



**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría  
en Tecnología de los Alimentos.**

Maestranda  
***Farm. Gabriela Pergher***

## **Parámetros fisicoquímicos e isotermas de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius**

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Tecnología de los Alimentos”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
***Mgter. Farm. Gabriela A. De Battista***  
Co-Director  
***Dr. Ing. Miguel E. Schmalko***

**Posadas, Misiones 2014**



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-  
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

---

**PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS E  
ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE  
HOJAS DE *Maytenus ilicifolia* Martius**

---



*Farm. Gabriela Pergher*

2014

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y  
NATURALES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

**PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS E ISOTERMAS DE  
ADSORCIÓN DE HOJAS DE *Maytenus ilicifolia* Martius**

Autor: *Farm.* Gabriela Pergher

Director: *Mgter. Farm.* Gabriela A. De Battista


Co-director: *Dr. Ing.* Miguel E. Schmalko

Noviembre 2014



Dedico este trabajo a mis hijos:  
Valentina y Santiago.

**Nosotros aprobamos la Tesis de Maestría de la Farm. Gabriela Pergher:**



\_\_\_\_\_  
Dra. Lic. Sonia Cecilia Sgroppo  
Evaluadora Externa - Facultad de Ciencias Exactas  
Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste

07/11/2014

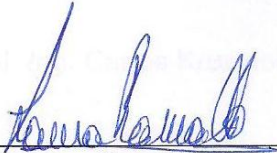
Fecha



\_\_\_\_\_  
Dr. Ing. José Luis Herrera  
Evaluador Interno - Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

07-11-2014

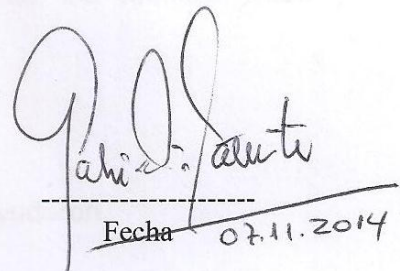
Fecha



\_\_\_\_\_  
Dra. Ing. Laura Ramallo  
Evaluadora Interna - Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

07/11/2014

Fecha



\_\_\_\_\_  
Mgter. Farm. Gabriela De Battista  
Director de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones

Fecha 07.11.2014

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Dr. Ing. Miguel E. Schmalko  
Co-Director de Tesis – Facultad de Ciencias Exactas,  
Naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste

CALIFICACIÓN: Elaboración de Tesis..... 9 (NUEVE)

CALIFICACIÓN: Defensa de Tesis..... 9 (NUEVE)

## Agradecimientos



A mi Directora *Prof. Gabriela A. De Battista*, por su dedicación y apoyo tanto personal como científico, y valiosa ayuda en la realización y revisión del trabajo.



A mi Co-Director *Prof. Miguel E. Schmalko*, por el gran aporte de conocimientos brindado.



A mi colega Lorena Gierztunovicz.



A los bioquímicos: Carlos González, Graciela Fernández de la Puente y Ana María Quiroga.



Al *Ing. Carlos Kruzolek* y la *Lic. Patricia Scipioni*.



A los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, por haberme permitido realizar las experiencias prácticas en los laboratorios de Yerba Mate, Calidad de los Medicamentos y Toxicología.



Al personal de la biblioteca de la facultad.



Y a todos los que de alguna u otra manera me ayudaron.

# PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS E ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE HOJAS DE *Maytenus ilicifolia* Martius

## Resumen

*Maytenus ilicifolia* Martius (Celastraceae) es una especie nativa en la Provincia de Misiones, clasificada dentro de árboles bajos y arbustos. Es conocida con el nombre vulgar de “cangorosa” y como “Espinheira santa” en Brasil. Las hojas y el tallo son empleadas en mezclas agregadas al mate para combatir la acidez y gastralgia provocada por esta infusión y aminorar el efecto irritante de la cafeína. En la descripción química de la especie se indica contenidos de taninos, flavonoides y triterpenos.

Las isotermas de adsorción aportan información sumamente valiosa para predecir cambios potenciales en la estabilidad biológica del material, permitiendo determinar la máxima humedad que el mismo puede ganar o perder durante el secado o almacenamiento. Las mismas ilustran la relación funcional entre el contenido de humedad de equilibrio y la actividad de agua a temperatura constante.

Se estudiaron parámetros fisicoquímicos e isotermas de adsorción de las hojas de *Maytenus ilicifolia* que crecen en la zona sur de la Provincia para su estandarización y para contribuir a su inclusión al Código Alimentario Argentino.

El contenido de humedad de equilibrio fue medido usando un método gravimétrico estático, a humedades relativas y temperaturas en un rango de 11.0 % a 80.3 % y de 30°C a 60°C respectivamente. Los modelos matemáticos de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Chung-Plost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado y Halsey fueron testeados para ajustar los datos experimentales por análisis de regresión no lineal. Para el modelo de GAB, se utilizaron diferentes métodos en el tratamiento de los datos.

Los ensayos de cenizas totales, pérdida por secado y extractos acuosos cumplieron los requerimientos de Farmacopea Brasileira. Los valores óptimos obtenidos por TLC para los extractos de triterpenos fueron con la fase móvil cloroformo-benceno,  $R_f$  de 0,23, 0,38, 0,57, 0,80 y 0,96 con el revelador anisaldehído-sulfúrico bajo luz UV 365 nm. Los datos experimentales de adsorción exhiben una curva sigmoidea Tipo II, típica de la mayoría de los productos biológicos. Los mejores ajustes de isotermas de adsorción se obtuvieron con la ecuación de GAB. Se deberían continuar los estudios para establecer las causas de las diferencias observadas al procesar los datos a la temperatura de 60°C respecto de las demás.

**Palabras claves:** parámetros fisicoquímicos, isotermas de adsorción, contenido de humedad de equilibrio, *Maytenus ilicifolia*, modelos matemáticos.

# PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS AND ADSORPTION ISOTHERMS OF *Maytenus ilicifolia* Martius LEAVES

## Abstract

*Maytenus ilicifolia* Martius (Celastraceae) is a native species in the Province of Misiones, classified into low trees and shrubs. It is known under its common name "cangorosa" and as "Espinheira santa" in Brazil. The leaves and twigs are used in mixtures with yerba mate indicated for stomach acidity and gastralgia produced when yerba mate is consumed due to the irritant effect of caffeine. In the chemical species description content of tannins, flavonoids and triterpenes are indicated.

Adsorption isotherms provide extremely valuable information to predict potential changes in the biological stability of the material, allowing to determine the maximum moisture that it can gain or lose during drying or storage. These procedures illustrate the functional relationship between the equilibrium moisture content and water activity at constant temperature.

Physicochemical parameters and adsorption isotherms of *Maytenus ilicifolia* leaves that grow in the southern part of the Province were studied for standardization and thus contribute to the inclusion in the Argentine Food Code.

The equilibrium moisture content was measured using a gravimetric static method, at relative humidities and temperatures in the range of 11,0 % to 80,3 % and from 30°C to 60°C respectively. Mathematical models of Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Chung-Plost, modified Halsey, modified Oswin, modified Henderson and Halsey were tested to fit the experimental data by nonlinear regression analysis. For the GAB model, different methods in the data processing were used.

Total ash tests, loss on drying and aqueous extracts completed the requirements of Brazilian Pharmacopoeia. The optimum values obtained by TLC for triterpenes extracts with the mobile phase were chloroform-benzene,  $R_f$  0,23, 0,38, 0,57, 0,80 and 0,96 with the developer anisaldehyde-sulfuric under UV light 365 nm. The experimental adsorption data exhibit a sigmoidal curve type II, typical of most biological products. Best fitting adsorption isotherms were obtained with the GAB equation. Studies should continue to establish the causes of the observed differences in processing data at a temperature of 60°C compared to the others.

**Key words:** physicochemical parameters absorption isotherms, equilibrium moisture content, *Maytenus ilicifolia*, mathematical modelling.



## Tabla de contenidos

RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
TABLA DE CONTENIDOS .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	XI
NOMENCLATURA .....	XIV
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Alcances y justificación de la investigación .....	4
1.2 Objetivo general del trabajo .....	6
1.3 Objetivos específicos .....	6
CAPÍTULO II	
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	7
2.1 <i>Maytenus ilicifolia</i> Martius .....	7
2.1.1 Distribución geográfica .....	7
2.1.2 Agricultura .....	8
2.1.3 Descripción botánica .....	8
2.1.4 Uso popular de las hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	10
2.1.5 Actividad biológica de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	11
2.1.6 Estudios toxicológicos .....	14
2.2 Actividad acuosa .....	15
2.3 Isotermas de adsorción .....	19
2.3.1 Ecuaciones matemáticas para ajustar los datos de sorción .....	20
2.3.2 Aplicaciones de las Isotermas de sorción .....	25
CAPÍTULO III	
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29

3.1	Muestras analizadas .....	29
3.2	Equipamientos .....	30
3.3	Insumos y reactivos .....	30
3.4	Pérdida por secado .....	31
3.5	Cenizas .....	32
3.6	Extractos acuosos .....	32
3.7	Cromatografía en capa fina –TLC .....	33
3.7.1	Extracción de terpenos .....	33
3.7.2	Sistema cromatográfico .....	34
3.8	Detección de taninos .....	35
3.9	Isotermas de adsorción .....	36
3.9.1	Método experimental .....	36
3.9.2	Ajustes de los datos de adsorción .....	37
3.9.3	Tratamiento estadístico de los resultados de las Isotermas de adsorción .....	40

#### CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
4.1	Ensayo de pérdida por secado, cenizas totales y extractos acuosos .....	41
4.2	Cromatografía en capa fina – TLC .....	45
4.2.1	Terpenos en hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	45
4.3	Detección de taninos .....	47
4.4	Isotermas de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	48
4.4.1	Ajustes matemáticos de los datos experimentales de adsorción .....	49
4.5	Contenido de humedad de la monocapa-BET y actividad del agua de la monocapa .....	69

#### CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES .....	71
----	--------------------	----

6.	PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS .....	73
7.	RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN PUBLICADOS .....	74
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
9.	ANEXOS	88
9.1	Anexo I: Resumen del trabajo: “Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> Martius” .....	88
9.2	Anexo II: Copia del certificado del trabajo: “Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> Martius”. .....	90

## Lista de tablas

Tabla 2.1	Actividades de agua requeridas para sustentar el crecimiento de Microorganismos Representativos, medidas a 25°C .....	18
Tabla 3.1	Diseño de las experiencias para determinar pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso en hojas de <i>M. ilicifolia</i> .....	31
Tabla 3.2	Modelos matemáticos aplicados a datos de isotermas de adsorción en hojas de <i>M. ilicifolia</i> ...	37
Tabla 4.1	Porcentajes de pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso de hojas de <i>M. ilicifolia</i> , secadas en condiciones naturales y artificiales ....	41
Tabla 4.2	Parámetros poblacionales del ensayo de pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso, y estadígrafo <i>t</i> calculado (comparación de medias)	43
Tabla 4.3	Expresión gráfica del cromatograma de extractos de acetato de etilo de hojas de cangorosa reveladas bajo luz UV a 254 nm, luz UV a 365 nm y con anisaldehído – sulfúrico bajo luz UV a 365 nm.....	45
Tabla 4.4	Resultado experimental de la valoración de contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.) para adsorción a diferentes temperaturas y humedades relativas .....	48
Tabla 4.5	Resultados positivos de la prueba de Dixon sobre datos de contenido de humedad de equilibrio en hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	48
Tabla 4.6	Parámetros estimados, coeficientes de determinación y de Chi cuadrado, y errores en los ajustes de los modelos de isotermas de adsorción en hojas de <i>M. ilicifolia</i> . .....	51

Tabla 4.7	Parámetros estimados, coeficientes de determinación y de Chi-cuadrado, y errores en ajustes del modelo de referencia: GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), del modelo de GAB polinomial de segundo orden y de propuestas aplicadas en el tratamiento de datos del modelo de GAB en hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> . .....	62
Tabla 4.8	Aspectos comparativos en la determinación de Isotermas de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> (trabajo de referencia vs. trabajo de investigación realizado) .....	68
Tabla 4.9	Constantes estimados e índices estadísticos, contenido de humedad y actividades de agua de monocapa correspondientes al modelo de BET modificado para adsorción en hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	69

## Lista de Figuras

Figura 2.1	<i>Maytenus ilicifolia</i> Martius, planta silvestre de la zona sur de la Provincia de Misiones .....	8
Figura 2.2	Velocidad de alteración de los alimentos en función de la actividad de agua, según Labuza, (1975). .....	18
Figura 2.3	Tipos de isotermas de adsorción de Van der Waals, según Brunauer y Col., (1940) .....	20
Figura 2.4	Isoterma de sorción de humedad generalizada del segmento de baja humedad de un alimento (20°C) .....	21
Figura 3.1	Muestra de <i>Maytenus ilicifolia</i> secada en condiciones naturales .....	29
Figura 3.2	Estufa de secado al vacío. Laboratorio del Dpto. de Farmacia- FCEQyN .....	33
Figura 3.3	.Lámpara UV 254-365 c/cámara de visualización. Laboratorio del Dpto. de Farmacia – FCEQyN .....	35
Figura 4.1	Ensayo de pérdida por de <i>M. ilicifolia</i> secado (pesada de muestras). Laboratorio del Dpto. de Farmacia, FCEQyN .....	42
Figura 4.2	Pérdida por secado (secado de muestras) de <i>M. ilicifolia</i> . Laboratorio del Dpto. de Farmacia, FCEQyN .....	42
Figura 4.3	Extractos acuosos secos de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .....	42
Figura 4.4	TLC de extractos de Terpenos de hojas de cangorosa. FM: cloroformo–benceno, Revelador: anisaldehído-sulfúrico bajo luz UV 365 nm. M1: Muestra 1, M4: Muestra control.....	46
Figura 4.5	Extractos acuosos de <i>M. ilicifolia</i> .....	47

Figura 4.6	Reacción positiva de extractos acuosos de <i>M. ilicifolia</i> con solución de tricloruro férrico (Muestra 1 y Muestra control).....	47
Figura 4.7	Precipitación de la gelatina con extractos acuosos de hojas de <i>M. ilicifolia</i> (Muestra 1 y Muestra control) .....	47
Figura 4.8	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB .....	54
Figura 4.9	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Chung Pfost .....	54
Figura 4.10	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Oswin Modificado .....	55
Figura 4.11	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Halsey Modificado .....	55
Figura 4.12	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Henderson Modificado .....	56
Figura 4.13	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida	

	con la estimación del modelo de Halsey .....	56
Figura 4.14	Gráfico de residuales de la ecuación de GAB, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	58
Figura 4.15	Gráfico de residuales de la ecuación de Chung Pfof, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	58
Figura 4.16	Gráfico de residuales de la ecuación de Oswin Modificado, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	59
Figura 4.17	Gráfico de residuales de la ecuación de Halsey Modificado, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	59
Figura 4.18	Gráfico de residuales de la ecuación de Henderson Modificado, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	60
Figura 4.19	Gráfico de residuales de la ecuación de Halsey, ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	60
Figura 4.20	Comparación de la relación $a_w$ y contenido de humedad de equilibrio de datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB polinomial .....	64
Figura 4.21	Comparación del contenido de humedad de equilibrio de datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB ( $X_m$ de BET) .....	64
Figura 4.22	Gráfico de distribución de residuales de la ecuación de GAB polinomial de segundo orden	



	ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	65
Figura 4.23	Gráfico de residuales de la ecuación de GAB ( $X_m$ BET) ajustados a los datos de adsorción de hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> a varias temperaturas .....	65
Figura 4.24	Efecto de la temperatura sobre el contenido de agua de monocapa en hojas de <i>M. ilicifolia</i> . .....	70

## Nomenclatura

$a_w$	Actividad del agua
$(a_w)_x$	Actividad del agua correspondiente al contenido de humedad de monocapa
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
SAFyBi	Asociación Argentina de Farmacia y Bioquímica Industrial
b.s.	Base seca
BET	Brunauer, Emmett & Teller
CAPS	Centro de Atención Primaria de la Salud
CAA	Código Alimentario Argentino
$R^2$	Coefficiente de determinación
CEDIT	Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica
$c_o, k_o$	Constantes del modelo de GAB
$A_x, B_x$	Constantes del modelo de BET modificado
$X_m, K, A, B, C, r$	Constantes de los modelos matemáticos
$X$	Contenido de humedad de equilibrio
$X_e$	Contenido de humedad experimental
$X_c$	Contenido de humedad calculado
R	Constante universal de los gases
TLC	Cromatografía en capa fina
DS	Desvío estándar
$H_c, H_k$	Entalpías de sorción molares
E%	Error medio relativo porcentual
$f$	Fugacidad del solvente desde la solución
$f_o$	Fugacidad del solvente puro
$d_f$	Grados de libertad
GAB	Guggenheim-Anderson-de Boer

ERH	Humedad relativa de equilibrio
JorFyBi	Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
N	Número de observaciones
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONG	Organización no gubernamental
<i>p</i>	Presión de vapor del agua en el equilibrio
<i>p<sub>o</sub></i>	Presión de vapor del agua pura
RVP	Presión de vapor relativa
PFNM	Productos Forestales No Madereros
RMSE	Raíz cuadrada del error medio cuadrático
T	Temperatura absoluta (°K)
t	Temperatura (°C)
WHO	World Health Organization



## 1. INTRODUCCIÓN

*Maytenus ilicifolia* Martius (Celastraceae) es una especie nativa que crece en la Provincia de Misiones, clasificada dentro de árboles bajos y arbustos (Martínez-Crovetto, 1963), y es conocida con el nombre vulgar, en español, de: “congorosa”, “cangorosa”, “capororoca”, “molle espinoso”, “cancerosa”, “sombra de toro”, “quebrachillo”, “pus pus” (Sharapin y Col., 2006) y en Brasil con el nombre de: “espinheira santa”, “cancorosa”, “cancerosa”, “cancrosa”, “espinheira-divina” (Farmacopeia Brasileira 4º ed. [FB 4º], 2002).

Se registra su uso en la literatura etnobotánica con fines medicinales por los indígenas que vivían en la región Sur de Brasil, en Argentina, en Paraguay y en el Uruguay, también por la población no indígena, existen registros que datan de 1930 (Scheffer, 2004; RainTree, s.f.).

En 1988, fueron publicadas investigaciones efectuadas por Carlini y Col. que confirmaban las propiedades terapéuticas de las hojas para la protección y el tratamiento de úlceras gástricas. Las hojas y el tallo de *Maytenus ilicifolia* eran empleadas en mezclas agregadas al mate para combatir la acidez y gastralgia provocada por esta infusión (Scheffer, 2004).

En los últimos años los Productos Forestales No Madereros (PFNM) han suscitado interés por su contribución económica y social en los países de todo el mundo, sobre todo para la población rural. A partir de documentos elaborados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 17 países de Latinoamérica y El Caribe, se pudo conocer que la extracción de PFNM de origen vegetal en Argentina es variada e incluye 396 especies que involucran un uso medicinal (Resico, 2001).

Las políticas que viene desarrollando la Organización Mundial de la Salud (OMS) en función de valorizar el saber tradicional referido al correcto empleo de las plantas medicinales, ha motivado la aparición por parte de ese organismo de una serie de documentos referidos a las buenas prácticas de agricultura y control de calidad sobre aquellas plantas medicinales que puedan

ser incorporadas en los Centros de Atención Primaria de la Salud (CAPS), lo que constituye un importante aporte para contar con documentos que se integren a la justificación base para la posible inclusión de la "cangorosa" en el Código Alimentario Argentino.

En el aprovechamiento de los recursos naturales silvestres, se ha utilizado a la "cangorosa" en la provincia como parte del Proyecto "Cultivando la Salud", aprobado por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Italia y financiado por el Gobierno Italiano (Cooperazione italiana, Región Lombardía y la ONG italiana Centro de Orientación Educativa), tiene como finalidad elaborar fitomedicamentos para la Atención Primaria de la Salud, con aval de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en Laboratorios provinciales estatales, a partir de plantas nativas de Argentina. Las Provincias de Misiones, Santa Fe y Buenos Aires fueron afectadas inicialmente a este proyecto (Alonso, 2005).

Los productores practican principalmente, una agricultura de subsistencia libre de agroquímicos, cuya finalidad es la puesta en valor de las hierbas con propiedades medicinales de la región (Lezcano y Marin, 2008).

Para la utilización de la especie, esta debe cumplimentar requisitos que están incluidos en la Farmacopea Argentina. Esta define como "*Droga Vegetal a las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos*" (Farmacopea Argentina 7° ed. [FA 7°], 2003).

Otros antecedentes destacan la evolución de la Yerba Mate compuesta, valorada por sus propiedades nutritivas y/o terapéuticas, la que es consumida en la actualidad como una de las tradicionales infusiones. La Comisión Parlamentaria Conjunta del MERCOSUR declara a la Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) y sus derivados "Producto regional autóctono del

MERCOSUR" con el objeto de proteger su calidad, incrementar su producción y promover su comercialización y consumo (Ramos y Rivas, 2003).

Cabe destacar experiencias que se han realizado en la Provincia de Misiones. El Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT) desarrolló la producción de una Yerba Mate compuesta más suave, con el agregado de "cangorosa" (*Maytenus ilicifolia*) como uno de sus principales componentes. El objetivo es el logro de un nuevo producto (Yerba Mate compuesta) que permita una mayor comercialización del cultivo base del agro misionero. En el mismo está previsto aprovechar la producción local, utilizada en sus primeras etapas con un fin medicinal en la localidad de Santa Ana. Desde el CEDIT se aseguró que en el catado con tomadores normales de mate, no se percibió un cambio sustancial en el sabor (El Territorio Digital, 2006).

Hasta el momento no existe en el mercado Yerba Mate compuesta con *Maytenus ilicifolia*. Existen antecedentes que hacen suponer el uso ancestral de la "cangorosa" fundamentalmente por las comunidades indígenas de la región, que se fue transmitiendo de generación en generación.

El Código Alimentario Argentino en el capítulo I: Disposiciones Generales, Art. 6-2 define: "...*La designación de alimentos incluye también a las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo*" (Código Alimentario Argentino [CAA], 2000).

Este mismo Código define "...*Yerba Mate Compuesta*" o "*Yerba Mate Aromatizada*", según corresponda de acuerdo con su composición, al producto constituido por Yerba Mate Elaborada Despalillada o con Palo, adicionada de una o varias hierbas sávido-aromáticas de reconocida inocuidad fisiológica en la forma habitual de su uso (infusión o mate): cedrón, menta, tomillo, salvia, poleo, romero, peperina u otras que apruebe la autoridad sanitaria. Estos vegetales podrán adicionarse hasta un 40% en total, debiendo satisfacer las exigencias establecidas en el Código Alimentario Argentino y/o en la

*Farmacopea Nacional Argentina. El 60 % restante deberá estar compuesto por yerba mate. El producto final no contendrá más de 9,5 % de agua ni más del 2 % de cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 % p/v, calculados ambos sobre producto seco” (CAA, 1990).*

Se deberá tener especial cuidado con la leyenda del rótulo con la que se expendía el producto, considerando lo que establece la reforma del Artículo 235 del Código Alimentario Argentino: "...*En los rótulos o anuncios, por cualquier medio (propaganda radial, televisiva, oral o escrita) queda prohibido efectuar indicaciones que se refieran a propiedades medicinales, terapéuticas o aconsejar su consumo por razones de estímulo, bienestar o salud "* (CAA, 2005).

### **1.1 Alcances y justificación de la Investigación**

El conocimiento de los atributos fisicoquímicos de la especie vegetal silvestre proveniente de la región, conjuntamente con otras investigaciones vinculadas a técnicas cuantitativas, caracterización nutricional, estudios de toxicidad, etc. podrían contribuir para incluirla al Código Alimentario Argentino.

La Farmacopea Argentina no incluye a esta especie vegetal en sus monografías. La Farmacopeia Brasileira 4º ed., (2002) y la 5º ed., (2010) codifican a las hojas de *Maytenus ilicifolia* bajo la denominación de "Espinheira santa". En la monografía se establecen los requerimientos mínimos que la droga vegetal debe cumplir, estas especificaciones se utilizarán como referencia.

Durante el secado y almacenamiento de productos agrícolas pueden suceder transformaciones físicas, químicas y microbiológicas. Estos cambios son influenciados particularmente por el contenido de agua del material, la humedad relativa del ambiente y las condiciones de secado y almacenamiento (Cordeiro y Col., 2006).

Las plantas medicinales y aromáticas comúnmente contienen altos niveles de humedad y microorganismos. Las condiciones de secado y

almacenamiento son muy importantes para proteger la calidad de las cosechas (Soysal & Öztekin, 1999).

El secado es un método de conservación basado en la disminución de la actividad acuosa de los alimentos para prolongar el período de vida útil de estos. Además, reduce el peso y el volumen, lo cual facilita el transporte y almacenamiento. El contenido de humedad final del producto debe tener un valor que le permita ser estable durante un tiempo prolongado. La estabilidad microbiológica se obtiene a valores de actividad de agua ( $a_w$ ) menores a 0,6 (García y Col., 2007).

Dado que en el proceso de deshidratación lo que se controla es el contenido de humedad y no la actividad acuosa, el punto final de secado en términos del contenido de humedad, debe ser determinado mediante las isotermas de adsorción de humedad del alimento en cuestión. La isoterma de adsorción de humedad es la expresión de la relación funcional existente entre el contenido de humedad de un alimento (expresado como g de agua por cada 100 g de sólidos secos) y la actividad acuosa, en forma gráfica o de ecuación (del Valle Canseco, 1985).

El estudio de las isotermas de adsorción es sumamente valioso para predecir cambios potenciales en la estabilidad biológica del material, permitiendo determinar la máxima humedad que el mismo puede ganar o perder durante el secado o almacenamiento (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col. 2006). Además, posibilitan prever el comportamiento de un alimento en condiciones distintas a las que se estudió experimentalmente, este aspecto presenta un evidente interés práctico (Cheftel y Cheftel, 1988).

La especie *Maytenus ilicifolia* es oriunda de diversas partes de Sud América (Sur de Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina). Existen antecedentes relacionados con estudios de sorción en hojas de *Maytenus ilicifolia* en plantas cultivadas en Brasil (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006); sin embargo no se disponen de estudios de la especie silvestre de la Provincia de Misiones.



## **1.2 Objetivo general del trabajo**

Definir propiedades fisicoquímicas e isothermas de adsorción en hojas de *Maytenus ilicifolia* de plantas nativas de la región.

## **1.3 Objetivos específicos**

Determinar y comparar parámetros fisicoquímicos en hojas de *Maytenus ilicifolia* con las especificaciones farmacopeicas.

Establecer las características del fenómeno de adsorción de las hojas de *Maytenus ilicifolia*.

Realizar el modelado matemático del fenómeno de adsorción y establecer el modelo que mejor ajuste a los datos experimentales.

Determinar el contenido de humedad final del producto que asegure su estabilidad microbiológica.



## 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 *Maytenus ilicifolia* Martius

*Maytenus ilicifolia* Martius (Celastraceae), es conocida en la región con el nombre vulgar de “congorosa” o “cangorosa”, y en Brasil con el nombre de “Espinheira santa” en alusión a sus hojas ya que las mismas presentan bordes espinosos y propiedades medicinales.

La Farmacopea de Brasil incluye su monografía en la cuarta edición, (2002) bajo la denominación de "Espinheira Santa" y está codificada también en la quinta edición del año 2010.

La familia de las Celastraceae, dentro de las plantas superiores, fue reconocida por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) como una de las más prometedoras para su estudio, dada su amplia distribución, la naturaleza química y complejidad de sus metabolitos, y fundamentalmente por las actividades farmacológicas de sus especies (Nuñez Rivas, 2004).

El nombre genérico *Maytenus* proviene de "Maytén", nombre popular de una planta utilizada por los Mapuches en Chile; *ilicifolia* hace referencia a la similitud de sus hojas con las del género "*Ilex*" (*Ilex aquifolium*, acebo) (Sharapin y Col., 2006).

#### 2.1.1 Distribución geográfica

El género *Maytenus* comprende unas 200 especies americanas, de las cuales 11 crecen en Argentina y 77 en Brasil. La especie *Maytenus ilicifolia* es oriunda del Sur de Brasil, Paraguay, Bolivia, Uruguay y Argentina (región chaqueña y mesopotámica, Provincias de La Pampa, Córdoba y nordeste de Buenos Aires) (Sharapin y Col., 2006). En la Provincia de Misiones se

encuentra distribuida en el Sector Misionero, según la descripción de Martínez-Crovetto, (1963).

### 2.1.2 Agricultura

En la provincia de Misiones la especie crece en forma silvestre. En Brasil, debido al fuerte incremento del consumo, se ha desarrollado su cultivo (Negri, 2007). La propagación de la planta puede ser por semillas, estacas o cultivo de tejidos (Sharapin y Col., 2006).

La cosecha se realiza con poda y el corte es hecho manualmente. El período ideal de cosecha es al inicio de la primavera (Brasil). La primera cosecha puede ser realizada con la poda a la altura de 50 cm y las demás en los años subsiguientes, por encima de las ramificaciones promovidas por la poda anterior. Se considera que la planta necesita de 2 años para recuperar la cantidad de hojas de su copa. Así, el sistema alternado de cosecha en cada mitad de la planta proporciona cosechas anuales (de Magalhães, 2002).

### 2.1.3 Descripción botánica

Es un árbol pequeño, que crece hasta 5 m de altura con hojas y bayas que se asemejan al acebo.



Figura 2.1: *Maytenus ilicifolia* Martius, planta silvestre de la zona sur de la Provincia de Misiones.

Las ramas jóvenes son glabras, angulosas con estrías longitudinales. El pecíolo tiene una longitud de 0,2 cm a 0,5 cm con pequeñas estipulas. Las hojas son simples de forma ovalo-oblonga, elíptica o elíptica-lanceolada, alternas, coriáceas a subcoriáceas, glabras, pectinadas, marginadas y con venas pinadas. Algunas de las nervaduras secundarias terminan en el margen y otras pueden ramificarse próximas al margen, aún pueden unirse a otra nervadura secundaria adyacente, con curso recto hasta  $\frac{2}{3}$  o  $\frac{4}{5}$  de la mitad del largo de la lámina, pudiendo formar un ángulo de divergencia grande. Las nervaduras de menor orden son reticuladas de tipo rándómico. Las nervaduras son prominentes y muy visibles en la cara axial. La longitud de la lámina es de 2,1 cm a 9,0 cm (raramente hasta 15 cm) de largo y de 1,0 cm a 3,1 cm (raramente hasta 7 cm) de ancho. La base y el ápice tienen forma desde aguda a obtusas y el ápice mucronato o aristado, borde interno con una espina apical o con dientes laterales agudos, generalmente de dos a siete, dispuestos más frecuentemente en la mitad apical de uno o ambos semilimbos. El borde de la lámina es espaciado y amarillado cuando está seco. La hoja es hipoestomática. La epidermis en la fase adaxial está recubierta por una cutícula espesa, con ornamentación estriada y papilosa, con visibles campos de puntuación primarios, cristales de oxalato de calcio. La lámina seca se torna de coloración verde acinezado, siendo la fase abaxial mas clara que en la adaxial. Las mismas son inodoras, con sabor suave y ligeramente astringente (FB 4º ed., 2002).

Las flores son pentámeras, actinomorfas, blancas o amarillentas, muy pequeñas, y generalmente están agrupadas en inflorescencias axilares. El fruto es una pequeña cápsula ovoide o elipsoidal, con 1 a 4 semillas. Florece en primavera y fructifica en verano (Sharapin y Col., 2006).

#### **2.1.4 Uso popular de las hojas de *Maytenus ilicifolia***

Desde hace siglos, las hojas de *Maytenus ilicifolia* fueron utilizadas para fines medicinales por indígenas y por la población no indígena de la región Sur de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay (Scheffer, op. cit.).

El uso extensivo de ciertas drogas, los cambios en formas de vida y los hábitos alimentarios, como también factores de estrés en las vidas humanas modernas han llevado a un aumento exponencial en la incidencia de la ulceración gástrica (Maity y Chattopadhyay, 2008).

En 1920, el médico y profesor Aloízio França de la Facultad de Medicina de la Universidad Federal de Paraná informó del éxito de las acciones terapéuticas de *Maytenus ilicifolia* en el tratamiento de la úlcera (Chimin y Col., 2008). En Brasil, las hojas de la planta se preparan en forma de té para el tratamiento de úlceras, indigestión, gastritis crónica y dispepsias (RainTree, s.f.).

Las hojas de Espinheira santa eran mezcladas con la Yerba Mate (*ilex paraguariensis*) en una proporción del 10 % al 15 % y comercializadas en Brasil, con el objetivo de combatir la acidez y gastralgia provocada por esta infusión en algunas personas. Actualmente la comercialización de esta mezcla no se realiza a gran escala aunque algunas empresas han reiniciado su comercialización, popularmente se suele agregar las hojas al mate (Scheffer, op. cit.).

Como resultado de entrevistas realizadas en Brasil, acerca del conocimiento popular asociado al uso de Espinheira santa, se pudo conocer que los encuestados que identificaron el uso de la planta con fines medicinales, hicieron referencia a las hojas. Éstos utilizan la planta en forma de té (infusión), mayoritariamente sin mezclar con otras especies medicinales en la preparación y en menor proporción (15 %) mediante el agregado de las hojas en el mate (Mariot y Barbieri, 2007).

### 2.1.5 Actividad biológica de *Maytenus ilicifolia*

Numerosos estudios se han realizado referentes a la fitoquímica de plantas del género de *Maytenus* y de sus actividades biológicas relacionadas.

Se identificó por TLC la presencia de cinco  $\beta$ -carotenos en extractos de acetato de etilo obtenido de las hojas y corteza de la raíz de *Maytenus aquifolium* que exhibían características antioxidantes. Éstos fueron investigados por sus características redox, y capacidades en el barrido de radicales en la reducción del 2,2-diphenyl-picryl hydrazyl (DPPH) (Corsino y Col., 2003).

Teixeira Games, (2010) evaluó mediante cinéticas de decoloración del radical DPPH, expresados como  $CE_{50}$  (concentración de eliminación del 50 % de radicales libres) la actividad antioxidante de infusiones de drogas vegetales de *M. ilicifolia* comercializadas en Brasil. Encontró una enorme variabilidad y los valores más bajos (cinco muestras) presentaron muy buena actividad antioxidante, comparada por ejemplo con própolis verde (11,33  $\mu\text{g/ml}$ ). Demostró una correlación en la curva descendente en relación a la  $CE_{50}$  y el porcentaje de taninos totales.

La actividad antioxidante, expresada como  $CI_{50}$  (concentración capaz de inhibir el 50 % del DPPH), fue mayor en muestras secadas a 40°C (4,02  $\mu\text{g/ml}$  de espinheira santa) en relación a otras muestras analizadas (7,07  $\mu\text{g/ml}$  a 80°C), pero menores que los patrones de rutina. Fue valorada también la actividad antioxidante, con el método fosfomolibdénico por espectrofotometría a una  $\lambda = 695 \text{ nm}$ , los resultados fueron expresados en relación al ácido ascórbico (100 % de actividad), hubo una disminución con el aumento de la temperatura de secado (Negri y Col., 2009).

Los polifenoles y flavonoides (extracto etanólico) de la corteza de la raíz de *Maytenus ilicifolia* han demostrado acción potencial como depurador de radicales, basado en el blanqueo del radical monocación 2,2'-azinobis (3-

ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) y por la capacidad de eliminar del ácido hipocloroso (HOCl) (Velloso y Col., 2006).

La presencia de metabolitos fenólicos, tales como los flavonoides (Baggio y Col., 2007), taninos (França y Col., 1997; Martins y Col., 2003; Jorge y Col., 2004; Mossi y Col., 2009) y triterpenos (Pereira y Col., 1992; França y Col., 1997; Cordeiro y Col., 1999; Queiroga y Col., 2000; Mossi y Col., 2009; Jorge y Col., 2004) podrían explicar el uso de algunas especies de *Maytenus* como droga antiulcerogénica.

Carlini y Frochtengerten en 1988 demostraron mediante estudios realizados con "abafado" (hojas secas) y extractos liofilizados de *M. ilicifolia* que, cuanto mayor es el tiempo de tratamiento mayor es su gastroprotección. Sin embargo, detectaron que pueden haber alteraciones en el pH (Santos-Oliveira y Col., 2009). Esta observación pudo ser confirmada en experiencias realizados sobre la secreción ácida de la mucosa gástrica aislada de rana, donde se pudo comprobar que los extractos acuosos liofilizados de las hojas, como también la Cimetidina, poseen un efecto inhibitorio sobre los mediadores de histamina H<sub>2</sub> con acción en la superficie serosal de la mucosa gástrica (Ferreira y Col., 2004).

Los mecanismos implicados en esta actividad fueron evaluadas también a partir de extractos acuosos, fracción rica en flavonoides. La acción gastroprotectora se asoció a la inhibición de la secreción de ácido gástrico, posiblemente asociada a la inhibición de la ATPasa H<sup>+</sup>K<sup>+</sup> y modificación en la formación de óxido nítrico (Baggio y Col., 2007).

Los efectos antiulcerogénicos de extractos de *M. aquifolia* han sido confirmados por análisis biológicos. Se identificaron por espectrometría y cromatografía de gases compuestos fenólicos y triterpénicos (friedelina en células cultivadas en medios semisólidos con producción de callos y friedelan-3-ol en cultivos de células en suspensión). En medios semisólidos se observaron rendimientos más altos de compuestos fenólicos (França y Col., 1997).

Fue descripta la identificación de algunos constituyentes minoritarios de Espinheira santa (*M. ilicifolia* y *M. aquifolium*) por HRGC-MS, principalmente triterpenoides y esteroides, varios de los cuales fueron reportados por primera vez en ambas especies de *Maytenus* (Cordeiro y Col., 1999). Queiroga y Col., (2000) evaluaron los efectos de los triterpenos en modelos de úlcera inducida por Indometacina en ratas y determinaron que no son los únicos activos responsables de la acción antiulcerogénica.

Extractos acuosos de *M. ilicifolia* exhibieron actividad antiulcerogénica que ha sido confirmada luego de la administración oral e intraperitoneal en ratas, contra las lesiones de úlcera inducidas por Indometacina y por estrés de restricción en frío. Los extractos demostraron un aumento en volumen y pH del jugo gástrico, con efectos sobre el pH comparable a los de la Cimetidina (Souza-Formigori y Oliveira, 1991). Estudios realizados, utilizando extractos hidroalcohólicos secos obtenidos por "Jet Spouted Bed Dryer", presentaron resultados similares luego de la administración intraperitoneal en ratas Wistar, con un modelo de inducción de stress por restricción en frío (Tabach y Oliveira, 2003).

El extracto acuoso seco obtenido por "spray-dried" a partir de las hojas de *M. ilicifolia* no presentó actividad antiulcerogénica significativa en la administración oral en ratones machos Wistar. Sin embargo, el extracto acuoso liofilizado (control) redujo un 77 % la lesión en úlcera gástrica inducida por Indometacina. La menor actividad fue asociada a la disminución del contenido en taninos (Martins y Col., 2003).

Se evaluó la eficacia de extractos hexánicos (triterpenos) y de acetato de etilo (polifenoles: taninos condensados y flavonoides) como antiinflamatorio, anticonceptivo y en lesiones gástricas, como protector y cicatrizante. El extracto hexánico presentó mejor actividad que el de acetato de etilo, ambos fueron activos por vía oral a dosis de 320 mg/Kg en ratones; se registró un aumento del volumen y pH del jugo gástrico (Jorge y Col., 2004).



Los primeros estudios en relación a la actividad antineoplásica fueron desarrollados por Santana y Col. en 1971 y fueron aislados compuestos triterpénicos con actividad citotóxica *in vitro* (Santos-Oliveira y Col., 2009).

González y Col. en el año 2001 encontraron un efecto analgésico en la prueba de compresión de cola de ratones. Demostraron que la Friedelina y otros triterpenoides del género *Maytenus* inhiben la enzima aldosa reductasa, esta actividad fue débil en compuestos aislados, pero consistente en la fracción de los triterpenos (Santos-Oliveira y Col., 2009).

La administración oral de extractos hidroalcohólicos liofilizados de hojas de *M. ilicifolia* causó un efecto abortivo en ratones a dosis de 1.000 mg/Kg/día con reducción de la tasa de pre-implantación de embriones, pero no tuvo efecto sobre la implantación o la organogénesis. Sugieren una interferencia con la pared uterina dificultando la adherencia del embrión (Montanari y Bevilacqua, 2002).

Las hojas de *M. ilicifolia* son capaces de relajar el endotelio intacto de anillos aórticos de rata, evento que parece implicar la producción de óxido nítrico, la activación de la guanilato ciclasa y la apertura del canal de potasio (Rattmann y Col., 2006).

### **2.1.6 Estudios toxicológicos**

Se comprobó que luego de la administración crónica (tres meses) de un extracto acuoso de partes iguales de *M. aquifolium* y *M. ilicifolia* en ratas y ratones, el comportamiento de los animales no cambió y siguieron ganando peso al igual que los controles. Varios parámetros bioquímicos, hematológicos como así también el examen patológico, no mostraron ninguna alteración significativa. Los efectos sobre la fertilidad de ratas femeninas y masculinas y sobre el embarazo, como así también efectos teratogénicos no revelaron diferencias significativas (Oliveira y Col., 1991).

Además, no fueron encontradas alteraciones morfológicas del sistema reproductivo, ni efectos embriotóxicos después de la administración oral de un extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *M. ilicifolia* (Montanari y Bevilacqua, 2002).

## **2.2 Actividad acuosa**

Desde hace mucho tiempo se sabe que existe una relación entre el contenido de agua de un alimento y su vida útil. No obstante, se ha observado que diferentes alimentos con el mismo contenido de agua difieren significativamente en su estabilidad (Cheftel y Cheftel, 1988).

Existen dos términos relacionados con la humedad contenida en los materiales y productos alimenticios, con significados totalmente diferentes. Uno de ellos se denomina "humedad" o "contenido de agua" y es el porcentaje en peso del agua en el producto. El segundo término corresponde a la seguridad microbiológica del producto, y se la conoce como "humedad relativa de equilibrio" (%ERH) de un material o "actividad de agua" ( $a_w$ ) en alimentos (López, s.f.).

La actividad del agua no es un índice predictivo totalmente exacto, pero se correlaciona suficientemente bien con las velocidades de crecimiento microbiano y muchas reacciones degradativas. El sistema más fácil para tener una medida de la mayor o menor disponibilidad del agua en los diversos alimentos es con la actividad del agua, definida por el descenso de la presión parcial de vapor de agua. Este término se implantó para tener en cuenta la intensidad con que el agua se asocia a los diferentes componentes no acuosos (Fennema, 2000).

En alimentos frescos con alto contenido de humedad, el agua tiene propiedades solventes, incluyendo la habilidad de disolver sólidos y permitir difundir y/o participar directamente en una reacción. A través de estas propiedades, el agua ejerce una fuerte influencia sobre las velocidades de

deterioro químico en alimentos, especialmente oxidación de lípidos y pardeamiento no enzimático. En alimentos con un nivel intermedio de humedad, la oxidación de lípidos y el pardeamiento pueden ocurrir simultáneamente, como indicaron los modelos simples estudiados por Labuza y Col., (1970).

El agua contenida en un alimento ejerce una presión de vapor que es inferior a la ejercida por el agua pura, a la misma temperatura del alimento. La disminución de esta presión por el alimento se debe a varias causas: 1) la interacción de las moléculas del agua con los grupos polares de los polímeros alimenticios, principalmente proteínas y carbohidratos; 2) la disolución de los solutos macromoleculares (sales, azúcares, etc.) en el agua; y 3) la presencia del agua dentro de los poros capilares del alimento. Los puntos 1) y 2) se explican recordando que la disolución de cualquier sustancia en el agua disminuye su presión de vapor, de acuerdo con las leyes de Raoult y Henry; cabe recordar que la interacción de los grupos polares de los polímeros alimenticios equivale a la disolución de estos grupos en el agua. En lo referente al punto 3), se ha establecido que el agua contenida dentro de un poro capilar ejerce, por la curvatura convexa de la superficie, una presión de vapor menor que la del agua en superficie plana, y la disminución de la presión aumenta al disminuir el radio de la curvatura del poro capilar (del Valle Canseco, 1985).

Debido a que el parámetro medido es el descenso de la presión de vapor ( $p/p_o$ ) y no siempre es igual a la actividad del agua ( $a_w$ ), es más exacto usar la relación  $p/p_o$ . A este cociente se lo denomina presión de vapor relativa (RPV) y está relacionado con el porcentaje de humedad relativa de equilibrio del ambiente (%ERH), véase "Ecuación 2.1".

$$a_w \approx p/p_o = \%ERH/100 \quad (2.1)$$

La presión de vapor relativa es una propiedad intrínseca de la muestra; mientras que el porcentaje de humedad relativa de equilibrio es una propiedad de la atmósfera en equilibrio con la muestra. Esta igualdad solo se cumple si se

establece un equilibrio entre el producto y su entorno, es un proceso muy lento incluso con muestras muy pequeñas (menores de 1 g y es casi imposible alcanzarlo con muestras grandes, especialmente a temperaturas inferiores a 50°C). Si se desea ajustar una pequeña muestra a una presión de vapor relativa específica, se coloca la muestra en una cámara cerrada (hermética), a una temperatura constante, manteniendo también constante la humedad relativa de la atmósfera mediante soluciones salinas saturadas apropiadas y dejándolas en estas condiciones hasta peso constante de la muestra (Fennema, op. cit.).

El crecimiento de microorganismos está en relación con la actividad del agua, debido particularmente a la influencia de la presión osmótica sobre los cambios entre membranas. Su crecimiento solo se observa con actividades de agua relativamente elevadas y hay un valor óptimo para su crecimiento, siendo este entre 0,92 y 0,99. Por debajo de este óptimo el crecimiento se retarda, paraliza o inhibe, esto explica parcialmente, la relativa estabilidad frente a los microorganismos de los alimentos secos y adicionados de sal o azúcar. Existe un valor por debajo del cual el organismo ya no crece, véase "Tabla 2.1", Estos valores limitantes son universales, es decir no dependen del tipo de alimento (Cheftel y Cheftel, 1988).

Tabla 2.1: Actividades de agua requeridas para sustentar el crecimiento de Microorganismos Representativos, medidas a 25°C.

Bacteria	Actividad de Agua ( $a_w$ )	Hongos Filamentosos y Levaduras	Actividad de Agua ( $a_w$ )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,97	<i>Rhizopus nigricans</i>	0,93
<i>Bacillus cereus</i>	0,95	<i>Mucor plumbeus</i>	0,92
<i>Clostridium botulinum</i> , Tipo A	0,95	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0,92
<i>Escherichia coli</i>	0,95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	<i>Paecilomyces variotti</i>	0,84
<i>Lactobacillus viridescens</i>	0,95	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,83
<i>Salmonella</i> spp.	0,95	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,82
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,94	<i>Penicillium glabrum</i>	0,81
<i>Bacillus subtilis</i>	0,90	<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
<i>Micrococcus lysodeketicus</i>	0,93	<i>Aspergillus niger</i>	0,77
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	<i>Zygosachharomyces rouxii</i> (levadura osmofílica)	0,62
<i>Halobacterium halobium</i> (bacteria halofílica)	0,75	<i>Xeromyces bisporus</i> (hongo xerofílico)	0,61

Fuente: Farmacopea de los Estados Unidos de América USP 30 NF 25, (2007).

La "Tabla 2.1" indica que un valor de  $a_w = 0,61$  representa la mínima actividad de agua necesaria para el crecimiento de todo tipo de microorganismos. Así, si se desea conservar un alimento por deshidratación será necesario eliminar el agua hasta el punto en que su actividad sea menor de 0,6 (del Valle Canseco, op. cit.).

La importancia de la actividad acuosa de los productos alimenticios durante el tratamiento y/o almacenamiento queda demostrada por las curvas de la "Figura 2.2".

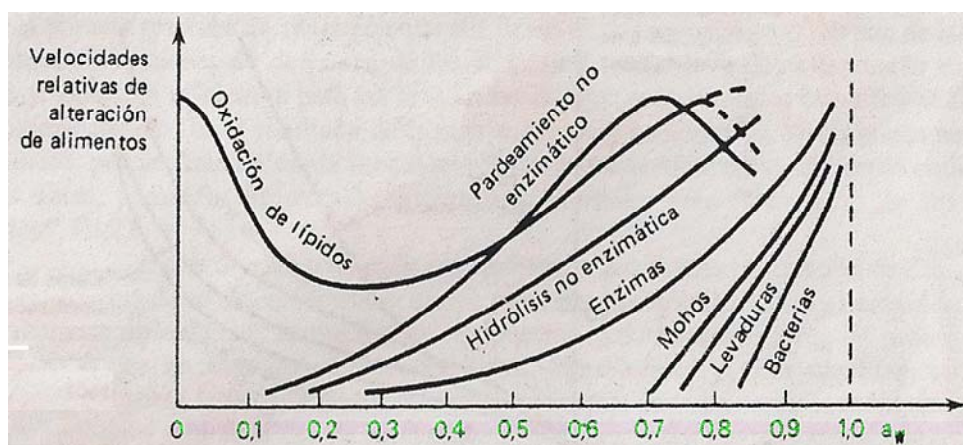


Figura 2.2: Velocidad de alteración de los alimentos en función de la actividad de agua, según Labuza, (1975). Fuente: Chefftel y Chefftel, (1988).

Para poder predecir el punto final de secado, en términos de contenido de humedad de equilibrio, se debe recurrir a la utilización de las isothermas de adsorción de humedad.

### **2.3 Isothermas de adsorción**

El contenido de humedad de un producto cuando está en equilibrio con la atmósfera que lo rodea, es conocido como "contenido de humedad de equilibrio" o "equilibrio higroscópico". Este es útil para determinar si un producto ganará o perderá humedad bajo un sistema dado de condiciones de temperatura y humedad relativa (Ghodake y Col., 2007).

La relación entre el contenido de humedad de equilibrio y la actividad del agua para un alimento sobre un rango de valores a temperatura constante, producen las isothermas de sorción de humedad del material cuando son representadas gráficamente (Rao & Rizvi, 1995).

Las isothermas de adsorción aportan información sumamente valiosa para predecir cambios potenciales en la estabilidad biológica del material, permitiendo determinar la máxima humedad que el mismo puede ganar o perder durante el secado o almacenamiento (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col. 2006).

Las isothermas de adsorción posibilitan también prever el comportamiento de un alimento después de su tratamiento o almacenamiento, en condiciones distintas a las que se estudió experimentalmente. Este aspecto presenta un evidente interés práctico, principalmente en lo referente al almacenamiento (Cheftel, op. cit.).

Las isothermas de adsorción de la mayoría de los alimentos son no lineales, generalmente en forma sigmoidea y han sido clasificadas como

isotermas Tipo II, según Brunauer y Col., (1940), véase "Figura 2.3" (Rao & Rizvi, 2005).

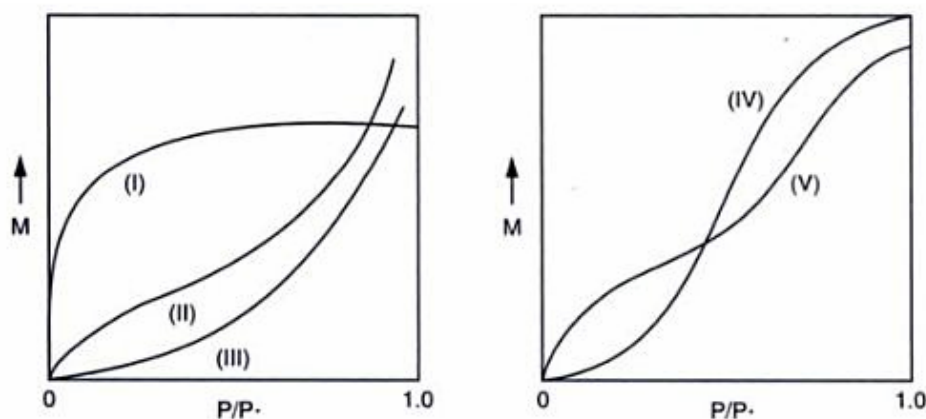


Figura 2.3: Tipos de isotermas de adsorción de Van der Waals, según Brunauer y Col., (1940). Fuente: Rao & Rizvi, (2005).

El método tradicional para medir las propiedades de sorción es el método estático. Aunque éste método requiere largos períodos de tiempo hasta que el equilibrio higroscópico sea alcanzado, tiene la ventaja de mantener fácilmente constantes las condiciones de trabajo (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col. 2006) y presenta un dominio mas estricto de la variación del contenido de agua (Belghit y Col., 2000).

El método de sales saturadas pudo ser usado satisfactoriamente para la determinación experimental del contenido de humedad de equilibrio de plantas aromáticas y medicinales (Kouhila y Col., 2001; Ethmane Kane y Col., 2008; Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006) con suficiente exactitud para propósitos prácticos.

El agua en la región inicial de la capa monomolecular está ligada por enlaces hidrofílicos fuertes en sitios polares en alimentos, es la cantidad de agua necesaria para formar una capa monomolecular continua. Una alta absorción en esta región refleja generalmente altos niveles de macromoléculas hidrofílicas. En la segunda región, el agua esta ligada por enlaces de hidrógeno y se encuentra libremente dentro de los poros o de la estructura de la matriz de

la fibra. Esta región de múltiples capas se puede considerar una fase de transición entre las regiones iniciales y finales de la isoterma. El agua está menos firmemente ligada, cuando el nivel de actividad de agua sobrepasa 0,5, el agua condensada se encierra mecánicamente dentro de los espacios vacíos del alimento y tiene muchas de las características del agua líquida, véase “Figura 2.4” (Fennema, op. cit.).

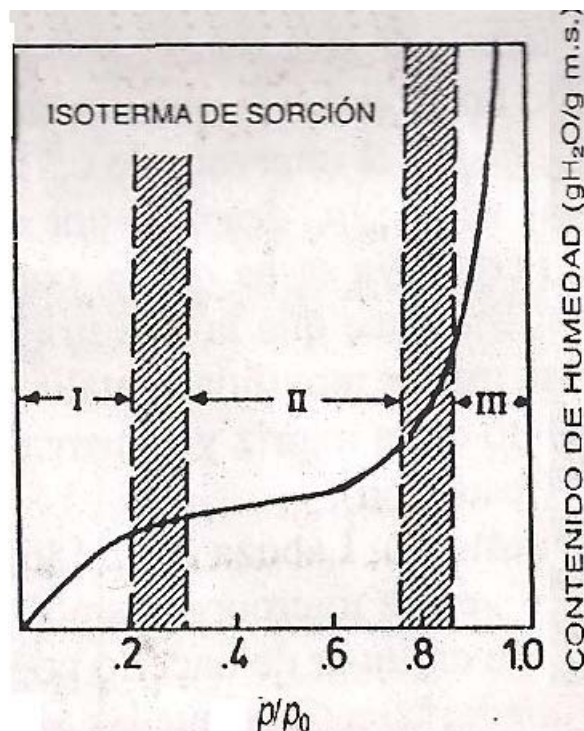


Figura 2.4: Isoterma de sorción de humedad generalizada del segmento de baja humedad de un alimento (20°C). Fuente: Fennema, (2000).

### 2.3.1 Ecuaciones matemáticas para ajustar los datos de sorción

Numerosas ecuaciones empíricas, semi-empíricas o teóricas se han aplicado para correlacionar los datos de isotermas de sorción en hojas de productos agrícolas, incluyendo plantas aromáticas y medicinales (Arslan y Togrul, 2006; Belghit y Col., 2000; Park y Col., 2002; Cordeiro y Oliveira, 2004, Cordeiro y Col., 2006; Zanoelo, 2005; Jamali y Col., 2006; Ghodake y Col.,



2007; Soysal & Öztekin, 1999; Soysal & Öztekin, 2001; Ethmane Kane y Col, 2008).

La utilidad de obtener estas ecuaciones son múltiples: a) las variaciones continuas de temperatura y humedad del aire en contacto con los productos almacenados originan cambios en el contenido de humedad de equilibrio. En investigaciones relativas al almacenamiento, frecuentemente es preciso calcular dicho tenor de humedad por medio de estas ecuaciones; y b) en los cálculos de secado, independientemente del sistema de secado que se ocupe, los valores de contenido de humedad de equilibrio se calculan incontables veces (FAO, 1991).

Cada uno de los modelos propuestos en la literatura ha conseguido reproducir los datos de contenido de humedad de equilibrio para un dado tipo de alimentos y en un rango de actividad de agua (Chirife & Iglesias, 1978; Park y Col., 2002).

Sin embargo, las isotermas calculadas con los datos experimentales usando una ecuación para un modelo de sorción en particular, no proporciona una prueba exacta, frecuentemente se observa que una curva es descrita por muchas ecuaciones diferentes (Chirife & Iglesias, 1978). Chen & Morrey en 1989 fundamentaron que no se encontró una ecuación universal que ajuste a todas las isotermas (Chen, 2000).

Solo algunos modelos consideran a la temperatura como un parámetro. Además, se han propuesto modificaciones a diversas ecuaciones y en este caso la gama de validez aumenta sustancialmente (FAO, 1991).

En los últimos años la ecuación de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) se ha utilizado extensamente para describir el comportamiento de sorción de alimentos. La ecuación de GAB de tres parámetros, derivada de forma independiente de las ecuaciones de Guggenheim (1966), Anderson (1946) y de Boer (1953), es el modelo de sorción mas versátil disponible en la literatura. Las mayores ventajas del modelo de GAB son que: 1) tiene bases

teóricas, 2) describe el comportamiento de sorción de casi todos los alimentos desde cero a 0,9 de  $a_w$ , 3) es una simple fórmula matemática con sólo tres parámetros que la hace muy favorable para cálculos de ingeniería, 4) los parámetros tienen un significado físico en términos de procesos de sorción, y 5) es capaz de describir algunos efectos de la temperatura sobre las isothermas por medio de una ecuación tipo Arrhenius. Además, la ecuación se puede reorganizar y transformarse en una ecuación polinomial de segundo orden (Rao & Rizvi, 1995).

Para muchos productos agrícolas la ecuación de GAB no exhibe una relación tipo Arrhenius con la temperatura. La incorporación del término temperatura incrementa el número de parámetros, haciéndola menos aplicable (Chen & Jayas, 1998).

El modelo de GAB es una versión refinada del modelo de Brunauer, Emmett & Teller (BET), que comparte dos constantes originales y se deriva por la introducción de una tercer constante,  $K$ . Sin embargo, el uso de los dos modelos con datos experimentales ha mostrado valores diferentes para las constantes  $X_m$  y  $C$ ; donde  $X_{m(BET)} < X_{m(GAB)}$  y  $C_{BET} > C_{GAB}$ , estas diferencias han sido atribuidas a la naturaleza matemática de las dos ecuaciones y no a una naturaleza físico-química de los sistemas de sorción al cual son aplicados (Rao & Rizvi, 2005).

Iglesias & Chirife en 1976 reportaron que la ecuación de Halsey pudo ser usada para describir 220 isothermas experimentales de sorción de 69 alimentos diferentes, en un rango aproximado de  $0,1 < a_w < 0,8$  (Chirife & Iglesias, 1978; Rao & Rizvi, 2005).

La ecuación de Oswin modificada podría predecir bien el efecto de la temperatura sobre las isothermas de sorción de algunos materiales biológicos. Aparentemente, no es exacta para todo el rango de humedad relativa (0,01-0,99) y no pudo demostrarse que ajuste a todos los materiales biológicos. Sin embargo, es una ecuación simple con tres parámetros que se usa a menudo (Chen, 1990).

Las ecuaciones de Halsey y Oswin modificada tienen la habilidad de describir exactamente la relación entre contenido de humedad de equilibrio y la humedad relativa de equilibrio en algunas plantas medicinales y aromáticas, en un amplio rango de humedad relativa y temperatura. La ecuación de Oswin modificada y la ecuación de Halsey producen los resultados más fiables para las temperaturas 5°C-45°C y 60°C respectivamente (Soysal & Öztekin, 1999).

Chen & Morrey, (1989) reportaron que la ecuación de Henderson modificada y la de Chung-Pfost son modelos satisfactorios para la mayoría de los granos almidonados y materiales fibrosos (Chen, 2000).

El modelo de Chung-Pfost fue el que mejor ajustó a los datos experimentales para las isotermas de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* de plantas cultivadas en Brasil, y el modelo de Henderson-Thompson para isotermas de desorción. Así, estos modelos pueden ser usados para la estimación del contenido de humedad de equilibrio de hojas de *M. ilicifolia* (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006).

El contenido de humedad de la monocapa ( $X_m$ ) es crítico, de interés práctico y tiene una importancia significativa en la estabilidad física y química de materiales deshidratados con respecto a la oxidación de lípidos, actividad enzimática, pardeamiento no enzimático, preservación de componentes del flavor y características estructurales (Labuza y Col., 1970); coincide con la máxima estabilidad física y química en alimentos secos (Labuza y Col., 1999 citado por Arslan y Togrul, 2006).

Las ecuaciones de BET y GAB proveen el contenido de agua de la monocapa, ambas se pueden considerar por ser los más útiles para determinar las condiciones de humedad óptimas para una buena estabilidad durante el almacenamiento, especialmente en alimentos deshidratados. La ecuación de BET es probablemente la más popular en alimentos, usada generalmente solo para actividades de agua de 0,05 a 0,45 (Chirife & Iglesias, 1978).

La ecuación de BET modificada (lineal) describe la correlación del contenido de humedad de monocapa con la temperatura, y fue aplicada para un grupo de productos de diversos orígenes y propiedades. Se ha establecido que para la mayoría de los materiales existe una alta correlación lineal entre estos dos valores que fue descrita con suficiente precisión (Menkov y Col., 1999).

El modelo lineal de BET fue adecuado para describir las isotermas de sorción en hojas de *Citrus aurantium* (Ait Mohamed y Col., 2005), *Citrus reticulata* (Jamali y Col., 2006<sup>(b)</sup>) y *Chenopodium ambrosioides* (Jamali y Col., 2006<sup>(a)</sup>) para actividades de agua en un rango menor a 0,5. Para actividades de agua hasta 0,4 fue adecuado en hojas de té (Arslan y Togrul, 2006) y frutos de *Opuntia ficus indica* (Lahsasni y Col., 2004); mientras que en semillas de lenteja (Mencov, 2000), a humedades relativas decimales menores a 0,45.

### **2.3.2 Aplicaciones de las isotermas de sorción**

El contenido de humedad de equilibrio de hojas de *Maytenus ilicifolia* de plantas cultivadas en Brasil fue determinado a cuatro temperaturas (30°C, 40°C, 50°C y 60°C), en un rango de humedad relativa de 11 % a 85 %. El modelo matemático que mejor ajustó a los datos experimentales de adsorción, por análisis estadístico, fue el modelo de Chung-Pfost (Cordeiro y Col., 2006). Estos resultados fueron concordantes con estudios previos realizados sobre la misma especie (Cordeiro y Oliveira, 2004).

Belghit y Col., (2000) obtuvieron las curvas de sorción de plantas aromáticas (hojas de verbena) para determinar la cinética de secado del producto y las condiciones que permitan su almacenamiento. Establecieron el modelo que mejor describió las isotermas determinadas a 40°C y mencionan que podrían utilizar los resultados obtenidos a 40°C, con una precisión satisfactoria, para el análisis de otras experiencias de secado a temperaturas cercanas a 40°C.

Arslan y Togrul, (2006) a partir de los datos obtenidos de contenido de humedad de equilibrio del té (*Camellia sinensis* L.), expresados por los modelos de isotermas de sorción que mejor ajustaron, calcularon el calor isostérico de adsorción y desorción. Esos resultados fueron graficados, como una función del contenido de humedad de equilibrio y fueron convenientes para propósitos computacionales relacionados al secado y almacenamiento del té. Por otra parte, con el contenido de humedad de monocapa obtenido con la ecuación de BET modificada (lineal), determinaron entre otras propiedades termodinámicas, el área de la superficie sólida de las muestras y la actividad de agua de monocapa  $(a_w)_m$ , para  $X = X_m$ . Esta última es importante ya que determina las condiciones de almacenamiento del producto a un contenido de agua de monocapa.

Las isotermas de sorción de plantas aromáticas y medicinales (*Mentha pulegium* y *Mentha rotundifolia*) fueron determinadas experimentalmente. Las isotermas de sorción mostraron una forma sigmoidea, con buenos ajustes para los modelos de GAB, Halsey modificado y Peleg. Los valores de calor isostérico de sorción fueron calculados a partir de los datos de equilibrio a diferentes temperaturas, aplicando la ecuación de Clausius-Clapeyron, este calor da una medida de la fuerza vinculante sólido-agua. Se determinaron también otras propiedades termodinámicas (Ethmane Kane y Col., 2008).

Se determinó el contenido de humedad de equilibrio correspondiente a semillas de lenteja, usando el método gravimétrico estático. Entre los resultados se muestra una comparación de los valores de contenidos de humedad de monocapa obtenidos por la ecuación de BET y la ecuación de BET modificada. A partir de la figura de dicha comparación se puede observar que la ecuación lineal (BET modificada) proporciona una mejor descripción de los datos. La actividad de agua de monocapa  $(a_w)_m$  fue determinada por el modelo de BET modificado al poner  $X = X_m = A + B \cdot t$ . A pesar del efecto de histéresis de  $(a_w)_m$  observado para absorción y desorción, las semillas almacenadas a un valor de  $(a_w)_m$  tienen un contenido de humedad igual al de una monocapa sobre todo el intervalo estudiado (Menkov, 2000).

Las isothermas de sorción de tres plantas aromáticas (*Mentha viridis*, *Salvia officinalis* y *Lippia citriodora*), fueron determinadas dentro del rango de 10-90 % de humedad relativa del aire, a tres temperaturas (25°C, 40°C y 50°C), usando el método de soluciones de sales saturadas. Estas determinaciones fueron necesarias para realizar con posterioridad, estudios de secado convectivos usando una secadora solar que posee un sistema de calentamiento complementario (Kouhila y Col., 2001). Con el mismo objetivo se determinaron las cinéticas de secado en hojas de *Citrus reticulata*, el modelo que mejor ajustó al representar los datos del contenido de humedad de equilibrio de esta planta fue el modelo de GAB, mientras que el modelo de BET modificado dio buenos ajustes para actividades de agua en un rango menor a 0,5 (Jamali y Col., 2006<sup>(b)</sup>).

Las curvas de sorción de humedad en hojas de *Chenopodium ambrosioides* a tres temperaturas (30°C, 40°C y 50°C) fueron investigadas experimentalmente. Estas temperaturas se seleccionaron porque son usadas a menudo en el almacenamiento y en los procesos de secado de plantas medicinales. El modelo de GAB y el de Halsey modificado fueron los más adecuados al estimar las isothermas de adsorción. El modelo de BET lineal fue el mejor para un rango de actividad de agua menor a 0,5. El calor neto isostérico de sorción del agua fue calculado a partir de los datos experimentales, este disminuyó con el incremento del contenido de humedad y representó una función polinomial para los datos de adsorción (Jamali y Col., 2006)<sup>(a)</sup>.

Se estudió el contenido de humedad de equilibrio de adsorción y desorción de hojas de *Citrus aurantium* a las temperaturas comúnmente utilizadas para el secado y almacenamiento (30°C, 40°C y 50°C). El modelo de GAB fue el que mejor describió las isothermas de adsorción para este producto y la ecuación de BET modificada arrojó el mejor ajuste para adsorción y desorción en el rango de  $a_w$  de 0,1 a 0,5. Al aplicar el concepto de Clausius-Clapeyron fueron evaluados el calor isostérico de adsorción y desorción, como una función del contenido de humedad. Estas relaciones matemáticas se

pueden utilizar para calcular el calor de sorción de las hojas a varios contenidos de humedad (Ait Mohamed y Col., 2005).

Las isotermas de adsorción para diferentes hortalizas y plantas aromáticas: cebollita de verdeo (*Allium cepa* L.), puerro (*Allium porrum* L.) y pimiento verde (*Capsicum annuum* L.) fueron determinadas experimentalmente. Se obtuvieron los valores máximos de contenido de humedad que deberían tener estos materiales para ser almacenados. Las constantes calculadas para el modelo de GAB se compararon con las de otros productos, encontrándose que no diferían apreciablemente. En particular, con la constante  $X_m$  se pudo conocer los valores de contenido de humedad para el cual los productos almacenados tienen la máxima estabilidad (García y Col., 2007),

Asimismo, la selección de las condiciones óptimas para el almacenamiento de cereales tiene una gran importancia económica. A partir de las gráficas de sorción, obtenidas de dos variedades de maíz y trigo, se observó que si se disminuye la temperatura a valores de actividad de agua constantes, aumenta el contenido de humedad que está en equilibrio. Esto adquiere gran importancia en el almacenamiento de cereales, si se disminuyen algunos grados la temperatura permite almacenar el grano con un porcentaje mayor de humedad, implicando la necesidad de evaporar menor cantidad de agua y menor daño térmico al secar el grano (Arana e Iturbe, s.f.).



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Muestras analizadas

Se analizaron hojas de “cangorosa” (*Maytenus ilicifolia* Mart.) provenientes del Cerro de Santa Ana, provistas por la Asociación Civil Solidaria "Santa Madre Paulina", cosechadas de árboles que crecen en forma silvestre en esa región de la Provincia de Misiones, recolectadas en Junio del 2005.

Las mismas fueron sometidas al proceso de secado bajo las siguientes condiciones:

**Muestra 1:** secado artificial, al aire libre en origen por 2 semanas y luego secadas en estufa a 50°C por 24 horas.

**Muestra control:** secado natural, al aire libre y a la sombra por 72 horas, véase “Figura 3.1”.



Figura 3.1: Muestra de *Maytenus ilicifolia* secada en condiciones naturales.

Luego del secado se seleccionaron manualmente las hojas y se almacenaron en frascos de vidrio de color ámbar.

La determinación y evaluación taxonómica de la especie *Maytenus ilicifolia* Mart. procedente del Cerro de Santa Ana, se encuentra bajo el Registro de coleccionista N° 1239 (30/06/04) en el Herbario de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.



Las muestras para laboratorio se obtuvieron a partir de un lote de 71 kg de hojas y ramas de "cangorosa" distribuida en siete bolsas de aproximadamente 10 Kg cada una, según la metodología propuesta por la Farmacopea Argentina 7° ed., (2003) y las consideraciones de las normas IRAM 37505, 1995 (*Drogas vegetales. Muestreo. Obtención de la muestra compuesta*) e IRAM 37506, 1994 (*Drogas vegetales. Muestreo. Obtención de la muestra para ensayo*).

### **3.2 Equipamientos**

Balanza analítica (Ohaus<sup>®</sup>, modelo Pioner<sup>™</sup>), Evaporador Rotativo escala laboratorio (Figmay<sup>®</sup>), Equipo de filtración con bomba de vacío (Dosivac<sup>®</sup> DVR95), Centrifuga (Gelec<sup>®</sup> G142), Destilador de agua (Dalvo<sup>®</sup> eficiencia 10 litros por hora), Estufa de secado (Sanjor<sup>®</sup>, exactitud  $\pm 0,1$  %), Horno mufla de laboratorio con regulación y control digital de temperatura, Lámpara UV 254-365 nm con Cámara de visualización (ColeParmer<sup>®</sup>), Cámaras de desarrollo de vidrio para cromatografía planar, Cámaras herméticas de vidrio, Micropipeta automática regulable (1-10  $\mu$ l), Aspersor de vidrio, Estufa de vacío (O.R.L.<sup>®</sup>), Juego de tamices, Molino a cuchillas escala laboratorio, Manta calefactora con equipo refrigerante.

### **3.3 Insumos y reactivos**

Cromatofolios de aluminio con Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck<sup>®</sup>), Papel de filtro (Whatman<sup>®</sup> 40 y 41, libre de cenizas), Metanol grado cromatográfico (Merck<sup>®</sup>), Metanol para análisis (Biopack<sup>®</sup>), Cloroformo y Benceno grado cromatográfico (Douglas<sup>®</sup>, U.V.E.<sup>®</sup>), Etanol 96°, Agua destilada de uso farmacéutico, sales de; LiCl, MgCl<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaCl, KBr. Cl<sub>3</sub>Fe y KOH, Ácido Clorhídrico fumante 37 %, Ácido Sulfúrico concentrado 98 % ( $\rho = 1,98$ ), Anisaldehído reactivo para laboratorio (Sigma<sup>®</sup>), Acetato de Etilo grado analítico, gelatina soluble (Anhedra<sup>®</sup>), Cápsulas de porcelana, guantes de amianto, Pesa filtros de aluminio y material volumétrico de vidrio.

Se evaluó la influencia de la temperatura de secado (secado artificial a 50°C y secado en condiciones naturales, temperatura media de 25°C) con los siguientes parámetros: porcentaje de pérdida por secado, contenido de cenizas totales y de extractos solubles, véase “Tabla 3.1”.

Tabla 3.1: Diseño de las experiencias para determinar pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso en hojas de *M. ilicifolia*.

Ensayos	Condición y temperatura de secado	
	Artificial (50°C)	Natural (Tm: 25°C)
Pérdida por secado	M <sub>1.1.1</sub>	M <sub>2.1.1</sub>
	M <sub>1.1.2</sub>	M <sub>2.1.2</sub>
	M <sub>1.1.3</sub>	M <sub>2.1.3</sub>
Cenizas totales	M <sub>1.2.1</sub>	M <sub>2.2.1</sub>
	M <sub>1.2.2</sub>	M <sub>2.2.2</sub>
	M <sub>1.2.3</sub>	M <sub>2.2.3</sub>
Extracto acuoso	M <sub>1.3.1</sub>	M <sub>2.3.1</sub>
	M <sub>1.3.2</sub>	M <sub>2.3.2</sub>
	M <sub>1.3.3</sub>	M <sub>2.3.3</sub>

### 3.4 Pérdida por secado

Se ensayó siguiendo el procedimiento de *Pérdida por secado* codificado en el capítulo <630> *Métodos de Farmacognosia* de la Farmacopea Argentina 7° ed., (2003).

El valor máximo permitido según las especificaciones de la Farmacopeia Brasileira 4° ed., (2002) para Espinheira santa es del 6 %; mientras que en la 5° ed., (2010) de la misma farmacopea este máximo es del 8 % p/p en base seca.

### 3.5 Cenizas

Los ensayos de cenizas se realizaron a hojas sanas y sin tallos de *Maytenus ilicifolia*. Los mismos se efectuaron siguiendo los lineamientos de la Farmacopea Argentina 7 ° ed., (2003).

El valor máximo permitido en la monografía de la Farmacopeia Brasileira 4° ed., (2002) para cenizas totales es del 8 %. Cabe mencionar que no se indica límites para el ensayo de cenizas insolubles en ácido en esta edición.

Con el ensayo de cenizas totales se determina la cantidad total del material después de la ignición. Esto incluye las "cenizas fisiológicas", que se derivan del tejido vegetal en sí mismo, y las cenizas "no fisiológicas", que son el residuo de la materia extraña (por ejemplo: arena y tierra) que se adhieren a la superficie de la planta. Mientras que, las cenizas insolubles en ácido determinan la cantidad de sílice presente, especialmente como arena y tierra silíceas (WHO, 1998).

### 3.6 Extractos acuosos

El ensayo se realizó según la metodología de la Farmacopea Argentina 7° ed., (2003) *Extracto Acuoso, Método I (método de extracción en caliente)* cuyo procedimiento se halla descrito en el capítulo <630> *Métodos de Farmacognosia*.

La monografía de Espinheira santa de la Farmacopeia Brasileira no indica límites para este ensayo que puedan ser tomados como referencia.

Este método determina la cantidad de componentes activos extraídos con el solvente, a partir de una cantidad dada del material de la planta medicinal (WHO, 1998).

### 3.7 Cromatografía en capa fina – TLC

Con el fin de caracterizar las muestras de "cangorosa" y obtener un sistema cromatográfico adecuado para fines comparativos, se realizaron estudios cualitativos por cromatografía planar a extractos de acetato de etilo (fracción que contiene terpenos) de hojas de cangorosa.

#### 3.7.1 Extracción de terpenos

La marcha para la extracción de terpenos se realizó siguiendo los lineamientos del trabajo de Cordeiro, Vilegas y Lanças, (1999).

Procedimiento: Pesar 3 g de droga seca, extraer con acetato de etilo durante 15 minutos a 40°C (tres extracciones de 30 mL cada una). Luego de filtrar, extraer los compuestos ácidos con solución acuosa de KOH 5 % (tres extracciones de 10 mL). Posteriormente, extraer los compuestos básicos con solución acuosa de HCl 5 % (tres extracciones de 10 mL). Lavar la fracción orgánica que contiene los compuestos neutros con 30 mL de agua y concentrar en evaporador rotativo a 30 mL, centrifugar 10 min a 6000 rpm para remover las partículas en suspensión. Evaporar el solvente a sequedad ("Figura 3.2"), el residuo contiene los terpenos.



Figura 3.2: Estufa de secado al vacío. Laboratorio del Dpto. de Farmacia - FCEQyN.

### 3.7.2 Sistema cromatográfico

Se evaluaron dos sistemas de solventes (Cloroformo-Benceno y Metanol-Benceno) por cromatografía en capa delgada, cuyos parámetros se detallan a continuación:

Fase Estacionaria: cromatofolios de Sílica Gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck®)

Disolvente de las muestras: Metanol

Fase Móvil:

- ✓ Cloroformo-Benceno (1:1)
- ✓ Metanol-Benceno (1:9)

Desarrollo de la Fase Móvil: 15 cm

Tiempo aproximado: 1 hora

Secuencia de visualización del perfil cromatográfico en las placas:

- ✓ Luz blanca a simple vista
- ✓ Luz ultravioleta a 254 nm en cámara de visualización ("Figura 3.3")
- ✓ Luz ultravioleta a 365 nm en cámara de visualización
- ✓ Placas rociadas con anisaldehído/ácido sulfúrico bajo luz blanca
- ✓ Placas rociadas con anisaldehído / ácido sulfúrico bajo luz ultravioleta a 254 nm en cámara de visualización
- ✓ Placas rociadas con anisaldehído/ácido sulfúrico bajo luz ultravioleta a 365 nm en cámara de visualización (Debiasi Alberton y Col., 2002)



Figura 3.3: Lámpara UV 254-365 nm con cámara de visualización. Laboratorio del Dpto. de Farmacia - FCEQyN.

### 3.8 Detección de taninos

La detección de taninos se realizó siguiendo el procedimiento establecido en la norma IRAM 37518, 1998 (*Drogas Vegetales. Detección de taninos en plantas vegetales*).

Procedimiento: a partir del material vegetal triturado (Muestra 1 y Muestra control), tratadas separadamente, se realizó una extracción con una mezcla de metanol-agua (25:75) por 48 horas con agitación ocasional. Luego de la extracción, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida utilizando un evaporador rotativo escala laboratorio, a una temperatura entre 40°C – 45°C, se disolvió el residuo con agua y se filtró nuevamente.

La detección de los compuestos (taninos condensados) se realizó mediante reacciones coloreadas y de precipitación con solución de gelatina,

Procedimiento: a 1 mL de la solución obtenida se le adicionó dos gotas de solución acuosa de cloruro férrico, y a otra alícuota del mismo volumen se le adicionó 1 mL de solución de gelatina.

Los taninos, por poseer grupos fenólicos, reaccionan y originan compuestos de color verde, azul o negro con solución de tricloruro férrico. Además, debido a su poder astringente, precipitan a la gelatina en solución, por

lo que la aparición de turbidez o de precipitado blanco serán considerados también como reacción positiva.

### **3.9 Isotermas de adsorción**

Para el estudio de las Isotermas de adsorción se utilizaron las hojas correspondientes a la Muestra 1, trituradas y tamizadas, utilizando tamiz 30 (IRAM 1501,1976). El contenido promedio de humedad inicial de las hojas secas determinado por pérdida por secado fue de 7,1 % p/p (n = 3).

#### **3.9.1 Método experimental**

El método utilizado para determinar las Isotermas de adsorción de las hojas de *M. ilicifolia* fue el método gravimétrico estático. Se colocaron muestras por triplicado, en recipientes herméticos que contenían soluciones salinas saturadas, se mantuvieron a temperatura constante para mantener una atmósfera de actividad de agua conocida durante 15 días. Las soluciones salinas utilizadas fueron: LiCl, MgCl<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaCl y KBr en un rango de  $a_w$  comprendido entre 0,110-0,803 en orden creciente (Greenspan, 1976). Los procesos de adsorción fueron repetidos para temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C ± 2°C.

Se determinó el contenido de humedad de equilibrio por pérdida de masa según la norma IRAM 20503, (1995). El mismo fue calculado como incrementos de masa, expresado en porcentaje sobre base seca. Los datos de contenido de humedad de equilibrio de los pares de temperatura y humedad relativa fueron analizados estadísticamente con las pruebas de Dixon.

### 3.9.2 Ajustes de los datos de adsorción

La relación entre los datos del contenido de humedad de equilibrio, la humedad relativa y la temperatura para las hojas de *Maytenus ilicifolia* fueron evaluadas con los modelos de: Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Chung-Pfost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado y Halsey cuyas expresiones matemáticas se presentan en la "Tabla 3.2".

Tabla 3.2: Modelos matemáticos aplicados a datos de isotermas de adsorción en hojas de *Maytenus ilicifolia*.

Modelo	Expresión del modelo	Referencias
Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB)	$\frac{X}{X_m} = \frac{CKa_w}{(1 - Ka_w)(1 - Ka_w + CKa_w)}$	Van den Berg and Bruin, (1981)
Chung-Pfost	$a_w = \text{Exp}\left(-\frac{A}{T+C}\text{Exp}(-B*X)\right)$	Pfost y Col., (1976)
Oswin modificado	$a_w = \frac{1}{\left(\frac{A+B*T}{X_m}\right)^c + 1}$	Chen, (1990)
Halsey modificado	$\bar{a}_w = \text{Exp}\left(-\text{Exp}(A+B*T) * X^{-c}\right)$	Iglesias & Chitife, (1976)
Henderson modificado	$1 - a_w = \text{Exp}\left(-A * (T+C) * X^B\right)$	Thompson y Col., (1968)
Halsey	$\bar{a}_w = \text{Exp}\left(-A * X^{-c}\right)$	Iglesias & Chitife, (1976)

$X$ : contenido de humedad de equilibrio,  $a_w$ : actividad del agua,  $T$ : temperatura,  $R$ : constante universal de los gases,  $X_m$ ,  $K$ ,  $A$ ,  $B$  y  $C$ : coeficientes específicos de las ecuaciones.

Además de los modelos propuestos en la "Tabla 3.2", y con respecto al modelo de GAB en particular, se realizaron ajustes matemáticos aplicando diferentes alternativas en el tratamiento de los datos experimentales, ellos fueron:

1. **Ecuación de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981):** a partir de los datos experimentales de contenido de humedad de equilibrio, se estimaron los parámetros  $X_m$ ,  $C$  y  $K$  por análisis



de regresión no lineal. Este modelo fue tomado como referencia para evaluar los ajustes que se citan a continuación.

**2. Ecuación de GAB - relación con las entalpías de sorción:**

Conociendo las constantes  $C$  y  $K$  calculadas en el punto 1, se las relacionó con la temperatura, aplicando la "Ecuación 3.1" y la "Ecuación 3.2". Se estimaron los parámetros  $c_o$ ,  $k_o$ ,  $\Delta H_c$  y  $\Delta H_k$  por análisis de regresión no lineal.

$$C = c_o \exp\left[\frac{(\bar{H}_o - \bar{H}_n)}{RT}\right] = c_o \exp(\Delta\bar{H}_c)/RT \quad (3.1)$$

$$K = k_o \exp\left[\frac{(\bar{H}_n - \bar{H}_l)}{RT}\right] = k_o \exp(\Delta\bar{H}_k)/RT \quad (3.2)$$

Las constantes  $C$  y  $K$  se relacionan la temperatura del sistema, el calor de sorción y el calor de condensación del agua;  $X_m$  es el contenido de humedad de monocapa;  $c_o$  y  $k_o$  son factores entrópicos;  $H_o$ ,  $H_n$  y  $H_l$  son las entalpías de sorción molares de la monocapa, multicapa y masa líquida respectivamente;  $T$  es la temperatura absoluta (°K) y  $R$  es la constante universal de los gases (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) (Rao & Rizvi, 2005).

Posteriormente, a partir de estos parámetros se estimaron los valores de  $X_m$  para cada temperatura utilizando la ecuación de GAB.

**3. Ecuación de GAB - modelo polinomial de segundo orden:**

se estimaron las constantes  $a$ ,  $b$  y  $c$  por regresión lineal para cada temperatura, utilizando la ecuación propuesta por Bizot, (1983), véase "Ecuación 3.3". A partir de estas constantes, y según las relaciones indicadas por las "Ecuaciones 3.4", se calcularon los parámetros  $C$  y  $k$  y los valores de contenido de agua de monocapa,  $X_m$ .

$$\frac{a_w}{X_m} = aa_w^2 + ba_w + c \quad (3.3)$$

$$a = \frac{k}{X_m} \left( \frac{1}{C} - 1 \right), \quad b = \frac{1}{X_m} \left( 1 - \frac{2}{C} \right), \quad c = \frac{1}{X_m C k} \quad (3.4)$$

Las constantes  $C$  y  $k$  relacionan la temperatura del sistema con el calor de sorción y el calor de condensación del agua;  $X_m$  es el contenido de humedad de monocapa (Rao & Rizvi, 1995).

4. **Ecuación de GAB - parámetro  $X_m$  = monocapa-BET:** se calculó el contenido de humedad de monocapa-BET ( $X_m$ ) para cada temperatura estudiada, a partir de los datos experimentales de contenido de humedad de equilibrio hasta  $a_w$  de 0,56, aplicando el modelo de BET modificado propuesto por Brunauer, Emmett & Teller, (1938) y Chirife & Iglesias, (1976) (Ait Mohamed, 2005), véase "Ecuación 3.5" y "Ecuación 3.6".

$$X = \frac{(A_x + B_x t) C a_w}{[(1 - a_w)(1 - a_w + C a_w)]} \quad (3.5)$$

$$X_m = A_x + B_x t \quad (3.6)$$

$X$  es el contenido de humedad de equilibrio (% b.s.);  $X_m$  es el contenido de humedad de la monocapa y  $t$  es la temperatura en °C;  $A_x$ ,  $B_x$  y  $C$  son coeficientes independientes de la temperatura.

Los valores de  $X_m$  obtenidos se sustituyeron en la de la ecuación de GAB, y se estimaron las constantes  $C$  y  $K$  por análisis de regresión no lineal.

Además, se determinó la actividad de agua correspondiente a cada contenido de humedad de monocapa  $(a_w)_x$ , aplicando el modelo de BET modificado luego de reemplazar  $X = X_m = A_x + B_x t$ , véase "Ecuación 3.7" (Menkov, 2000).

$$(a_w)_x = \frac{\sqrt{C} - 1}{C - 1} \quad (3.7)$$

Finalmente, se calculó el contenido de humedad que corresponde a una actividad de agua de 0,6 para cada temperatura ensayada, utilizando el modelo matemático que mejor ajustó a los datos experimentales. Para ello, se le asignó

un valor de 0,6 a la actividad de agua ( $a_w$ ), y se reemplazaron las constantes de la ecuación con los valores estimados en este estudio, para determinar los contenidos de humedad límites que eviten el desarrollo de microorganismos.

### 3.9.3 Tratamiento estadístico de los resultados de isothermas de adsorción

La estimación de los parámetros de cada modelo fue determinada por análisis de regresión no lineal, aplicando el método de los mínimos cuadrados con el programa StatGraphics Plus, Versión 5.1.

La determinación de la calidad de los ajustes fue evaluada con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el error medio relativo, expresado como porcentaje (E%), la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE), la prueba de Chi cuadrado y los gráficos de residuales (Boquet y Col., 1979; Menkov, 2000; Cordeiro y Col. 2006; Cuervo-Andrade, 2011), véase "Ecuación 3.8", "Ecuación 3.9" y "Ecuación 3.10".

$$E \% = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|X_{ei} - X_{ci}|}{X_{ei}} \quad (3.8)$$

$$RMSE = \left[ \frac{1}{d_f} \sum_{i=1}^N (X_{ei} - X_{ci})^2 \right]^{1/2} \quad (3.9)$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(X_{ei} - X_{ci})^2}{X_{ci}} \quad (3.10)$$

$X_e$  es el contenido de humedad experimental,  $X_c$  es el contenido de humedad calculado,  $N$  es el número de observaciones y  $d_f$  los grados de libertad (número de observaciones menos número de constantes del modelo) (Menkov, 2000).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Ensayo de pérdida por secado, cenizas totales y extractos acuosos

Se evaluó la influencia de la temperatura de secado de las hojas de *M. ilicifolia* sobre el contenido de pérdida por secado ("Figura 4.1" y "Figura 4.2"), cenizas totales y extracto acuoso, los resultados se muestran en la "Tabla 4.1".

Tabla 4.1: Porcentajes de pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso en hojas de *M. ilicifolia*, secadas en condiciones naturales y artificiales.

Ensayos	Condición y temperatura de secado	
	Artificial (50°C)	Natural (Tm: 25°C)
Pérdida por secado (% p/p)	7,13 7,12 7,16	7,94 8,04 7,98
Cenizas totales (% p/p)	4,72 4,55 4,48	3,37 3,55 3,85
Extracto acuoso (% p/p)	35,80 34,01 36,41	35,32 34,92 34,01

Tm: Temperatura media.

Se aplicó el test de Dixon sobre los resultados obtenidos, los  $r_{calculados}$  fueron menores que el de tabla ( $r_{tabla}$  0,941,  $n = 3$  y  $\alpha = 0,05$ ), no existen datos outlier.

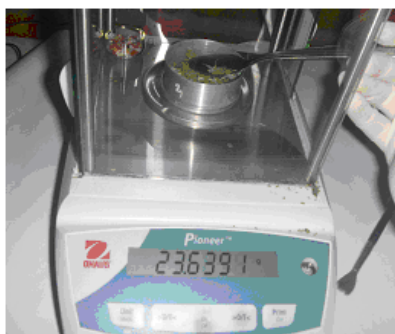


Figura 4.1: Ensayo de pérdida por secado de hojas de *M. ilicifolia* (pesada de las muestras). Laboratorio Dpto. de Farmacia - FCEQyN.



Figura 4.2: Ensayo de pérdida por secado de hojas de *M. ilicifolia* (secado de muestras). Laboratorio Dpto. de Farmacia - FCEQyN.

En la obtención de los extractos secos se observaron precipitados con características de textura gomosa, tal como se observa en la "Figura 4.3".



Figura 4.3: Extractos acuosos secos de hojas de *Maytenus ilicifolia*.

Por otro lado, se aplicó el test de Student a las medias muestrales de porcentaje de pérdida por secado, contenido de cenizas totales y de extractos acuosos correspondientes a la Muestra 1 y Muestra control para evaluar si existen diferencias significativas, los resultados se muestran en la "Tabla 4.2".

Tabla 4.2: Parámetros poblacionales del ensayo de pérdida por secado, cenizas totales y extracto acuoso, y estadígrafo  $t$  calculado (comparación de medias).

Ensayos		Condición y temperatura de secado		Estadígrafo $t$
		Artificial (50°C)	Natural (Tm: 25°C)	
Pérdida por secado (% p/p)	Media	7,14	7,99	24,253
	DS	0,033	0,050	
	CV%	0,47	0,63	
Cenizas totales (% p/p)	Media	4,58	3,59	6,323
	DS	0,123	0,242	
	CV%	2,69	6,75	
Extractos acuosos (% p/p)	Media	35,41	34,75	0,803
	DS	1,247	0,67	
	CV%	3,52	1,93	

$t_{\alpha,v}=2,776$  (95% confianza)      Tm: Temperatura media

Al analizar los resultados obtenidos para el estadígrafo  $t$  se puede observar que para el ensayo de extracto acuoso, las diferencias entre las medias no son significativas, las muestras pertenecen a la misma población. El ensayo de extracto acuoso no se encuentra codificado en la monografía de la FB 4° ed., (2002) para *Maytenus*; sin embargo éstos resultados podrían considerarse para hallar una relación entre la extracción de solubles y las condiciones de secado.

Para el ensayo de pérdida por secado, si bien las diferencias son significativas, ambas muestras cumplen con los requerimientos farmacopéicos de no contener más del 8 % p/p en b.s. (FB 5° ed., 2010).

Respecto a la temperatura de secado del material vegetal, la Organización Mundial de la Salud recomienda que las plantas medicinales sean secadas a temperaturas inferiores a 60°C, evitando pérdida de material volátil y degradación de principios activos (WHO, 2003).

En este sentido Negri y Nakashima, (2006) evaluaron el contenido de polifenoles totales y taninos en hojas de Espinehira santa secadas a diferentes temperaturas (intervalo de 40°C – 80°C, esta última corresponde al secado de rutina de productores). Los resultados indicaron que el contenido de polifenoles totales y taninos disminuyen con el aumento de la temperatura de secado, presentando la muestra secada a 40°C los mayores valores para ambos activos. Los valores encontrados de polifenoles totales y taninos estuvieron comprendidos en el rango de las especificaciones de la FB 4° ed., (2002). A menores temperaturas de secado se verifican los mayores valores de capacidad antioxidante; siendo sugeridas temperaturas de secado de 40°C para las hojas de Espinehira santa (Negri, 2007).

En relación al contenido de cenizas totales, las diferencias fueron significativas pero también ambas muestras cumplen los requerimientos farmacopeicos que establecen como máximo un 8 % (FB 4° ed., 2002).

La Farmacopeia Brasileira 4 ° ed., (2002) no reporta límites en relación al contenido de cenizas insolubles en ácido que puedan ser consideradas como valores comparativos. Al realizar los ensayos sobre hojas de la Muestra 1 se obtuvo un CV % = 48,81 (n = 3), lo que es indicativo de la necesidad de controlar los puntos críticos (restos carbonosos al final de la calcinación, pérdidas del residuo al retirarlo de la mufla, etc.). Estas diferencias estarían asociadas al método de determinación y no a las muestras, por tal motivo no se presentan los resultados obtenidos. Se evidencia la necesidad de realizar otras experiencias para la determinación del contenido de cenizas insolubles en ácido.

Considerando principalmente que ambas muestras cumplen los requerimientos farmacopeicos, las experiencias de Isotermas de adsorción se realizaron en las hojas correspondientes a la Muestra 1.

## 4.2 Cromatografía en capa Fina - TLC

### 4.2.1 Terpenos en *Maytenus ilicifolia*

El perfil cromatográfico más óptimo obtenido para los extractos de hojas de *Maytenus ilicifolia* conteniendo triterpenos fue con el sistema de solventes Cloroformo/Benceno, cuya expresión gráfica se observa en la "Tabla 4.3".

Tabla 4.3: Expresión gráfica del cromatograma de extractos de acetato de etilo de hojas de cangorosa reveladas bajo luz UV a 254 nm, luz UV a 365 nm y con anisaldehído – sulfúrico bajo luz UV a 365 nm.

TERPENOS		Luz ultravioleta (254 nm)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MUESTRA																
1			x				x					x	x		x	x
4				x		x				x	x			x	x	x
		Luz ultravioleta (365 nm)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MUESTRA																
1															x-n	x-n
4														x-a		
		Luz ultravioleta (365 nm) revelado con anisaldehído														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MUESTRA																
1		0,23-n	0,38-am	0,57-li										0,8-a		0,96-a
4		0,23-n	0,38-am	0,57-li										0,8-a		0,96-a

Referencias: M1: Muestra 1, M4: Muestra control.

Colores: am: ámbar, a: amarillo, n: naranja, li: liláceo.

En la "Figura 4.4" se observa la fotografía de una fracción de la placa cromatográfica con muestras de cangorosa relacionadas a esta investigación, luego del revelado con anisaldehído/sulfúrico y observado bajo lámpara UV a 365 nm en cámara de visualización.





Figura 4.4: TLC de extractos de terpenos en cangorosa. FM: Cloroformo–Benceno.  
Revelador: anisaldehído–sulfúrico bajo luz UV a 365 nm.  
M1: Muestra 1, M4: Muestra control.

Los valores obtenidos de  $R_f$  para terpenos en hojas de *M. ilicifolia* fueron: 0,23, 0,38, 0,57, 0,8 y 0,96 con el sistema de solventes Cloroformo/Benceno y revelado con anisaldehído/sulfúrico bajo luz UV de onda larga (Pergher y De Battista, 2009).

### 4.3 Detección de taninos

Los extractos acuosos correspondientes a la Muestra 1 y a la Muestra control ("Figura 4.5") reaccionaron con solución acuosa de tricloruro férrico originando una coloración en la gama del verde oscuro al negro, véase "Figura 4.6" y con la gelatina formando los precipitados característicos, véase "Figura 4.7".



Figura 4.5: Extractos acuosos de *M. ilicifolia*.

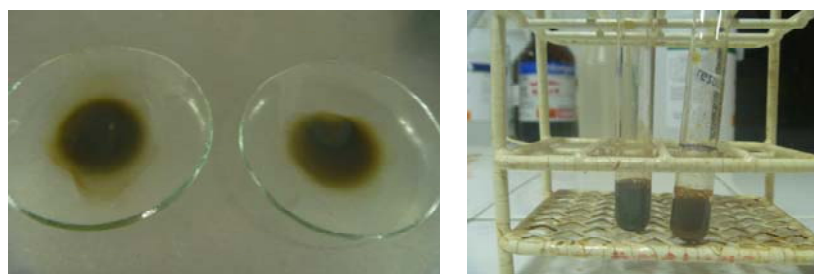


Figura 4.6: Reacción positiva de extractos acuosos de *M. ilicifolia* con solución de tricloruro férrico (Muestra 1 y Muestra control).

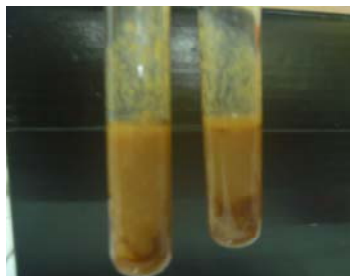


Figura 4.7: Precipitación de la gelatina con extractos acuosos de hojas de *M. ilicifolia* (Muestra 1 y Muestra control).

#### 4.4 Isotermas de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia*

La "Tabla 4.4" contiene los resultados experimentales de la valoración del contenido de humedad de equilibrio en base seca para adsorción, a las diferentes temperaturas y humedades relativas decimales ( $a_w$ ) ensayados. La desviación estándar se expresa sobre triplicados.

Tabla 4.4: Resultado experimental de la valoración de contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.) para adsorción en hojas de *Maytenus ilicifolia* a diferentes temperaturas y humedades relativas. Fuente: Pergher y De Battista, (2009).

Sal	$a_w^*$	30°C		40°C		50°C		60°C	
		$a_w^*$	Contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.)	$a_w^*$	Contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.)	$a_w^*$	Contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.)	$a_w^*$	Contenido de humedad de equilibrio (% p/p b.s.)
CLi	0,113	4,5 ± 0,06	0,112	4,2 ± 0,15	0,111	3,5 ± 0,07	0,110	2,4 ± 0,24	
CIMg	0,324	6,7 ± 0,07	0,316	6,5 ± 0,05	0,305	5,8 ± 0,09	0,293	3,9 ± 0,10	
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg	0,514	9,0 ± 0,07	0,484	7,9 ± 0,14	0,454	6,8 ± 0,13	----	4,9 ± 0,00	
BrNa	0,560	8,9 ± 0,01	0,532	8,5 ± 0,01	0,509	7,7 ± 0,12	0,497	6,2 ± 0,09	
NO <sub>3</sub> Na	0,731	12,8 ± 0,13	0,710	12,4 ± 0,00	0,690	13,0 ± 0,31	0,674	9,1 ± 0,85	
ClNa	0,751	13,2 ± 0,05	0,747	12,3 ± 0,15	0,744	12,4 ± 0,14	0,745	12,8 ± 0,64	
BrK	0,803	13,1 ± 0,04	0,791	12,0 ± 0,13	0,790	10,5 ± 0,05	0,789	15,2 ± 0,07	

\*Greenspan, (1976).

Al aplicar la prueba de Dixon sobre los datos obtenidos de contenido de humedad de equilibrio se detectaron valores outlier. En la "Tabla 4.5" se observan estos valores con sus correspondientes estadígrafos " $r$ " calculados.

Tabla 4.5: Resultados positivos de las pruebas de Dixon sobre datos de contenido de humedad de equilibrio en hojas de *Maytenus ilicifolia*.

Temperatura	Valores outlier	$r$ calculado
30°C	8,74	0,953
50°C	11,62	0,998
60°C	6,66	0,954

$r_{\text{tabla}} = 0,941$  (n = 3 y  $\alpha = 0,05$ ).

Los resultados de la valoración del contenido de humedad de equilibrio indican que la temperatura y humedad relativa tienen un efecto significativo sobre los valores experimentales. El contenido de humedad de equilibrio se incrementa cuando disminuye la temperatura a humedad relativa constante. Mientras que, a temperatura constante, el contenido de humedad de equilibrio se incrementa cuando aumenta la humedad relativa (Pergher y De Battista, 2009). Según Ait Mohamed y Col., (2005) este efecto se puede relacionar con el estado de excitación más alto de las moléculas de agua a temperaturas elevadas, conduciendo a una reducción en las fuerzas atractivas. Un comportamiento opuesto es causado por la humedad relativa (Ghodake y Col., 2007). La activación de las moléculas de agua debido al aumento de la temperatura hace que se rompan los sitios de unión del agua, reduciendo así el contenido de humedad de equilibrio (Ethmane Kane y Col., 2008).

El efecto de la temperatura sobre el contenido de humedad de equilibrio de las hojas de *Maytenus ilicifolia* fue consistente con los resultados observados en estudios realizados sobre hojas de la misma especie (Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006).

Tendencias similares fueron reportadas en plantas aromáticas y medicinales (Kouhila y Col., 2001; Park y Col., 2002; Arslan y Togrul., 2006; Ghodake y Col., 2007), como así también para materiales alimenticios (Menkov, 2000; Lahsasni y Col., 2003; Ait Mohamed y Col., 2005).

#### **4.4.1 Ajustes matemáticos a los datos experimentales de adsorción**

Se ajustaron los modelos de: Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Chung-Pfost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado y Halsey a los datos experimentales de adsorción de hojas de *M. ilicifolia* para cada temperatura ensayada (30°C, 40°C, 50°C y 60°C), y se calcularon las constantes de los mismos.

La "Tabla 4.6" contiene las constantes estimadas, por análisis de regresión no lineal, utilizando las ecuaciones propuestas en la "Tabla 3.2" (ver 3.9.2 Ajustes matemáticos a los datos experimentales de adsorción). También se muestran los parámetros estadísticos utilizados para evaluar la calidad de los ajustes.

Tabla 4.6: Parámetros estimados, coeficientes de determinación y de Chi-cuadrado, y errores en los ajustes de los modelos de Isotermas de adsorción en hojas de *M. ilicifolia*.

Modelos de sorción		30°C	40°C	50°C	60°C
Parámetros					
Guggenheim-Anderson-de Boer (Van den Berg and Bruin, 1981)	$X_m$	5,979	6,044	7,765	3,120
	$K$	0,722	0,693	0,571	1,014
	$C$	23,552	19,661	8,063	17,814
	$R^2$	97,79	96,37	85,85	99,76
	E%	-1,98	0,32	0,72	-8,94
	RMSE	0,76	0,76	1,78	1,4
	$\chi^2$	0,131	0,202	1,135	0,033
Chung-Pfost	$A$	150,177	163,887	164,893	125,82
	$B$	0,243	0,252	0,245	0,178
	$C$	-5,020	-12,319	-17,172	-3,174
	$R^2$	97,46	96,27	84,93	92,87
	E%	0,06	-0,10	-0,97	22,21
	RMSE	0,67	0,77	1,68	2,30
	$\chi^2$	0,179	0,221	1,041	Valor significativo
Oswin modificado	$A$	3,861	2,175	0,460	7,198
	$B$	0,162	0,154	0,149	-0,013
	$C$	3,025	3,017	2,851	1,568
	$R^2$	97,53	95,98	83,51	98,61
	E%	-0,17	-0,53	-2,73	4,87
	RMSE	0,66	0,80	1,76	0,76
	$\chi^2$	0,147	0,221	1,135	0,457
Halsey modificado	$A$	2,88	2,744	2,467	1,281
	$B$	0,050	0,039	0,030	.0,008
	$C$	2,221	2,226	2,113	1,177
	$R^2$	96,32	94,26	80,56	99,60
	E%	-1,26	-1,92	-4,34	11,8
	RMSE	0,78	0,95	1,91	1,95
	$\chi^2$	0,227	0,357	1,422	3,311
Henderson modificado	$A$	0,006	0,002	0,002	0,006
	$B$	2,097	2,102	1,948	1,037
	$C$	-28,769	-36,783	-43,000	-43,93
	$R^2$	97,01	96,12	95,49	96,63
	E%	33,30	33,03	34,05	59,04
	RMSE	4,5	4,22	4,48	7,49
	$\chi^2$	11,434	10,622	12,625	39,431
Halsey	$A$	78,761	68,939	51,085	
	$r$	2,220	2,202	2,111	
	$R^2$	96,47	94,35	80,56	Modelo no válido
	E%	-1,19	-1,61	-4,33	
	RMSE	1,11	1,34	2,70	
	$\chi^2$	0,227	0,350	1,422	

$X_m$ ,  $K$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $r$ : constantes de los modelos,  $R^2$ : coeficiente de determinación, E%: error medio relativo, RMSE: raíz del error cuadrático medio y  $\chi^2$ : coeficiente de Chi-cuadrado.  $X^2_{(0,05, 3)} = 7,8147$ ).

Los datos experimentales a la temperatura de 60°C no pudieron ser modelados con la ecuación de Halsey, debido a que al ingresar la ecuación para estimar sus constantes en el programa StatGraphics Plus versión 5.1, el modelo resultaba no válido para el tratamiento de datos experimentales.

Técnicas de regresión no lineal pueden ser usadas en plantas medicinales y aromáticas para describir la relación entre el contenido de humedad de equilibrio y la humedad relativa de equilibrio (Soysal & Öztekin, 1999), esto queda demostrado al evaluar los índices estadísticos calculados para los diferentes modelos.

La calidad de los ajustes se analizó evaluando el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el error medio relativo, expresado como porcentaje (E%), la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE), la prueba de Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y los gráficos de residuales (Bouquet y Col., 1979; Menkov, 2000; Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006; Cuervo-Andrade, 2011). En general, valores mayores de  $R^2$  y valores pequeños de error medio relativo, asociados a distribuciones al azar en los gráficos de residuales indican buenos ajustes (Cordeiro y Col., 2006).

El coeficiente de determinación más elevado ( $R^2_{\text{promedio}} = 97,44$ ) fue obtenido con el modelo de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981). Este modelo fue capaz de describir los 97,4 % de la variación de los datos de contenido de humedad experimentales debido al efecto de la temperatura en un intervalo de 30°C a 60°C y/o humedad relativa decimal de 0,110 a 0,803.

Generalmente, valores de error por debajo del 10 % indican ajustes adecuados para fines prácticos (Park y Col., 2002; Arslan y Togfúl, 2006). Los modelos de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), Oswin modificado y Halsey cumplirían con esta condición; mientras que el modelo de Chung-Pfost y el de Halsey modificado no la cumplen a la temperatura de 60°C. El modelo de Henderson modificado arrojó los valores más elevados de error medio relativo ( $E\%_{\text{promedio}} = 39,86 \%$ ).

Con el propósito de encontrar los parámetros de máxima verosimilitud, se buscan los mínimos de RMSE (Bouquet y Col., 1979). El modelo de Henderson modificado arrojó los valores más elevados para todas las temperaturas estudiadas ( $RMSE_{promedio} = 5,17$ ) comparativamente con los demás modelos.

Los valores de Chi-cuadrado más bajos o aquellos que tienden a cero, se consideran los más óptimos (Cuervo-Andrade, 2011), Según los resultados obtenidos para este estadígrafo se observa que no existen diferencias significativas entre los valores predichos por el modelo y los datos experimentales al evaluar los modelos de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), Oswin modificado, Halsey modificado y Halsey. En particular, el factor  $\chi^2$  de comparación a la temperatura de 60°C para el modelo de Chung-Pfost, arroja un valor de magnitud muy alejada de la media ( $X^2_{calculado} 326,226$ ), se concluye que el modelo de Chung-Pfost no es aplicable a la mencionada temperatura. Asimismo, los valores obtenidos para el modelo de Henderson modificado indican que las diferencias son significativas para todas las temperaturas estudiadas.

En base a los parámetros estadísticos evaluados hasta ahora se puede concluir que, el modelo de Henderson modificado no puede ser aplicado para predecir los datos experimentales de adsorción en hojas de *M. ilicifolia* dado los elevados errores obtenidos, sumado a los resultados del factor Chi-cuadrado. Esto corrobora la importancia de aplicar varios parámetros de decisión para evaluar adecuadamente los modelos.

En las "Figura 4.8", "Figura 4. 9", "Figura 4.10", "Figura 4.11", "Figura 4.12" y la "Figura 4.13" se observan las predicciones de las diferentes ecuaciones ajustadas a los datos experimentales de adsorción en hojas de *M. ilicifolia* para las temperaturas ensayadas.



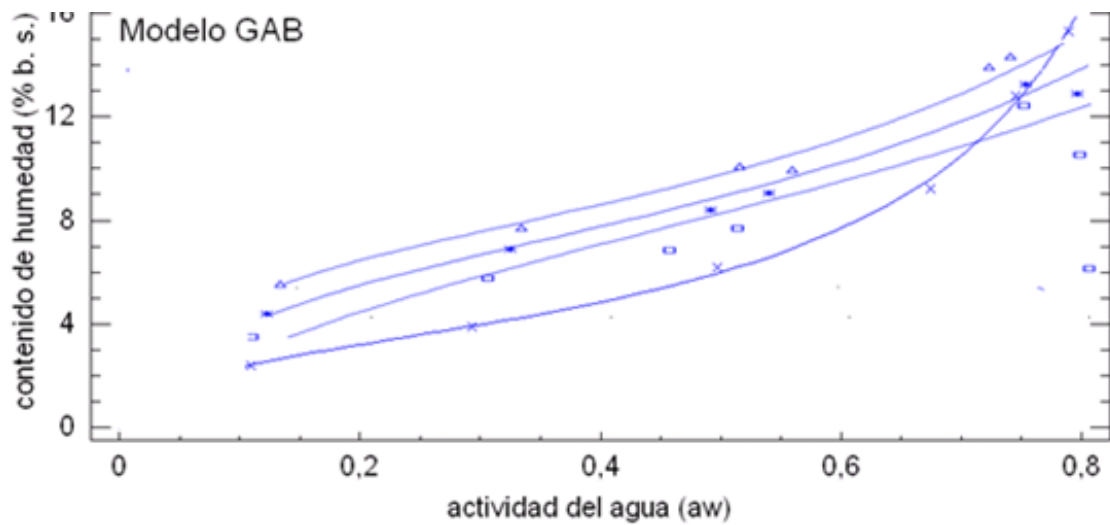


Figura 4.8: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB.

Δ t=30°C, \* t=40°C. □ t=50°C, × t=60°C. Fuente: Pergher y De Battista, (2009).

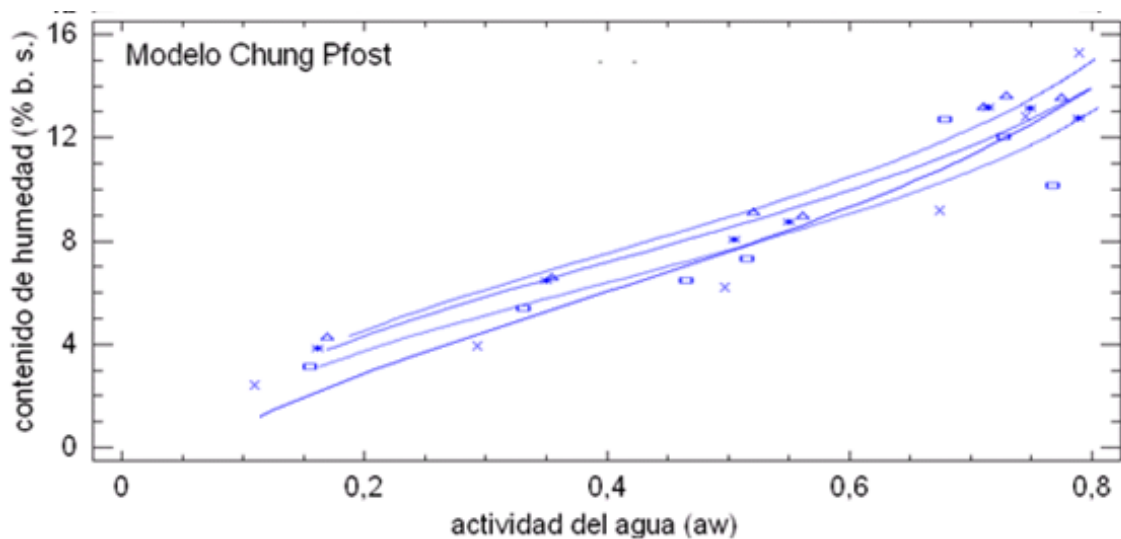


Figura 4.9: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Chung Pfof.

Δ t=30°C, \* t=40°C. □ t=50°C, × t=60°C.

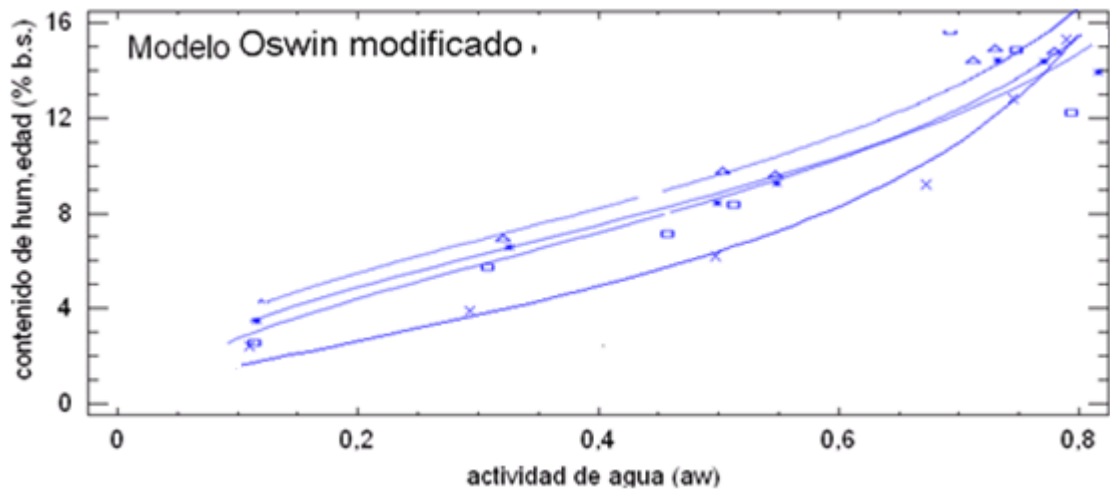


Figura 4.10: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Oswin Modificado.  $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .

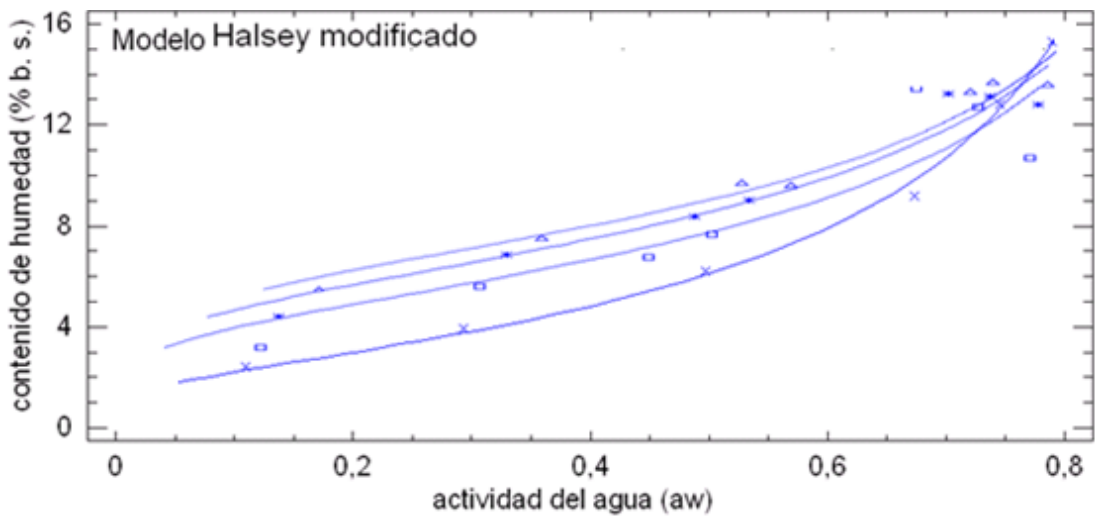
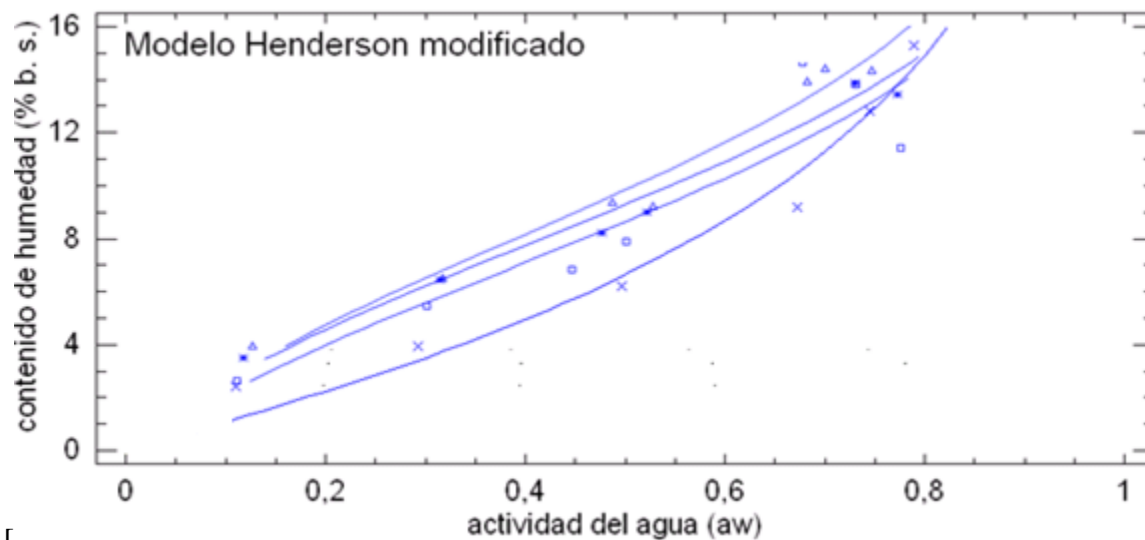


Figura 4.11: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Halsey Modificado.  $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .



[  
 Figura 4.12: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Henderson Modificado.  
 $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .

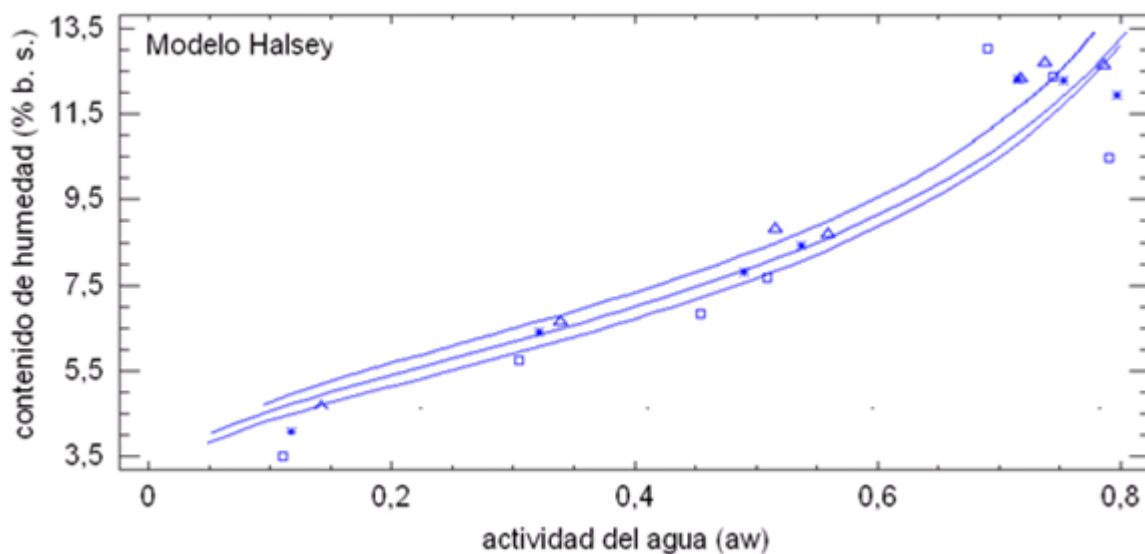


Figura 4.13: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de Halsey.  
 $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .

En general, el contenido de humedad de equilibrio aumenta al incrementarse la actividad de agua, para una misma temperatura (Rao & Rizvi, 2005). Esta isoterma fue una curva sigmoideal, lo que refleja una isoterma de Tipo II, según la clasificación de Brunauer y Col., (1940).

Esta isoterma típica fue observada en varios productos biológicos (Arslan y Togfúl, 2006; Jamali y Col., 2006; Cordeiro y Oliveira, 2004; Cordeiro y Col., 2006; Lahsasni y Col., 2003; Mencov. 2000).

Al evaluar el efecto de la temperatura sobre los resultados del contenido de humedad de equilibrio se observa que las Isotermas de adsorción de las hojas de *Maytenus ilicifolia* muestran una ligera disminución en la cantidad de agua absorbida para un aumento de la temperatura, a humedad relativa constante. Esto podría atribuirse a una activación de las moléculas de agua debido al aumento de la temperatura que hace que los sitios de unión del agua se rompan, con lo que disminuye el contenido de humedad de equilibrio (Arslan y Togfúl, 2006).

Los resultados del efecto de la temperatura sobre las isotermas de adsorción de hojas de *M. ilicifolia* fueron consistentes con los observados por Cordeiro y Oliveira, (2004) y por Cordeiro y Col., (2006) que estudiaron plantas de la misma especie pero cultivadas en Brasil.

Para todos los modelos de isotermas obtenidos a la temperatura de 60°C, las curvas exhiben un comportamiento diferente comparado con las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C. Esto podría atribuirse a cambios estructurales y/o químicos de la muestra, las altas temperaturas podrían ejercer algún tipo de efecto sobre los diferentes componentes de la muestra y modificar su adsorción.

Los valores del contenido de humedad de equilibrio de los productos biológicos dependen de la temperatura y de la humedad relativa del aire, de la especie o variedad del producto. También influyen la madurez fisiológica, la historia del producto y la manera en que se obtuvo el equilibrio (adsorción o desorción) (FAO, 1991; Fennema, 2000).

En "Figura 4.14", "Figura 4.15", "Figura 4.16" "Figura 4.17", "Figura 4.18", y en la "Figura 4.19", se observan los gráficos de distribución de residuales de los modelos ajustados a los datos experimentales de contenido de humedad de equilibrio de hojas de *M. ilicifolia*.

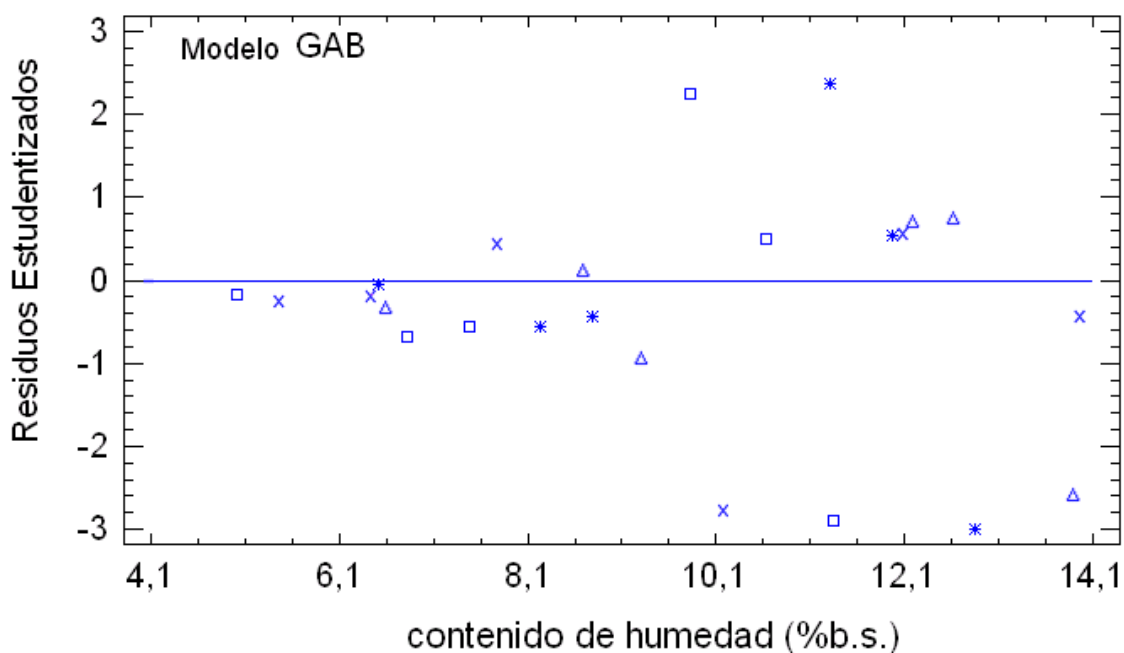


Figura 4.14: Gráfico de residuales de la ecuación de GAB, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  
 $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

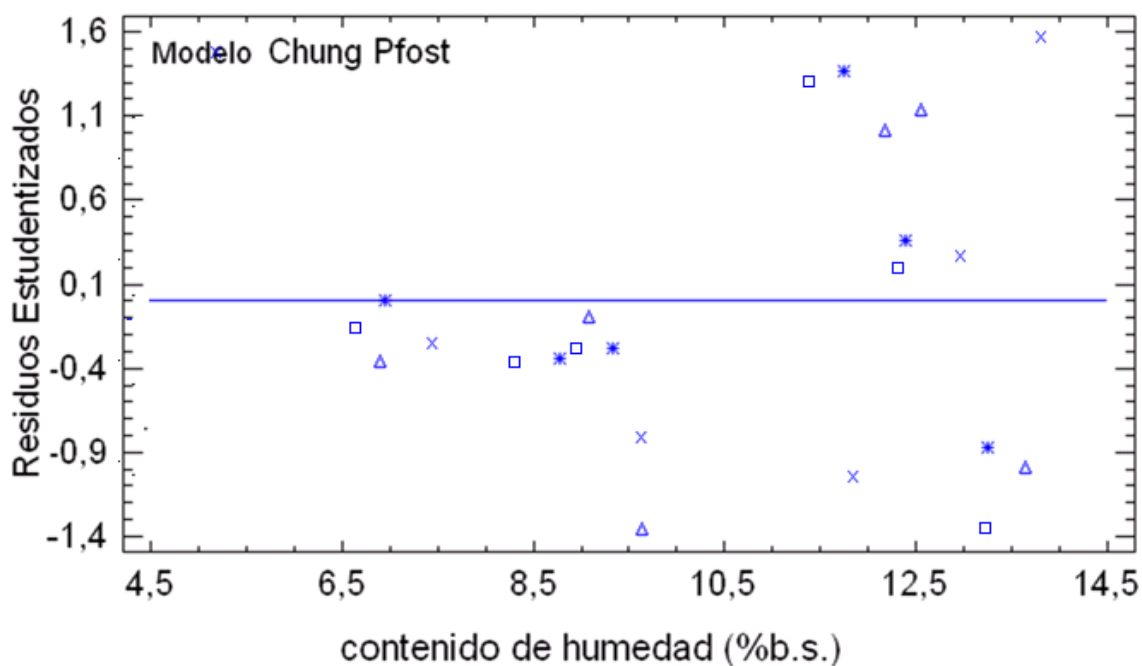


Figura 4.15: Gráfico de residuales de la ecuación de Chung Pfof, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  
 $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

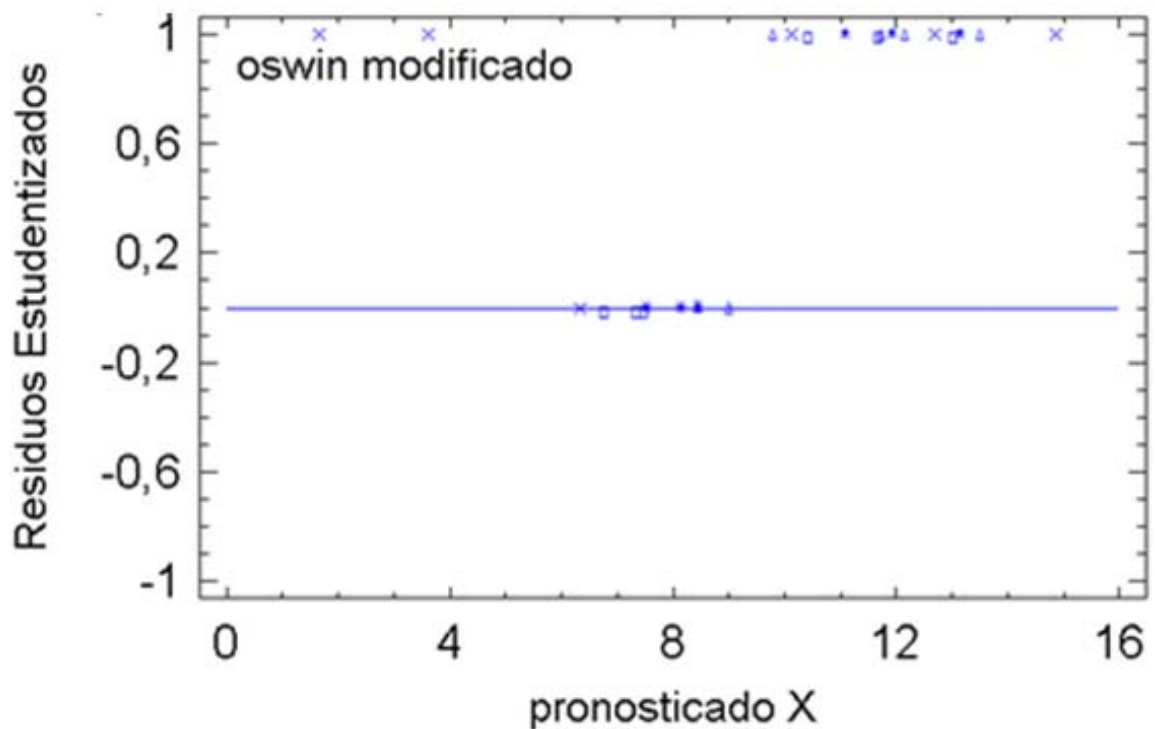


Figura 4.16: Gráfico de residuales de la ecuación de Oswin Modificada, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

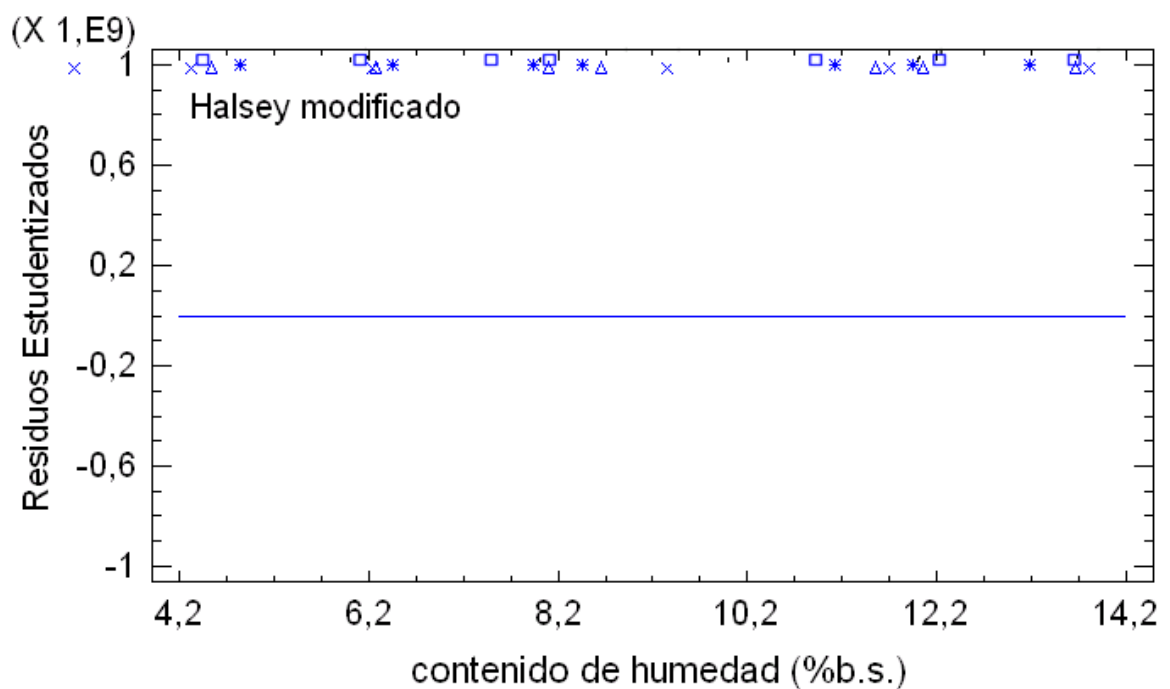


Figura 4.17 Gráfico de residuales de la ecuación de Halsey Modificada, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

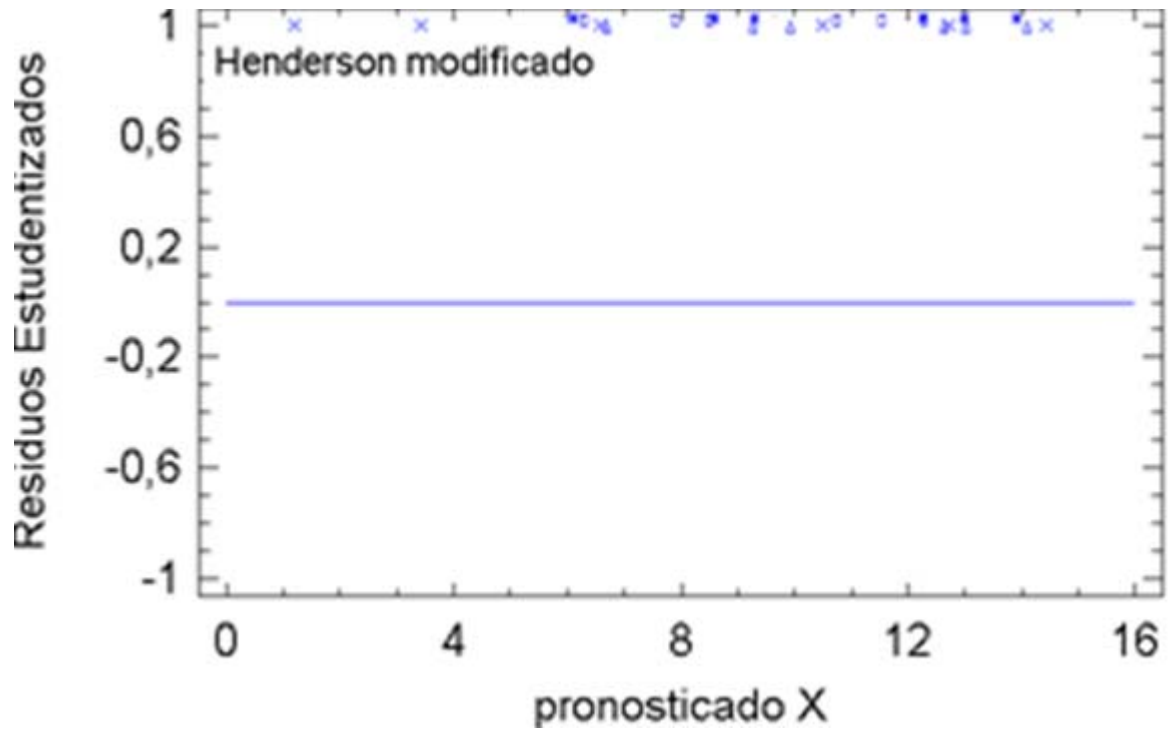


Figura 4.18: Gráfico de residuales de la ecuación de Henderson Modificada, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

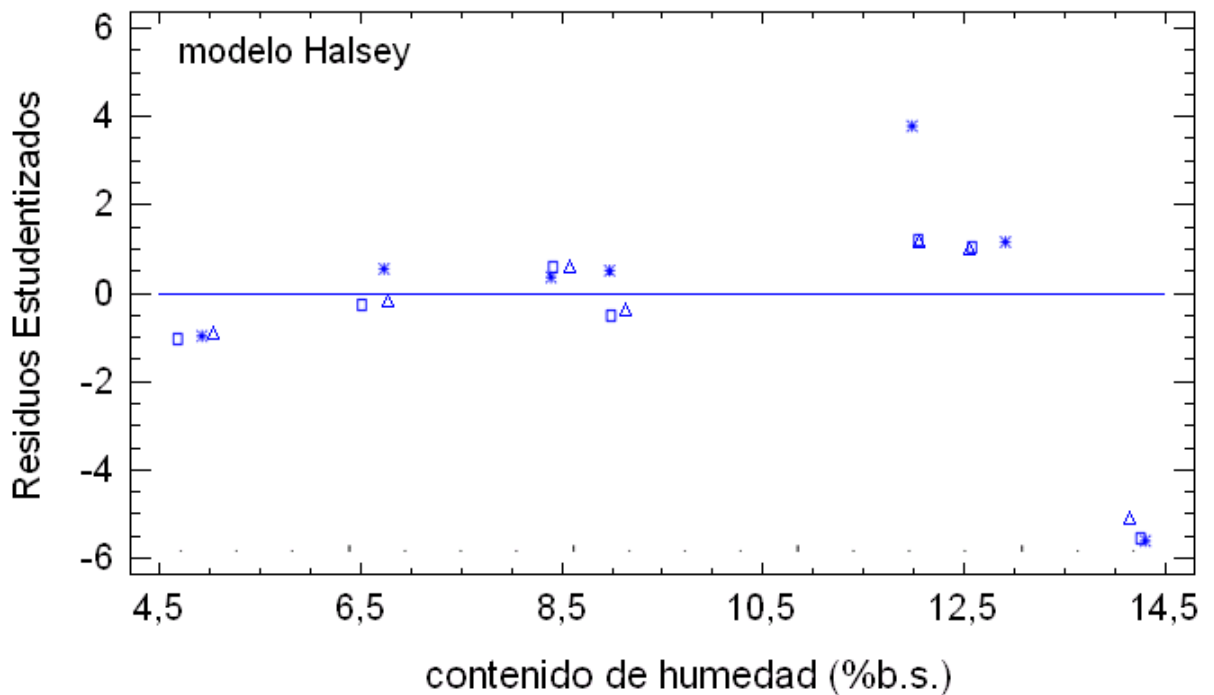


Figura 4.19: Gráfico de residuales de la ecuación de Halsey, ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C.  $\square$  t=50°C,  $\times$  t=60°C.

Los modelos de Halsey modificado y Henderson modificado indican una distribución de errores residuales alejado de la línea media, siguiendo un claro patrón de distribución, por lo que estas ecuaciones se consideran inadecuadas. Para el modelo de Oswin modificado se evidencia que el modelo puede predecir únicamente los datos experimentales en un rango comprendido aproximadamente entre el 6 % y 9,5 % de contenido de humedad.

Los residuales obtenidos para el modelo de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981) tuvieron una distribución relativamente aleatoria, pero que indica una desviación que podría corregirse si se introduce en la ecuación un término cuadrático. Considerando lo antes mencionado, se ajustaron los datos experimentales utilizando el modelo polinomial de segundo orden propuesto por Bizot, (1983).

Además, se realizaron ajustes matemáticos utilizando diferentes propuestas para el tratamiento de los datos experimentales basados en la ecuación de GAB, según lo indicado en la sección 3.9.2 Ajustes de datos adsorción.

La "Tabla 4.7" contiene los parámetros estimados, coeficientes de determinación y de Chi-cuadrado, y los errores en ajustes del modelo tomado de referencia: GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), del modelo de GAB polinomial de segundo orden y de las diferentes propuestas aplicadas al modelo de GAB en el tratamiento de datos experimentales en hojas de *M. ilicifolia*.



Tabla 4.7: Parámetros estimados, coeficientes de determinación y de Chi-cuadrado, y errores en ajustes del modelo de referencia: GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), del modelo de GAB polinomial de segundo orden y de propuestas aplicadas al modelo de GAB en el tratamiento de datos en hojas de *M. ilicifolia*.

Modelos de sorción	Parámetros	30°C	40°C	50°C	60°C
Guggenheim - Anderson-de Boer (Van den Berg and Bruin, 1981)	$X_m$	5,979	6,044	7,765	3,1197
	$K$	0,722	0,693	0,571	1,014
	$C$	23,552	19,661	8,063	1,814
	$R^2$	97,79	96,37	85,85	99,76
	E%	-0,23	-0,56	-3,12	0,32
	RMSE	0,61	0,75	1,70	0,32
	$\chi^2$	0,131	0,202	1,135	0,033
GAB - modelo polinomial de segundo orden	$X_m$	5,152	6,948	5,449	3,525
	$K$	0,781	0,609	0,718	0,977
	$C$	220,863	13,126	17,047	11,012
	$a$	-0,151	-0,081	-0,124	-0,252
	$b$	0,192	0,122	0,162	0,232
	$c$	0,001	0,018	0,015	0,026
	$R^2$	99,01	92,36	61,44	97,49
	E%	-1,67	1,81	1,27	0,19
GAB - relación con las entalpías	RMSE	0,82	0,83	1,75	0,45
	$\chi^2$	0,304	0,301	1,160	1,835
	$X_m$	6,765	5,928	5,130	4,606
	$k_o$				17,799
	$c_o$				0,025
	$H_k$				-8387,49
	$H_c$				17146,3
$R^2(k_o \text{ y } H_k)$				27,77	
$R^2(c_o \text{ y } H_c)$				55,65	
GAB - $X_m$ calculado por BET modificado	$X_m$	4,493	4,268	3,995	3,312
	$K$	0,855	0,861	0,875	0,946
	$C$	$1199 \times 10^8$	2069,04	$1,61 \times 10^2$	$3,01 \times 10^{14}$
	$R^2$	94,38	94,57	77,70	67,35
	E%	2,89	1,64	0,55	7,99
RMSE	1,20	1,2	2,04	2,47	

$X_m$ ,  $K$ ,  $C$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $c$ : constantes de los modelos,  $k_o$ ,  $c_o$ : factores entrópicos  $H_o$ ,  $H_k$ : entalpías de sorción molares,  $R^2$ : coeficiente de determinación, E%: error medio relativo porcentual, RMSE: raíz cuadrada del error cuadrático medio,  $\chi^2$ : coeficiente Chi cuadrado.

Los valores estimados de contenido de humedad de monocapa ( $X_m$ ) obtenidos a partir de la ecuación de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981) no mostraron una tendencia con la temperatura como era de esperar.

Al analizar el efecto de la temperatura sobre las isothermas de adsorción utilizando las ecuaciones tipo Arrhenius (ver "Ecuación 3.1" y "Ecuación 3.2") se obtuvieron coeficientes de determinación bajos ( $R^2(k_o \text{ y } H_k) = 27,77$  y  $R^2(c_o \text{ y } H_c) = 56,65$ ), lo que confirma que no existe una tendencia con la temperatura para los datos experimentales en este estudio. Para muchos productos, la ecuación de GAB no exhibe una relación tipo Arrhenius con la temperatura, la incorporación del término temperatura incrementa el número de parámetros haciéndola menos aplicable. Esta ecuación no es un modelo adecuado para todos los productos agrícolas (Chen & Jayas, 1998).

Al ajustar los datos experimentales de contenido de humedad de equilibrio a la temperatura de 50°C, utilizando el modelo de GAB polinomial de segundo orden, se obtuvo un coeficiente de determinación de 61,44 %, arrojando un promedio bajo para el modelo ( $R^2_{\text{promedio}} = 87,58$ ).

Asimismo, los índices estadísticos obtenidos con el modelo de GAB -  $X_m$  BET modificado no mejoraron respecto de los obtenidos con el modelo de comparación.

En la "Figura 4.20" y en la "Figura 4.21" se observan las predicciones gráficas del modelo de GAB como una función polinomial de segundo orden y del modelo de GAB -  $X_m$  = monocapa-BET; en la "Figura 4.22" y en la "Figura 4.23" sus respectivos gráficos de distribución de errores residuales.

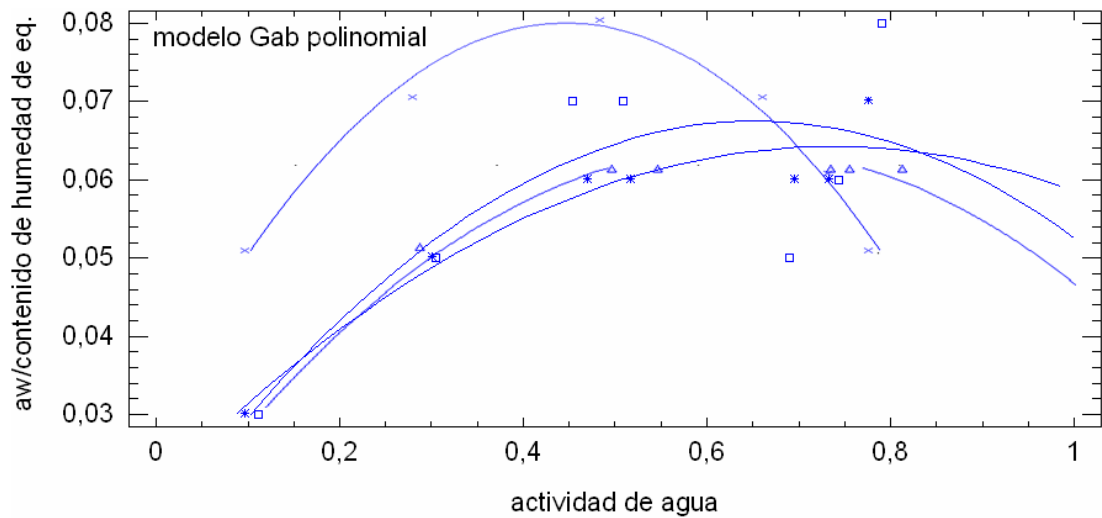


Figura 4.20: Comparación de la relación  $a_w$  y contenido de humedad de equilibrio de datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB polinomial.  
 $\Delta$   $t=30^\circ\text{C}$ ,  $*$   $t=40^\circ\text{C}$ .  $\square$   $t=50^\circ\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^\circ\text{C}$ .

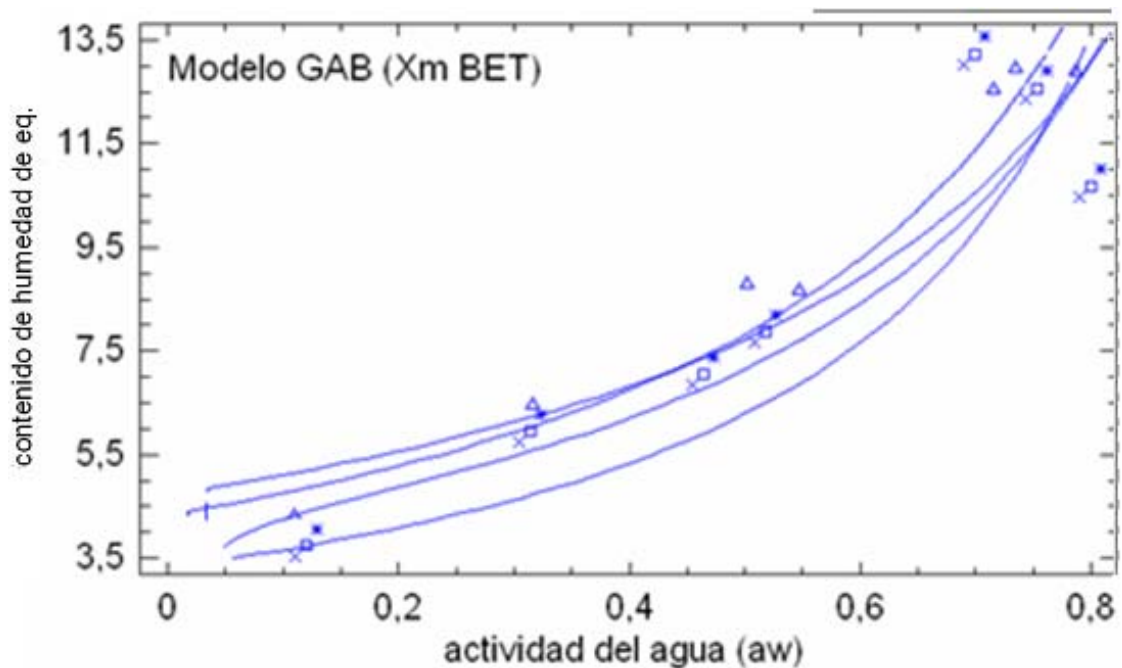


Figura 4.21: Comparación del contenido de humedad de equilibrio de datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas, obtenida con la estimación del modelo de GAB ( $X_m$  de BET).  
 $\Delta$   $t=30^\circ\text{C}$ ,  $*$   $t=40^\circ\text{C}$ .  $\square$   $t=50^\circ\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^\circ\text{C}$ .

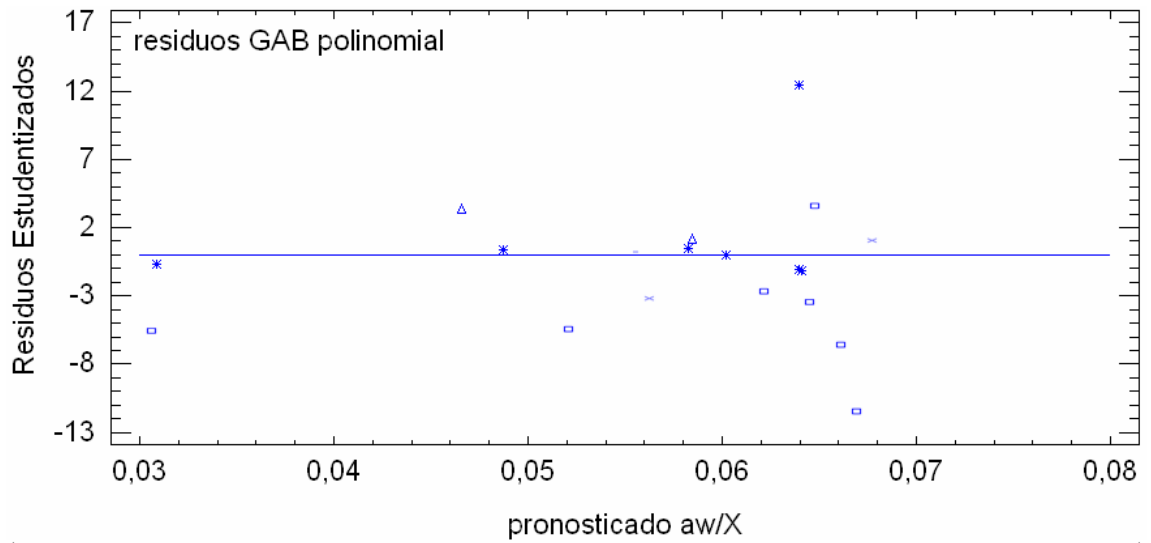


Figura 4.22: Gráfico de residuales de la ecuación de GAB polinomial de segundo orden ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .

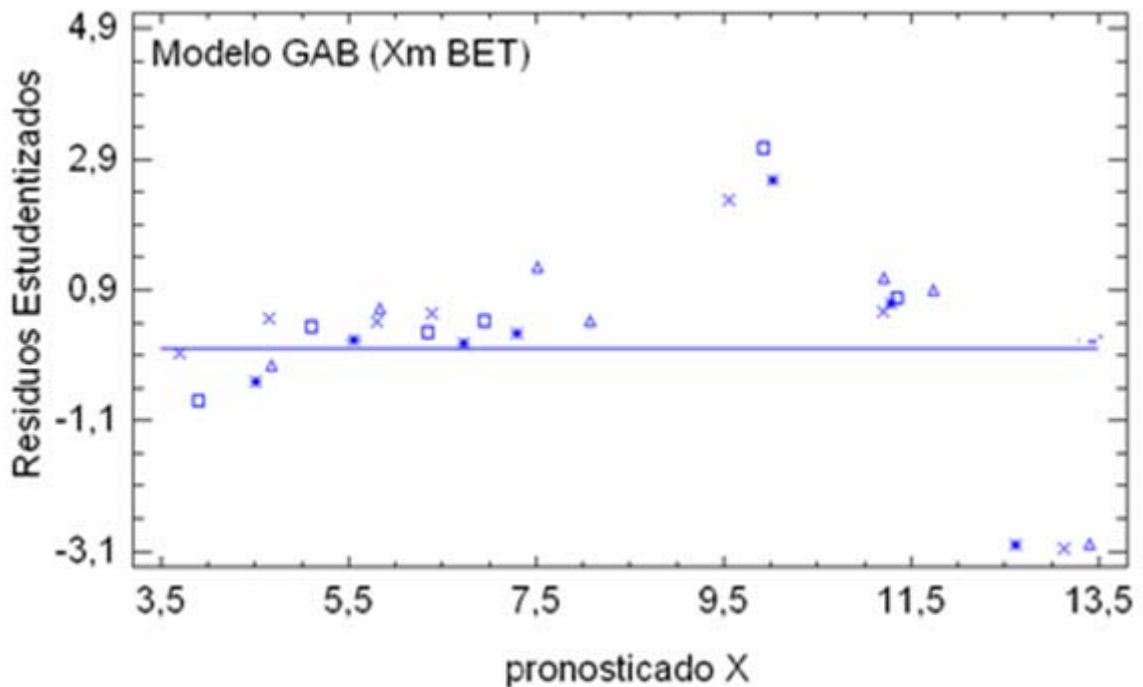


Figura 4.23: Gráfico de residuales de la ecuación de GAB ( $X_m$  BET) ajustados a los datos de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* a varias temperaturas.  $\Delta$   $t=30^{\circ}\text{C}$ , \*  $t=40^{\circ}\text{C}$ .  $\square$   $t=50^{\circ}\text{C}$ ,  $\times$   $t=60^{\circ}\text{C}$ .

Al evaluar los gráficos de distribución de residuales de la ecuación de GAB polinomial de segundo orden, se observan mayores diferencias entre los valores predichos por el modelo y los experimentales respecto del modelo de referencia.

En el modelo de GAB, cuyo  $X_m$  corresponde al de monocapa de BET, se observa que para valores predictivos de contenido de humedad en rangos superiores, los datos puntuales de residuales arrojan diferencias aún mayores que el de referencia.

Los análisis estadísticos aplicados sobre los ajustes matemáticos de los datos experimentales de adsorción demostraron que el modelo de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981) es el que mejor describe las isothermas y puede ser recomendado para caracterizarlas. No obstante, se deberían continuar los estudios para verificar estos resultados en virtud de las diferencias observadas al procesar los datos a la temperatura de 60°C respecto de las demás (Pergher y De Battista, 2009).

Las principales ventajas del modelo de GAB son que tiene solo tres parámetros, con bases teóricas y significados físicos y describe el comportamiento de casi todos los alimentos de cero a 0,9 de  $a_w$  (Rao & Rizvi, 1995). Según refieren Bizot y Col., (1987) presenta la ventaja de describir perfectamente las isothermas de adsorción y desorción para valores de humedad relativa  $< 0,9$  (Lahsasni y Col., 2003).

Las isothermas de adsorción son esenciales para seleccionar las condiciones adecuadas de almacenamiento y así garantizar la calidad del producto. El contenido de humedad final del producto debe tener un valor tal que este sea estable durante un tiempo prolongado, la estabilidad microbiológica se obtiene a valores de actividad de agua ( $a_w$ ) menores a 0,6 (García y Col., 2007). En general se recomienda una humedad relativa de cámara del 60 % como el límite superior para evitar el crecimiento de microorganismos (Cordeiro y Col., 2006).

Se determinaron los contenidos de humedad para una actividad de agua de 0,6 a las temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C, utilizando el modelo de

GAB (Van den Berg and Bruin, 1981) que fue el que mejor ajustó a los datos experimentales. Para ello, se le asignó un valor de 0,6 a la actividad de agua ( $a_w$ ) y se reemplazaron las constantes  $X_m$ ,  $C$  y  $K$  con los valores estimados en este estudio.

Los contenidos de humedad límites calculados para las temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C fueron respectivamente del 10,0 %, 9,7 %, 9,5 % y 7,7 % p/p en base seca.

De acuerdo a estos resultados, si el proceso de secado se lleva a cabo a temperaturas de hasta 40°C, la cual fue sugerida por Negri, (2007), las hojas deberían secarse hasta un contenido de humedad no mayor al 10 % p/p en base seca para alcanzar la estabilidad microbiológica.

Por otro lado, si el secado del material vegetal se efectúa a una temperatura superior (60°C), según los datos obtenidos a partir del estudio de las isotermas de adsorción, las hojas deberían secarse hasta un contenido de agua del 8 %. Este valor es coincidente con las especificaciones de la FB 5° ed., (2010).

Si bien, los resultados experimentales admiten estos máximos de humedad sería importante investigar la posible influencia en la variación química que pudiesen modificar las propiedades de la planta.

Para comparar estos resultados con los obtenidos en hojas de *Maytenus ilicifolia* del trabajo de referencia de Cordeiro y Col. (2006), debemos considerar que los valores del contenido de humedad de equilibrio de los productos biológicos dependen, principalmente de la temperatura y de la humedad relativa del aire, de la especie o variedad del producto. También influyen en la humedad de equilibrio la madurez fisiológica, la historia del producto y la manera en que se obtuvo el equilibrio (adsorción o desorción) (FAO, 1991).

Se encontraron diferencias entre ambas experiencias, las mismas se detallan en la "Tabla 4.8".

Tabla 4.8: Aspectos comparativos en la determinación de isotermas de adsorción de hojas de *Maytenus ilicifolia* (trabajo de referencia vs. trabajo de investigación realizado).

	<b>Trabajo de referencia Cordeiro y Col., (2006)</b>	<b>Trabajo de investigación realizado</b>
Procedencia de las muestras (hojas de <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.)	Plantas cultivadas en la nursery de la Universidad de Ribeirão Preto, São Paulo - Brasil	Plantas silvestres del Cerro de Santa Ana, Misiones- Argentina
Acondicionamiento de las muestras para adsorción	Secadas en estufa con circulación de aire a 40°C por 48 horas	Secadas en estufa a 50°C por 24 horas
Soluciones salinas saturadas utilizadas	LiCl, CH <sub>3</sub> COOK, MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O.K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaNO <sub>3</sub> , NaCl y KCl	LiCl, MgCl <sub>2</sub> , Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , NaBr, NaNO <sub>3</sub> , NaCl y KBr
Rango de $a_w$ evaluada	0,111-0,836	0,110-0,803
Tiempo en condiciones termodinámicas constantes	30 días	15 días
Método de determinación del contenido de humedad de equilibrio	Secado en estufa a 105°C ± 2°C por 24 h (AOAC, 1990)	Pérdida de masa a 103°C ± 2°C por 6 a 7 h (IRAM 20503, 1995)
Modelos matemáticos ajustados a datos de contenido de humedad de equilibrio	Chung-Pfost, Oswin modificado, Halsey modificado, Henderson-Thompson, Guggenheim-Anderson-de Boer (tipo Arrhenius)	Guggenheim-Anderson-de Boer (Van den Berg, 1981), Chung-Pfost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado, Halsey, GAB polinomial de 2° orden y otras alternativas propuestas del modelo de GAB

Los parámetros de la ecuación de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981), modelo que mejor ajustó a los datos experimentales de esta investigación, no pudieron ser comparados dado que el mencionado modelo no fue propuesto para el ajuste de datos experimentales en el trabajo de referencia.

El modelo de Chung-Pfost fue el que mejor ajustó a los datos experimentales para las isotermas de adsorción en el trabajo de referencia de Cordeiro y Col., (2006), cuyos valores de las constantes específicas fueron  $a = 16,355$ ,  $b = -7,214$  y  $c = 188,624$ , con un coeficiente de correlación de 0,880, un error medio relativo porcentual del 14,3 %, una raíz del error medio cuadrático de 0,011 y gráficos de distribución de residuales con puntos centrados sobre el eje del cero, que confirma una tendencia no sistemática.

Para las experiencias realizadas en hojas de la región, este fue el segundo modelo que mejor ajustó al evaluar el coeficiente de determinación y los errores, sin embargo al considerar el factor de Chi-cuadrado de comparación a la temperatura de 60°C se obtiene un valor significativo, por lo que se rechaza la igualdad entre los datos experimentales y los predichos por el modelo para esta temperatura.

#### 4.5 Contenido de humedad de monocapa-BET y actividad del agua de la monocapa

Se determinaron las constantes de la ecuación de BET modificada (lineal) utilizando la "Ecuación 3.5" (ver 3.9.2 Ajustes de datos de adsorción del capítulo de Materiales y Métodos), y a partir de estas se calculó el contenido de humedad de la monocapa-BET ( $X_m$ ) para cada temperatura estudiada, utilizando la "Ecuación 3.6". Además, con las constantes obtenidas y para  $X = X_m$  se determinó la actividad de agua de la monocapa ( $a_{w(x)}$ ) con la "Ecuación 3.7" para humedades relativas decimales hasta 0,56. La "Tabla 4.9" contiene las constantes estimadas e índices estadísticos utilizados para evaluar la calidad de los ajustes, el contenido de humedad de monocapa-BET y sus correspondientes actividades de agua.

Tabla 4.9: Constantes estimadas e índices estadísticos, contenido de humedad y actividades de agua de la monocapa correspondientes al modelo de BET modificado para adsorción en hojas de *Maytenus ilicifolia*.

Modelo		30°C	40°C	50°C	60°C
de sorción	Parámetros				
BET modificado	$A_x$	7,297	7,484	7,647	7,606
	$B_x$	-0,093	-0,080	-0,073	-0,072
	$C$	74,238	61,74	33,246	14,488
	$R^2$	100	100	100	100
	E %	0,19	0,25	0,08	0,13
	$X_m$	4,493	4,268	3,995	3,312
	$a_{w(x)}$	0,104	0,113	0,148	0,208

$A_x$ ,  $B_x$ ,  $C$ : constantes del modelo,  $R^2$ : coeficiente de determinación, E %: error medio relativo porcentual,  $X_m$  contenido de humedad de monocapa (% b.s.),  $a_{w(x)}$ : actividad de agua de monocapa.



Se puede concluir que, este modelo es capaz de describir los datos de contenido de humedad de equilibrio de hojas de *M. ilicifolia* para el rango de actividad de agua comprendido entre 0,11 - 0,56 con buenos ajustes ( $R^2_{\text{promedio}} = 100$ ,  $E\%_{\text{promedio}} = 0,13$ ).

Los valores de contenido de humedad de monocapa, que expresan la medida de la capacidad de sorción del material, disminuyeron con el aumento de la temperatura. Existe concordancia con los resultados obtenidos para varios materiales biológicos (Menkov, 2000; Ait Mohamed y Col., 2005).

Se representó gráficamente el efecto de la temperatura sobre los valores de contenido de agua de monocapa en hojas de *M. ilicifolia*, véase la “Figura 4.24”.

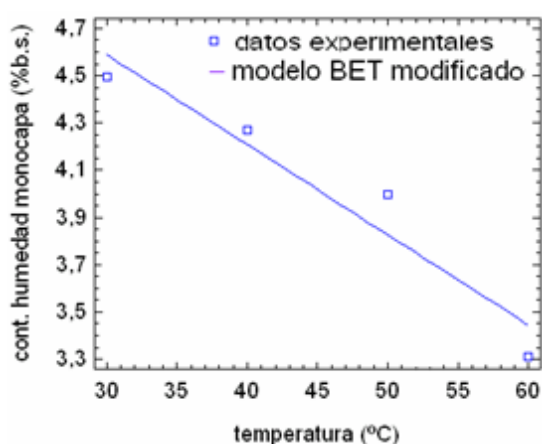


Figura 4.24: Efecto de la temperatura sobre el contenido de agua de monocapa en hojas de *M. ilicifolia*.

Se evidencia que los valores de contenido de agua de monocapa decrecen cuando se incrementa la temperatura. Este comportamiento está generalmente asociado a una reducción en el número de sitios activos debido a cambios físicos y químicos inducidos por la temperatura, la intensidad de la reducción depende de la naturaleza del alimento (Rao & Rizvi, 2005).



## 5. CONCLUSIONES

Las muestras estudiadas cumplieron los requisitos de la Farmacopeia Brasileira 5<sup>o</sup> ed., (2010) en lo referente a los ensayos fisicoquímicos.

El contenido de humedad de equilibrio de adsorción de las hojas de *M. ilicifolia* fue determinado a cuatro temperaturas (30°C, 40°C, 50°C y 60°C) y a humedades relativas en el intervalo de 11.0 % a 80.3 %.

Los datos experimentales de adsorción obtenidos para las hojas de *M. ilicifolia* exhiben una curva sigmoidea Tipo II, típica de la mayoría de los productos biológicos.

De los resultados obtenidos se observa que el contenido de humedad de equilibrio se incrementa cuando disminuye la temperatura, para una actividad de agua constante.

Se obtuvieron las constantes para los modelos de: Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), Chung-Pfost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado y Halsey a las temperaturas ensayadas de 30°C, 40°C, 50°C y 60°C.

El modelo matemático de GAB (Van den Berg and Bruin, 1981) fue el que mejor describió la relación entre el contenido de humedad de equilibrio y la actividad de agua en las condiciones experimentales ensayadas.

Dado el diferente comportamiento para las isotermas a 60°C respecto de las demás, se deberían continuar los estudios para establecer las causas de las diferencias observadas.

Se define un método por cromatografía planar para caracterizar terpenos que podrían ser utilizados como marcadores en extractos de la planta.



## 6. PROPUESTA DE TRABAJOS FUTUROS

Las directrices establecidas por OMS, (1996) referidas a las especificaciones de las materias primas de origen vegetal indican que: *"...en la medida de lo posible, las especificaciones de los materiales de plantas medicinales incluirán, entre otros datos a la valoración, si corresponde, de los constituyentes con actividad terapéutica o marcadores conocidos"*.

En este sentido, se continúan los estudios referidos a la cuantificación de taninos en hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius de la región. En el trabajo propuesto se estudian hojas provenientes de plantas silvestres del Cerro de Santa Ana (Tesis de maestría en desarrollo).

Se deben continuar los estudios para caracterizar en todos sus aspectos la especie silvestre de la región, para su inclusión al Código Alimentario Argentino.

## 7. RESULTADOS PUBLICADOS DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo: "Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius", ha sido presentando en la modalidad Poster y publicado en el Libro de Resúmenes en las: "X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial" (JorFyBi 2009), organizado por la Asociación Argentina de Farmacia y Bioquímica Industrial (SAFyBi), realizada entre los días 27 y 29 de Octubre del 2009, véase en el Anexo I el Resumen del trabajo publicado y en el Anexo II la certificación correspondiente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Ait Mohamed; Kouhila, M.; Jamali, A.; Lahsasni, S.; Mahrouz, M. (2005). Moisture sorption isotherms and heat of sorption of bitter orange leaves (*Citrus aurantium*). En: Journal of Food Engineering. Volume 67, Issue 4, pp. 491-498.

Alonso, J. (2005). Las Plantas medicinales y su utilidad en la Atención medico-farmacéutica y en APS. Presentado en: XVI Congreso Argentino del Medicamento. Buenos Aires. Publicado en: Homeonews. Edición N° 2, pp. 19-21.

Arana, E. R.; Iturbe, G. A. (s.f.). Determinación de las isothermas de sorción a tres temperaturas en dos variedades de maíz y trigo, su ajuste a modelos matemáticos y el estudio preliminar de las condiciones de almacenamiento. 1ª Parte. Determinación de las isothermas y su ajuste a modelos matemáticos. En: Tec. Aliment. (Méx.). Vol. 24, n° 1, pp. 4-13.

Arslan, N. and Togrul, H. (2006). The fitting of various models to water sorption isotherms of tea stored in a chamber under controlled temperature and humidity. En: Journal of Stored Products Research. Volume 42, Issue 2, pp. 112–135.

Baggio, C. H.; Freitas, C. S.; de Martini Otofujii, G.; Cipriani, T. R.; Mera de Souza, L ; Lanzi Sasaki, G.; Iacomini, M.; Andrade Marques, M. C.; Mesia-Vela, S. (2007). Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase activity and formation of nitric oxide. En: Ethnopharmacology 113, pp. 433-440.

Belghit, A.; Kouhila, M.; Boutaleb, B. C. (2000). Experimental study of drying kinetics by forced convection of aromatic plants. En: Energy Conversion and Management. Volume 41, Issue 12, pp. 1303-1321.

Boquet, R.; Chirife, J.; Iglesias, H. A. (1979). Equations for fitting water sorption isotherms for foods. III. Evaluation of various three-parameter models. En: Journal Food Technoogyl. 14, pp. 527-534.

Cheftel, J. C.; Cheftel, H. (1988). Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Volumen I. Zaragoza, España. Editorial Acribia. Capítulo I-1: .pp. 25-40.

Chen Chia-Chung; Morey T. V.. (1989). Comparison of four EMC/ERH equations products [\[Abstract\]](#). En Transactions of the American Society of Agricultural Engineers. Volume 32, Issue 3.

Chen Chia-Chung. (1990). Modification of Oswin EMC/ERH equation. En: Journal Agri. Res. China, 39(4), pp. 367-376.

Chen, C.; Jayas, D, S. (1998). Evaluation of the GAB equation for the isotherms of agricultural products [\[Abstract\]](#). En: Transactions of the ASAE. Volume 41, issue 6.

Chen Chia-Chung. (2000). A Rapid Method to determine the Sorption Isotherms of Peanuts. En: Journal Agric. Engineering. Res. 75, pp. 401-408.

Chimin, A.; de Lima, E. L.; Beltrame, F. L.; Pereira, A. V.; Esmerino, L. A. (2008). Avaliação da Qualidade de Amostras Comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) Comercializadas no Estado do Paraná. En: Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense). 27 (4), pp. 591-597.

Chirife, J. and Iglesias, H. A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods. Part 1. En: Journal of Food Technology 13, pp. 159–174.

Código Alimentario Argentino [CAA]. (1990). Capítulo XV: Productos Estimulantes o Fructivos – Yerba Mate: Art 1198 - (Res 307, 29.11.90).

Código Alimentario Argentino [CAA]. (2000). Capítulo I: Disposiciones Generales. Artículo 3 - (Res. Conj. SAGPA y SPyRS N° 187 y N° 048, 4.05.00); Artículo 6-2.

Código Alimentario Argentino [CAA]. (2005). Capítulo V: Normas para la rotulación y publicidad de los Alimentos. (Resolución Conjunta SPRyRS 149/2005 y SAGPyA 683/2005).

Cordeiro, P. J. M.; Vilegas, J. H. Y. and Lanças, F. M. (1999). HRGC-MS Analysis of Terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira Santa"). En: Journal of the Brazilian Chemical Society. Vol.10 n° 6, pp. 523-526.

Cordeiro, D. S. and Oliveira, W. P. (2004). Drying of Medicinal Plants Equilibrium Moisture Content and Mathematical Modeling of *Maytenus ilicifolia* Leaves. En: Drying 2004 – proceedings of the 14th International Drying Symposium. São Paulo, Brasil. Vol. C, pp. 1712–1719.

Cordeiro, D. S.; Raghavan, G. S. V. and Oliveira, W. P. (2006). Equilibrium Moisture Content Models for *Maytenus ilicifolia* Leaves. En: Biosystems Engineering. Volume 94, Issue 2, pp. 221-228.

Corsino, J.; Siqueira Silva, D. H.; Boldrin Zanoni, M. V.; da Silva Bolzani, V.; Castro França, S.; Pereira, A. M. S.; Furlan M. (2003). Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium* [Abstract]. En: Phytotherapy Research. Volume 17, Issue 8.

Cuervo- Andrade, S. P. (2011). Quality oriented drying of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Agrarwissenschaften (Dr. agr.). Witzenhausen.

Debiasi Alberton, M.; de Barcellos Falkemberg, D.; de Barcellos Falkemberg, M. (2002). Análise cromatográfica de fitoterápicos a base de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*). En: Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.12 supl., pp. 11-13.

del Valle Canseco, F. R. (1985). La actividad acuosa y su relación con la estabilidad de los alimentos. En: Tecnol. Aliment. (Méx.), Volume 20, nº 3, pp. 25-30.

de Magalhães, P. M. (2002). Agrotecnologia para o cultivo da Espinheira Santa. En: CPQBA-UNICAMP, Campinas, São Paulo - Brasil. Disponible en: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm> Capturado el: 08/2005.

El Territorio digital. (18 de Mayo de 2006). El Cedit desarrolla la producción de una yerba más suave con cangorosa. Disponible en: <http://www.territorioidigital.com/nota.aspx?c=7965101078625969> Capturado el: 10/2006.

Ethmane Kane, C. S.; Kouhila, M.; Lamharrar, A.; Ildlimam, A.; Mimet, A. (2008). Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of tow mints: *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia*. En: Revité des Energies Renouvelables. Vol. 11 nº 2, pp. 181–195.

Farmacopea Argentina 7º ed. [FA 7º]. Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT. (2003). *Farmacopea Argentina* 7º edición. Volumen I. Buenos Aires. Argentina. Imprenta del Congreso de la Nación. Capítulo <630> Métodos de Farmacognosia, pp. 245-250.



Farmacopeia Brasileira 4º ed. [FB 4º]. Ministério da Saúde. (2002). *Farmacopeia Brasileira* 4º edição. São Paulo. Ateneu Editora São Paulo Ltda. Parte 2, fascículo 6. Monografia: Espinheira-Santa, pp. 194-1-194-6. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/farmacopeia.htm>. Capturado em: 07/2005.

Farmacopeia Brasileira 5º ed. [FB 5º]. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz. (2010). *Farmacopeia Brasileira* 5ª edição. Brasília. Ateneu Editora São Paulo Ltda. Volume 2. Monografia: Espinheira-Santa, pp. 922-927. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm) Capturado em: 06/2013.

Farmacopea de los Estados Unidos de América [USP 30], Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2007). *Farmacopea de los Estados Unidos 30 Formulario Nacional 25*. Estados Unidos de América. Port City Press, Baltimore. Capítulo <1112> Determinación de actividad de agua en Productos Farmacéuticos No Estériles, pp. 647-648.

Fennema, O. R. (2000). Química de los Alimentos. Segunda edición. Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. pp. 19-109.

Ferreira, P. M.; Oliveira, C. N.; Braga de Oliveira, A.; Lopes, M. J.; Alzamora, F. and Ribeiro Vieira, M. A. (2004). A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa [Abstract]. En: Biomedical and Life Sciences Planta. Vol. 219, nº 2.

França, S. C.; Duarte, I. B.; Pereira, A. M. S.; Carvalho, D.; Queiroz, M. E. C. (1997). Triterpenes and phenolics in callus of *Maytenus aquifolium* Mart. [Abstract]. En: ISHS International Society for Horticultural Science. Acta Horticulturae 502.

García, S. V.; Schmalko, M. E.; Tanzariello, A. (2007). Isotermas de adsorción y cinética de secado de ciertas hortalizas y aromáticas cultivadas en Misiones. En: Revista INTA Argentina: RIA 36: (1), pp. 115-129.

Ghodake, H. M.; Goswami, T. K. and Chakraverty, A. (2007). Moisture sorption isotherms, heat of sorption and vaporization of withered leaves, black and green tea. En: Journal of Food Engineering. Volume 78, Issue 3, pp. 827-835.

Greenspan, L. (1976). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions, En: Journal of Research of the National Bureau of Standards A-Physics and Chemistry 81A (1), pp. 86–96.

IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) N° 1501. (1976). Tamices de Ensayo. Tamaños nominales de abertura.

IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) N° 37506. (1994). Drogas vegetales. Muestreo. Obtención de la muestra para ensayo.

IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) N°:37505. (1995). Drogas vegetales. Muestreo. Obtención de la muestra compuesta.

IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) N° 20503, (1995). Yerba Mate. Determinación de pérdida de masa a 103°C.

IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) N° 37518. (1998). Drogas Vegetales. Detección de taninos en plantas vegetales.

Jamali, A.<sup>(a)</sup>; Kouhila, M.; Ait Mohamed, L.; Jaouhari, J. T.; Idlimam, A.; Abdenouri, N. (2006). Sorption isotherms of *Chenopodium ambrosioides* leaves at three temperatures. En: Journal of Food Engineering. Volume 72, Issue 1, pp. 77-84.

Jamali, A.<sup>(b)</sup>; Kouhila, M.; Ait Mohamed, L.; Idimam, A. and Lamharrar, A. (2006). Moisture adsorption-desorption of *citrus reticulata* leaves at tree temperatures. En: Journal of Food Engineering. Volume 77, Issue 1, pp. 71-78.

Jorge, R. M.; Leite, P, V,; Oliveira, A. B,; Tagliati, C. A. (2004). Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. En: Journal of Ethnopharmacology, Volume 94, Issue 1, pp. 93-100.

Kouhila, M.; Belghit, A.; Daguinet, M. and Boutaleb, B. C. (2001). Experimental determination of the sorption isotherms of mint (*Mentha viridis*), sage (*Salvia officinalis*) and verbena (*Lippia citriodora*). En: Journal of Food Engineering. Volume 47, Issue 4, pp. 281-287.

Labuza, T. P.; Tannenbaum, S. R. and Karel, M. (1970). Water content and stability of low-moisture and intermediate- moisture foods. En: Food Technology 24, pp. 543–549.

Lahsasni, S.; Kouhila, M.; Mahrouz, M.; Kechaou, N. (2002). Experimental study and modelling of adsorption and desorption isotherms of prickly pear peel (*Opuntia ficus indica*). En: Journal of Food Engineering. Volume 65, Issue 3, pp. 201-207.

Lahsasni, S.; Kouhila, M.; Mahrouz, M.; Fliyou, M. (2003). Moisture adsorption–desorption isotherms of prickly pear cladode (*Opuntia ficus indica*) at different temperatures. En: Energy Conversion and Management. Volume 44, Issue 6, pp. 923-936.

Lahsasni, S.; Kouhila, M. and Mahrouz, M. (2004). Adsorption–desorption isotherms and heat of sorption of prickly pear fruit (*Opuntia ficus indica*). En: Energy Conversion and Management. Volume 45, Issue 2, pp. 249-261.

Lezcano, M. A.; Marin, R. (2008). Fitomedicamentos: Una experiencia de medicina alternativa en la región. En: Cinntec - Revista Digital de innovación Tecnológica del CEDIT. Número 1.

López, F. (s. f.). El isoterma de la absorción y su registro. Disponible en: <http://www.mathiasbcn.com/files/El%20isoterma%20de%20la%20absorci%C3%B3n%20y%20su%20registro.pdf> Capturado en: 03/2008.

Lopes, G. C.; Blainski, A.; Pires dos Santos, P. V.; Diciaula, M. C.; Palazzo de Mello, J. C. (2010). Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. En: Brazilian Journal of Pharmacognosy. Volume 20, Issue 5, pp. 781-788.

Maity, B. and Chattopadhyay, S. (2008). Natural Antiulcerogenic Agents: An Overview. En: Current Bioactive Compounds 2008, 4: pp. 225-244.

Mariot, M. P.; Barbieri, R. L. (2007). O Conhecimento Popular Associado ao Uso da Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *Maytenus aquifolium*). En: Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, Vol. 5, supl. 1, pp. 666-668.

Martínez-Crovetto, R. (1963). Esquema Fitogeográfico de la Provincia de Misiones, (República Argentina). En: Revista Bonplandia. Tomo 1, Vol. N° 3, pp. 171-178.

Martins, A. G.; Guterres, S. S.; González Ortega, G. (2003). Anti-ulcer activity of spray-dried powders prepared from Leaf Extracts of *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. En: Acta Farm. Bonaerense. Vol. 22, nº 01, pp. 39-44.

Menkov, N. D.; Paskalev, H. M.; Galyazkov, D. I.; Kerezieva-Rakova, M. (1999). Applying the linear equation of correlation of Brunauer-Emmet-Teller (BET) - monolayer moisture content with temperature [Abstract]. En: Nahrung. Vol. 43.

Menkov, N. D. (2000). Moisture sorption isotherms of lentil seeds at several temperatures. En: Journal of Food Engineering. Volume 44, Issue 4, pp. 205–211.

Montanari, T.; Bervilacqua, E.. (2002). Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. En: Contraception. 65(2), pp. 171-175.

Mossi, A J.; Mazutti, M.; Paroul, N.; Corazza, M. L.; Dariva, C., Cansian, R. L. and Oliveira, J. V. (2009). Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. En: Brazilian Journal of Biology, 69(2), pp. 339-345.

Negri, M. L. S.; Nakashima, T. (2006). Secagem da espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e influência nos teores de polifenóis. En: XIV Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM, Unicamp., Campinas.

Negri, M. L. S. (2007). Secagem das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. sob diferentes temperaturas e influência nos teores de polifenóis, na atividade antioxidante e nos aspectos microbiológicos. Dissertação apresentada ao: Programa de Pósgraduação em Ciências Farmacêuticas, requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponible en: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/12096/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20DEFINITIVA.pdf?sequence=1> Capturado el: 08/2008.

Negri, M. L. S.; Possamai, J. C.; Nakashima, T. (2009). Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas, pp. 553-556.

Núñez Rivas, M. J. (2003-2004). Metabolitos Secundarios Bioactivos Aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae). (Tesis

Doctorado). En: Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Oliveira, M. G.; Monteiro, M. G.; Macaúbas, C.; Barbosa, V. P.; Carlini, E. A. (1991). Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals [Abstract]. En: *Ethnopharmacology* 34(1).

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (1996). Prácticas adecuadas de fabricación: Directrices suplementarias para la fabricación de productos medicinales herbarios. En: Serie de Informes Técnicos N° 863, Anexo 08.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (1991). Principios de secado de granos psicrometría higroscopia. En: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.

Park, K. J.; Vohnikova, Z. and Reis Brod, F. P. (2002). Evaluation of drying parameters and desorption isotherms of garden mint leaves (*Mentha crispo* L.). En: *Journal of Food Engineering*. Volume 51, Issue 3, pp. 193-199.

Pereira, A. M. S.; Pereira, P. S.; Cerdeira, R. M. M.; Franca, S. C.; Rodrigues, D. C.; Moraes, F. R.; Moraes, J. R. E. (1992). Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) [Abstract]. En: ISHS. International Society for Horticultural Science. *Acta Horticulturae* 333.

Pergher, G.; De Battista, G. A. (2009). Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico cualitativo de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius. En: X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial - JorFyBi 2009,

Queiroga, C. L.; Faría Silva, G.; Corrêa Dias, P.; Possenti, A.; de Carvalho, J. E. (2000). Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 $\beta$ -ol and

friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). En: Journal of Ethnopharmacology. Vol. 72, Issue 3, pp. 465-468.

RainTree. (s.f.). Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*). Herbal Properties and Actions. En: Tropical Plant Database. Disponible en: <http://www.rain-tree.com/espinheira.htm#.UnT2DnBg8vy> Capturado el: 06/2010.

Ramos, H. D.; Rivas, E. (2003). Proyecto AR.11 - MERCOSUR/CPC/REC. N° 23/03 - Yerba mate - Producto regional autóctono del MERCOSUR. En: Actas y Documentos emanados de la Comisión Parlamentaria Conjunta del MERCOSUR, pp. 767-768.

Rao, M. A.; Rizvi, S. S. H. (1995). Engineering Properties of Foods. Edition: 2. Publicado por Marcel Dekker. Disponible en: [http://books.google.com.ar/books?id=t4L4wX7zurYC&printsec=frontcover&source=gbs\\_v2\\_summary\\_r](http://books.google.com.ar/books?id=t4L4wX7zurYC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r) Capturado el 03/2009.

Rao, M. A.; Rizvi, S. S. H.; Datta, A. K. (2005). Engineering properties of foods Edition: 3. Publicado por CRC Press. Disponible en: <http://books.google.com.ar/books?id=OOo98fhmEqoC&dq=tao+rizvi+%2B+2005>. Capturado el 03/2009.

Rattmann, Y. D.; Cipriani, T. R.; Sasaki, G. L.; Iacomini, M.; Rieck, L.; Marques, M. C. A.; da Silva-Santos, J. E. (2006). Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek (Celastraceae) leaves [Abstract]. En: Journal of Ethnopharmacology. Volume 104, Issue 3, 6,

Resico, C. (2001). Estado actual de la información sobre Productos Forestales No Madereros. En: Estado de la Información Forestal en Argentina. Volumen I. Proyecto GCP/RLA/133/EC Información y Análisis ara el manejo forestal sostenible, integrando esfuerzos nacionales e internacionales en 13 países

tropicales en América Latina. Publicado por: Comisión Europea y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago de Chile. Capítulo VIII, pp. 212-215. Disponible en:

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/ad393s/ad393s00.pdf> Capturado el: 28/2006.

Santos-Oliveira, R.; Coulaud-Cunha, S.; Colaço W. (2009). Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. En: Rev. Bras. farmacognosia. Vol.19 n°.2b, pp. 650-659.

Scheffer, M. C. (2004). Produção de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss) na região metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. En: Productos forestales, medios de subsistencia y conservación. Estudios de Caso sobre Sistemas de Manejo de Productos Forestales no Maderables. Vol. 3. América Latina. Editores: Alexiades, M. N. y Shanley, P.. Publicado por: Centro para la investigación forestal internacional. Indonesia. SMK Putera. Capítulo 17: pp. 329-331.

Sharapin, N.; Aonso, J. R.; Henriquez, A. T.; Zuanazzi, J. A. S.; Mentz, L. A.; Nunez, E.; Apel, M. A.; Cañigueral, S. (2006). Hoja de congrosa (*Mayteni folium*). En: Revista de Fitoterapia 2006; 6(1), pp. 29-43.

Soaza – Formigoni, M. L.; Oliveira, M. G.; Monteiro, M. G.; da Silveira Filho, N. G.; Braz, S.; Carlini, E. A. (1991). Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals [Abstract]. En: Journal of Ethnopharmacology, Vol. 34 n° 1.

Soysal, Y.; Öztekin, S. (1999). Equilibrium Moisture Content Equations for some Medicinal and Aromatic Plants. En: Journal Agric. Engineering Res. 74, pp. 317-324.



Soysal, Y.; Öztekin, S. (2001). Comparison of seven Equilibrium Moisture Content Equations for some Medicinal and Aromatic Plants, En: Journal Agric. Enginering Res. 78(1), pp. 57-63.

Tabach, R. and Oliveira, W. P. (2003). Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of a dry extract of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss produced by a jet spouted bed dryer [Abstract]. En: Pharmazie. Vol. 58, Issue 8,.

Teixeira Games, R. A. (2010). Contribuição ao controle de qualidade da Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. – Celastraceae) En: Programa de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Bandeirante Brasil, São Paulo.

Velloso, J. C. R.; Khallia, N. M.; Formenton, V. A. F.; Ximenes, V. F.; Fonseca, L, M.; Furlan, M.; Brunetti, I. L. and Oliveira, O. M. M. F. (2006). Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. En: Fitoterapia. Volume 77, Issue 3, pp. 243-244.

WHO (World Health Organization). (1998). Quality Control Methods for Medicinal Plants. Geneva. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf> Capturado el: 09/2006.

WHO (World Health Organization). (2003). Guidelines on agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5527s/> Capturado el: 08/2006.

Zanoelo, E. F. (2005). Equilibrium Moisture Isotherms for Mate Leaves. En: Biosystems Engineering, Volume 92, Issue 4, pp. 445-452.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo I

Resumen del trabajo: "Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius" presentando en la modalidad Poster en las: "X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial" (JorFyBi 2009).

#### **Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico cualitativo de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius.**

**Gabriela Pergher, Gabriela A. De Battista.**

**Cátedra de Calidad de los medicamentos y Farmacognosia.**

**Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales – Universidad Nacional de Misiones.**

**Avda. Mariano Moreno 1375, Posadas - Misiones. [gabriela.pergher@gmail.com](mailto:gabriela.pergher@gmail.com),  
[gadebattista@gmail.com](mailto:gadebattista@gmail.com)**

*Maytenus Ilcifolia* Martius es una especie nativa en la Provincia de Misiones, clasificada dentro de árboles bajos y arbustos, que pertenece a la familia de las Celastraceae y es conocida con el nombre vulgar de "cangorosa" y en Brasil como "espinheira santa". La infusión de las hojas es usada en el tratamiento de úlceras, indigestión, gastritis crónicas y dispepsias. Las hojas y el tallo de *M. ilicifolia* son empleados en mezclas agregadas al mate para combatir la acidez y gastralgia provocada por esta infusión y aminorar el efecto irritante de la cafeína. En la descripción química de la especie se indica contenidos de taninos, flavonoides y triterpenos.

Una especie vegetal para que pueda ser utilizada como materia prima para la elaboración de medicamentos fitoterápicos, debe cumplimentar los requisitos de garantía de la calidad desde el cultivo, recolección, secado hasta la elaboración del producto final. La identificación taxonómica de las especies vegetales forma parte de lo anteriormente mencionado pero no aseguran que las mismas reúnan los requisitos para ser consideradas materias primas farmacéuticas.

Las isotermas de adsorción aportan información sumamente valiosa para predecir cambios potenciales en la estabilidad biológica del material, permitiendo determinar la máxima humedad que el mismo puede ganar o perder durante el secado o almacenamiento. Las mismas ilustran la relación funcional entre el contenido de agua y la  $a_w$  a temperatura y presión constante.

Se determinaron las isotermas de adsorción de hojas de *Maytenus Ilcifolia* de plantas silvestres de la región y compararon los resultados experimentales con modelos matemáticos disponibles en la literatura y se realizaron los perfiles cromatográficos cualitativos de las mismas. El contenido de humedad de equilibrio fue medido usando un método gravimétrico estático, a humedades relativas y temperaturas en un rango de 11.0% a 80.3% y de 30°C a 60°C respectivamente.

De los resultados obtenidos, Tabla 1, se observa que el contenido de humedad de equilibrio se incrementa cuando decrece la temperatura a humedad relativa constante. Contrariamente, a temperatura constante, el contenido de humedad de equilibrio se incrementa con el aumento de humedad relativa.

Los modelos matemáticos de Guggenheim-Anderson-deBoer (GAB), Chung-Plost, Halsey modificado, Oswin modificado, Henderson modificado y Halsey fueron testeados para ajustar los datos experimentales. La estimación de los parámetros de cada modelo fue determinada por análisis de regresión no lineal aplicando el método de los mínimos cuadrados con el programa StatGraphics Plus, Versión 5.1. El coeficiente de correlación ( $R^2$ ), el error medio relativo, expresado como %, el error estándar de la estimación de humedad y gráficos residuales fueron utilizados para determinar la calidad del ajuste.

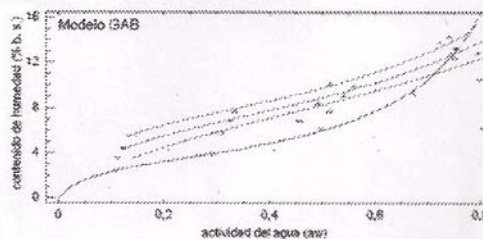
La ecuación de GAB fue la que mejor describió la relación entre el contenido de humedad de equilibrio y la actividad de agua de las hojas de *M. ilicifolia* en las condiciones ensayadas

Tabla 1: Resultado experimental de la valoración de contenido de humedad de equilibrio (base seca)

Sal	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	aw*	Contenido de humedad de equilibrio (%)	aw*	Contenido de humedad de equilibrio (%)	aw*	Contenido de humedad de equilibrio (%)	aw*	Contenido de humedad de equilibrio (%)
CLi	0,113	4,5 ± 0,06	0,112	4,2 ± 0,15	0,111	3,5 ± 0,07	0,110	2,4 ± 0,24
ClMg	0,324	6,7 ± 0,07	0,316	6,5 ± 0,05	0,305	5,8 ± 0,09	0,293	3,9 ± 0,10
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Mg	0,514	9,0 ± 0,07	0,484	7,9 ± 0,14	0,454	6,8 ± 0,13	---	4,9 ± 0,00
BrNa	0,560	8,9 ± 0,01	0,532	8,5 ± 0,01	0,509	7,7 ± 0,12	0,497	6,2 ± 0,09
ClCo	0,618	9,3 ± 0,03	0,555	7,8 ± 0,04	0,500	5,9 ± 0,21	0,467	6,4 ± 0,00
NO <sub>3</sub> Na	0,731	12,8 ± 0,13	0,710	12,4 ± 0,00	0,690	13,0 ± 0,31	0,674	9,1 ± 0,85
ClNa	0,751	13,2 ± 0,05	0,747	12,3 ± 0,15	0,744	12,4 ± 0,14	0,745	12,8 ± 0,64
BrK	0,803	13,1 ± 0,04	0,791	12,0 ± 0,13	0,790	10,5 ± 0,05	0,789	15,2 ± 0,07

\*Greenspan (1976)

Figura 1 Predicciones de isotermas de adsorción del modelo de GAB.  
 $\Delta$  t=30°C, \* t=40°C, □ t=50°C, > t=60°C.



Se observa un diferente comportamiento de la isoterma a 60 °C. Esto podría atribuirse a cambios estructurales o químicos de la muestra.

La extracción de terpenos se realizó según lineamientos propuestos por Lanças et al. 1999. Las corridas cromatográficas ensayadas fueron con la utilización como fase móvil de Cloroformo-Benceno y Benceno-Metanol, desarrollo 15 cm. La visualización del perfil se realizó bajo luz UV (265nm), luz UV (360 nm) y con anisaldehído-sulfúrico bajo luz UV 360 nm. Los valores óptimos fueron obtenidos con la fase móvil Cloroformo-Benceno, los R<sub>f</sub> fueron 0.23, 0.38, 0.57, 0.8 y 0.96 con el último sistema de revelado mencionado.

Los resultados obtenidos en relación a las isotermas de adsorción son indicativos de la necesidad de continuar los estudios en virtud de las diferencias obtenidas en el comportamiento para las temperaturas de 30°C, 40°C y 50°C con respecto a la de 60°C para poder clasificarlas según los diferentes modelos propuestos por Brunauer et. al.



## 9.2 Anexo II

Copia del certificado correspondiente a la presentación del trabajo:  
"Isotermas de adsorción y perfil cromatográfico de hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius".



*Gabriela Pergher*