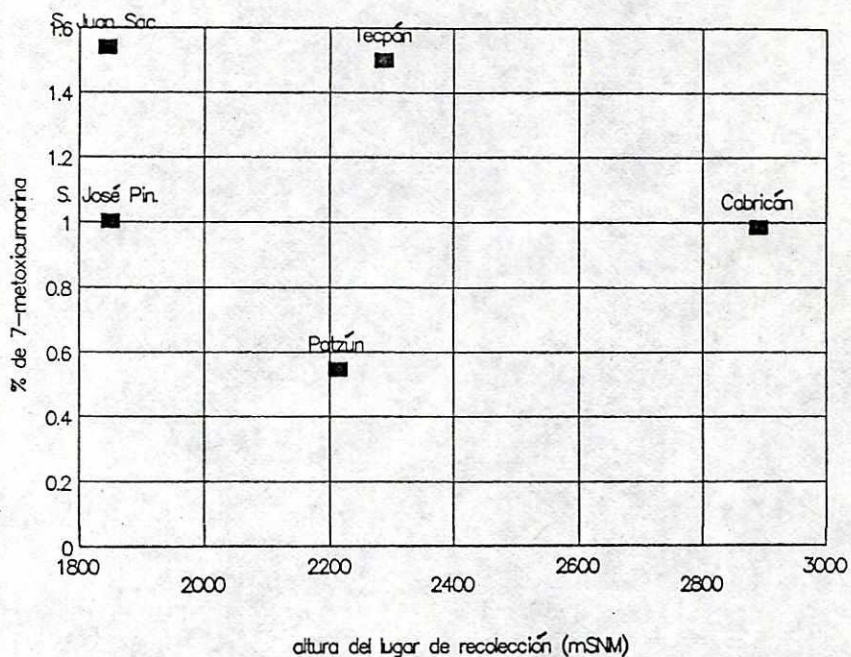


FIGURA 24 Variación de la concentración en las hojas con la altura del lugar

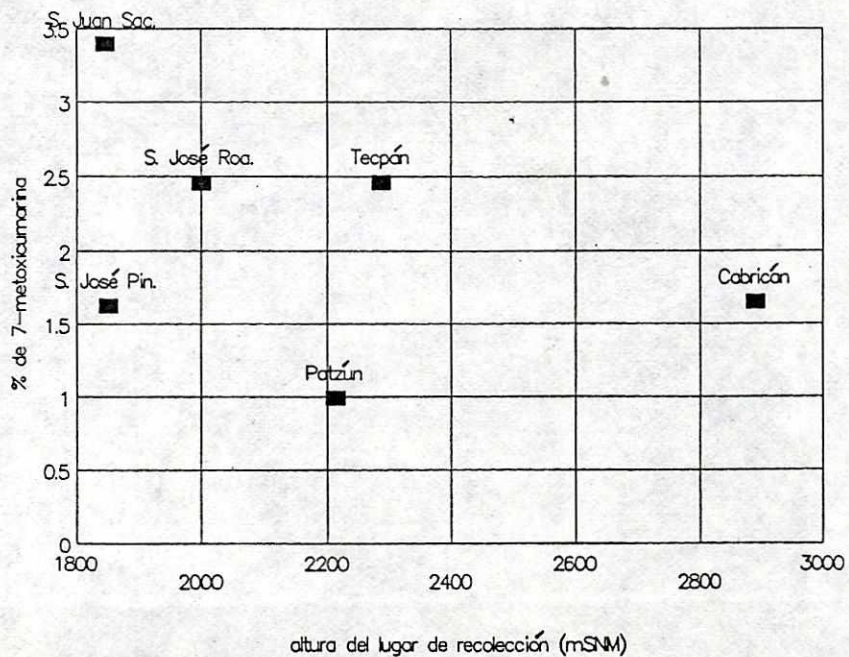


FIGURA 25

Variación de la concentración en las flores con la altura del lugar

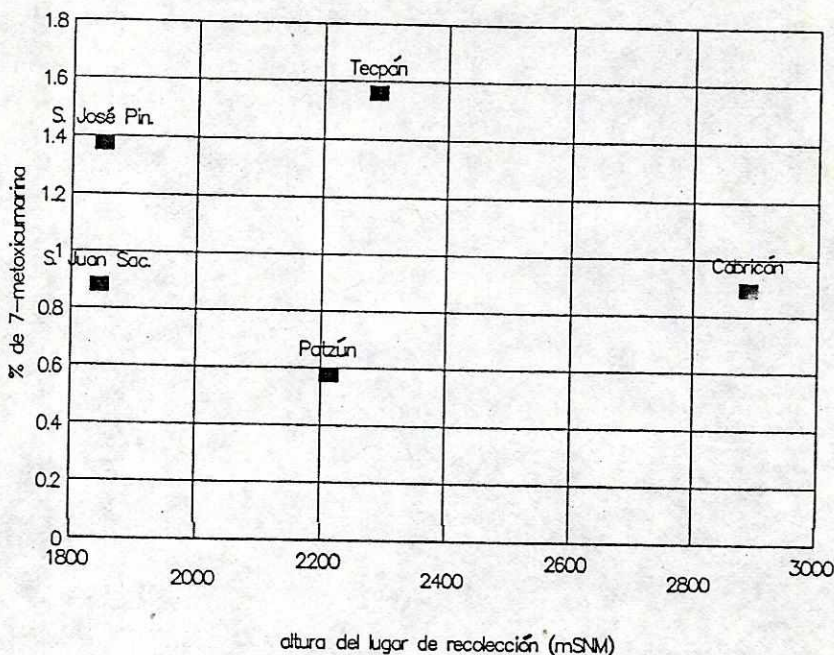
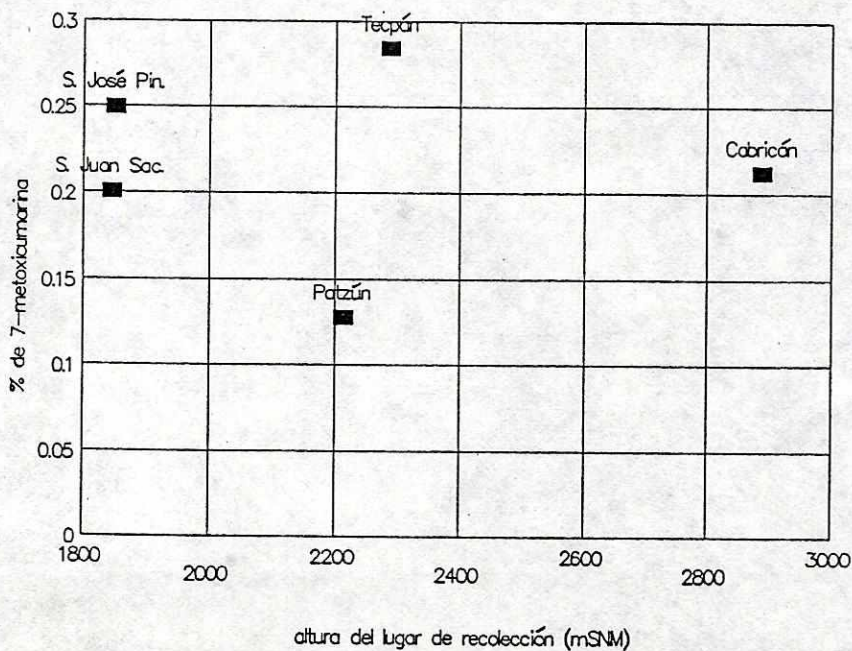


FIGURA 26

Variación de la concentración en los tallos con la altura del lugar



Analizando las gráficas se observa que en Cabricán, que está a mayor altura, la concentración es más baja que en la mayoría de las muestras de los otros lugares. Pero en Chichoy Bajo, Patzún, la concentración es la más baja de todas, y se encuentra a una altura casi igual a la de Tecpán. Si se trata de relacionar la humedad del lugar con la concentración de 7-metoxicumarina en las partes de la planta, se encuentra que San José Pinula que tiene un clima más húmedo que los demás, tiene una concentración más baja en las hojas y más alta en los tallos y las flores con relación a los demás lugares de recolección. En general, no se ve ninguna tendencia con los datos analizados.

No se puede llegar a mayores conclusiones, por falta de información, ya que no se controlaron los factores del lugar de recolección y ni se tomaron en cuenta otros como la fertilidad del suelo y el régimen de lluvias durante la época que creció la planta. Además, es posible que las plantas no tengan la misma madurez, pese a los cuidados que se tuvieron en la fecha de corte y que ya estuvieran floreciendo.

B. 7-Metoxicumarina en las infusiones y cocciones

1. Análisis de varianza

Al realizar un análisis de varianza con los datos del Cuadro 17, se puede determinar si hay diferencia significativa en la dosis de 7-Metoxicumarina en las infusiones y cocciones analizadas. En el Cuadro 24 se presenta el análisis de varianza (para cálculos ver el Apéndice A):

Notamos que hay una diferencia significativa en las dosis de al menos un té; podemos suponer que es el de Tecpán, debido a que es el

que más difiere de los otros (ver Figura 27); y hacer el mismo análisis de varianza con todos los tratamientos, menos el de Tecpán (ver Cuadro 25).

CUADRO 24

Análisis de varianza del contenido de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones (del Cuadro 17 a un 95% de confianza)

Fuente Var.	Sum.Cuad.	Grad.Lib.	Sum.Cu.Med.	F
Tratamientos	64.16	4	16.04	53.80*
Error	2.98	10	0.298	
Total	67.14	14		

* Diferencia significativa ($F_{crit} = 3.48$)

CUADRO 25:

Análisis de varianza del contenido de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones (del Cuadro 17 menos Tecpán a un 95% de confianza)

Fuente Var	Sum.Cuad.	Grad.Lib.	Sum.Cu.Med.	F
Tratamientos	5.30	3	1.77	4.73*
Error	2.97	8	0.37	
Total	8.27	11		

* Diferencia significativa ($F_{crit} = 4.07$)

De donde hay diferencia significativa (al 95% de confianza, $F = 4,07$) en la dosis de al menos una de las cuatro muestras. Para encontrar dicha diferencia se usó el método de contrastes ortogonales (ver el Apéndice A); los contrastes que se hicieron fueron: 1) infusiones vrs. cocciones, 2) entre las dos infusiones, 3) entre las dos cocciones que quedaron. En el Cuadro 26 se presentan los resultados de los contrastes ortogonales, en donde vemos que la diferencia está entre infusiones y cocciones; por lo que se puede decir

que las infusiones (hechas de bolsitas de té que se encuentran en el mercado), contienen más 7-metoxicumarina. La anterior diferencia se puede deber a que las bolsitas tengan más hojas que las ramas con que se prepararon las cocciones, a que la planta con la que se prepararon las bolsitas tuviera más concentración del 7-metoxicumarina; o que al seguir hirviendo el agua al preparar la cocción, se descomponga la 7-metoxicumarina (Weast, 1977, menciona que éste compuesto se descompone en agua). No es tan poderosa esta conclusión ya que no hay réplicas independientes de cada cocción ni infusión.

CUADRO 26
Contrastes ortogonales de las infusiones y cocciones

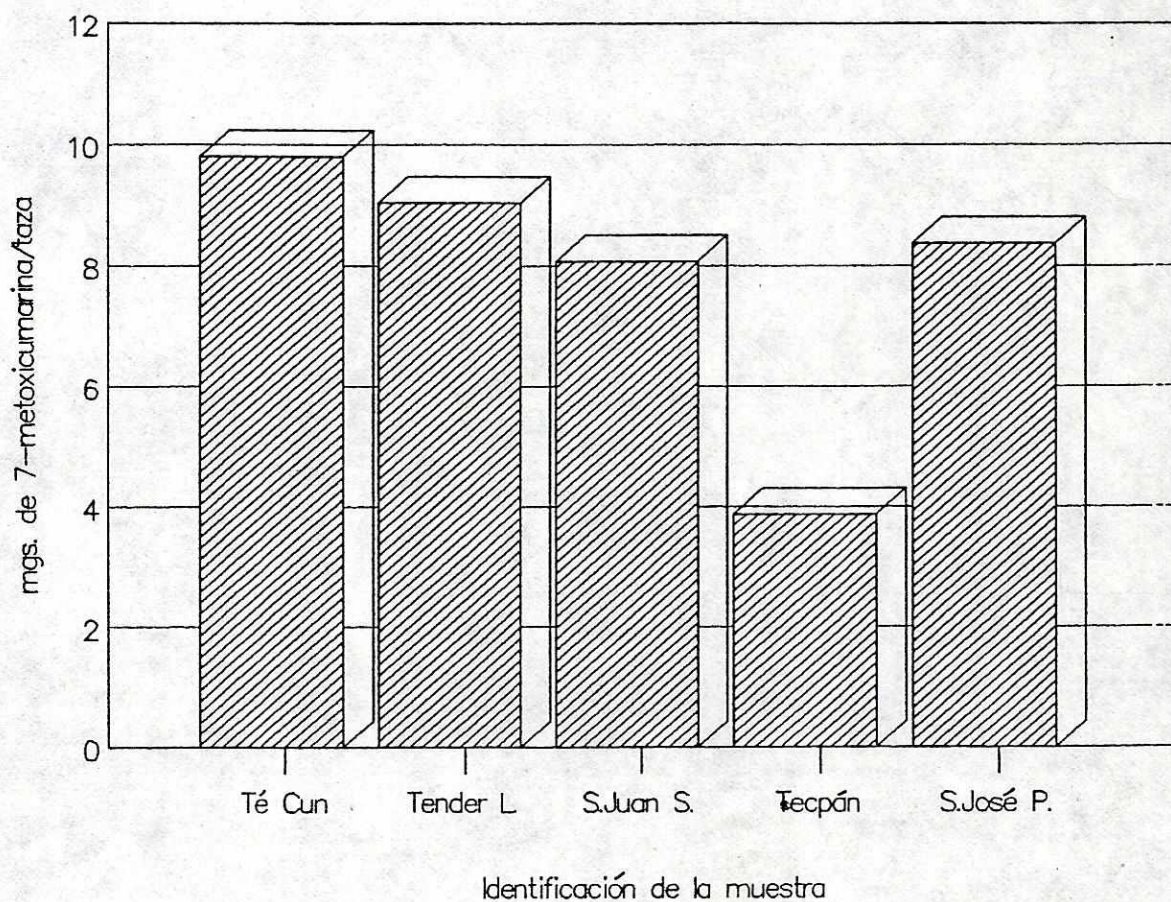
con- tras- te:	tratamientos					Resultados			
	trata.	Te Cun	Tender	S. J. Sac.	S. J. Pin.	$\alpha =$	$\beta =$	$\beta/\alpha =$	F
	Yi. (suma)	29.43	27.13	24.25	25.14	$\sum r_i c_i^2$	$\sum c_i y_i$	SC _{cont.}	
ri (repet)	3	3	3	3					
1		1	1	-1	-1	12	7.17	4.2841	11.5786 *
2		1	-1	0	0	6	2.30	0.8817	2.3829 NS
3		0	0	1	-1	6	-0.89	0.1320	0.3568 NS

NS= no significativo. * = significativamente diferentes. F(95%,1,8)= 5.32
Para abreviaturas consulte el Apéndice A

En el Cuadro 27 y la Figura 27 se presentan los resultados de la dosis promedio de cada infusión o cocción. Se puede decir con los datos del Cuadro 17, que la dosis de 7-metoxicumarina en las muestras de infusiones y cocciones analizadas tiene un promedio de 7.84 mg/ taza (sin tomar en cuenta la muestra de Tecpán sería de 8.83mg/ taza) y con una dosis no mayor de 10mg/ taza. Este último dato se podría usar junto con la dosis letal media para hacer cálculos de posibles peligros de intoxicación; pero no se encontraron datos toxicológicos de la 7-metoxicumarina (Meyers, 1980; Melmon, 1978; Loebel, 1986; CAS 83:190324t; The United States Pharmacopeia, 1985; The National Formulary, 1985).

FIGURA 27

Contenido de 7-metoxicumarina en infusiones y cocciones



CUADRO 27

Contenido de 7-metoxicumarina en las infusiones y cocciones

Identificación de la muestra (lugar o marca)	mgs. de 7-metoxicumarina/taza	
	(media)	(lim.conf 95%)
Te Cun	9.8	0.8
Te Tender Leaf	9.0	0.2
San Juan Sacatepequez	8.1	0.4
Tecpan	3.88	0.09
San Jose Pinula	8	1

2. Eficiencia de la extracción en las cocciones

Dado que las plantas utilizadas para las cocciones provenían del mismo lote que aquellas separadas en sus partes y luego analizadas. Se tiene analizando el resultado de la dosis de 7-metoxicumarina en las cocciones y la concentración de este compuesto junto con el porcentaje en peso de cada parte de la planta, que se puede calcular la eficiencia de la extracción de la 7-metoxicumarina. El cálculo se hizo según:

$$\%Ext. = \frac{WCu}{WMu} * \frac{100}{[(\%H * \%CuH) + (\%F * \%CuF) + (\%T * \%CuT)]} \quad (2)$$

Donde:

%Ext = Eficiencia de la extracción

WCu = peso de la cumarina cuantificada en la cocción

WMu = peso de la planta con que se hizo la cocción en base húmeda

%H = porcentaje en peso de hojas en la planta en base húmeda

%CuH = porcentaje de la 7-metoxicumarina en las hojas en base húmeda

%F = porcentaje en peso de flores en la planta base húmeda

%CuF = porcentaje de la 7-metoxicumarina en las flores base húmeda

%T = porcentaje en peso de tallos en la planta base húmeda

%CuT = porcentaje de la 7-metoxicumarina en los tallos base húmeda

El resultado se muestra en el Cuadro 28:

CUADRO 28:

Eficiencia de la extracción de la 7-metoxicumarina en las cocciones de pericón

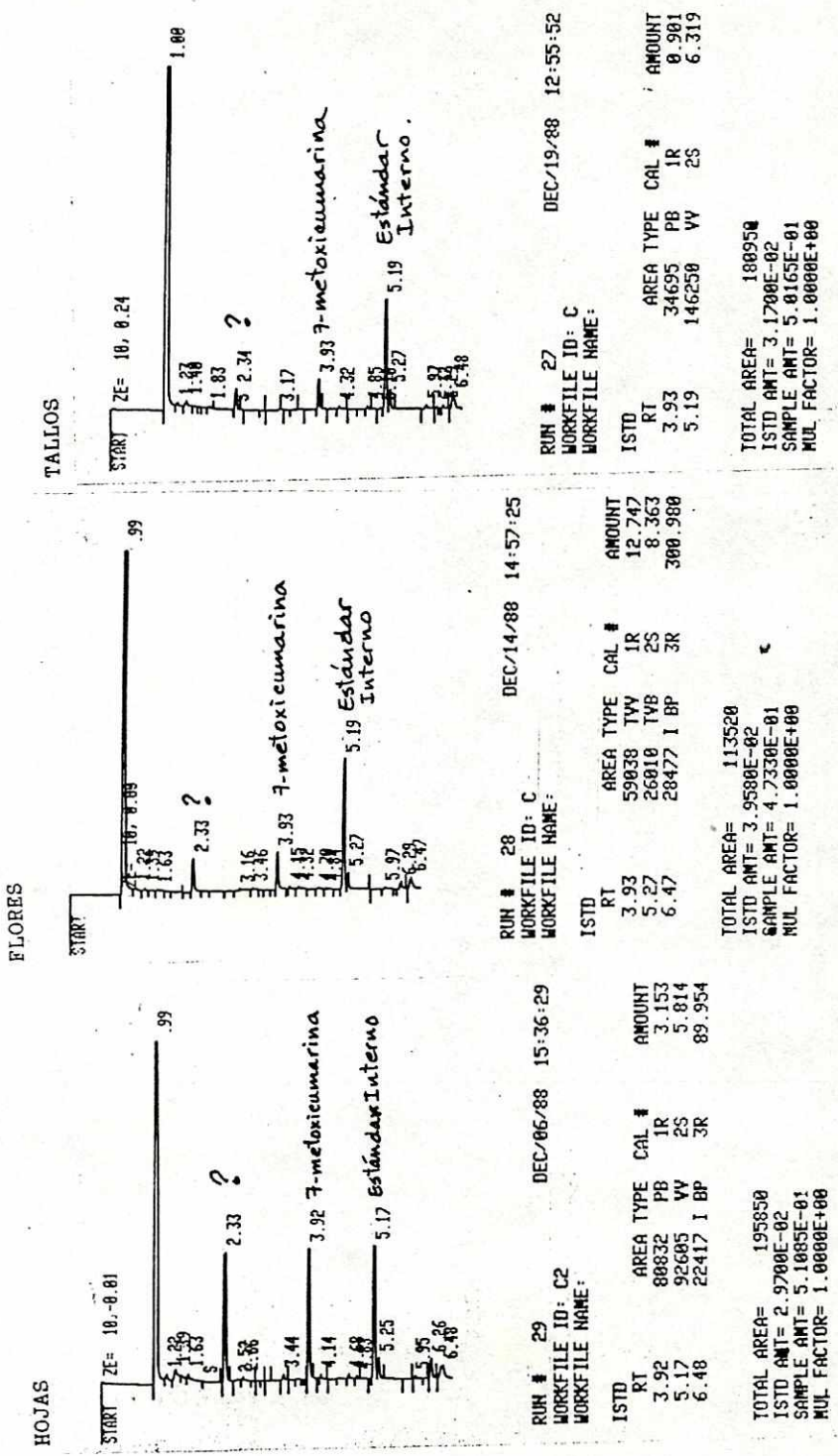
LUGAR	EFICIENCIA
San Juan Sacatepequez	34.9 %
Tecpán	17.3 %
San José Pinula	38.3 %

Vemos que la eficiencia de la extracción es bastante baja; esto posiblemente se deba a que la 7-metoxicumarina se descompone en agua (Weast, 1977). Esta descomposición pudo ser mayor en la muestra de Tecpán debido a un sobrecalentamiento durante la evaporación de la muestra; pero debido a falta de réplicas independientes de cada cocción, no es posible determinar si ésta sea la causa de la diferencia de la muestra de Tecpán.

C. Compuestos en los cromatogramas

Si se observan los cromatogramas (ver Apéndice C), se puede apreciar que en todos los cromatogramas aparecen dos picos: El del patrón interno con un tiempo de retención de 5.19 min. y el de la 7-metoxicumarina con 3.93 min. En el cromatograma de la muestra purificada que se utilizó como patrón aparece a 6.27 min. un pico muy pequeño que se cree que sea de otra cumarina; ya que al hacerle cromatografía en capa fina a la muestra purificada (Ortiz, 1987) da dos manchas Fluorescentes (características de las cumarinas). El pico a 6.27 min. también aparece en la mayoría de los cromatogramas de extractos, infusiones y cocciones.

FIGURA 28
 Cromatogramas de extractos de hojas, flores y tallos de plantas de pericón de Chicoy Bajo, Patzún



Es de hacer notar que los cromatogramas de las infusiones y cocciones tienen menos picos que los de los extractos de las partes de la planta; posiblemente se deba a que la extracción en metanol y con soxhlet es más completa para la 7-metoxicumarina y además extrae más compuestos.

Entre todos los picos que aparecen en los cromatogramas de los extractos, hay uno que tiene un tiempo de retención de 2.32 min. y que pasa desapercibido entre todos los picos en la mayoría de los cromatogramas, menos en los de Chichoy Bajo, Patzún (ver la Figura 28); en donde aparece en los cromatogramas de todos los extractos y es de un tamaño igual al pico de la 7-metoxicumarina. Ya que este pico aparece en todos los extractos y en todas las partes de la planta (8 extracciones independientes), difícilmente se trate de un compuesto producido por descomposición o degradación de otro; Por lo que podemos decir que las muestras de Chichoy Bajo tienen un compuesto en una cantidad mayor que las muestras de los otros lugares. Es interesante, ya que las muestras de éste lugar son las que tienen la 7-metoxicumarina en una concentración significativamente menor que las de los otros lugares de recolección.

La diferencia entre las muestras de Chichoy Bajo y las de los otros lugares se podría deber a que se cortó la planta con una madurez diferente a las demás. El otro compuesto que tiene posiblemente sea el precursor de la 7-metoxicumarina o un compuesto metabólico de ella; por lo que este compuesto aparece en mayor cantidad y la 7-metoxicumarina en menor cantidad que en las muestras de otros lugares. Es posible que la diferencia se deba a una variedad diferente de pericón, o que la muestra estuviera contaminada con otra

planta, o que se deba al lugar de recolección.

D. Humedad de las plantas

1. Análisis de varianza

Con los datos del Cuadro 12 se puede realizar un análisis de varianza para ver de que depende la variación de la humedad de la planta seca (si de el lugar de recolección o de la parte de la planta).

CUADRO 29:

Análisis de varianza bifactorial con igual número de réplicas para la humedad de las muestras de planta secada bajo condiciones ambientales.

Fuente Var.	Sum.Cuad.	Grad.Lib.	Sum.Cu.Med.	F
Lugar de rec.	15.873	4	3.968	9.539*
Parte de pla.	9.443	2	4.722	11.351*
Parte y Lugar	6.012	8	0.752	1.808NS
Error	12.488	30	0.416	

* Fuente de variación significativa ($F_{crit} = 2.69, 3.32$)
NS Fuente de variación no significativa ($F_{crit} = 2.27$)

Se tiene diferencia significativa en la humedad de las muestras debido al lugar de recolección y debido a la parte de la planta estudiada. Según esto sí era necesario determinar dicha humedad y hacer la corrección para presentar los resultados del contenido de 7-metoxicumarina en base seca.

VII. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta los siguientes aspectos que son antecedentes e hipótesis de este trabajo:

El pericón, *T. lúcida*, tiene un uso extenso y variado en la medicina tradicional guatemalteca, especialmente por su actividad antiespasmódica.

Por una parte, la 7-metoxicumarina, el principio antiespasmódico y antibacterial del pericón, es además, la cumarina presente en mayor cantidad en tal planta. Por otra parte, este compuesto es fototóxico y tiene otras propiedades adversas como mutagénica, inhibidora del hígado (citocromo P45), reacciona fotoquímicamente con ácidos nucleicos, teniendo posibles propiedades cancerígenas.

El pericón crece en gran variedad de condiciones de alturas y lugares, por lo cual es posible que la concentración de la 7-metoxicumarina varíe debido a condiciones.

Se concluye lo siguiente en base a los resultados de este trabajo:

Una planta de pericón secada por el método tradicional está compuesta en su mayor parte de tallos, de 44.6 a 48.4 % p/p (tomando en cuenta la humedad remanente); luego de hojas con 34.8 a 45.3 % p/p y por último de flores con 9.2 a 17.1 % p/p .

Las plantas de pericón secadas por el método tradicional y molidas tienen una humedad residual entre 6 y 11% p/p.

Es posible hacer una extracción completa de la 7-metoxicumarina presente en muestras de pericón secas y molidas, usando metanol industrial tridestilado como solvente y extrayéndola con soxhlet durante 8 horas. Este tiempo es suficiente para hacer una extracción completa del compuesto estudiado.

Para la cuantificación de la 7-metoxicumarina es posible usar cromatografía de gases usando ftalato de dibutilo como patrón interno y una columna capilar HP1 de 25 m de largo, un detector de ionización de llama y las condiciones cromatográficas descritas en la página 33.

La 7-metoxicumarina está presente en el pericón en mayor concentración en las hojas, de 1.0 a 3.4 % peso/peso en base seca (2.1 % en promedio); luego en las flores, de 0.58 a 1.6 % p/p en base seca (1.03 % en promedio), y por último en los tallos, de 0.13 a 0.28 % p/p en base seca (0.22 % en promedio).

Existe variación en la concentración de 7-metoxicumarina en las diferentes partes del pericón debido al lugar de donde éste se produce.

Por medio de los espectros y cromatogramas del material usado como patrón, se comprobó que la cumarina presente en mayor cantidad en el pericón es la 7-metoxicumarina, encontrándose además un compuesto que está en gran cantidad en el extracto metanólico de las muestras de Chichoy Bajo, Patzún.

La dosis de 7-metoxicumarina en una infusión o cocción de pericón no es mayor de 10 mg por taza.

Al hacer una cocción de pericón por el método tradicional, se extrae hasta el 38% p/p de la 7-metoxicumarina presente en la planta entera secada bajo condiciones ambientales. Tal material tiene una concentración promedio de 1.3 % p/p de 7-metoxicumarina (tomando en cuenta la humedad remanente).

Dado que las plantas secas tienen más tallos que hojas o flores (en porcentaje p/p), y que los tallos tienen una concentración mínima de 7-metoxicumarina, si se desea extraer este compuesto para su purificación para uso en investigación o medicina, no es aconsejable extraer material de los tallos.

Es posible que las infusiones de pericón contengan más 7-metoxicumarina que las cocciones, debido a que, con el calor, se descomponga más rápido este compuesto al estar en soluciones acuosas.

VIII. SUGERENCIAS DE ESTUDIO

Determinar si las plantas frescas de pericón contienen o no la 7-metoxicumarina, cuantificándola o estudiando el precursor presente en la planta fresca. Así se puede saber algo más de la biosíntesis de esta cumarina.

Cuantificar la 7-metoxicumarina en hojas y tallos de plantas de pericón secas y cortadas en distintas etapas del desarrollo de la planta, para estudiar cuando está en su punto máximo la concentración de 7-metoxicumarina. Ver además si se encuentra en otras plantas de pericón (de distintos lugares y edades) el compuesto encontrado en las muestras de Chichoy Bajo, Patzún; si varía con la etapa de desarrollo de la planta, determinando si es un precursor o un metabolito de la 7-metoxicumarina.

Determinar la dosis letal media oral de la 7-metoxicumarina en rata o algún otro animal de laboratorio; determinando además efectos en la piel producidos por fototoxicidad (al reaccionar en la piel con la luz solar o UV).

Realizar un experimento cultivando pericón, controlando factores tales como los elementos mayores del suelo, sombra, riego; y registrando otros factores como temperatura, clima etc. y ver como influyen éstos en la concentración de la 7-metoxicumarina en la planta.

Estudiar el efecto de la temperatura en la descomposición de la 7-metoxicumarina en soluciones acuosas; y comprobar si las infusiones tienen más de este compuesto que las cocciones.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, G. A. Datos no publicados obtenidos en el estudio fitoquímico del pericón, en el curso de Química de productos vegetales, Universidad del Valle de Guatemala, 1986.
- Buckingham, J. "Dictionary of organic compounds", 5th Ed; Chapman and Hall: N. Y., 1982; m00530.
- Calle, Juan de Dios. comunicación personal, Universidad del Valle de Guatemala, 1987.
- CAS: Chemical Abstracts Services:
- 75:35617g: Use of NMR spectroscopy in the chemistry of natural coumarins, Perel'son, M.E. etal (USSR). tr. Uses: Nauch-Issled. Inst. Lek. Dromat. Rast 1969, 15, 60 - 86 (Russ).
- 80:14523n: Use of nuclear magnetic resonance in the study of coumarin structures. Gonzales, etal (Inst. Invest. Quim, Univ. La Laguna, La Laguna Spain) An Quim. 1973, 69 (9-10), 1013-29 (Spain).
- 82:13353k: NMR Procedure for determining methosyl positions of coumarin trimethylsilyl ethers using the benzene induce solvent shift. Brown, etal, (Dep. chem., Univ. Wyoming, Laramie, Wyo.) Phytochemistry 1974, 13(9), 1923-4 (Eng.).
- 82:149030k: Separation of coumarins by liquid chromatography, Nakatoma, etal (Fac Sci., Hiroshima Univ., Hiroshima, Japan). Nippon Kagaku Kaishi 1975, (1), 96-9 (Japan).
- 83:190324t: Therapeutic use of some Tagetes species. Their botanical, chemical, pharmacodynamic and agronomical characteristics. Szabo, etal. (Talcarnan = ytermesztési kut. Allomas, Bicserd, Hung.) Gyogyszereszet 1975, 19 (8), 281-5 (Hung) Areview with 10 refs. The medical.
- 84:169712d: Gaschromatographic study of pharmacopeia drugs. Part 5. Chamomile flower. A new evaluation of the chamomile drug and its preparations. Glasl, H., etal (Inst. Pharm. Arzneimittellehre, Univ. Muenchen, Munich, Ger.). Dtsch. Apoth. Ztg. 1976, 116(3), 45-50 (Ger).
- 85:17061y: Chemical study of Tagetes, I. Rios, etal, (Inst Quim, Univ. Naci. Auton. Mexico, Mexico City, Mex. Rev. Latinoam. Quim. 1976, 7 (1), 33 - 6 (Spain).
- 97:103102s: Carbon-13 NMR studies of some hydroxy coumarins and related compounds, Sankar, tal. (Sch Fext., North Carolina State Univ., Raleigh, N.C. 27650 USA). Org. Magn. Reson. 1982, 19(4), 222 -4 (Eng).
- Chickering, C.R. "Flowers of Guatemala", University of Oklahoma Press: Norman, 1973.
- Cooper, James W. "Spectroscopic techniques for organic chemists", John Wiley & sons: New York, 1980.

- Diaz, J.L. "Usos de las plantas medicinales de México", Monografías Científicas II: México, 1976.
- Emboden, W. Narcotic Plants, Collier Books; McMillan Publishing Co. Inc.: N.Y., 1979.
- Evans Schultes & Hofmann, A. "The botany and chemistry of hallucinogens", 2nd ed.; American Lecture Series, 1980.
- Evans Schultes & Hofmann, A. "Plantas de los Dioses"; Fondo de Cultura Económica: México, 1982.
- Gándara Rosal, M. "Estudio de la efectividad de Tagetes lucida Cav. (Pericón) como antimicrobiano y análisis del compuesto que le confiere esta propiedad". Tesis. (Bioquímico) Universidad del Valle de Guatemala, Facultad de Ciencias y Humanidades. Guatemala, 1988.
- Guzmán, N. "Determinación de estructuras de los componentes mayoritarios del extracto de hojas y flores de Tagetes lúcida Cav. (pericón) soluble en eter de petroleo mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas". Tesis. (Químico) Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1987.
- Gros, E. et. al. "Introducción al estudio de los productos naturales"; Secretaría general de la O.E.A., 1985; 48- 53 pp.
- Hewlett Packard. "Stat pac manual, HP-41C"; Hewlett Packard portable computer division, Singapore, 1984.
- Instituto de Geografía e Historia, "Diccionario Geográfico de Guatemala" segunda edición: Tomos 1 (pp 275-278, 697-704) 3 (pp 341-342, 372-376) 4 (pp47 - 53) Guatemala, 1983.
- Kaplan. "Historical and Ethnobotanical aspects of domestication in Tagetes"; Economic Botany, 1962; 14:200-202.
- Lee, W. "Experimental design and analysis"; W. H. Freeman and company: San Francisco, 1975.
- Loebl, S. et al, "Manual de Farmacología", Editorial Limusa: México, 1986.
- Martínez, M. "Plantas útiles de la flora mexicana"; Ediciones Botas: México, 1959.
- Martínez, M. "Las plantas medicinales de México", 5ta. edición; Ediciones Botas: México, 1969.
- Melmon, K. L. et, al, "Clinical Pharmacology, Basic principles in therapeutics", 2nd ed: Macmillan Publishing Co. Inc.: NY, 1978.
- Meyers, F. et al. "Review of medical Pharmacology", 7ed; Lange Medical Publications: Los Altos CA., 1980.

- Morán Chinchilla, S. "Guía geográfica de los departamentos de Guatemala"; imp. Mansilla: Guatemala, 1974.
- Morton, J.F. "Atlas of medicinal plants of middle America"; Thomas Books: N.Y., 1981.
- Nash, D.E. & Williams, L.D. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Part XII. Field Museum of Natural History, 1976.
- Neher, R.T. "The Ethnobotany of Tagetes", Economic Botany. 22:317-325, 1968.
- Ortiz de Montellano, B.R. & Browner C.H. "Chemical bases for medicinal plants use in Oaxaca, México", Journal of Ethnopharmacology, 1985, 13:55-88.
- Ortiz, S. "Aislamiento y elucidación de la estructura del los alcaloides del pericón Tagetes lúcida", tesis Facultad de Ciencias Químicas y farmacia, USAC. pags 3,4,5,6,7 y 23, 1977.
- Ortiz, S. Departamento de química orgánica Facultad de ciencias químicas y farmacia USAC. Comunicación personal, 1987.
- Pouchert, C. J. "The Aldrich Library of FT-IR spectra" 1st edition Volume 2. Aldrich Co. 1985.
- Pouchert, C. J. "The Aldrich Library of NMR spectra" 1st edition Volume 7. Aldrich Co. 1974.
- Pouchert, C. J. "The Aldrich Library of IR spectra" 2nd edition . Aldrich Co. 1975.
- Rios, T. et. al. "Chemical Study of Tagetes I. Rev. Latinoam. Quim. 1976; (1) : 36-6.
- Salguero, I. E. "Estudio farmacológico de Tagetes lúcida", tesis (Químico Farmacéutico) Facultad de Ciencias Químicas y farmacia, USAC. 1989.
- Schuster, R. Chromatographia, 13 (7), 379 (1980).
- Siegel, R.K. et al. On the use of Tagetes lúcida and Nicotiana rústica as a huichol smoking mixture: the aztec "Yahutli" with suggestive hallucinogenic effects: Economic Botany; 1976, 3: 16.23.
- Sodeman, W. Pathologic Physiology: mechanisms of disease; W.B. Saunders: Philadelphia, 1950; 262 pp.
- Standley, P.C. "Flora of the Lancetilla Valley of Honduras"; Field Museum of Natural History. Botanical Series. Field Museum Press. Vol. X., 1931.

Taylor, J. R. "An introduction to error analysis, the study of uncertainties in physical measurements"; University Science Books Oxford University Press: Oxford, 1982.

"The National Formulary" Sixteenth edition; United States Pharmacopeial Convention, Inc: Washington D.C., 1985.

"The United States Pharmacopeia", Twenty first revision; United States Pharmacopeial Convention, Inc: Washington D.C., 1985.

Vande Casteele, K et al. Jour. of Chrom., 258 111-124 pp. (1983).

Weast R. "CRC Handbook of Chemistry and Physics", 58th ed.; CRC Press Inc.: Cleveland Ohio, 1976.

Winer, B. J. "Statistical principles in experimental desing", 2nd edition; McGraw-Hill Book Co.: N. Y., 1971.

NOTA: Se consultó el Chemical Abstracts desde el Vol. 68 hasta el 98.

APENDICES

APENDICE A

FORMULAS Y PROGRAMAS DE ANALISIS DE VARIANZA UTILIZADOS:

1. Análisis de varianza bifactorial con bloques al azar y con submuestreo (winer, 1971)

Sean:

A primer factor con p niveles (subíndice i)

B segundo factor con q niveles (subíndice j)

C variable de bloqueo con r niveles (subíndice K)

Cada tratamiento ABC ijk con m mediciones (subíndice n)

En este trabajo A es el lugar de recolección, B es la parte de la planta (factor fijo) y C es el tiempo de extracción y m el número de inyecciones en el cromatógrafo de cada extracción.

Las fórmulas para las sumas de cuadros son:

$$SS_a = nqr \sum_i (\bar{A}_i - \bar{G})^2 = (3) - (1)$$

$$SS_b = npr \sum_j (\bar{B}_j - \bar{G})^2 = (4) - (1)$$

$$SS_c = npq \sum_k (\bar{C}_k - \bar{G})^2 = (5) - (1)$$

$$\begin{aligned} SS_{ab} &= nr \sum_{ij} (\bar{AB}_{ij} - \bar{A}_i - \bar{B}_j + \bar{G})^2 \\ &= nr \sum_{ij} (\bar{AB}_{ij} - \bar{G})^2 - SS_a - SS_b = (6) - (3) - (4) + (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} SS_{ac} &= nq \sum_{ik} (\bar{AC}_{ik} - \bar{A}_i - \bar{C}_k + \bar{G})^2 \\ &= nq \sum_{ik} (\bar{AC}_{ik} - \bar{G})^2 - SS_a - SS_c = (7) - (3) - (5) + 1 \end{aligned}$$

$$SS_{bc} = np \sum_{jk} (\overline{BC}_{jk} - \overline{B}_j - \overline{C}_k + \overline{G})^2$$

$$= np \sum_{jk} (\overline{BC}_{jk} - \overline{G})^2 - SS_b - SS_c = (8) - (4) - (5) + (1)$$

$$SS_{abc} = n \sum_{ijk} (\overline{ABC}_{ijk} - \overline{AB}_{ij} - \overline{AC}_{ik} - \overline{BC}_{jk} + \overline{A}_i + \overline{B}_j + \overline{C}_k - \overline{G})^2$$

$$= n \sum_{ijk} (\overline{ABC}_{ijk} - \overline{G})^2 - SS_{ab} - SS_{ac} - SS_{bc} - SS_a - SS_b - SS_c$$

$$= (9) - (6) - (7) - (8) + (3) + (4) + (5) - (1)$$

$$SS_{w\text{ cell}} = \sum_{ijkm} (X_{ijkm} - \overline{ABC}_{ijk})^2 = (2) - (9)$$

$$SS_{TOTAL} = \sum_{ijkm} (X_{ijkm} - \overline{G})^2 = (2) - (1)$$

donde:

$$(1) = G^2 / npqr = \left[\sum_i \sum_j \sum_k \sum_m X_{ijkm} \right]^2 / npqr$$

$$(2) = \sum X_{ijkm}^2 = \sum_i \sum_j \sum_k \sum_m X_{ijkm}^2$$

$$(3) = (\sum A_i^2) / nqr = \left[\sum_i \left(\sum_j \sum_k \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / nqr$$

$$(4) = (\sum B_j^2) / npr = \left[\sum_j \left(\sum_i \sum_k \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / npr$$

$$(5) = (\sum C_k^2) / npq = \left[\sum_k \left(\sum_i \sum_j \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / npq$$

$$(6) = \left[\sum (AB_{ij})^2 \right] / nr = \left[\sum_i \sum_j \left(\sum_k \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / nr$$

$$(7) = \left[\sum (AC_{ik})^2 \right] / nq = \left[\sum_i \sum_k \left(\sum_j \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / nq$$

$$(8) = \left[\sum (BC_{jk})^2 \right] / np = \left[\sum_j \sum_k \left(\sum_i \sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / np$$

$$(9) = \left[\sum (ABC_{ijk})^2 \right] / n = \left[\sum_i \sum_j \sum_k \left(\sum_m X_{ijkm} \right)^2 \right] / n$$

Y para los grados de libertad se tiene:

$$gl_a = (p-1)$$

$$gl_b = (q-1)$$

$$gl_c = (r-1)$$

$$gl_{ab} = (p-1)(q-1)$$

$$gl_{ac} = (p-1)(r-1)$$

$$gl_{bc} = (q-1)(r-1)$$

$$gl_{abc} = (p-1)(q-1)(r-1)$$

$$gl_{error} = pqr(n-1)$$

$$gl_{total} = pqrn - 1$$

Para el cuadro medio se tiene $CM = \frac{SS}{gl}$

A continuación se presenta un listado del programa con una corrida del mismo, para cada conjunto de datos con que se utilizó en este trabajo.

listado de WWANOVA.PAS

PROGRAM ANOVA(INPUT,OTPUT);

```

{*****}
* Programa que calcula el analisis de varianza para un experimento tri- *
* factorial con submuestreo. los tres factores pueden tener 6, 3 y 3 ni- *
* veles como máximo respectivamente. El número de submuestras puede ser *
* de 3 como máximo. (sise desea mayor capacidad, se puede cambiar la di- *
* mensión del arreglo X). *
* Tiene la posibilidad de ingresar datos, verlos, corregirlos, calcular *
* el analisis de varianza, viendo los datos, y de imprimirlos; todo esto *
* se selecciona por medio de un menú. *
* Autor: Guillermo Alvarez Monzon *
* Fecha: 1 Septiembre 1989 *
* tiene los siguientes procedimientos: *
* MENSAJE *
* POSICON *
* MENU *
* INGRESAR *
* MUESTRA *
* CAMBIA *
* IMPRIME_RES *
* IMPRIME_TABLA *
* CALCULA *
*****}

```

```

VAR
P,Q,R,N: INTEGER;           {Subindices}
I,J,K,M: INTEGER;          {Subindices}
X: ARRAY[1..6,1..3,1..3,1..3]OF REAL; {arreglo de las mediciones}
INGRESADO: BOOLEAN;        {indica si se ingresaron datos}
CALCULADO: BOOLEAN;        {indica si se calcularon datos}
OPCION: INTEGER;           {opción del menú}
CUADSUMTOT: REAL;          {sumatoria para calcular SS's}
SUMTOT: REAL;              {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADA: REAL;            {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADB: REAL;            {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADC: REAL;            {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADAB: REAL;          {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADBC: REAL;          {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADAC: REAL;          {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADABC: REAL;         {sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADTOT: REAL;         {sumatoria para calcular SS's}
SSA: REAL;                 {SS = suma de cuadrados}
SSB: REAL;                 {SS = suma de cuadrados}
SSC: REAL;                 {SS = suma de cuadrados}
SSAB: REAL;                {SS = suma de cuadrados}
SSBC: REAL;                {SS = suma de cuadrados}
SSAC: REAL;                {SS = suma de cuadrados}
SSABC: REAL;               {SS = suma de cuadrados}
SSE: REAL;                 {SS = suma de cuadrados}
SSTOT: REAL;               {SS = suma de cuadrados}
GLA: INTEGER;              {GL = grados de libertad}
GLB: INTEGER;              {GL = grados de libertad}
GLC: INTEGER;              {GL = grados de libertad}
GLAB: INTEGER;             {GL = grados de libertad}
GLBC: INTEGER;             {GL = grados de libertad}
GLAC: INTEGER;             {GL = grados de libertad}
GLABC: INTEGER;           {GL = grados de libertad}
GLE: INTEGER;              {GL = grados de libertad}
GLTOT: INTEGER;           {GL = grados de libertad}
MSA: REAL;                 {MS = cuadrados medios}

```

listado de WWANOVA.PAS

```
MSB: REAL;           {MS = cuadrados medios}
MSC: REAL;           {MS = cuadrados medios}
MSAB: REAL;          {MS = cuadrados medios}
MSEC: REAL;          {MS = cuadrados medios}
MSAC: REAL;          {MS = cuadrados medios}
MSAEC: REAL;         {MS = cuadrados medios}
MSE: REAL;           {MS = cuadrados medios}
```

```
PROCEDURE POSICION; {*****}
* Procedimiento que borra la pantalla y posiciona el cursor. Es utilizado *
* por los procedimientos MENSAJE, MENU, INGRESAR, CAMBIA, CALCULA, MUESTRA*
* e IMPRIME_TABLA. *
*****}
BEGIN
  CLRSCR;
  GOTOXY(10,10);
  WRITELN;
END;
```

```
PROCEDURE MENU; {*****}
* Procedimiento que muestra un menú con opciones y revisa si es válida la *
* opción antes de aceptarla. Es utilizado por el programa principal. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  WRITELN;
  WRITELN('          MENU:');
  WRITELN('1: INGRESAR DATOS');
  WRITELN('2: VER DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('3: EDITAR DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('4: CALCULAR ANALISIS DE VARIANZA');
  WRITELN('5: IMPRIMIR DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('6: IMPRIMIR RESULTADOS DE ANOVA');
  WRITELN('7: TERMINAR AL PROGRAMA');
  WRITELN;
  WRITE('          INGRESE OPCION:');
  READLN(OPCION);
  WHILE (7 < OPCION) OR (OPCION < 1) DO
  BEGIN
    WRITELN(CHR(07), 'OPCION INVALIDA, INGRESE OPCION');
    READLN(OPCION)
  END
END;
```

```
PROCEDURE MENSAJE; {*****}
* Procedimiento que avisa al usuario que debe alistar la impresora antes *
* de seguir corriendo el programa. Es utilizado por los procedimientos *
* IMPRIME_RES e IMPRIME_TABLA. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  WRITELN('ALISTE LA IMPRESORA Y OPRIMA RETURN');
  READLN
END;
```

```
PROCEDURE INGRESAR; {*****}
```

listado de WWANOVA.PAS

* Procedimiento por el cual se ingresan los datos. Es utilizado por el *
 * programa principal. *

*****}

```

BEGIN
  POSICION;
  WRITE('      NIVELES DEL PRIMER FACTOR: P=? ');
  READLN(P);
  WRITE('      NIVELES DEL SEGUNDO FACTOR: Q=? ');
  READLN(Q);
  WRITE('      NIVELES DEL TERCER FACTOR: R=? ');
  READLN(R);
  WRITE('      NUMERO DE OBSERVACIONES POR MUESTRA: N=? ');
  READLN(N);
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR K:= 1 TO R DO
      BEGIN
        FOR M:= 1 TO N DO
        BEGIN
          WRITE('X('I','J','K','M')= ? ');
          READLN(X[I,J,K,M])
        END
      END
    END
  END;
  INGRESADO:=TRUE
END;
```

PROCEDURE MUESTRA;{*****}

* Procedimiento que muestra en la pantalla los datos ingresados. Es uti- *
 * lizado por el programa principal. *

*****}

```

BEGIN
  POSICION;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR K:= 1 TO R DO
      BEGIN
        FOR M:= 1 TO N DO
        BEGIN
          WRITE('  X('I','J','K','M')= ', X[I,J,K,M]:5:2);
          END;
          WRITELN
        END
      END
    END
  END
END;
```

PROCEDURE CAMBIA;{*****}

* Procedimiento que permite cambiar los datos ingresados, utiliza como *
 * clave de parada el -99. Es utilizado por el programa principal *

*****}

```

BEGIN
  POSICION;
```

```

REPEAT
  WRITE('I=? CLAVE DE PARADA I= -99 ');
  READLN(I);
  WRITE('J=? ');
  READLN(J);
  WRITE('K=? ');
  READLN(K);
  WRITE('M=? ');
  READLN(M);
  WRITE('VALOR DE X('I',' ','J',' ','K',' ','M,')= ? ');
  READLN(X[I,J,K,M])
UNTIL I= -99
END;

```

```

PROCEDURE IMPRIME_RES;{*****}
* Procedimiento que imprime resultados en la impresora, lo llama el pro- *
* grama principal. *
*****}

```

```

BEGIN
  MENSAJE;
  WRITELN(LST, 'SSA = ', SSA:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSB = ', SSB:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSC = ', SSC:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSAB = ', SSAB:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSBC = ', SSB:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSAC = ', SSAC:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSABC = ', SSABC:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSE = ', SSE:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSTOT = ', SSTOT:7:3);
  WRITELN(LST, 'GLA = ', GLA);
  WRITELN(LST, 'GLB = ', GLB);
  WRITELN(LST, 'GLC = ', GLC);
  WRITELN(LST, 'GLAB = ', GLAB);
  WRITELN(LST, 'GLBC = ', GLBC);
  WRITELN(LST, 'GLAC = ', GLAC);
  WRITELN(LST, 'GLABC = ', GLABC);
  WRITELN(LST, 'GLE = ', GLE);
  WRITELN(LST, 'GLTOT = ', GLTOT);
  WRITELN(LST, 'MSA = ', MSA:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSB = ', MSB:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSC = ', MSC:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSAB = ', MSAB:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSBC = ', MSBC:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSAC = ', MSAC:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSABC = ', MSABC:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSE = ', MSE:7:3);

```

```

END;

```

```

PROCEDURE IMPRIME_TABLA;{*****}
* Procedimiento que imprime por medio de la impresora la tabla de los da-*
* tos ingresados. Lo llama el programa principal. *
*****}

```

```

BEGIN
  MENSAJE;
  FOR I:= 1 TO P DO
    BEGIN
      FOR J:= 1 TO Q DO
        BEGIN;

```

listado de WWANOVA.PAS

```

FOR K:= 1 TO R DO
BEGIN
  FOR M:= 1 TO N DO
  BEGIN
    WRITE(LST, '      X(' , I, ', ', ' , J, ', ', ' , K, ', ', ' , M, ') = ', X[I,J,K,M]:5:2);
  END;
  WRITELN(LST);
END
END
END
END;

```

```

PROCEDURE CALCULA; {*****}
* Procedimiento que hace los cálculos del análisis de varianza. Lo llama *
* el programa principal. *
*****}

```

```

VAR
  ACUMULA:REAL;
  ACUMULADO:REAL;
BEGIN
  SUMCUADABC:= 0;
  SUMCUADTOT:= 0;
  SUMTOT:=0;
  ACUMULA:= 0;
  ACUMULADO:= 0;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN;
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR K:= 1 TO R DO
      BEGIN;
        FOR M:= 1 TO N DO
        BEGIN;
          SUMTOT:= SUMTOT + X[I,J,K,M];
          SUMCUADTOT:= SUMCUADTOT + SQR(X[I,J,K,M]);
          ACUMULA:= ACUMULA + X[I,J,K,M]
        END;
        SUMCUADABC:= SUMCUADABC + SQR(ACUMULA);
        ACUMULA:= 0
      END
    END
  END;
  CUADSUMTOT:= SQR(SUMTOT)/(N*P*Q*R);
  SUMCUADABC:= SUMCUADABC/N;
  SUMCUADA:= 0;
  SUMCUADAB:= 0;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN;
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR K:= 1 TO R DO
      BEGIN;
        FOR M:= 1 TO N DO
        BEGIN;
          ACUMULA:= ACUMULA + X[I,J,K,M];
          ACUMULADO:= ACUMULADO + X[I,J,K,M]
        END
      END
    END
  END;
  SUMCUADAB:= SUMCUADAB + SQR(ACUMULADO);

```

listado de WWANOVA.PAS

```

ACUMULADO:= 0
END;
SUMCUADA:= SUMCUADA + SQR(ACUMULA);
ACUMULA:= 0
END;
SUMCUADA:= SUMCUADA / (N*Q*R);
SUMCUADAB:= SUMCUADAB / (N*R);
SUMCUADB:= 0;
SUMCUADEC:= 0;
FOR J:= 1 TO Q DO
BEGIN;
  FOR K:= 1 TO R DO
  BEGIN;
    FOR I:= 1 TO P DO
    BEGIN;
      FOR M:= 1 TO N DO
      BEGIN;
        ACUMULA:= ACUMULA + X[I,J,K,M];
        ACUMULADO:= ACUMULADO + X[I,J,K,M]
      END
    END;
    SUMCUADEC:= SUMCUADEC + SQR(ACUMULADO);
    ACUMULADO:= 0
  END;
  SUMCUADB:= SUMCUADB + SQR(ACUMULA);
  ACUMULA:= 0
END;
SUMCUADB:= SUMCUADB / (N*P*R);
SUMCUADEC:= SUMCUADEC / (N*P);
SUMCUADC:= 0;
SUMCUADAC:= 0;
FOR K:= 1 TO R DO
BEGIN;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN;
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR M:= 1 TO N DO
      BEGIN;
        ACUMULA:= ACUMULA + X[I,J,K,M];
        ACUMULADO:= ACUMULADO + X[I,J,K,M]
      END
    END;
    SUMCUADAC:= SUMCUADAC + SQR(ACUMULADO);
    ACUMULADO:= 0
  END;
  SUMCUADC:= SUMCUADC + SQR(ACUMULA);
  ACUMULA:= 0
END;
SUMCUADC:= SUMCUADC / (N*P*Q);
SUMCUADAC:= SUMCUADAC / (N*Q);
SSA:= SUMCUADA - CUADSUMTOT;
SSB:= SUMCUAEB - CUADSUMTOT;
SSC:= SUMCUADC - CUADSUMTOT;
SSAB:= SUMCUADAB - SUMCUADA - SUMCUAEB + CUADSUMTOT;
SSBC:= SUMCUADEC - SUMCUAEB - SUMCUADC + CUADSUMTOT;
SSAC:= SUMCUADAC - SUMCUADA - SUMCUADC + CUADSUMTOT;
SSABC:= SUMCUADABC - SUMCUADAB - SUMCUADEC - SUMCUADAC +
  SUMCUADA + SUMCUAEB + SUMCUADC - CUADSUMTOT;
SSE:= SUMCUADTOT - SUMCUADABC;

```

listado de WWANOVA.PAS

```

SSTOT:= SUMCUADTOT - CUADSUMTOT;
GLA:= P-1;
GLB:= Q-1;
GLC:= R-1;
GLAB:= (P-1)*(Q-1);
GLBC:= (Q-1)*(R-1);
GLAC:= (P-1)*(R-1);
GLABC:= (P-1)*(Q-1)*(R-1);
GLE:= P*Q*R*(N-1);
GLTOT:= (P*Q*R*N)-1;
MSA:= SSA / GLA;
MSB:= SSB / GLB;
MSC:= SSC / GLC;
MSAB:=SSAB / GLAB;
MSBC:=SSBC / GLBC;
MSAC:=SSAC / GLAC;
MSABC:= SSABC / GLABC;
MSE:= SSE / GLE;
CALCULADO := TRUE;
POSICION;
WRITELN('SSA = ',SSA:7:3);
WRITELN('SSB = ',SSB:7:3);
WRITELN('SSC = ',SSC:7:3);
WRITELN('SSAB = ',SSAB:7:3);
WRITELN('SSBC = ',SSBC:7:3);
WRITELN('SSAC = ',SSAC:7:3);
WRITELN('SSABC = ',SSABC:7:3);
WRITELN('SSE = ',SSE:7:3);
WRITELN('SSTOT = ',SSTOT:7:3);
WRITELN('GLA = ',GLA);
WRITELN('GLB = ',GLB);
WRITELN('GLC = ',GLC);
WRITELN('GLAB = ',GLAB);
WRITELN('GLBC = ',GLBC);
WRITELN('GLAC = ',GLAC);
WRITELN('GLABC = ',GLABC);
WRITELN('GLE = ',GLE);
WRITELN('GLTOT = ',GLTOT);
WRITELN('MSA = ',MSA:7:3);
WRITELN('MSB = ',MSB:7:3);
WRITELN('MSC = ',MSC:7:3);
WRITELN('MSAB = ',MSAB:7:3);
WRITELN('MSBC = ',MSBC:7:3);
WRITELN('MSAC = ',MSAC:7:3);
WRITELN('MSABC = ',MSABC:7:3);
WRITELN('MSE = ',MSE:7:3);
END;

{PROGRAMA PRINCIPAL*****}
* Consta principalmente de un case que permite al usuario seleccionar lo *
* que desea hacer del menú. *
*****}
BEGIN
  INGRESADO:=FALSE;
  CALCULADO:=FALSE;
  REPEAT
    MENU;
  CASE OPCION OF
    1: INGRESAR;
    2: IF INGRESADO

```

listado de WWANOVA.PAS

```
      THEN MUESTRA
      ELSE WRITELN(CHR(07), 'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
3: IF INGRESADO
      THEN CAMBIA
      ELSE WRITELN(CHR(07), 'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
4: IF INGRESADO
      THEN CALCULA
      ELSE WRITELN(CHR(07), 'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
5: IF INGRESADO
      THEN IMPRIME_TABLA
      ELSE WRITELN(CHR(07), 'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
6: IF CALCULADO
      THEN IMPRIME_RES
      ELSE WRITELN(CHR(07), 'NO SE HAN CALCULADO DATOS');
7: {Sale del menu y termina programa}
END;
WRITELN('OPRIMA RETURN PARA CONTINUAR');
READLN;
UNTIL OPCION = 7
END.
```

X(1,1,1,1)=	1.23	X(1,1,1,2)=	1.26	X(1,1,1,3)=	1.26
X(1,1,2,1)=	2.72	X(1,1,2,2)=	2.66	X(1,1,2,3)=	2.67
X(1,1,3,1)=	1.61	X(1,1,3,2)=	1.73	X(1,1,3,3)=	1.69
X(1,2,1,1)=	1.27	X(1,2,1,2)=	1.55	X(1,2,1,3)=	1.30
X(1,2,2,1)=	0.83	X(1,2,2,2)=	0.89	X(1,2,2,3)=	0.88
X(1,2,3,1)=	1.03	X(1,2,3,2)=	0.91	X(1,2,3,3)=	0.88
X(1,3,1,1)=	0.20	X(1,3,1,2)=	0.20	X(1,3,1,3)=	0.20
X(1,3,2,1)=	0.31	X(1,3,2,2)=	0.33	X(1,3,2,3)=	0.33
X(1,3,3,1)=	0.34	X(1,3,3,2)=	0.32	X(1,3,3,3)=	0.33
X(2,1,1,1)=	3.39	X(2,1,1,2)=	3.50	X(2,1,1,3)=	3.44
X(2,1,2,1)=	3.21	X(2,1,2,2)=	3.37	X(2,1,2,3)=	3.17
X(2,1,3,1)=	2.93	X(2,1,3,2)=	3.30	X(2,1,3,3)=	3.35
X(2,2,1,1)=	1.41	X(2,2,1,2)=	1.55	X(2,2,1,3)=	1.41
X(2,2,2,1)=	0.86	X(2,2,2,2)=	0.85	X(2,2,2,3)=	0.88
X(2,2,3,1)=	1.34	X(2,2,3,2)=	1.31	X(2,2,3,3)=	1.63
X(2,3,1,1)=	0.18	X(2,3,1,2)=	0.18	X(2,3,1,3)=	0.18
X(2,3,2,1)=	0.26	X(2,3,2,2)=	0.28	X(2,3,2,3)=	0.25
X(2,3,3,1)=	0.22	X(2,3,3,2)=	0.22	X(2,3,3,3)=	0.22
X(3,1,1,1)=	2.33	X(3,1,1,2)=	2.40	X(3,1,1,3)=	2.58
X(3,1,2,1)=	2.33	X(3,1,2,2)=	2.49	X(3,1,2,3)=	2.69
X(3,1,3,1)=	2.64	X(3,1,3,2)=	2.58	X(3,1,3,3)=	2.12
X(3,2,1,1)=	1.64	X(3,2,1,2)=	1.29	X(3,2,1,3)=	1.36
X(3,2,2,1)=	1.64	X(3,2,2,2)=	1.42	X(3,2,2,3)=	1.63
X(3,2,3,1)=	1.53	X(3,2,3,2)=	1.54	X(3,2,3,3)=	1.66
X(3,3,1,1)=	0.28	X(3,3,1,2)=	0.30	X(3,3,1,3)=	0.27
X(3,3,2,1)=	0.28	X(3,3,2,2)=	0.31	X(3,3,2,3)=	0.30
X(3,3,3,1)=	0.29	X(3,3,3,2)=	0.28	X(3,3,3,3)=	0.28

SSA = 3.769
SSB = 70.351
SSC = 0.065
SSAB = 6.465
SSBC = 1.446
SSAC = 0.874
SSABC = 2.178
SSE = 0.654
SSTOT = 85.802
GLA = 2
GLB = 2
GLC = 2
GLAB = 4
GLBC = 4
GLAC = 4
GLABC = 8
GLE = 54
GLTOT = 80
MSA = 1.885
MSB = 35.175
MSC = 0.033
MSAB = 1.616
MSBC = 0.362
MSAC = 0.218
MSABC = 0.272
MSE = 0.012

2. Análisis de varianza bifactorial con número de submuestreo desigual (winer, 1971)

Sean:

A primer factor con p niveles (subíndice i)

B segundo factor con q niveles (subíndice j)

Cada tratamiento con n_{ij} número de submuestras.

En este trabajo A es el lugar de recolección y B es la parte de la planta. Se tiene n_{ij} mediciones para cada combinación del i-ésimo lugar y j-ésima parte de la planta.

Además se usó el mismo programa para generar resultados de un análisis de varianza bifactorial con número de muestras iguales.

Las fórmulas para las sumas de cuadros son:

$$SS_a = n_h [(3)-(1)]$$

$$SS_b = n_h [(4)-(1)]$$

$$SS_{ab} = n_h [(5)-(3)-(4) + (1)]$$

$$SS_{error} = \sum_i \sum_j SS_{ij} = (2)$$

donde:

$$(1) = G^2/pq = \left[\sum_i \sum_j \left(\frac{\sum_m x_{ijm}}{n_{ij}} \right) \right]^2 / pq$$

$$(2) = \sum_i \sum_j SS_{ij}$$

$$(3) = \left(\sum_i \bar{A}_i^2 \right) / q = \left\{ \sum_i \left[\sum_j \left(\frac{\sum_m x_{ijm}}{n_{ij}} \right) \right]^2 \right\} / q$$

$$(4) = \left(\sum_j \bar{B}_j^2 \right) / p = \left\{ \sum_j \left[\sum_i \left(\frac{\sum_m x_{ijm}}{n_{ij}} \right) \right]^2 \right\} / p$$

$$(5) = \left(\sum_{ij} \bar{AB}_{ij}^2 \right) = \left[\sum_i \sum_j \left(\frac{\sum_m x_{ijm}}{n_{ij}} \right)^2 \right]$$

donde

$$SS_{ij} = \sum_m X_{ijm}^2 - \frac{(\sum_m X_{ijm})^2}{n_{ij}}$$

$$n_h = \frac{pq}{\sum_i \sum_j (1/n_{ij})}$$

y los grados de libertad son:

$$gla = p-1$$

$$glb = q-1$$

$$glab = (p-1)(q-1)$$

$$gle = \sum_{ij} (n_{ij}-1)$$

A continuación se presenta un listado del programa con un corrida del mismo, para cada conjunto de datos con que se utilizó en este trabajo.

PROGRAM ANOVA(INPUT,OTPUT);

```
{*****}
* Programa que calcula el analisis de varianza para un experimento bi- *
* factorial con submuestreo. los dos factores pueden tener 6 y 3 niveles *
* como máximo respectivamente. El número de submuestras puede ser variado *
* para cada tratamiento y tener 10 como máximo. (si se desea mayor capaci- *
* dad, se puede cambiar la dimensión del arreglo X). *
* Tiene la posibilidad de ingresar datos, verlos, corregirlos, calcular *
* el analisis de varianza, viendo los datos, y de imprimirlos; todo esto *
* se selecciona por medio de un menú. *
* Autor: Guillermo Alvarez Monzon *
* Fecha: 1 Septiembre 1989 *
* tiene los siguientes procedimientos: *
*          MENSAJE *
*          POSICON *
*          MENU *
*          INGRESAR *
*          MUESTRA *
*          CAMBIA *
*          IMPRIME_RES *
*          IMPRIME_TABLA *
*          CALCULA *
{*****}
```

VAR

P,Q: INTEGER;	{Subindices}
I,J,M: INTEGER;	{Subindices}
N: ARRAY[1..6,1..4] OF INTEGER;	{Subindices}
SN: INTEGER;	{Suma de # de muestras}
NH: REAL;	{Número de muestras ponderado}
SX:ARRAY[1..6,1..4] OF REAL;	{Suma de X}
SSX:ARRAY[1..6,1..4] OF REAL;	{Suma de cuad. de tratamiento}
SX2:ARRAY[1..6,1..4] OF REAL;	{Suma de x^2}
MX:ARRAY[1..6,1..4] OF REAL;	{Media de tratamiento}
X: ARRAY[1..6,1..4,1..10]OF REAL;	{arreglo de las mediciones}
INGRESADO:BOOLEAN;	{indica si se ingresaron datos}
CALCULADO:BOOLEAN;	{indica si se calcularon datos}
OPCION: INTEGER;	{opcion del menu}
CUADSUMTOT: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SUMTOT: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADA: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADB: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADAB: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SUMCUADTOT: REAL;	{sumatoria para calcular SS's}
SSA: REAL;	{SS = suma de cuadrados}
SSB: REAL;	{SS = suma de cuadrados}
SSAB: REAL;	{SS = suma de cuadrados}
SSE: REAL;	{SS = suma de cuadrados}
SSTOT: REAL;	{SS = suma de cuadrados}
GLA: INTEGER;	{GL = grados de libertad}
GLB: INTEGER;	{GL = grados de libertad}
GLAB: INTEGER;	{GL = grados de libertad}
GLE: INTEGER;	{GL = grados de libertad}
GLTOT: INTEGER;	{GL = grados de libertad}
MSA: REAL;	{MS = cuadrados medios}
MSB: REAL;	{MS = cuadrados medios}
MSAB: REAL;	{MS = cuadrados medios}
MSE: REAL;	{MS = cuadrados medios}

listado de WANOVA2.PAS

```

PROCEDURE POSICION;{*****}
* Procedimiento que borra la pantalla y posiciona el cursor. Es utilizado *
* por los procedimientos MENSAJE, MENU, INGRESAR, CAMBIA, CALCULA, MUESTRA*
* e IMPRIME_TABLA. *
*****}
BEGIN
  CLRSCR;
  GOTOXY(10,10);
  WRITELN
END;

```

```

PROCEDURE MENU;{*****}
* Procedimiento que muestra un menú con opciones y revisa si es válida la *
* opción antes de aceptarla. Es utilizado por el programa principal. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  WRITELN;
  WRITELN('          MENU:');
  WRITELN('1: INGRESAR DATOS');
  WRITELN('2: VER DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('3: EDITAR DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('4: CALCULAR ANALISIS DE VARIANZA');
  WRITELN('5: IMPRIMIR DATOS INGRESADOS');
  WRITELN('6: IMPRIMIR RESULTADOS DE ANOVA');
  WRITELN('7: TERMINAR AL PROGRAMA');
  WRITELN;
  WRITE('          INGRESE OPCION:');
  READLN(OPCION);
  WHILE (7 < OPCION) OR (OPCION < 1) DO
  BEGIN
    WRITELN(CHR(07), 'OPCION INVALIDA, INGRESE OPCION');
    READLN(OPCION)
  END
END;

```

```

PROCEDURE MENSAJE;{*****}
* Procedimiento que avisa al usuario que debe alistar la impresora antes *
* de seguir corriendo el programa. Es utilizado por los procedimientos *
* IMPRIME_RES e IMPRIME_TABLA. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  WRITELN('ALISTE LA IMPRESORA Y OPRIMA RETURN');
  READLN
END;

```

```

PROCEDURE INGRESAR;{*****}
* Procedimiento por el cual se ingresan los datos. Es utilizado por el *
* programa principal. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  WRITE('          NIVELES DEL PRIMER FACTOR: P=? ');
  READLN(P);
  WRITE('          NIVELES DEL SEGUNDO FACTOR: Q=? ');
  READLN(Q);

```

```

FOR I:= 1 TO P DO
BEGIN
  FOR J:= 1 TO Q DO
  BEGIN;
    WRITE('          NUMERO DE OBSERVACIONES PARA P= ',I,', Q= ',J,',? ');
    READLN(N[I,J]);
    FOR M:= 1 TO N[I,J] DO
    BEGIN
      WRITE('X(',I,',',J,',',M,')= ? ');
      READLN(X[I,J,M])
    END
  END
END;
INGRESADO:=TRUE
END;

```

```

PROCEDURE MUESTRA;{*****}
* Procedimiento que muestra en la pantalla los datos ingresados. Es uti- *
* lizado por el programa principal. *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR M:= 1 TO N[I,J] DO
      BEGIN
        WRITE(' X(',I,',',J,',',M,')= ', X[I,J,M]:5:2);
      END;
      WRITELN
    END
  END
END;
END;

```

```

PROCEDURE CAMBIA;{*****}
* Procedimiento que permite cambiar los datos ingresados, utiliza como *
* clave de parada el -99. Es utilizado por el programa principal *
*****}
BEGIN
  POSICION;
  REPEAT
    WRITE('I=? CLAVE DE PARADA I= -99 ');
    READLN(I);
    WRITE('J=? ');
    READLN(J);
    WRITE('M=? ');
    READLN(M);
    WRITE('VALOR DE X(',I,',',J,',',M,')= ? ');
    READLN(X[I,J,M])
  UNTIL I= -99
END;

```

```

PROCEDURE IMPRIME_RES;{*****}
* Procedimiento que imprime resultados en la impresora, lo llama el pro- *
* grama principal. *
*****}

```

```

BEGIN
  MENSAJE;
  WRITELN(LST, '          Nij      SXij      SX^2ij      SSXij      Xij');
  WRITELN(LST, '=====');
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN;
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      WRITE(LST, ' I=', I, ' J=', J, '      ', N[I,J]);
      WRITE(LST, SX[I,J]:10:2, SX2[I,J]:10:2);
      WRITE(LST, SSX[I,J]:10:2, MX[I,J]:10:2);
      WRITELN(LST)
    END
  END;
  WRITELN(LST, 'SSA = ', SSA:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSB = ', SSB:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSAB = ', SSAB:7:3);
  WRITELN(LST, 'SSE = ', SSE:7:3);
  WRITELN(LST, 'GLA = ', GLA);
  WRITELN(LST, 'GLB = ', GLB);
  WRITELN(LST, 'GLAB = ', GLAB);
  WRITELN(LST, 'GLE = ', GLE);
  WRITELN(LST, 'MSA = ', MSA:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSB = ', MSB:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSAB = ', MSAB:7:3);
  WRITELN(LST, 'MSE = ', MSE:7:3);
END;

```

```

PROCEDURE IMPRIME_TABLA; {*****}
* Procedimiento que imprime por medio de la impresora la tabla de los da-
* tos ingresados. Lo llama el programa principal.
*
*****}

```

```

BEGIN
  MENSAJE;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN
    FOR J:= 1 TO Q DO
    BEGIN;
      FOR M:= 1 TO N[I,J] DO
      BEGIN
        WRITE(LST, ' X(', I, ', ', J, ', ', M, ')= ', X[I,J,M]:5:2);
      END;
      WRITELN(LST)
    END
  END
END;

```

```

PROCEDURE CALCULA; {*****}
* Procedimiento que hace los cálculos del análisis de varianza. Lo llama *
* el programa principal.
*
*****}

```

```

VAR
  ACUMULA: REAL;
BEGIN
  NH:= 0;
  SN:= 0;
  SUMTOT:= 0;
  SUMCUADAB:= 0;

```

```

SUMCUADA:= 0;
SUMCUADB:= 0;
SSE:= 0;
FOR I:= 1 TO P DO
BEGIN;
  ACUMULA:= 0;
  FOR J:= 1 TO Q DO
  BEGIN;
    SX[I,J]:= 0;
    SX2[I,J]:= 0;
    FOR M:= 1 TO N[I,J] DO
    BEGIN;
      SX[I,J]:= SX[I,J] + X[I,J,M];
      SX2[I,J]:= SX2[I,J] + SQR(X[I,J,M])
    END;
    SSX[I,J]:= SX2[I,J] - SQR(SX[I,J]) / N[I,J];
    MX[I,J]:= SX[I,J] / N[I,J];
    SSE:= SSE + SSX[I,J];
    NH:= NH + 1 / N[I,J];
    SN:= SN + N[I,J];
    SUMTOT:= SUMTOT + MX[I,J];
    SUMCUADAB:= SUMCUADAB + SQR(MX[I,J]);
    ACUMULA:=ACUMULA + MX[I,J]
  END;
  SUMCUADA:= SUMCUADA + SQR(ACUMULA)
END;
NH:= P * Q / NH;
CUADSUMTOT:= SQR(SUMTOT)/(P*Q);
SUMCUADA:= SUMCUADA / Q;
FOR J:= 1 TO Q DO
BEGIN;
  ACUMULA:= 0;
  FOR I:= 1 TO P DO
  BEGIN;
    ACUMULA:= ACUMULA + MX[I,J]
  END;
  SUMCUADB:= SUMCUADB + SQR(ACUMULA);
END;
SUMCUADB:= SUMCUADB / P;
SSA:= NH * (SUMCUADA - CUADSUMTOT);
SSB:= NH * (SUMCUADB - CUADSUMTOT);
SSAB:= NH * (SUMCUADAB - SUMCUADA - SUMCUADB + CUADSUMTOT);
GLA:= P-1;
GLB:= Q-1;
GLAB:= (P-1)*(Q-1);
GLE:= SN - (P*Q);
MSA:= SSA / GLA;
MSB:= SSB / GLB;
MSAB:=SSAB / GLAB;
MSE:= SSE / GLE;
CALCULADO := TRUE;
POSICION;
WRITELN('SSA = ',SSA:7:3);
WRITELN('SSB = ',SSB:7:3);
WRITELN('SSAB = ',SSAB:7:3);
WRITELN('SSE = ',SSE:7:3);
WRITELN('GLA = ',GLA);
WRITELN('GLB = ',GLB);
WRITELN('GLAB = ',GLAB);
WRITELN('GLE = ',GLE);

```

```
WRITELN('MSA = ',MSA:7:3);
WRITELN('MSB = ',MSB:7:3);
WRITELN('MSAB = ',MSAB:7:3);
WRITELN('MSE = ',MSE:7:3);
END;

{PROGRAMA PRINCIPAL*****}
* Consta principalmente de un case que permite al usuario seleccionar lo *
* que desea hacer del menú. *
*****}
BEGIN
  INGRESADO:=FALSE;
  CALCULADO:=FALSE;
  REPEAT
    MENU;
    CASE OPCION OF
      1:INGRESAR;
      2:IF INGRESADO
        THEN MUESTRA
        ELSE WRITELN(CHR(07),'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
      3:IF INGRESADO
        THEN CAMBIA
        ELSE WRITELN(CHR(07),'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
      4:IF INGRESADO
        THEN CALCULA
        ELSE WRITELN(CHR(07),'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
      5:IF INGRESADO
        THEN IMPRIME_TABLA
        ELSE WRITELN(CHR(07),'NO SE HAN INGRESADO DATOS');
      6:IF CALCULADO
        THEN IMPRIME_RES
        ELSE WRITELN(CHR(07),'NO SE HAN CALCULADO DATOS');
      7:{Sale del menu y termina programa}
    END;
    WRITELN('OPRIMA RETURN PARA CONTINUAR');
    READLN;
  UNTIL OPCION = 7
END.
```

X(1,1,1)=	9.56	X(1,1,2)=	9.29	X(1,1,3)=	8.91
X(1,2,1)=	9.08	X(1,2,2)=	9.94	X(1,2,3)=	9.15
X(1,3,1)=	7.90	X(1,3,2)=	8.31	X(1,3,3)=	7.19
X(2,1,1)=	8.41	X(2,1,2)=	9.12	X(2,1,3)=	8.95
X(2,2,1)=	8.70	X(2,2,2)=	9.82	X(2,2,3)=	8.92
X(2,3,1)=	6.94	X(2,3,2)=	7.32	X(2,3,3)=	7.30
X(3,1,1)=	6.73	X(3,1,2)=	7.18	X(3,1,3)=	8.01
X(3,2,1)=	7.26	X(3,2,2)=	7.41	X(3,2,3)=	7.59
X(3,3,1)=	7.85	X(3,3,2)=	6.53	X(3,3,3)=	6.08
X(4,1,1)=	6.84	X(4,1,2)=	6.03	X(4,1,3)=	8.43
X(4,2,1)=	7.91	X(4,2,2)=	8.05	X(4,2,3)=	8.83
X(4,3,1)=	7.19	X(4,3,2)=	7.27	X(4,3,3)=	6.69
X(5,1,1)=	6.83	X(5,1,2)=	7.79	X(5,1,3)=	7.84
X(5,2,1)=	8.35	X(5,2,2)=	8.84	X(5,2,3)=	7.32
X(5,3,1)=	8.16	X(5,3,2)=	8.81	X(5,3,3)=	6.85

		Nij	SXij	SX^2ij	SSXij	Xij
I=1	J=1	3	27.76	257.09	0.21	9.25
I=1	J=2	3	28.17	264.97	0.46	9.39
I=1	J=3	3	23.40	183.16	0.64	7.80
I=2	J=1	3	26.48	234.00	0.27	8.83
I=2	J=2	3	27.44	251.69	0.70	9.15
I=2	J=3	3	21.56	155.04	0.09	7.19
I=3	J=1	3	21.92	161.01	0.84	7.31
I=3	J=2	3	22.26	165.22	0.05	7.42
I=3	J=3	3	20.46	141.23	1.69	6.82
I=4	J=1	3	21.30	154.21	2.98	7.10
I=4	J=2	3	24.79	205.34	0.49	8.26
I=4	J=3	3	21.15	149.31	0.20	7.05
I=5	J=1	3	22.46	168.80	0.65	7.49
I=5	J=2	3	24.51	201.45	1.20	8.17
I=5	J=3	3	23.82	191.12	1.99	7.94

SSA = 15.873
 SSB = 9.443
 SSAB = 6.012
 SSE = 12.488
 GLA = 4
 GLB = 2
 GLAB = 8
 GLE = 30
 MSA = 3.968
 MSB = 4.722
 MSAB = 0.752
 MSE = 0.416

$X(1,1,1) = 0.94$ $X(1,1,2) = 0.98$ $X(1,1,3) = 0.94$ $X(1,1,4) = 0.98$ $X(1,1,5) = 0.95$ $X(1,1,6) = 1.00$ $X(1,1,7) = 1.08$ $X(1,1,8) = 1.07$ $X(1,1,9) = 1.03$
 $X(1,2,1) = 0.58$ $X(1,2,2) = 0.58$ $X(1,2,3) = 0.58$ $X(1,2,4) = 0.55$ $X(1,2,5) = 0.52$ $X(1,2,6) = 0.55$
 $X(1,3,1) = 0.12$ $X(1,3,2) = 0.13$ $X(1,3,3) = 0.13$ $X(1,3,4) = 0.11$ $X(1,3,5) = 0.09$ $X(1,3,6) = 0.11$ $X(1,3,7) = 0.18$ $X(1,3,8) = 0.15$ $X(1,3,9) = 0.18$
 $X(2,1,1) = 1.23$ $X(2,1,2) = 1.26$ $X(2,1,3) = 1.26$ $X(2,1,4) = 2.72$ $X(2,1,5) = 2.66$ $X(2,1,6) = 2.67$ $X(2,1,7) = 1.61$ $X(2,1,8) = 1.73$ $X(2,1,9) = 1.69$
 $X(2,2,1) = 1.27$ $X(2,2,2) = 1.55$ $X(2,2,3) = 1.30$ $X(2,2,4) = 0.83$ $X(2,2,5) = 0.89$ $X(2,2,6) = 0.88$ $X(2,2,7) = 1.03$ $X(2,2,8) = 0.91$ $X(2,2,9) = 0.88$
 $X(2,3,1) = 0.20$ $X(2,3,2) = 0.20$ $X(2,3,3) = 0.20$ $X(2,3,4) = 0.31$ $X(2,3,5) = 0.33$ $X(2,3,6) = 0.33$ $X(2,3,7) = 0.34$ $X(2,3,8) = 0.32$ $X(2,3,9) = 0.33$
 $X(3,1,1) = 3.39$ $X(3,1,2) = 3.50$ $X(3,1,3) = 3.44$ $X(3,1,4) = 3.21$ $X(3,1,5) = 3.37$ $X(3,1,6) = 3.17$ $X(3,1,7) = 2.93$ $X(3,1,8) = 3.30$ $X(3,1,9) = 3.35$
 $X(3,2,1) = 1.41$ $X(3,2,2) = 1.55$ $X(3,2,3) = 1.41$ $X(3,2,4) = 0.86$ $X(3,2,5) = 0.85$ $X(3,2,6) = 0.88$ $X(3,2,7) = 1.34$ $X(3,2,8) = 1.31$ $X(3,2,9) = 1.63$
 $X(3,3,1) = 0.18$ $X(3,3,2) = 0.18$ $X(3,3,3) = 0.18$ $X(3,3,4) = 0.26$ $X(3,3,5) = 0.28$ $X(3,3,6) = 0.25$ $X(3,3,7) = 0.22$ $X(3,3,8) = 0.22$ $X(3,3,9) = 0.22$
 $X(4,1,1) = 2.81$ $X(4,1,2) = 2.73$ $X(4,1,3) = 2.65$ $X(4,1,4) = 1.45$ $X(4,1,5) = 1.38$ $X(4,1,6) = 1.40$
 $X(4,2,1) = 1.39$ $X(4,2,2) = 1.35$ $X(4,2,3) = 1.38$ $X(4,2,4) = 1.09$ $X(4,2,5) = 1.24$ $X(4,2,6) = 1.42$ $X(4,2,7) = 1.63$ $X(4,2,8) = 1.61$ $X(4,2,9) = 1.37$
 $X(4,3,1) = 0.23$ $X(4,3,2) = 0.24$ $X(4,3,3) = 0.24$ $X(4,3,4) = 0.27$ $X(4,3,5) = 0.28$ $X(4,3,6) = 0.27$ $X(4,3,7) = 0.27$ $X(4,3,8) = 0.24$ $X(4,3,9) = 0.26$
 $X(5,1,1) = 2.33$ $X(5,1,2) = 2.40$ $X(5,1,3) = 2.58$ $X(5,1,4) = 2.33$ $X(5,1,5) = 2.49$ $X(5,1,6) = 2.69$ $X(5,1,7) = 2.64$ $X(5,1,8) = 2.58$ $X(5,1,9) = 2.12$
 $X(5,2,1) = 1.64$ $X(5,2,2) = 1.29$ $X(5,2,3) = 1.36$ $X(5,2,4) = 1.64$ $X(5,2,5) = 1.42$ $X(5,2,6) = 1.63$ $X(5,2,7) = 1.53$ $X(5,2,8) = 1.54$ $X(5,2,9) = 1.66$
 $X(5,3,1) = 0.28$ $X(5,3,2) = 0.30$ $X(5,3,3) = 0.27$ $X(5,3,4) = 0.28$ $X(5,3,5) = 0.31$ $X(5,3,6) = 0.30$ $X(5,3,7) = 0.29$ $X(5,3,8) = 0.28$ $X(5,3,9) = 0.22$

		Nij	SXij	SX ² ij	SSXij	Xij
I=1	J=1	9	8.97	8.96	0.02	1.00
I=1	J=2	6	3.36	1.88	0.00	0.56
I=1	J=3	9	1.20	0.17	0.01	0.13
I=2	J=1	9	16.83	34.73	3.26	1.87
I=2	J=2	9	9.54	10.62	0.51	1.06
I=2	J=3	9	2.56	0.76	0.03	0.28
I=3	J=1	9	29.66	97.98	0.24	3.30
I=3	J=2	9	11.24	14.78	0.75	1.25
I=3	J=3	9	1.99	0.45	0.01	0.22
I=4	J=1	6	12.42	28.34	2.63	2.07
I=4	J=2	9	12.48	17.53	0.22	1.39
I=4	J=3	9	2.30	0.59	0.00	0.26
I=5	J=1	9	22.16	54.83	0.27	2.46
I=5	J=2	9	13.71	21.03	0.15	1.52
I=5	J=3	9	2.59	0.75	0.00	0.29

SSA = 15.743
SSB = 76.373
SSAB = 12.957
SSE = 8.104
GLA = 4
GLB = 2
GLAB = 8
GLE = 114
MSA = 3.936
MSB = 38.187
MSAB = 1.620
MSE = 0.071

3. Análisis de varianza con número de réplicas desiguales (Hewlett Packard, 1984)

Las fórmulas para sumas de cuadrados son:

para n_i observaciones en cada muestra ($i = 1, 2, \dots, k$)

$$SS_{TOTAL} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

$$SS_{Trata} = \sum_{i=1}^k \frac{\left(\sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

$$SS_{error} = SS_{TOTAL} - SS_{Trat}$$

y para los grados de libertad:

$$gl_{Trat} = (k-1)$$

$$gl_{error} = \sum_{i=1}^k (n_i - 1)$$

$$gl_{TOTAL} = \left(\sum_{i=1}^k n_i \right) - 1$$

Se utilizó el programa AOVONE del módulo de estadística para calculadoras de la serie HP40

3. Contrastes ortogonales (Winer, 1971)

Definición: $\sum_{i=1}^k C_{1i} y_i$

es contraste, donde C_{1i} son los coeficientes del contraste 1 y y_i la sumatoria de las repeticiones para el i -ésimo tratamiento.

Dados los contrastes: $\sum_{i=1}^k C_{1i} y_i$ $\sum_{i=1}^k C_{2i} y_i$

si $\sum_{i=1}^k C_{1i} C_{2i} = 0$

Se les llama contrastes ortogonales.

La suma de cuadrados del contraste es: $SS_{\text{cont}} = \frac{(\sum_{i=1}^k c_i y_i)^2}{\sum_{i=1}^k r_i c_i^2}$

y el cuadrado medio del contraste: $\frac{SS_{\text{cont}}}{g_{\text{cont}}} = SS_{\text{cont}}$

y el estadístico F del contraste: $F = \frac{SS_{\text{cont}}}{SM_{\text{error}}}$

4. Prueba Tukey (Winer, 1971)

Prueba la diferencia entre todos los posibles pares de tratamientos, es muy exigente, poco sensible y de criterio drástico; es usada cuando el número de tratamientos es grande.

El comparador está dado por: $W = q_{\alpha}(t, g_{le}) \sqrt{\frac{SM_{ee}}{r}}$

donde: SM_{ee} = cuadrado medio del error experimental

r = número de repeticiones (o su media armónica)

q_{α} = valor de la distribución del estadístico de rango Studentizado (Q).

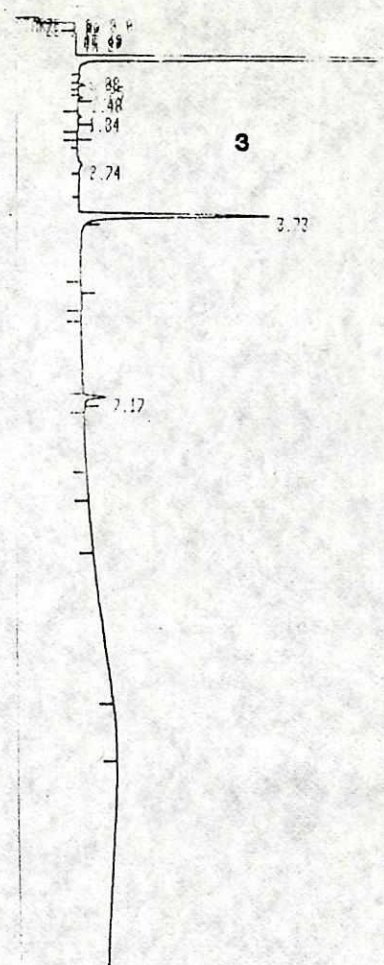
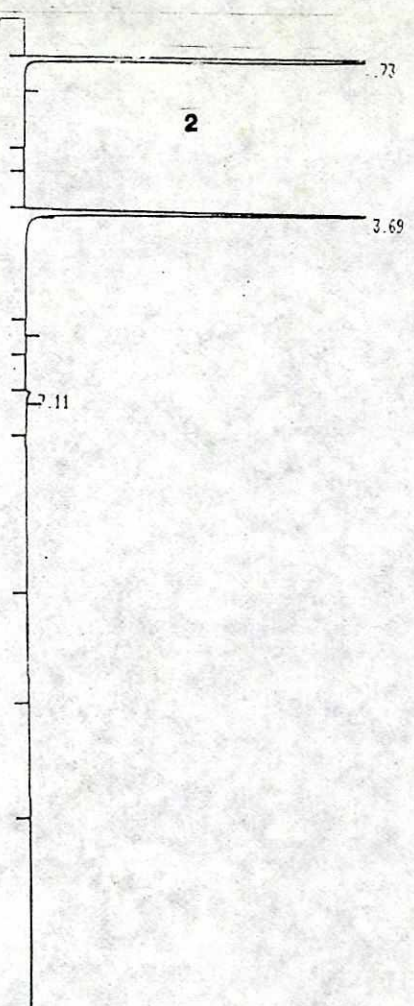
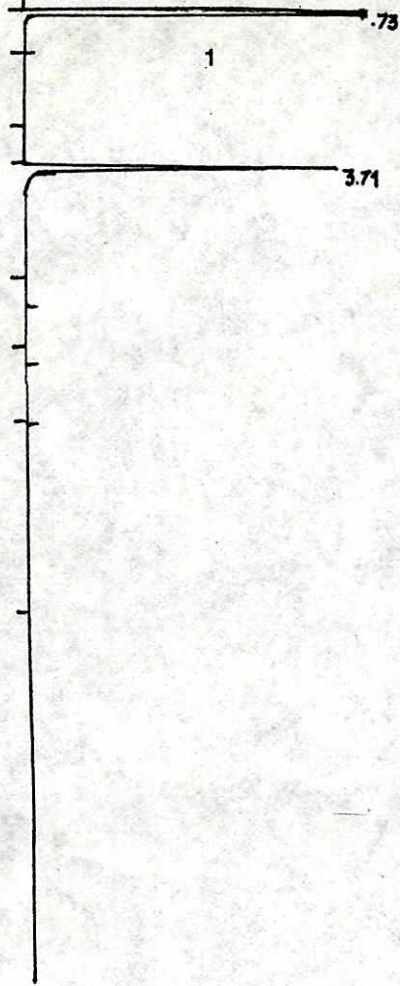
α : nivel de significancia

t : número de tratamientos

g_{le} : grados de libertad del error experimental

Se calcula la matriz de diferencias de medias (d); si d es mayor o igual que el estadístico de prueba (W), se tiene que la diferencia entre las medias de los tratamientos i y j es significativa.

Cromatogramas que se hicieron al implementar el método de Análisis.



RUN # 1
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:
 OCT/27/88 12:30:53

AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
6045E+07	SBB	0.034	98.041
3205E+0	PB	0.001	1.959

TOTAL AREA= 1.6756E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

RUN # 2
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:
 OCT/27/88 12:53:47

AREA%	RT	ARE	TYPE	AR/HT	AREA%
	0.73	1.5334E+07	SPB	0.032	96.688
	3.69	532260	PB	0.052	3.353
	7.11	6102	PB	0.072	0.038

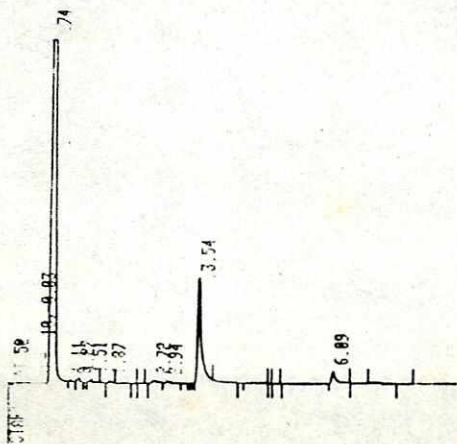
TOTAL AREA= 1.5873E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

RUN # 31
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:
 OCT/31/88 12:20:20

AREA%	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
	0.74	2.2725E+07	↑SBB	0.045	99.999
	1.08	2475	BP	0.048	0.001
	1.25	6411	PP	0.045	0.001
	1.48	4707	V8	0.044	0.001
	1.84	3309	PB	0.053	0.001
	2.74	9438	PV	0.119	0.001
	3.73	194970	PB	0.097	0.241
	7.17	26018	PB	0.050	0.111

TOTAL AREA= 2.2973E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

8



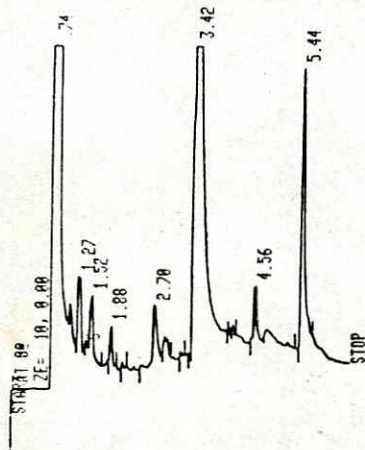
RUN # 22
 WORKFILE ID: C2
 WORKFILE NAME:

AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA
0.74	3.6354E+07	T888	0.072	98.867
1.11	3000	T888	0.055	0.008
1.27	10641	BV	0.072	0.023
1.51	9044	VB	0.078	0.025
1.87	4467	B8	0.052	0.012
2.72	11695	PV	0.106	0.032
2.94	6319	VP	0.127	0.017
3.54	334240	P8	0.078	0.909
6.89	37225	P8	0.086	0.101

TOTAL AREA= 3.6720E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

NOV/03/88 12:26:19

9



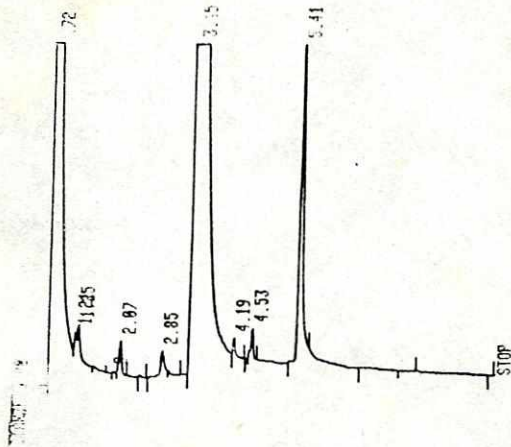
RUN # 23
 WORKFILE ID: C2
 WORKFILE NAME:

AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA
0.74	3.2241E+07	T888	0.064	99.288
1.27	6049	TP8	0.066	0.019
1.52	5260	VB	0.067	0.016
1.88	2540	B8	0.052	0.008
2.70	6340	PV	0.086	0.020
3.42	184010	P8	0.059	0.013
4.56	4149	BV	0.057	0.013
5.44	22735	P8	0.065	0.070

TOTAL AREA= 3.2472E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

NOV/03/88 12:49:23

10

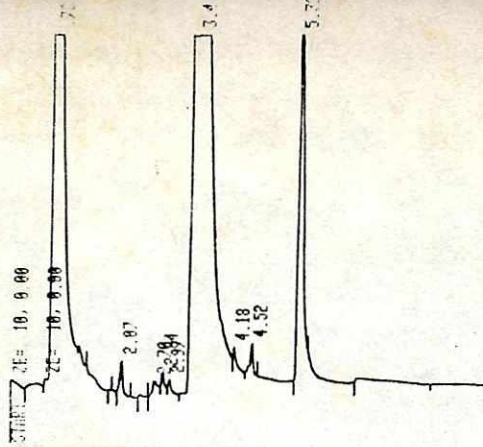


RUN # 1
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA
0.72	4.4251E+07	T888	0.088	94.886
1.21	1073	T888	0.041	0.002
1.25	1748	TP8	0.048	0.004
2.07	2446	VB	0.057	0.005
2.85	2369	PV	0.074	0.005
3.45	2350300	P8	0.060	5.040
4.19	723	B8	0.037	0.002
4.53	1961	VB	0.051	0.004
5.41	24598	P8	0.058	0.053

TOTAL AREA= 4.6036E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

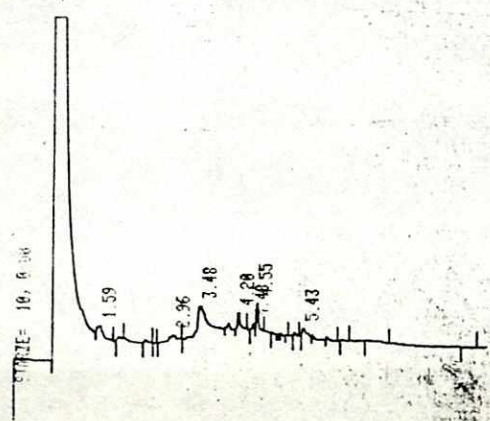
11



RUN # 2
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT	AREA
0.72	5.4855E+07	T888	0.109	93.207
2.07	2349	B8	0.058	0.01
2.70	2163	PV	0.108	0.06
2.84	2279	VP	0.079	0.01
2.97	1472	VP	0.078	0.01
3.47	3902400	P8	0.071	6.67
4.18	387	B8	0.027	6.5789E-01
4.52	2211	P8	0.060	0.01
5.37	63882	P8	0.061	0.1

12

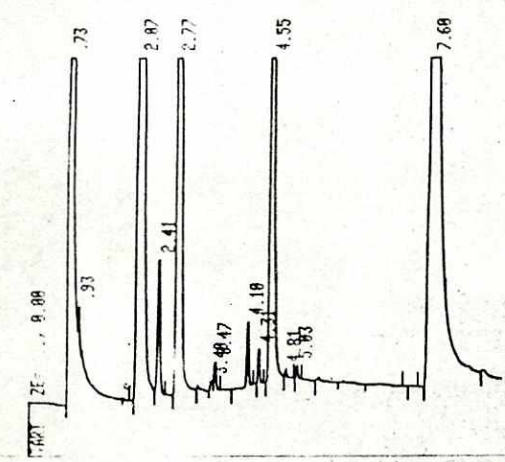


RUN # 2
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT
0.72	6.2534E+07	1237	T88	0.124	99.978	0.002			
1.59		875	PB	0.128	0.001				
2.96		8639	PV	0.212	0.013				
3.48		972	VB	0.047	0.002				
4.28		357	BV	0.041	5.7077E-04				
4.48		1573	VB	0.045	0.003				
4.55		986	BY	0.052	0.002				

TOTAL AREA= 6.2548E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

13

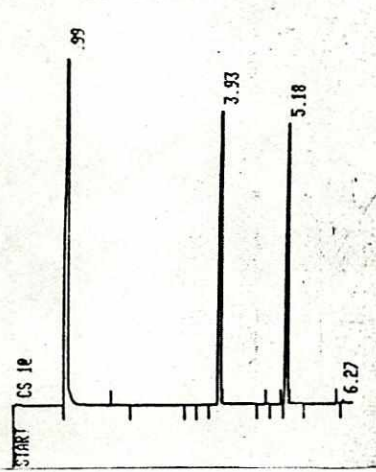


RUN # 4
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT
0.73	2.2378E+07	687	T88	0.045	85.003	0.002			
0.93		1175900	PB	0.020	4.467				
2.07		8090	BB	0.049	3.597	0.002			
2.41		946870	PB	0.045	0.002				
2.77		618	PV	0.047	0.002				
3.40		1615	VB	0.045	0.002				
3.47		2590	PB	0.033	0.002				
4.10		1624	BB	0.037	0.002				
4.31		1289200	PB	0.038	4.807				
4.55		296	PB	0.031	0.002				
4.81		636	BB	0.041	0.002				
5.03		520030	PB	0.050	1.971				

TOTAL AREA= 2.6326E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

14A

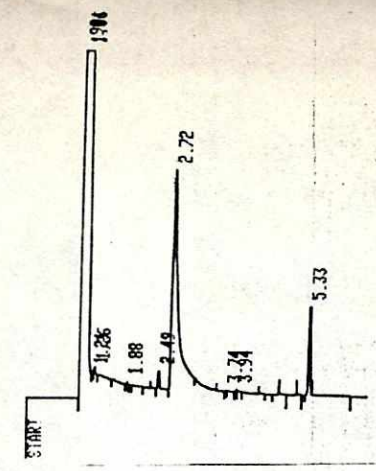


RUN # 6
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT
0.99	1.2737E+07	336410	SPB	0.026	94.753	2.503			
3.93		368890	PB	0.029	2.744				
5.18			PB	0.033					

TOTAL AREA= 1.3442E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

14B



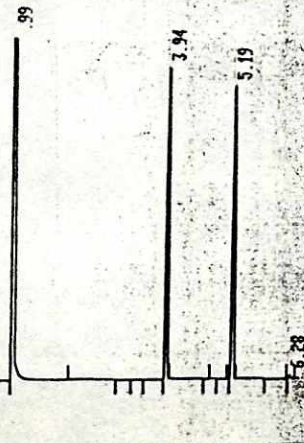
RUN # 7
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:

AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA#	RT	AREA	TYPE	AR/HT
0.98	1.1241E+07	8989300	SBH	0.023	24.24				
1.01		2.5050E+07	DSHH	0.024	19.38				
1.06		18681	T88	0.050	54.02				
1.26		19739	TVV	0.038	0.02				
2.49		945510	TBP	0.029	2.03				
2.72		115010	PB	0.033	0.24				

TOTAL AREA= 4.6372E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

14C

START ZE= 10, 0.00



RUN # 8
 WORKFILE ID: C1
 WORKFILE NAME:

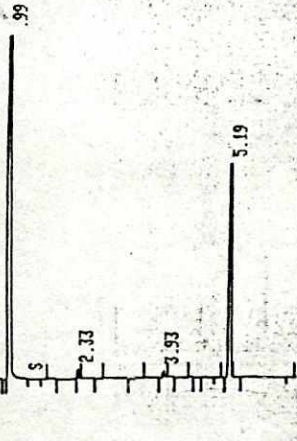
AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT
0.99	1.3465E+07	SBB	0.827
3.94	373698	PB	0.829
5.19	387448	PB	0.833

TOTAL AREA= 1.4226E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

DEC/01/88 12:29:28

14D

START ZE= 10, 0.00



RUN # 1
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

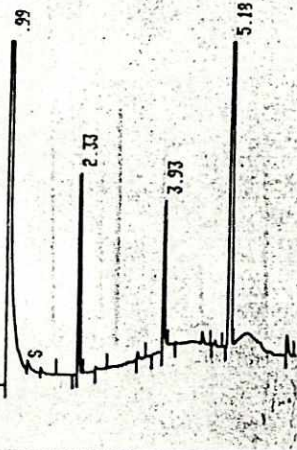
AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT
0.99	1.2923E+07	SBB	0.827
2.33	9286	PB	0.829
3.93	5984	PB	0.829
5.19	277568	PB	0.832

TOTAL AREA= 1.3216E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

DEC/05/88 12:34:49

14E

START ZE= 10, 0.00



RUN # 2
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

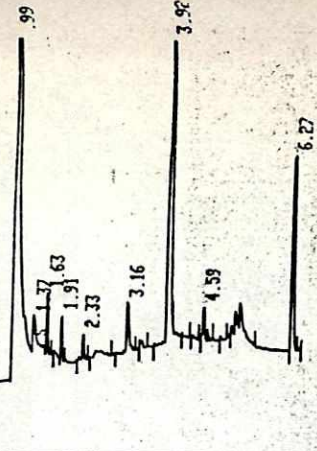
AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT
0.99	1.3289E+07	SBB	0.827
2.33	7124	PB	0.829
3.93	5289	PB	0.829
5.19	198868	PB	0.832

TOTAL AREA= 1.3499E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

DEC/05/88 15:23:36

14F

START ZE= 10, 0.00



RUN # 3
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

AREA	RT	AREA TYPE	AR/HT
0.99	1.1148E+07	SBB	0.824
1.63	4378	VB	0.898
1.91	2149	VB	0.829
2.33	1467	VB	0.828
3.16	1177	PB	0.837
4.59	3154	PB	0.858
6.27	78865	PB	0.826
	1331	VB	0.835
	10110	PB	0.841

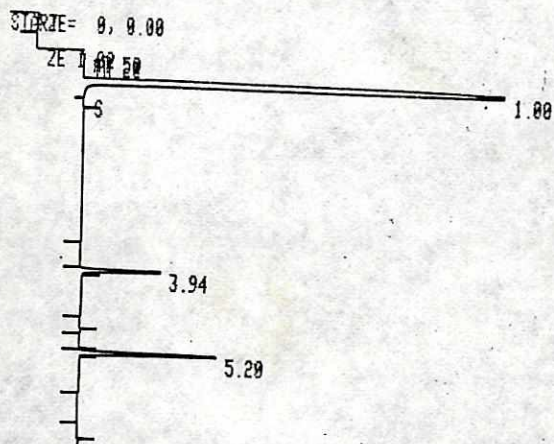
TOTAL AREA= 1.1242E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

DEC/05/88 15:37:5

APENDICE C

Datos de cromatogramas y métodos de calibración.

Ejemplo de cromatogramas del estándar.



RUN # 1
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:
 DEC/09/88 08:06:55

RT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
1.00	1.2402E+07	SPB	0.026	98.257
3.94	75497	PB	0.028	0.598
5.20	144470	PB	0.032	1.145

TOTAL AREA= 1.2622E+07
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

CALIB ISTD

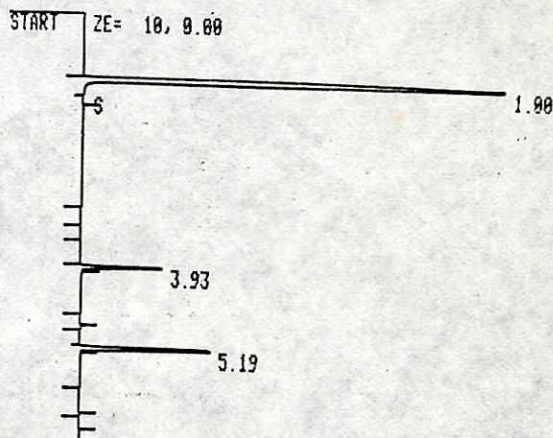
REF % RTW= 5
 % RTW= 5

CAL #	RT	AMT
1 = 3	9 4	= 0 1 1
2 = 3		
2 = 5	2 0	= 0 3 3
6 = 5		
3 =		

REF PK CAL # 1
 REF PK CAL #

ISTD CAL # 2

OP # 1 6 e
 ISTD AMT= 3 3 6 5 e
 SAMPLE AMT=0



RUN # 2
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:
 DEC/09/88 08:19:21

RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
3.93	72068	PB	1R	1.153
5.19	134360	PB	2S	3.365

TOTAL AREA= 206420
 ISTD AMT= 3.3650E+00
 SAMPLE AMT=
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

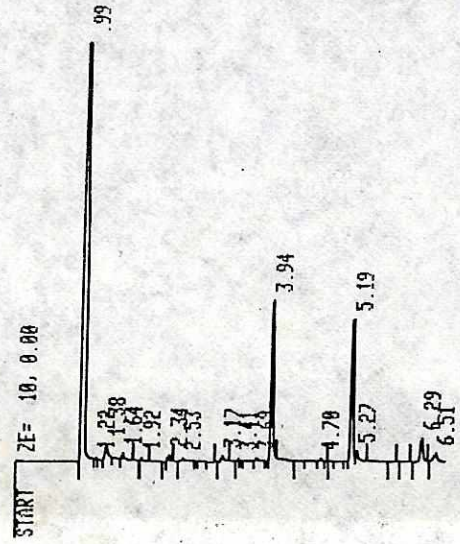
CALIB e
 RECALIBRATION

ISTD
 REF % RTW= 5.00 CALIB RUNS 2
 % RTW= 5.00

CAL #	RT	AMT	AMT/AREA
1R	3.93	1.1230E-02	1.5230E-07
2S	5.19	3.3650E-02	2.4169E-07

Ejemplo de cromatogramas de extracto de hojas (Tecprán, Guatemala)

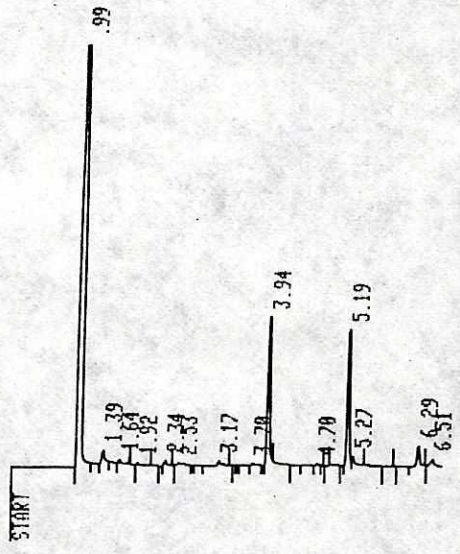
CP # 1 6 @
 ISTD AMT= 0 3 6 4 3 @
 SAMPLE AMT= 3 7 5 2 7 @



RUN # 4
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.94	162030	PB	IR	6.226
	5.19	158798	PV	2S	9.708
	6.29	31319	PB	3R	25.475

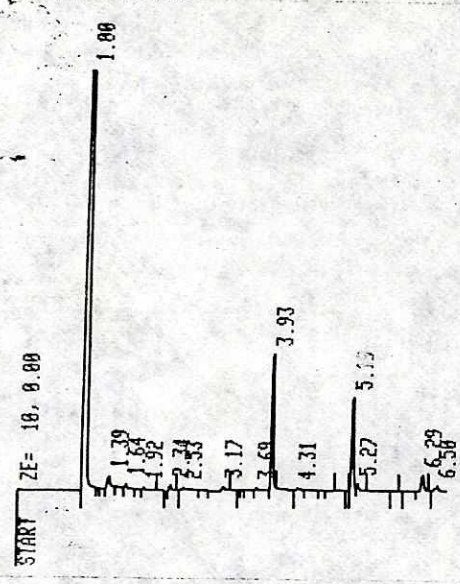
TOTAL AREA= 352140
 ISTD AMT= 3.6430E-02
 SAMPLE AMT= 3.7527E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



RUN # 5
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.94	155870	PB	IR	6.139
	5.19	154940	PV	2S	9.708
	6.29	30450	PB	3R	25.385

TOTAL AREA= 341260
 ISTD AMT= 3.6430E-02
 SAMPLE AMT= 3.7527E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



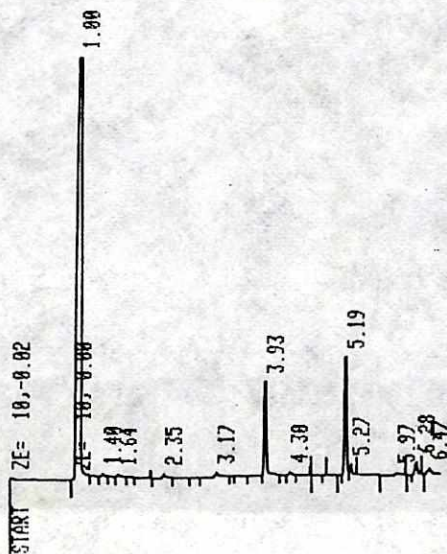
RUN # 6
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	130500	PB	IR	7.711
	5.19	103270	PV	2S	9.708
	6.29	22104	PB	3R	27.646

TOTAL AREA= 255880
 ISTD AMT= 3.6430E-02
 SAMPLE AMT= 3.7527E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

Ejemplo de cromatogramas de extracto de flores (Tecpán, Guatemala)

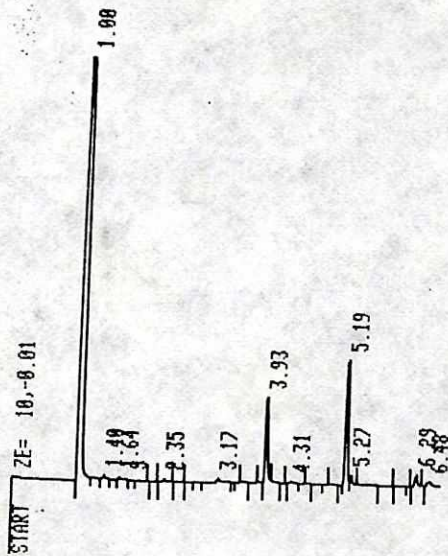
OP # 1 6 @
 ISTD AMT= 0 3 8 4 4 @
 SAMPLE AMT= 4 8 0 6 0 @



RUN # 23
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	101330	TVV	1R	4.226
	5.19	128790	VV	2S	7.998
	6.28	14611	VB	3R	29.830

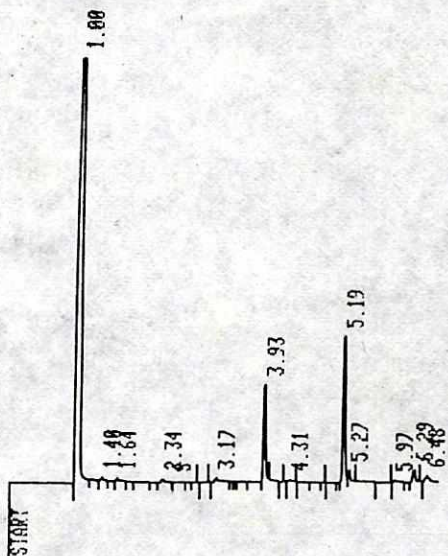
TOTAL AREA= 244730
 ISTD AMT= 3.8440E-02
 SAMPLE AMT= 4.8060E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



RUN # 25
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	89732	PB	1R	3.503
	5.19	137590	PY	2S	7.998
	6.29	14606	BB	3R	27.913

TOTAL AREA= 241920
 ISTD AMT= 3.8440E-02
 SAMPLE AMT= 4.8060E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00



RUN # 24
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	98269	PB	1R	3.321
	5.19	158930	PV	2S	7.998
	6.29	17158	VB	3R	28.386

TOTAL AREA= 274360
 ISTD AMT= 3.8440E-02
 SAMPLE AMT= 4.8060E-01
 MUL FACTOR= 1.0000E+00

DEC/14/88 14:27:20

DEC/14/88 14:17:14

DEC/14/88 14:07:01

Ejemplo de cromatogramas de Infusiones (Té Cum)

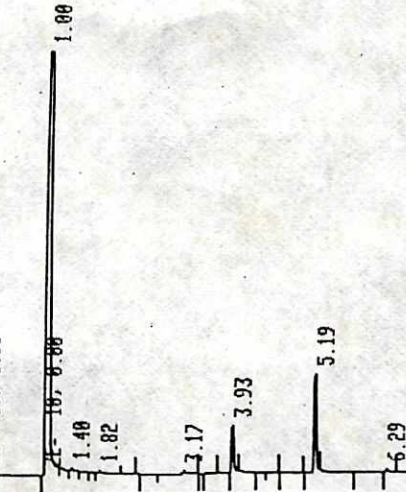
OP # - 1 6 e

OP # 1 6 e

ISTD AMT= 0 3 4 0 e

SAMPLE AMT=0

START ZE= 10.-0.03



RUN # 29

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

DEC/19/88 13:16:21

ISTD

RT

3.93

5.19

AREA TYPE

51833 PB

100200 PB

CAL #

1R

2S

AMOUNT

1.057

3.400

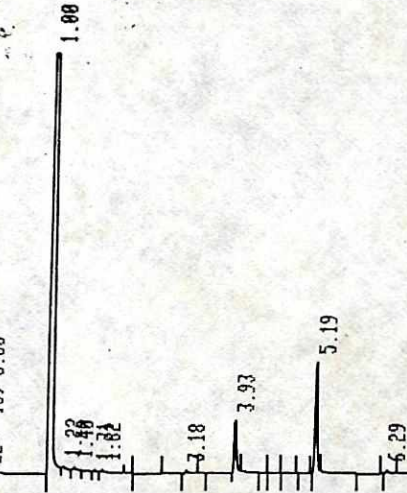
TOTAL AREA= 152040

ISTD AMT= 3.4000E-02

SAMPLE AMT=

MUL FACTOR= 1.0000E+02

START ZE= 10, 0.00



RUN # 30

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

DEC/19/88 13:27:19

ISTD

RT

3.93

5.19

AREA TYPE

54627 PB

120870 PB

CAL #

1R

2S

AMOUNT

0.923

3.400

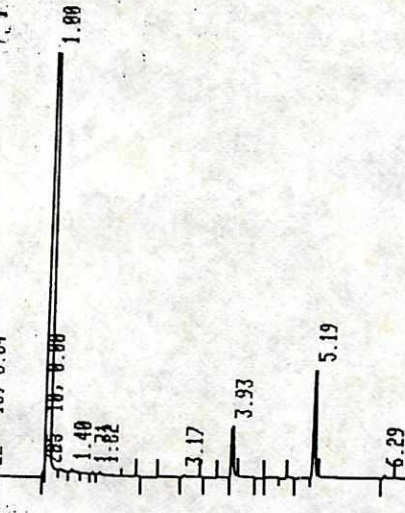
TOTAL AREA= 175490

ISTD AMT= 3.4000E-02

SAMPLE AMT=

MUL FACTOR= 1.0000E+02

START ZE= 10.-0.04



RUN # 31

WORKFILE ID: C

WORKFILE NAME:

DEC/19/88 13:37:04

ISTD

RT

3.93

5.19

AREA TYPE

54473 PB

115540 PB

CAL #

1R

2S

AMOUNT

0.963

3.400

TOTAL AREA= 170020

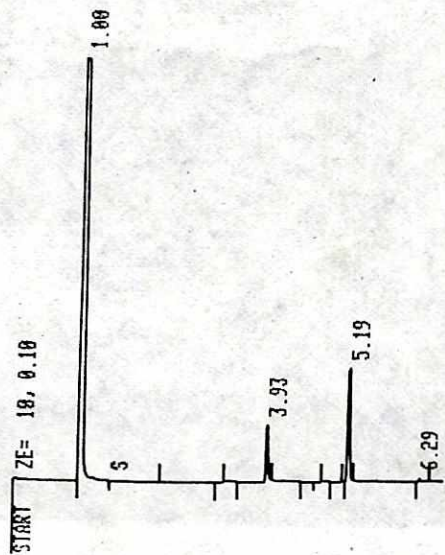
ISTD AMT= 3.4000E-02

SAMPLE AMT=

MUL FACTOR= 1.0000E+02

Ejemplo de cromatogramas de cocciones (San José, Pinula)

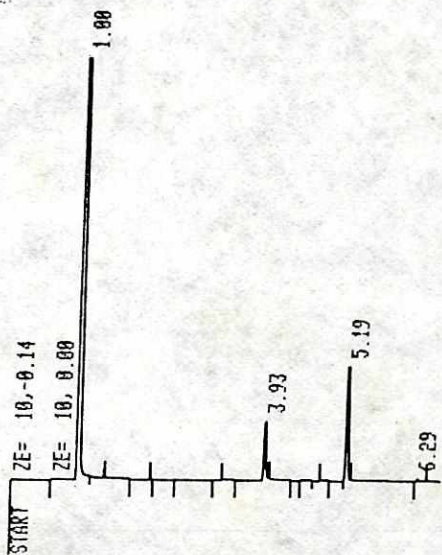
OP # 1 6 @
 ISTD AMT= . 0 3 3 2 @
 SAMPLE AMT=@



RUN # 41
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	47961	PB	1R	0.789
	5.19	121260	PB	2S	3.328

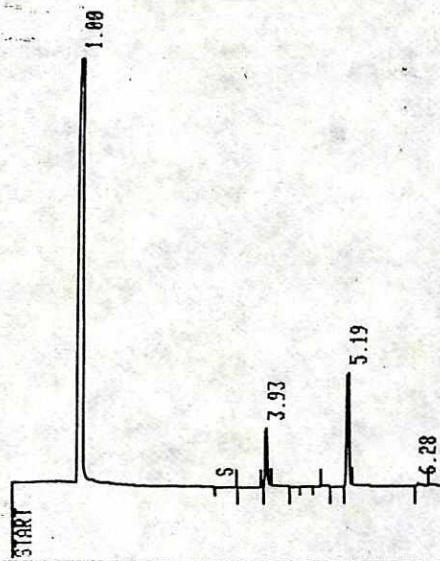
TOTAL AREA= 163220
 ISTD AMT= 3.3200E-02
 SAMPLE AMT=
 MUL FACTOR= 1.0000E+02



RUN # 42
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	46389	PB	1R	0.781
	5.19	118470	PB	2S	3.328

TOTAL AREA= 164860
 ISTD AMT= 3.3200E-02
 SAMPLE AMT=
 MUL FACTOR= 1.0000E+02



RUN # 43
 WORKFILE ID: C
 WORKFILE NAME:

ISTD	RT	AREA	TYPE	CAL #	AMOUNT
	3.93	58070	PB	1R	0.944
	5.19	122690	PB	2S	3.328

TOTAL AREA= 188760
 ISTD AMT= 3.3200E-02
 SAMPLE AMT=
 MUL FACTOR= 1.0000E+02