



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico para la cuantificación de dehidroleucodina DhL a partir de hojas de *Gynoxys verrucosa* de la zona sur del Ecuador, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Arrobo Minga, Santiago Alejandro

DIRECTOR: Ojeda Riascos, Edgar Santiago, Mgtr

LOJA-ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que la presente investigación “Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico para la cuantificación de dehidroleucodina (DhL) a partir de hojas de *Gynoxys verrucosa* de la zona sur del Ecuador, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.”, realizado por el profesional en formación Santiago Alejandro Arrobo Minga, ha sido orientado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Santiago Alejandro Arrobo Minga declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Desarrollo, validación y aplicación de un método analítico para la cuantificación de dehidroleucodina (DhL) a partir de hojas de *Gynoxys verrucosa* de la zona sur del Ecuador, usando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Edgar Santiago Ojeda Riascos director del mismo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f)

Autor: Santiago Alejandro Arrobo Minga

Cédula: 1105323545

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mi madre, y mi abuelita que en toda mi etapa universitaria han sido mi apoyo y ayuda constante frente a todas las adversidades que se me han presentado a lo largo de mi vida, sin ellas este logro no hubiese sido posible.

A mis hermanos Stefanny, Luis y Sebastián por estar a mi lado siempre y ser mi motivo de superación el cual me ha ayudado a seguir adelante siempre.

A mi tía Sandra quien se encuentra en el exterior pero que de alguna u otra manera siempre ha sido mi soporte y mi ayuda para continuar con mi carrera universitaria.

A todos mis familiares y amigos que han permanecido y creyeron en mí desde el inicio hasta el final logrando así cumplir una de mis metas.

Santiago Alejandro Arrobo Minga

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por ser parte fundamental en mi vida, y haberme dado la fuerza y guía suficiente para haber culminado con mi etapa universitaria.

A mi madre y mi abuelita que desde que tengo uso de razón han sido apoyo y sustento necesario para superar todas las adversidades que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por haberme permitido formar como profesional en sus aulas, y al Laboratorio de Química por haberme contribuido sus instalaciones para la realización de mi trabajo de investigación.

A mi director de tesis Mgtr. Santiago Ojeda por su valiosa guía, asesoramiento y contribución de sus conocimientos para la realización de mi tesis.

Santiago Alejandro Arrobo Minga

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Uso de plantas medicinales	6
1.2. Importancia de plantas medicinales en el Ecuador	6
1.3. Descripción Taxonómica de <i>Gynoxys verrucosa</i>	7
1.4. Metabolitos secundarios en las plantas	8
1.4.1. Terpenos o Terpenoides.	8
1.4.2. Lactonas sesquiterpénicas.....	9
1.4.3. Dehidroleucodina (DhL).	9
1.5. Cromatografía de gases acoplada e espectrometría de masas (GC/MS)	10
1.6. Método de validación.....	12
1.6.1. Parámetros de validación.....	12
1.6.1.1. Linealidad.	12
1.6.1.2. Exactitud.....	12
1.6.1.3. Precisión.....	13
1.6.1.4. Límite de detección (LOD).....	13
1.6.1.5. Límite de cuantificación (LOQ).	14
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Esquema metodológico	16
2.2. Recolección de las muestras vegetales.....	17
2.3. Secado y triturado de la planta	17
2.4. Maceración	17
2.5. Condiciones del cromatógrafo de gases	18
2.6. Preparación de soluciones patrón, estándares y muestra.....	19

2.6.1.	Solución patrón.	19
2.6.2.	Preparación del estándar interno.	19
2.6.3.	Preparación de la muestra (<i>Gynoxys verrucosa</i>).	19
2.6.3.1.	Linealidad.	19
2.6.3.2.	Preparación de los estándares.	19
2.6.3.3.	Exactitud.	20
2.6.3.4.	Precisión.	20
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		22
3.1.	Obtención de extractos de <i>G.verrucosa</i>	23
3.2.	Diseño del método analítico.....	23
3.2.1.	Linealidad.....	23
3.2.2.	Exactitud.	24
3.2.3.	Precisión.	26
3.2.4.	Límite de detección y cuantificación.	27
3.3.	Análisis de las muestras	28
CONCLUSIONES		30
RECOMENDACIONES.....		31
BIBLIOGRAFÍA.....		32
ANEXOS.....		34
Anexo 1. GC/MS Del extracto de <i>Gynoxys verrucosa</i>		35
Anexo 2. Datos para la determinación de Linealidad		35
Anexo 3. Datos obtenidos para la determinación de la precisión		36
Anexo 4. Análisis de varianza de un factor		36
Anexo 5. Datos obtenidos del GC/MS para el cálculo de DhL.....		38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Gynoxys verrucosa</i>	7
Figura 2. Molécula Dehidroleucodina	10
Figura 3. Esquema metodológico de la investigación.....	16
Figura 4. Muestra vegetal triturada.....	17
Figura 5. Cromatógrafo de gases.....	18
Figura 6. Extractos <i>G.verrucosa</i>	23
Figura 7. Curva de calibración global	24
Figura 8. Gráfico de control de DhL	25
Figura 9. Gráfico de cuantiles por sector.....	28
Figura 10. Gráfica de cuantiles por sectores	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nivel taxonómico de <i>G. verrucosa</i>	7
Tabla 2. Condiciones del Cromatógrafo de gases	18
Tabla 3. Valores para la curva de calibración	24
Tabla 4. Datos de recuperación de DhL	25
Tabla 5. Precisión DhL	26
Tabla 6. LOD y LOQ para DhL	27

RESUMEN

En la presente investigación se diseñó, desarrolló y se validó un método analítico para la cuantificación de dehidroleucodina (DhL) en hojas de *Gynoxys verrucosa* recolectadas en 4 sectores diferentes del sur del Ecuador. Este método validado se aplicó a 360 muestras de la especie vegetal con el propósito de encontrar poblaciones de *G. verrucosa* que produzcan de manera más eficiente el metabolito.

Los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, recuperación, límites de detección y cuantificación del método fueron alcanzados. Los resultados estuvieron dentro de los parámetros establecidos obteniendo una buena linealidad ($r^2=0.9978$). Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron de 9.0515 ng/ul y 10.4256 ng/ul, respectivamente. La recuperación estuvo entre 81,06% y 116,61%, en cuanto a la repetibilidad y reproducibilidad los resultados obtenidos fueron inferiores al 10% y 15% respectivamente. Así, un método simple, preciso, seguro y reproducible en GC/MS fue satisfactoriamente desarrollado y validado para analizar DhL en extractos de *G. verrucosa*.

Palabras clave: *Gynoxys verrucosa*, DhL, GC/MS, validación.

ABSTRACT

In the present research, an analytical method was designed, developed and validated for the quantification of dehydroleucodine in leaves of *Gynoxys verrucosa* collected in 4 different sectors of the south of Ecuador. This validated method was applied to 360 samples of the vegetable plants with the purpose of finding populations of *G.verrucosa* that produce more efficiently the metabolite.

The parameters of linearity, accuracy, precision, recovery, limits of detection and quantification of the method were reached. The results were into the established parameters obtaining a good linearity ($r^2 = 0.9978$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were 9.0515 ng/ul and 10.4256 ng/ul, respectively. The results of the recovery were between 81.06% - 116.61%, and the repeatability and reproducibility were less than 10% and 15% respectively. Thus, a simple, accurate, safe and reproducible GC/MS method was successfully developed and validated to analyze DhL in *G.verrucosa* extracts.

Keywords: *Gynoxys verrucosa*, DhL, GC/MS, validation.

INTRODUCCIÓN

Gynoxys verrucosa es una hierba usada en medicina tradicional en el sur del Ecuador para el tratamiento y curación de heridas (Ordóñez et al., 2011), en el aceite esencial de *Gynoxys verrucosa* se han encontrado 18 compuestos en los cuales destacan: α -pineno, β -pineno, felandreno, benceno, trans-ocimeno, fenol, α -bergamoteno, 2-hepteno, zingibereno, cadinol, α cedreno, sabineno, limoneno, α -humuleno, curcumeno y dehidroleucodina (Tobergte & Curtis, 2013).

La dehidroleucodina (DhL), es un sesquiterpeno que se puede obtener de algunas plantas del género asteraceae entre ellas *Artemisia douglasiana*, en el cual se proyectó su estudio para efectos antidiarreicos. La yohimbina y fentolamina pueden contrarrestar el efecto inhibitor de DhL. Por lo tanto, la actividad antidiarreica de DhL es posiblemente relacionado, a su acción inhibitora frente a la motilidad gastrointestinal (Wendel, María, Guzmán, Giordano, & Pelzer, 2008).

El efecto de la DhL sobre la secreción de ácido gástrico en ratas se investigó a una dosis de 40 mg/kg, mientras que su efecto anti-inflamatorio se ha investigado en dos modelos experimentales: artritis inducida por carragenina y granuloma pellet de algodón inducida de Freund. DhL no inhibió la secreción de ácido gástrico, lo que sugiere que su efecto anti-ulcerogénico puede atribuirse a su acción sobre los factores de defensa mucosa. Por otro lado, DhL inhibió ambas fases de la inflamación inducida por carragenina crónicas y agudas, siendo los más eficaces en la fase crónica. En la prueba del granuloma, DhL también inhibió la inflamación. Se sugiere que la actividad anti-inflamatoria de DhL puede ser atribuida a la interferencia con múltiples objetivos en el nivel de factores de transcripción, como NF-kappa B, y citoquinas (Guardia, Juarez, Guerreiro, Guzmán, & Pelzer, 2003).

Así mismo, la actividad de estos 2 compuestos, DhL y leucodina, se evaluaron contra ocho líneas celulares de leucemia mieloide aguda (AML) y se comparó su actividad contra las células mononucleares de sangre periférica normales. La DhL mostró actividad citotóxica contra las líneas celulares analizadas, con valores de DL_{50} entre 5,0 y 18,9 M, mientras que la leucodina era inactiva contra todas las líneas celulares ensayadas, con lo que la presencia del doble enlace en el anillo de la lactona es primordial para la presencia de dicha actividad citotóxica. Es importante destacar que la DhL induce una menor toxicidad para las células normales de la sangre que a líneas de células de AML (Ordóñez et al., 2016).

Esta molécula es por tanto promisoría en el tratamiento de distintas enfermedades como se describió anteriormente y con este proyecto se pretende desarrollar y validar un método GC/MS para establecer su presencia en distintas poblaciones de *G. verrucosa*, para así

poder evaluar la posibilidad de escalarla a nivel comercial, y posteriormente en estudios fitofarmacéuticos se puedan diseñar diversas formas farmacéuticas con la finalidad de conseguir alternativas que puedan ser usadas como coadyuvantes en el tratamiento de diversas enfermedades antes mencionadas.

CAPÍTULO I.
MARCO TEÓRICO

1.1. Uso de plantas medicinales

Desde hace ya mucho tiempo atrás, muchas personas han acudido al uso de plantas provenientes de la naturaleza como remedio o medicina para curación de diversas enfermedades y heridas. Actualmente la población mundial en especial países que se encuentran en auges de desarrollo usan las plantas para hacerle frente a enfermedades como primera asistencia médica (Tene et al., 2007).

Las plantas medicinales son en sí vegetales que en su composición poseen unas sustancias llamadas principios activos, estos al poseer actividad farmacológica van a ejercer una acción sobre la persona quien lo usa que puede ser tanto beneficiosa como perjudicial para el organismo, estos principios activos administrados en dosis adecuadas sirve como droga o medicamento que alivia los síntomas o restablece la salud perdida (Villavicencio Nieto, Pérez Escandón, Mendoza Pérez, & Maldonado Lagunas, 2008).

Las plantas medicinales constituyen la séptima parte de las especies vegetales existentes en el mundo, siendo su proporción mucho mayor en regiones tropicales, esto debido a que se desconoce la composición en su flora, de igual manera existen plantas vegetales que por composición de principios activos poseen actividad farmacológica y que cumplen reglas de la farmacopea para así poder preparar medicamentos (Villavicencio Nieto et al., 2008).

1.2. Importancia de plantas medicinales en el Ecuador

En nuestro país existe una variada existencia de culturas ancestrales que representan al menos un 30% de la población del país, estas culturas por muchos años han empleado múltiples remedios naturales (Tene et al., 2007). Varios compuestos y drogas sintéticas tienen su origen en las plantas medicinales ecuatorianas, por ejemplo la cascarilla utilizada eficazmente para curar la malaria; o el Modulador Biológico de la Respuesta Inmune que es extraído de la dulcamara, el cual proporciona una mejor calidad de vida a pacientes que padecen de cáncer o SIDA (Bussmann & Sharon, 2006).

En el Ecuador aproximadamente nueve nacionalidades indígenas usan medicina tradicional, en donde las plantas más utilizadas son, *Urera baccifera* (ortiga), *Verbena litoralis* (verbena), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), por lo cual desde hace mucho tiempo se ha venido estudiando la riqueza de la flora ecuatoriana, en la actualidad se conoce la presencia de más de 16000 especies de plantas, las cuales 5172 son especies útiles, en donde el 60% son medicinales, 30% comestibles, y el 20% restante para los llamados usos sociales (De la Torre, et all., 2008).

1.3. Descripción Taxonómica de *Gynoxys verrucosa*

Gynoxys verrucosa es una planta tipo arbusto que pertenece a la familia Asteraceae originario de Sudamérica, comprende 173 especies descritas, de las cuales 126 están aceptadas (**Tabla 1**) (Cuvier, 1827).

Tabla 1. Nivel taxonómico de *G. verrucosa*

Nivel	
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Tribu	Senecioneae
Subtribu	Tussilagininae
Género	<i>Gynoxys</i>
Especie	<i>Gynoxys verrucosa</i>

Fuente. Cuvier 1827

Elaboración: Autor

Es una planta tipo arbusto que alcanza 4 m de altura, semileñoso, con médula esponjosa en los tallos. Las hojas son opuestas con pubescencias de color café blanquecino (**Figura 1**), en el envés la lámina mide 12–16 cm x 7–9 cm, con raíz pivotante, hojas simples, opuestas sin estipular, su inflorescencia es en capítulos, con flores marginales de color amarillo, en la medicina tradicional la utilizan en caso de presión sanguínea baja, depresión psicológica y problemas visuales y respiratorios, también como sedante para cólicos, se encuentra distribuida en zonas con climas subtropicales hasta zonas de vida con clima cálido y seco (Cuvier, 1827), (De Feo, 2003).



Figura 1. *Gynoxys verrucosa*

Fuente: JSTOR, 2010

Elaboración: JSTOR, 2010

1.4. Metabolitos secundarios en las plantas

El carbono y energía son dos de los principales requisitos que las plantas utilizan para sintetizar una amplia variedad de moléculas orgánicas, dichas moléculas no cumplen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios o asimilación de nutrientes, las moléculas sintetizadas por las plantas se denominan metabolitos secundarios (Ávalos & Pérez, 2009).

Las plantas tienen la capacidad de secretar un sinnúmero de compuestos tipo orgánico, los cuales no participan del crecimiento y desarrollo de la planta en sí, a diferencia de los metabolitos primarios que se encuentran distribuidos por todo el reino vegetal, algunos metabolitos secundarios se encuentran únicamente en una determinada especie o en un determinado grupo de especies que guardan alguna relación entre sí; entre las principales funciones de los metabolitos secundarios es la de proteger a la planta de su ingesta por animales herbívoros además de protegerla de infecciones por microorganismos patógenos. Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en tres grupos principales que son: fenoles, terpenos y compuestos nitrogenados (Taiz, 2006).

Los terpenos constituyen el grupo de metabolitos mayoritarios en el reino vegetal, su biosíntesis se lleva a cabo a partir del acetil coenzima A o de intercambios glicólicos, los componentes básicos de los terpenos se denominan unidades de isopreno, es decir que cada grupo de terpenoides son el resultado de una condensación "cabeza-cola" de unidades isoprénicas (Fresno, 2001).

Los flavonoides son generalmente hidrosolubles, los cuales son pigmentos vegetales que le dan coloración a las flores y los frutos, existen casos en los que la zona de absorción de la molécula se halla cerca del ultravioleta, es así que pueden ser observados únicamente por insectos los cuales se sienten atraídos por el néctar, lo que ayuda al transporte del polen y la preservación de la especie (Fresno, 2001).

1.4.1. Terpenos o Terpenoides.

Los terpenos son el grupo más numeroso en poseer metabolitos secundarios (más de 40.000 molécula). Son insolubles en agua y se forman por la derivación de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma, se pueden clasificar los terpenos de acuerdo al número de unidades de isopreno a las que estén unidas; de esta manera los monoterpenos que contienen 10C se forman por la unión de dos unidades de 5C, los de 15C tienen tres unidades de 5C y los de 20C contienen cuatro unidades de 5C, y se denominan sesquiterpenos y diterpenos respectivamente. Son sintetizados a partir de dos rutas: la del

ácido mevalónico que activa el citosol, en la que tres moléculas de acetyl-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato, o bien la ruta del metileritritol fosfato que funciona en cloroplastos y genera también isopentenil difosfato (Ávalos & Pérez, 2009).

El interés por los compuestos terpenoides en el campo comercial es por su uso en aromas y fragancias, pero otros terpenos como las lactonas sesquiterpénicas ha llamado la atención en el campo medicinal e investigativo por su actividad antimicrobiana, antimalariales y anticancerígenas (Ávalos & Pérez, 2009).

1.4.2. Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas (LS) se caracterizan por estar presentes en su mayoría en la familia Asteraceae, en un amplio grupo de productos naturales, en más de 100 familias de plantas con flores (Kreuger, Grootjans, Biavatti, Vandenabeele, & D'Herde, 2012).

Las LS se manifiestan presentándose sin color y con un sabor amargo, están compuestas por 15 carbonos, unidas a un éster cíclico o lactona, las LS son de gran interés ya que muchas de ellas poseen una amplia actividad biológica y propiedades farmacológicas, entre ellas efectos citotóxicos, anti-inflamatorio, antiviral, antibacteriano, antifúngico, así como efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) y cardiovascular (Liu et al., 2010).

Por todas las características antes mencionadas sería de mucha importancia investigar más acerca de las LS, con el objetivo de crear medicamentos o fitofármacos que ayuden a combatir enfermedades que hoy en día son de controversia mundial tales como el cáncer (Kreuger et al., 2012).

En la actualidad, la actividad más estudiada de las LS es la anti-tumoral ya que éstas inhiben el crecimiento celular del tumor mediante un proceso de alquilación selectiva, son capaces de controlar la división celular y de esta manera inhibir funciones celulares, lo que dirige a las células a morir por apoptosis (Liu et al., 2010).

1.4.3. Dehidroleucodina (DhL).

La molécula DhL (**Figura 2**) corresponde al grupo de las lactonas sesquiterpénicas de tipo guaianólido, aislada en primera instancia a partir de la especie *Artemisia douglasiana* Besser, conocida comúnmente como matico (Penissi AB, Giordano OS, Guzman JA, Rudolph MI, 2006).

La DhL, es una lactona sesquiterpénica obtenida principalmente de hojas entre ellas de *Gynoxys verrucosa*, planta sobre el que se centró este estudio, la cual es un arbusto

pertenece a la familia de las Asteraceae, nativa del sur de Loja y Zamora Chinchipe, esta planta es comúnmente conocida como guángalo o congona y suele ser usada en medicina tradicional para el tratamiento y curación de heridas como infecciones de la piel, así como para la desaparición de verrugas (Ordóñez et al., 2011; Tene et al., 2007).

Se ha demostrado que la DhL es capaz de actuar como anti-inflamatorio y antimicrobiano sobre la especie *Staphylococcus spp* (Ordóñez et al., 2011). Además actúa como un inhibidor del crecimiento en el Astrocitoma cerebral, en el que además se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) menor a la determinada en algunos medicamentos que son usados actualmente para combatir el cáncer (Ojeda, 2012). Estudios recientes sobre el efecto anti-proliferativo producido por DhL en las mismas células de Astrocitoma cerebral, se obtuvo que a una concentración de 10 µM a un tiempo de 12 horas se provoca una inhibición del ciclo celular (Velásquez, 2013), el mecanismo por el cual las LS modifican la proliferación celular es variado, algunas afectan el proceso del ciclo celular y conducen a la apoptosis mediante el bloqueo de las células en fase G2/M y otras producen un bloqueo de la célula en la fase G0/G1 (Kreuger et al., 2012).

Otra de las actividades terapéuticas que se ha evaluado sobre la DhL es la de poseer efectos anti-proliferativo y protección gástrica, se ha obtenido muy buenos resultados despertando así interés en el estudio e investigación de la molécula y posteriormente proponer a esta lactona sesquiterpénica como un agente antineoplásico (Penissi et al., 2006; Constantino et al., 2013).

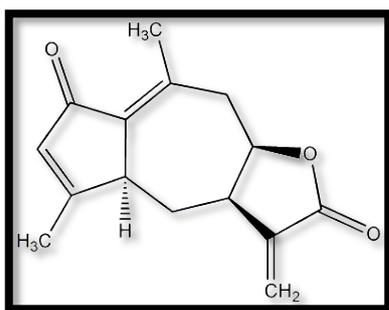


Figura 2. Molécula Dehidroleucodina

Fuente: Velásquez, 2013

Elaboración: Velásquez, 2013

1.5. Cromatografía de gases acoplada e espectrometría de masas (GC/MS)

La cromatografía es un proceso mediante la cual una fase móvil pasa a través de una fase estacionaria en la que se ha colocado una cantidad conocida de alguna muestra, el resultado de esta técnica es que los distintos componentes de la muestra que se colocó en

la fase estacionaria se separan de acuerdo a la afinidad con la fase móvil, éstas se mueven y eluyen a distintas velocidades y tiempos diferentes (Sierra, 2010).

En cromatografía de gases los componentes de una muestra se separan como consecuencia de que eluyen a través de un gas que suele ser inerte como el helio y una fase estacionaria que se encuentra adherida en una columna, esta técnica es uno de los procesos más utilizados para validar métodos analíticos debido a que la fase móvil no entra en contacto interactuando con los componentes de la muestra que se está analizando, convirtiéndolo así en una técnica con un alto grado de sensibilidad (Canosa Rodríguez, 2008).

Otro punto a favor que tenemos al utilizar un cromatógrafo de gases es que no sólo separaremos los compuestos de una muestra, sino que también obtendremos su identificación y cuantificación, el análisis cuantitativo está basado en la medida de tiempos y volúmenes de retención; en cuanto al análisis cualitativo se basa en la medida de altura o área de picos que estarán relacionados con la concentración de los componentes del analito (Douglas, 2008).

En cuanto a los tipos de columnas que utiliza un cromatógrafo de gases se pueden diferenciar dos: las empaquetadas o de relleno y tubulares abiertas o capilares, las columnas cromatográficas varían en longitud desde menos de 2m hasta los 50m o más, el tipo de material del que están fabricadas son de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida, o teflón (Douglas, 2008).

Combinar la cromatografía de gases con la espectrometría de masas nos permitirá obtener registros en tres dimensiones ya que por cada tiempo de retención nos ofrece un espectro de masas de los compuestos que brotan de la columna cromatográfica, el analizador de masas suele contener una trampa de iones un impacto eléctrico provocado por un filamento de wolframio que transmite electrones acelerados aplicado entre el ánodo y el filamento lo que produce una fuerte ionización en el eluyente cromatográfico. La espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas actualmente, muestra diversas cualidades entre ellas: información casi inequívoca del analito ya que proporciona un espectro característico de cada molécula, información cuantitativa de lo que se está analizando con lo que nos permite medir su concentración, gran sensibilidad; detecta concentraciones en ppm, y proporciona información estructural de la molécula analizada (Gutiérrez & Droguet, 2002).

1.6. Método de validación

Como lo dicta la norma ISO/IEC 17025 la validación es la confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto; de esta manera la validación analítica se define como un proceso para verificar por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestre científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas (B. Magnusson & U. Örnemark, 2014).

1.6.1. Parámetros de validación.

Para validar un método es necesario determinar mediante estudios de laboratorio parámetros estándares para su posterior aplicación, para la validación del método se definirán los siguientes parámetros:

1.6.1.1. Linealidad.

Es la capacidad del método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido, se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de trabajo (Agency, 2006).

Se confirma linealidad si cumple con los criterios de homocedasticidad (la varianza es constante para todas las concentraciones), distribución aleatoria de los residuos el coeficiente de correlación al cuadrado debe ser mayor de 0.995 (ICH, 2009).

1.6.1.2. Exactitud.

La exactitud expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. La validación de métodos trata de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre resultados individuales (B. Magnusson & U. Örnemark, 2014).

El Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos para el uso humano (ICH), recomienda que la precisión debe evaluarse usando un mínimo de 9 determinaciones sobre un mínimo de 3 niveles de concentración que cubren el rango especificado. La precisión debe determinarse como porcentaje de recuperación mediante el ensayo de la cantidad añadida conocida de analito en la

muestra o como la diferencia entre la media y el valor verdadero aceptado junto con los intervalos de confianza (Agency, 2006).

1.6.1.3. Precisión.

Expresa el grado de dispersión o concordancia entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una muestra homogénea en las condiciones prescritas, suele expresarse en términos de la desviación estándar o el coeficiente de variación, el objetivo de la precisión es conocer la variabilidad del ensayo, lo cual se puede deber a un sinnúmero de errores aleatorios dentro del laboratorio al momento de la preparación de las muestras (Magnusson & U. Örnemark, 2014).

En la precisión además se mide la repetibilidad que se expresa por el coeficiente de variación de una serie de medidas, los factores que influyen en este análisis es la concentración del analito, esto debido a que la desviación estándar de los resultados obtenidos aumenta al disminuir la concentración de la muestra que se está analizando, en el ensayo de repetibilidad se efectúa sobre una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza desde el momento de su preparación hasta la lectura de los resultados teniendo en cuenta que debe ser analizado por el mismo instrumento y preparado por el mismo analista (Agency, 2006).

El objetivo de la reproducibilidad es comprobar que el método que se está utilizando proporcione los mismos resultados en diferentes laboratorios usando el mismo método, se debe tener en cuenta además que cuanto mayor sea la manipulación de la muestra mayor será el error obtenido al final del ensayo (ICH, 2009).

1.6.1.4. Límite de detección (LOD).

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto, es comúnmente expresado como concentración del analito (ICH, 2009). Para un valor analítico el cual su resultado es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de, si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o al valor real del analito, el límite de detección corresponde a una señal K que corresponde a la desviación estándar del ruido de fondo, usualmente este valor K es igual a 4 ($LD = 3\sigma_F$), los valores por encima de este resultado puede significar la presencia del analito y los valores por debajo del LD significaría la ausencia del analito (Agency, 2006).

1.6.1.5. Límite de cuantificación (LOQ).

Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en una muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación, se expresa como concentración del analito (ICH, 2009). Este parámetro se emplea cuando se realizan determinaciones del analito a nivel de trazas, por medio de la determinación de la concentración más pequeña que se puede medir con este valor máximo, para el análisis cuantitativo se emplean valores que correspondan al analito, así el límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso (Agency, 2006).

En cuanto a la sensibilidad de un método analito podemos definir la capacidad del mismo para poder determinar pequeñas cantidades de analito en la muestra. También puede definirse como la capacidad para discriminar entre concentraciones semejantes de analitos. Corresponde a la pendiente de la curva de calibración (a mayor pendiente, mayor sensibilidad) (Agency, 2006).

CAPITULO II.
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Esquema metodológico

Para el desarrollo de la esta investigación se desarrolló la siguiente metodología (**Figura 3**):



Figura 3. Esquema metodológico de la investigación

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

2.2. Recolección de las muestras vegetales

Las hojas de *Gynoxys verrucosa* se las recolectaron de 4 sectores diferentes de la provincia de Loja, específicamente los sectores de Villonaco, Las Juntas, Celica y Yangana. De cada sector se tomaron 30 muestras diferentes, aproximadamente 10 g de cada muestra y que se las almacenó bajo una denominación GV-001 hasta GV-120, las muestras vegetales fueron almacenadas en la cámara de secado de la UTPL para su posterior tratamiento.

2.3. Secado y triturado de la planta

Las 120 muestras vegetales se colocaron en la cámara de secado a una temperatura de 29°C por 3 días, el cual fue el tiempo necesario para que las hojas estén totalmente secas, posteriormente y con la ayuda de un molino eléctrico ubicado en el laboratorio de alimentos de la Universidad, se procedió a triturar aproximadamente 50 mg de cada muestra que pasaron por un tamiz de 75 µm obteniéndose así un polvo fino verdoso como se muestra en la **Figura 4**.



Figura 4. Muestra vegetal triturada

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

2.4. Maceración

Luego de tener las 120 muestras trituradas, se pesó por triplicado 5 mg de cada una de las 120 muestras en viales de 2 ml y se procede a realizar una maceración dinámica con la ayuda de un rotador orbital añadiendo 1 ml de diclorometano. Se realiza este proceso por 4 horas, pasado ese tiempo se filtra el solvente en viales nuevos y debidamente etiquetados y se repite el proceso con 1 ml más de diclorometano. Filtrado los 2 ml de diclorometano se

obtiene un resultado final de 360 muestras. Posterior a ello el diclorometano se evaporará con la ayuda de una campana de extracción; de esta manera se obtiene extractos ricos en DhL para su posterior análisis.

2.5. Condiciones del cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases es un equipo Agilent Technologies 6890N (**Figura 5**) acoplado a espectrometría de masas (Agilent Technologies 5973 inert), la separación se alcanzó utilizando un tipo de columna DB-5ms: 0.25 mm x 30 m y 0.25 µm de espesor de la película, bajo las siguientes condiciones (**Tabla 2**):



Figura 5. Cromatógrafo de gases

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Tabla 2. Condiciones del Cromatógrafo de gases

Temperatura inicial	100°C
Tiempo inicial	1 min
Rampa	10
Temperatura final	300°C
Tiempo de equilibrio	1 min
Tiempo de corrido	16 min
Fase móvil	Helio
Presión	131.8 KPa
Flujo de gas	40.4 ml/min
Modo	SIM (238, 244.2)

Fuente: El autor, 2017

Elaboración: Autor

2.6. Preparación de soluciones patrón, estándares y muestra

2.6.1. Solución patrón.

Para la preparación de la solución patrón se pesa 36.9 mg de DhL y se aforó con etanol en un balón de 10 ml, obteniendo una concentración final de 3690 ng/ul. Esta solución nos servirá para realizar diluciones y construir la curva de calibración. Las concentraciones que se emplearon fueron: 5; 10; 25; 50; 75 y 100 ng/ml, se colocaron 100 ul en insert, para proceder con la lectura en el CG/MS.

2.6.2. Preparación del estándar interno.

Como estándar interno se utilizó chrysotol el cual se pesó 6.3 mg y se aforó con etanol en un balón de 5 ml, obteniendo una concentración de 1260 ng/ul. Luego se realizó otra dilución a una concentración de 30 ng/ul, y se colocó 25 ul a cada muestra para su posterior lectura.

2.6.3. Preparación de la muestra (*Gynoxys verrucosa*).

Se pesó 4 mg del extracto y se aforó con etanol en un balón de 10 ml, obteniendo una concentración de 400 ng/ul. Para la lectura de la misma se tomaron 25 ul del extracto y se le adicionó 75 ul más de etanol grado reactivo junto con 25 ul de estándar interno.

2.6.3.1. Linealidad.

Para evaluar la linealidad se construyó la curva de calibración y se realizaron 6 réplicas de inyección a partir de distintas concentraciones de DhL. Luego se procedió a graficar los picos de las áreas frente a la concentración. La linealidad de la respuesta del detector se determinó por medio de regresión lineal.

2.6.3.2. Preparación de los estándares.

A continuación se muestran los volúmenes tomados tanto de solución madre de DhL y etanol al 99%, con los resultados obtenidos del GC/MS se construyó la curva de calibración.

- **Concentración 1 (5 ng/ul):** Se tomó 40 ul de DhL y se añadió 1460 ul de etanol 99%
- **Concentración 2 (10 ng/ul):** Se tomó 375 ul de DhL y se añadió 125 ul de etanol 99%
- **Concentración 3 (25 ng/ul):** Se tomó 250 ul de DhL y se añadió 250 ul de etanol 99%

- Concentración 4 (**50 ng/ul**): Se tomó 225 ul de DhL y se añadió 675 ul de etanol 99%
- Concentración 5 (**75 ng/ul**): Se tomó 90 ul de DhL y se añadió 810 ul de etanol 99%
- Concentración 6 (**100 ng/ul**): Se tomó 45 ul de DhL y se añadió 855 ul de etanol 99%

De cada uno de los estándares preparados se tomaron de manera individual 100 µl y se le añadió 25 ul de estándar interno para así obtener las concentraciones necesarias para construir la curva de calibración. Cada una de estas concentraciones fueron inyectadas por cuadruplicado durante tres días distintos y tres analistas diferentes para evaluar y determinar que existe linealidad instrumental y del método.

2.6.3.3. Exactitud.

Este parámetro fue determinado mediante el análisis de recuperación, en el cual se utilizó la técnica de adición de estándar con 3 concentraciones distintas inyectadas por triplicado. Las muestras fueron preparadas a partir de extracto de *G.verrucosa*, el cual obtuvo una concentración inicial de 6 ng/ul y añadiendo 100 ul de DhL a concentraciones conocidas de 5, 10 y 25 ng/ul de DhL a cada una, obteniendo así concentraciones esperadas de 11, 16 y 31 ng/ul de DhL, respectivamente.

Es necesario determinar el porcentaje de recuperación para medir el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en el diseño experimental de los estándares y/o extracto, con los valores teóricos de los mismos. La recuperación del método se calculó a partir de las concentraciones observadas y las concentraciones esperadas mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{C. Observada}}{\text{C. esperada}} \times 100$$

2.6.3.4. Precisión.

El parámetro de precisión se lo evaluó mediante la determinación de repetibilidad y reproducibilidad. La precisión intra-batch fueron determinados por análisis repetitivos del grupo de estándares en un batch (n=4). La precisión inter-batch fueron determinados por análisis repetitivos en tres días consecutivos (n=4 series por día). La concentración de cada muestra fue determinada usando la curva de calibración preparada y analizada en el mismo

batch. Es necesario evaluar la repetibilidad y reproducibilidad mediante análisis ANOVA de un factor para determinar la varianza y comprobar que el método es exacto y preciso.

Repetibilidad (r). Se obtiene como resultado del promedio de las p varianzas que estiman la variabilidad interna de cada condición, esta variabilidad interna promedio (Sr) es conocida como el ruido presente en el experimento.

$$r = \sqrt{[Sr^2]} = \sqrt{\sum Sw^2/p}$$

Reproducibilidad (R). O variabilidad entre las condiciones (SL) se obtiene mediante la diferencia de la varianza (Sm^2) de los p promedios menos la varianza representativa del ruido del experimento (Sr^2) entre la cantidad de mediciones n de cada condición.

$$R = \sqrt{[SL^2]} = \sqrt{\sum Sm^2 - Sr^2/p}$$

**CAPÍTULO III.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1. Obtención de extractos de *G. verrucosa*

Se obtuvieron 360 extractos hexánicos de *G. verrucosa* ricos en DhL gracias al protocolo anunciado anteriormente y descrito en el literal **2.4**, los extractos analizados obtuvieron un rendimiento promedio del 1% a partir de 5 mg de muestra vegetal; los extractos son almacenados en viales de 2 ml a una temperatura de 4°C (**Figura 6**).

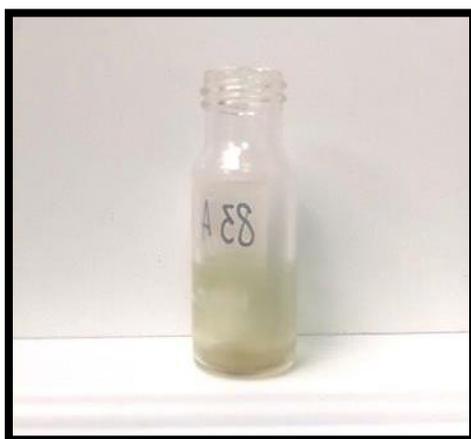


Figura 6. Extracto *G. verrucosa*
Fuente: Autor
Elaboración: Autor

En el **Anexo 5** se muestra las concentraciones de DhL obtenidas para los extractos de *G. verrucosa*.

3.2. Diseño del método analítico

3.2.1. Linealidad.

Para determinar la linealidad del método se construyó una curva de calibración a partir de los datos mostrados en la **Tabla 3**. De acuerdo a la guía del ICH para que un método sea lineal el coeficiente de correlación r^2 debe ser mayor al 0.995, tomando ese criterio como guía se obtuvieron los siguientes resultados:

- Coeficiente de correlación $r^2 = 0.9978$
- Pendiente = 0.139
- Intercepto = -0.2464
- Ecuación $y = 0.139x - 0.2464$

Con los resultados obtenidos (**Anexo 2**) se indica que el método es capaz de proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido, en el intervalo de concentración comprendido entre 5 ng/ul y 100 ng/ul se cumplen las condiciones de linealidad instrumental del método analítico, ya que

se alcanza los requerimientos de un coeficiente de correlación lineal ($r^2= 0.9978$) (Ver Figura 7).

Tabla 3. Valores para la curva de calibración

X	Y	Y min	Y max
5	0.692	-0.619	1.312
10	1.141	-0.054	2.197
25	3.214	1.641	4.851
50	6.336	4.467	9.276
75	10.023	7.294	13.700
100	13.937	10.120	18.124

Fuente: Autor
Elaboración: Autor

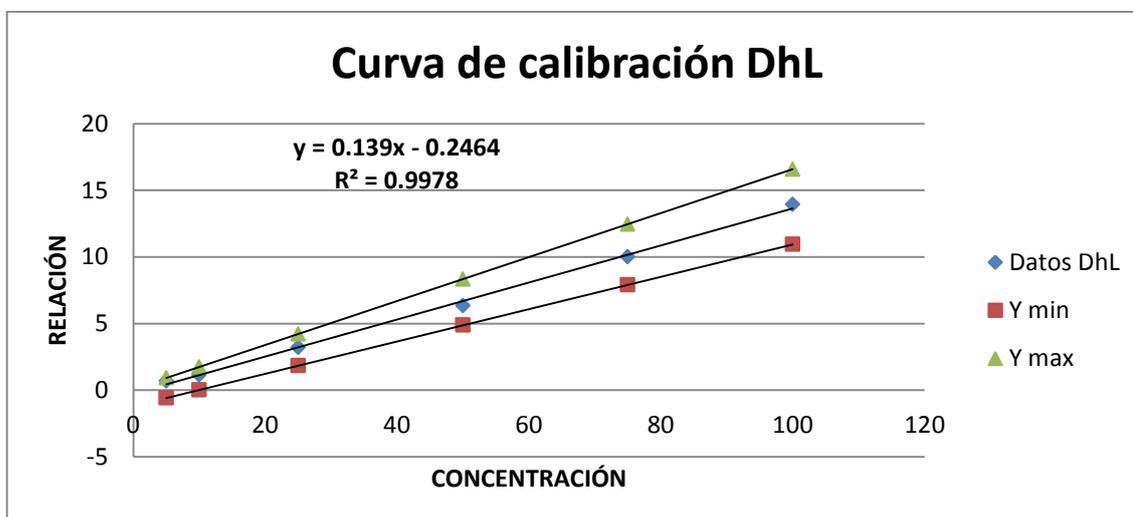


Figura 7. Curva de calibración global
Fuente: Autor
Elaboración: Autor

3.2.2. Exactitud.

Para el análisis de exactitud se analizó por triplicado 3 muestras de extracto de *G.verrucosa* que posteriormente se enriqueció con la solución madre de DhL a 3 diferentes niveles de concentración (5, 10 y 25 ng/ul), para su determinación se evaluó el porcentaje de recuperación obtenido con la fórmula mencionada en el literal 2.6.3.3. En la **tabla 4** se muestran los resultados obtenidos para recuperación de DhL.

Tabla 4. Datos de recuperación de DhL

Nº	Concentración de la muestra	Muestra + Concentraciones			Recuperación (%)		
		Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
		5 ng/ul	10 ng/ul	25 ng/ul			
1	6,387	10,135	18,944	26,721	89,01	115,71	85,13
2	6,387	11,984	13,293	35,109	105,25	81,06	111,86
3	6,387	11,139	15,525	29,585	97,83	94,74	94,26
4	6,387	11,852	15,888	36,317	104,08	96,96	115,71
5	8,576	12,377	21,378	34,282	91,18	115,09	102,11
6	8,576	11,348	17,683	29,879	83,59	95,19	88,99
7	8,576	14,946	20,929	38,671	110,10	112,67	115,18
8	8,576	11,411	20,658	38,973	84,06	111,21	116,08
9	9,256	14,931	20,684	31,932	104,74	107,42	93,22
10	9,256	14,898	21,543	37,408	109,51	111,88	109,20
11	9,256	15,860	19,722	38,016	111,26	102,42	110,98
12	9,256	13,323	20,910	29,609	93,46	108,59	86,44

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

De acuerdo al criterio de la ICH el porcentaje de recuperación debe estar comprendido entre 80% a 120%, con lo cual lo mostrado en la tabla 4 el método analítico cumple con esta condición. A partir de los resultados obtenidos en la recuperación de DhL podemos realizar el gráfico de control que se muestra en la **figura 8**.

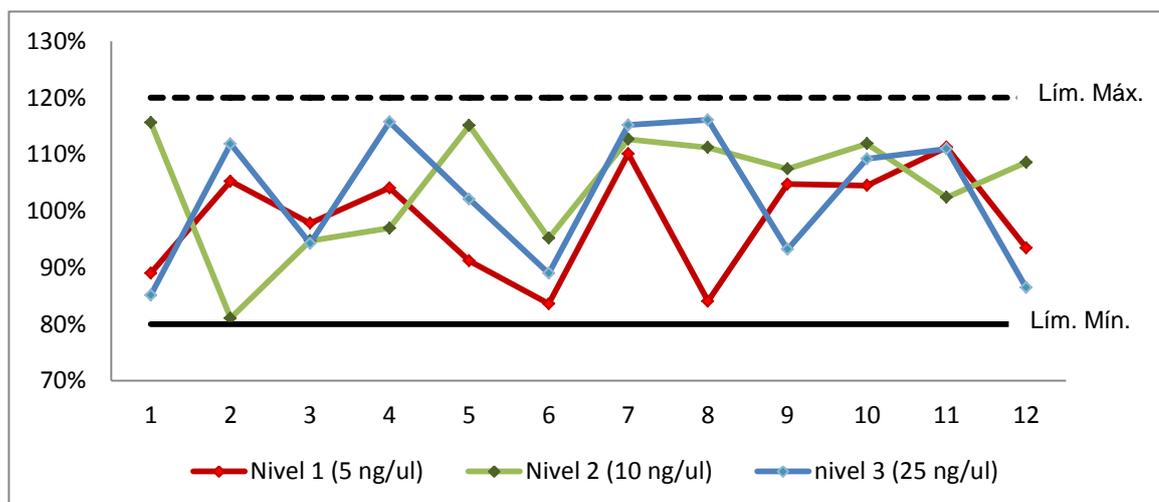


Figura 8. Gráfico de control de DhL

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

3.2.3. Precisión.

Mediante el análisis de precisión podremos saber y medir con exactitud el grado de similitud entre los resultados obtenidos de una serie de repeticiones de un mismo analito realizadas en las mismas condiciones antes previstas en el método, según la Oficina de las Naciones Unidas manifiesta que, para que en un método analítico la precisión sea aceptable debe estar en el nivel de concentración inferior al 20%; por lo cual para este estudio se establecieron para la repetibilidad y reproducibilidad criterios menores al 10% y 15%, respectivamente (UNODC, 2010), (ICH,2009).

En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para la repetibilidad y reproducibilidad, en el cual se evalúa el cálculo de los cuadrados medios y el nivel de significancia respecto a la prueba F, con un nivel de confianza del 95%. En el anexo 3 se muestran los cálculos respectivos.

Tabla 5. Precisión DhL

25 ng/ul	Norma	Resultado	Análisis de varianza	
Repetibilidad	<10%	9.95%	F	Valor crítico para F
Reproducibilidad	<15%	10.36%	1.35339599	4.256494729
Conclusión: No existe diferencia significativa				
10 ng/ul	Norma	Resultado	Análisis de varianza	
Repetibilidad	<10%	7.95%	F	Valor crítico para F
Reproducibilidad	<15%	6.98%	0.08409038	4.25649473
Conclusión: No existe diferencia significativa				
25 ng/ul	Norma	Resultado	Análisis de varianza	
Repetibilidad	<10%	3.80%	F	Valor crítico para F
Reproducibilidad	<15%	3.66%	0.71510134	4.25649473
Conclusión: No existe diferencia significativa				

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

3.2.4. Límite de detección y cuantificación.

Se analizaron 12 muestras de DhL obteniéndose así el límite más bajo en el cual el analito puede ser detectable, en la **tabla 6** se muestran los resultados obtenidos para el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) con sus respectivos cálculos.

Tabla 6. LOD y LOQ para DhL

Nº de ensayos	DhL (ng/ul)
1	6,36
2	7,39
3	6,03
4	6,52
5	6,77
6	6,39
7	7,69
8	7,21
9	7,78
10	6,72
11	8,46
12	6,58
Media	6,99
S	0,687
CV	9,83
LOD	9,051
LOQ	10,425

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

$$X_{(LoD)} = \bar{X}_{(B)} + 3s_{(B)}$$

$$X_{(LoD)} = 6,99 + 3 * (0,687)$$

$$X_{(LoD)} = 9,051 \text{ ng/ul}$$

$$X_{(LoQ)} = \bar{X}_{(B)} + 5s_{(B)}$$

$$X_{(LoQ)} = 6,99 + 5 * (0,687)$$

$$X_{(LoQ)} = 10,425 \text{ ng/ul}$$

3.3. Análisis de las muestras

Para poder determinar la concentración de DhL en los 360 extractos, se utiliza la ecuación de la recta obtenida en la linealidad, de esta manera sabremos con exactitud la cantidad en ng/ul de DhL presentes en los extractos de *G.verrucosa*; la ecuación que se utilizó para este cálculo fue el siguiente:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

En donde (y) es igual a la relación del área del pico correspondiente al DhL dividido para el área del pico del estándar interno, (m) es la pendiente y (b) el intercepto, en el anexo 2 se muestran las concentraciones de DhL obtenidas para las muestras analizadas.

En la **figura 9** se muestra el análisis de cuantiles por sector en el que se observa una diferencia en cuanto a la producción de DhL en el sector 2 perteneciente a Celica a diferencia de las muestras analizadas en los demás sectores, sector 1 (Villonaco), sector 3 (Yangana), sector 4 (Las Juntas).

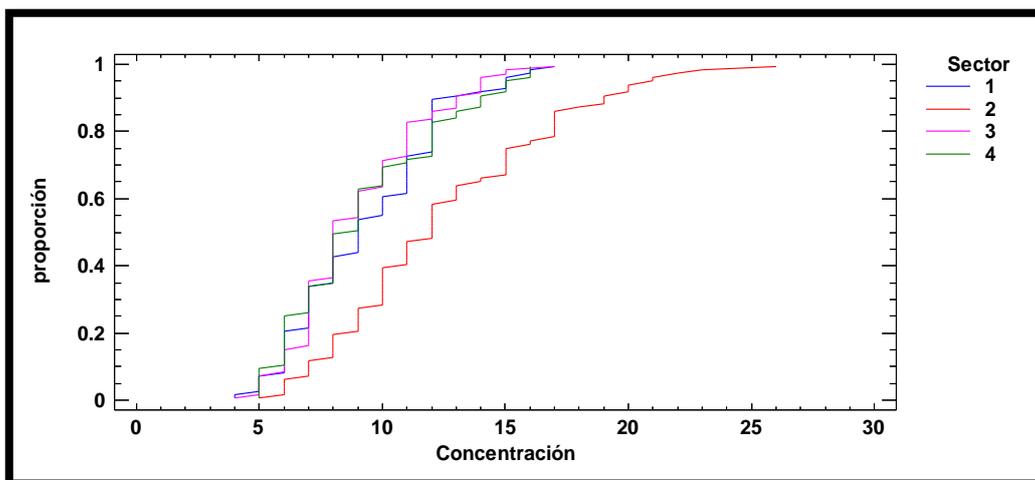


Figura 9. Gráfico de cuantiles por sector

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Como se muestra en la **Figura 10** se evidencia la variación de producción de DhL en todas las poblaciones, además se puede observar que el Villonaco es el sector con menor producción de DhL, a diferencia de las muestras recolectadas en el sector de Celica que muestra un rendimiento mayor en cuanto a concentración del analito.

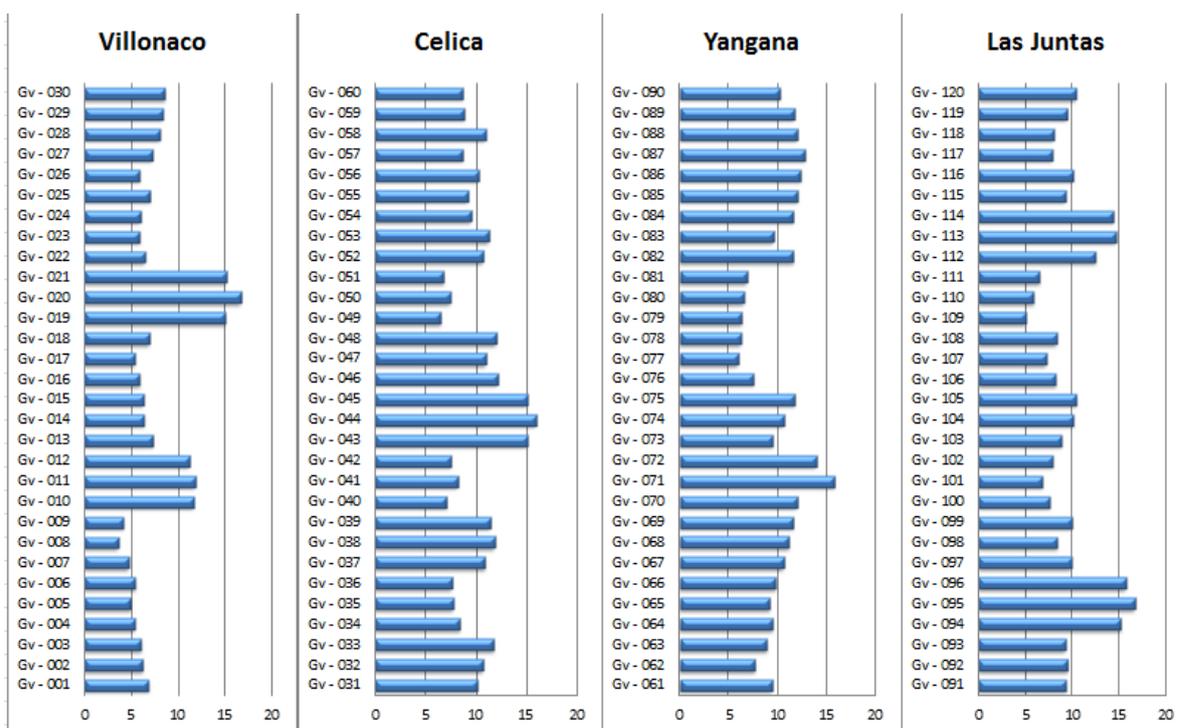


Figura 10. Gráfica de cuantiles por sectores

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

CONCLUSIONES

- El método diseñado para la cuantificación de DhL en extractos de *G. verrucosa* fue satisfactoriamente validado ya que cumple con todos los criterios de aceptación propuestos por la norma ISO/IEC 17025
- El método analítico puede ser aplicado con seguridad ya que si se observa los resultados obtenidos en la precisión, los datos de repetibilidad y reproducibilidad demuestran que el método cumple con las especificaciones y criterios propuestos.
- El método desarrollado es lineal, exacto y preciso, por lo cual es adecuado para evaluar y determinar cuantitativamente la concentración de DhL en hojas de *G. verrucosa*.
- El sector que presenta mayor promedio de concentración de DhL es el sector de Celica con un promedio de 12,46 ng/ul, y el segundo sector con mayor promedio de concentración de DhL es el Villonaco con un promedio de 9,29 ng/ul.
- La muestra que presenta un mayor rendimiento de DhL es la muestra Gv-042 con las coordenadas sur: 04°05'49.4'' y oeste: 79°59'42.4'' perteneciente al sector de Celica a una altura de 2065 msnm, y la muestra con el menor rendimiento de DhL es la muestra Gv-118 con las coordenadas sur: 03°49'51.9'' y oeste: 70°14'09.1'' perteneciente al sector de Las Juntas a una altura de 1993 msnm, cabe destacar que la mayoría de muestras fueron recolectadas a una considerable altura sobre el nivel del mar (2000 msnm).

RECOMENDACIONES

- El diseño experimental es el punto de partida que se debe tener en cuenta para la validación de un método analítico.
- Las condiciones en las cuales se trabajan deben ser tomadas en cuenta, desde las condiciones del cromatógrafo de gases, hasta las condiciones en las cuales se preparan las muestras, ya que las diversas repeticiones que se realizaron entre los tres analistas se pudo evidenciar que la temperatura ambiental influye de cierta manera alterando la concentración de DhL en las muestras que se inyectaban en el equipo.
- En cuanto al rendimiento de DhL en las muestras vegetales recolectadas se recomienda realizar investigaciones de la taxonomía de la planta para así poder encontrar una respuesta que justifique el mayor rendimiento de DhL en el sector de Celica.

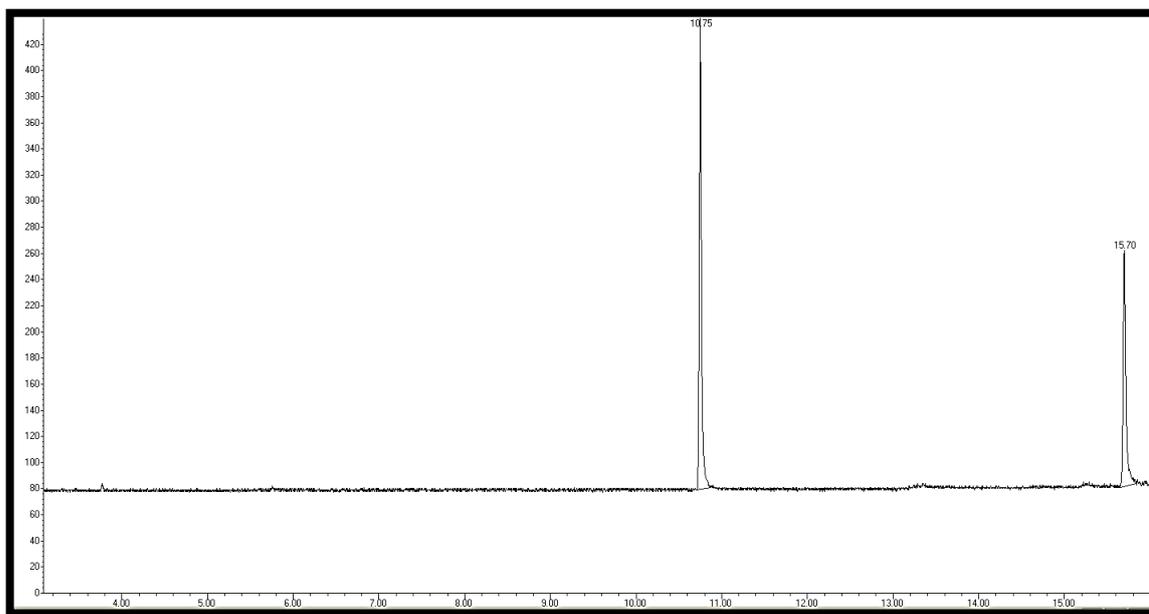
BIBLIOGRAFÍA

1. Agency, E. M. (2006). European Medicines Agency, 2(November 1994), 1–15.
2. Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2006). Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 47. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-47>
3. Canosa Rodríguez, M. del P. (2008). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales, 314. Retrieved from http://minerva.usc.es/bitstream/10347/2522/1/9788498871821_content.pdf
4. De Feo, V. (2003). Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2–3), 243–256. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00017-5)
5. Guía, U., Laboratorio, D., & Métodos, V. De. (n.d.). *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos*.
6. Guía de validación de métodos analíticos. 2011. ASECAL
7. *Guía de validación de métodos analíticos*. 2009, MINISTERIO DE SALUD (Fecha de consulta 11-09-2017); Available from: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>.
8. Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigacion Textil Y de Cooperacion Industrial*, (122), 35–41.
9. Hernández B. Castillo y Rolando G. 1996. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista cubana de farmacia*. Vol 30
10. Kreuger, M. R. O., Grootjans, S., Biavatti, M. W., Vandenabeele, P., & D'Herde, K. (2012). Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anti-Cancer Drugs*, 23(9), 883–96. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328356cad9>
11. Liu, J.-W., Cai, M.-X., Xin, Y., Wu, Q.-S., Ma, J., Yang, P., ... Huang, D.-S. (2010). Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(108), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-108>
12. OAA, Organismo Argentino para la acreditación. 2003. Guía para la validación de método de ensayo
13. Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito. 2010. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración de equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Nueva York

14. Ojeda C. (2012). Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares tumorales humanas, para la valoración citotóxica in vitro de extractos vegetales y metabolitos secundarios, mediante el ensayo de tinción con violeta cristal. Tesis de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico, Universidad Técnica Particular de Loja.
15. Ordóñez, P. E., Quave, C. L., Reynolds, W. F., Varughese, K. I., Berry, B., Breen, P. J., Compadre, C. M. (2011). Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(2), 1055–1059. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.012>
16. Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchi, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.032>
17. V, J. P. L., & V, J. P. A. (2009). Técnica De Cromatografía De Gases Acoplada a Espectrometría De, (43), 228–233.
18. Villavicencio Nieto, M. A., Pérez Escandón, B. E., Mendoza Pérez, E., & Maldonado Lagunas, V. (n.d.). Citotoxicidad en células hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica*, (26), 137–147. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682008000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

ANEXOS

Anexo 1. GC/MS Del extracto de *Gynoxys verrucosa*.



En el Anexo 1 se muestra el cromatograma del extracto de *G. verrucosa*, en donde se observan 2 picos, el primero a un tiempo de retención de 10,75 pertenece al metabolito DhL, y el segundo a un tiempo de retención de 15,70 pertenece al estándar interno (Chrysotol)

Anexo 2. Datos para la determinación de Linealidad

	5 ng/ul	10 ng/ul	25 ng/ul	50 ng/ul	75 ng/ul	100 ng/ul
Analista 1	0.719	1.171	3.344	6.473	9.902	13.869
	0.789	1.199	3.006	6.482	10.027	14.034
	0.720	1.038	2.957	6.626	9.864	12.517
	0.651	1.158	2.890	5.701	9.039	12.525
Analista 2	0.665	1.157	2.997	5.815	9.534	13.083
	0.706	1.107	3.098	5.758	8.745	12.470
	0.770	1.103	3.319	6.446	11.424	14.987
	0.697	1.045	3.096	6.605	9.767	14.184
Analista 3	0.721	1.088	3.147	6.480	11.098	14.956
	0.726	1.164	3.893	7.827	13.659	17.022
	0.672	1.120	3.0699	6.643	11.505	16.319
	0.691	1.166	3.808	7.792	11.820	16.719

Fuente: Autor

Elaboración: Autor

Anexo 3. Datos obtenidos para la determinación de la precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad)

CONCENTRACIÓN	Día 1	Día 2	Día 3
5 ng/ul	5,11	5.77	5.18
	5,52	5.39	5.22
	5.05	5.69	5.46
	5,12	5.21	5.58
10 ng/ul	9.65	10.55	10.20
	10.33	9.68	9.18
	8.50	9.86	11.17
	10.60	9.68	9.41
25 ng/ul	25.47	24.66	25.75
	23.27	26.00	24.53
	23.43	24.38	24.01
	24.55	24.25	25.15

Fuente: Autor
Elaboración: Autor

Anexo 4. Análisis de varianza de un factor para 3 diferentes concentraciones

Análisis de varianza de un factor (5 ng/ul)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	4	26.2979257	6.57448142	0.33798505
Columna 2	4	28.0581202	7.01453006	0.31309951
Columna 3	4	29.530438	7.38260949	0.80036979

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor Crítico para F</i>
Entre los Grupos	1.309594995	2	0.6547975	1.3533959	0.30628148	4.256
Dentro de los grupos	4.354363047	9	0.48381812			
Total	5.663958042	11				

Sr	0.695570353	9.95%	<10%
SL^2	0.042744845		
SR	0.725646582	10.38%	<15%

Análisis de varianza de un factor (10 ng/ul)

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	4	39.0931607	9.77329027	0.87599682
Columna 2	4	39.7704866	9.94242165	0.17318272
Columna 3	4	39.9626354	9.99065635	0.81140286

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor Crítico para F</i>
Entre los Grupos	0.104304717	2	0.05215236	0.08409038	0.92006189	4.256
Dentro de los grupos	5.581747208	9	0.62019413			
Total	5.686051924	11				

Sr	0.787524053	7.95%	<10%
SL^2	-0.142010444		
SR	0.787524053	7.95%	<15%

Análisis de varianza de un factor (25 ng/ul)

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	4	96.7217588	24.1804397	1.05814534
Columna 2	4	99.2821188	24.8202597	0.64253296
Columna 3	4	96.4422209	24.1105552	0.86864371

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor Crítico para F</i>
Entre los Grupos	1.22488375	2	0.61244188	0.71510134	0.51496051	4.256
Dentro de los grupos	7.70796604	9	0.85644406			
Total	8.93284979	11				

Sr	0.925440799	3.80%	<10%
SL^2	-0.060999699		
SR	0.925440799	3.8'	<15%

Anexo 5. Datos obtenidos del GC/MS para el cálculo de DhL en las muestras de *Gynoxys verrucosa*

CÓDIGO	Masa de muestra (mg)	STD	DhL	RELACIÓN	CONCENTRACIÓN (ng/ul)	MEDIA
GV-001	5.55	1141	800	0.7011	7	6.358
		1204	745	0.6188	6	
		1206	714	0.5920	6	
GV-002	4.99	1070	534	0.4991	5	5.226
		1139	497	0.4363	5	
		1296	654	0.5046	5	
GV-003	4.91	1231	496	0.4029	6	6.333
		1276	321	0.2516	7	
		1192	399	0.3347	6	
GV-004	5.12	1182	1616	1.3672	12	11.531
		1411	1967	1.3940	12	
		1366	1787	1.3082	11	

GV-005	5.41	1248	959	0.7684	7	6.652
		1146	730	0.6370	6	
		1190	749	0.6294	6	
GV-006	5.22	1139	652	0.5724	6	6.046
		1412	698	0.4943	5	
		1225	876	0.7151	7	
GV-007	5.41	1189	2191	1.8427	15	15.604
		1112	2302	2.0701	17	
		1150	2133	1.8548	15	
GV-008	5.12	1312	850	0.6479	6	6.071
		1348	764	0.5668	6	
		1350	780	0.5778	6	
GV-009	5.21	1372	997	0.7267	7	6.694
		1245	713	0.5727	6	
		1380	1039	0.7529	7	
GV-010	5.11	1248	1078	0.8638	8	8.299
		1297	1186	0.9144	8	
		1248	1177	0.9431	9	
GV-011	5.04	1357	1573	1.1592	10	10.876
		1304	1620	1.2423	11	
		1244	1735	1.3947	12	
GV-012	4.99	1143	1054	0.9221	8	7.924
		1229	1017	0.8275	8	
		1305	1064	0.8153	8	
GV-013	4.61	1216	1536	1.2632	11	11.373
		1244	1747	1.4043	12	
		1313	1754	1.3359	11	
GV-014	5.16	1426	1049	0.7356	7	7.607
		1524	1365	0.8957	8	
		1340	1074	0.8015	8	
GV-015	5.18	1263	2339	1.8519	15	15.367
		1418	2786	1.9647	16	
		1326	2456	1.8522	15	
GV-016	5.19	1444	2077	1.4384	12	11.696
		1353	1735	1.2823	11	
		1459	2068	1.4174	12	
GV-017	5.21	1343	883	0.6575	7	6.918
		1493	1174	0.7863	7	
		1408	988	0.7017	7	
GV-018	5.31	1348	1668	1.2374	11	10.483
		1231	1619	1.3152	11	
		1371	1480	1.0795	10	
GV-019	5.12	1337	1380	1.0322	9	9.379
		1466	1728	1.1787	10	

		1364	1311	0.9611	9	
GV-020	5.31	1255	1598	1.2733	11	9.480
		1436	1408	0.9805	9	
		1387	1332	0.9603	9	
GV-021	4.93	1386	1459	1.0527	9	8.592
		1436	1164	0.8106	8	
		1316	1290	0.9802	9	
GV-022	4.99	1286	1367	1.0630	9	9.427
		1164	1189	1.0215	9	
		1166	1291	1.1072	10	
GV-023	4.96	1392	1709	1.2277	11	11.101
		1413	1834	1.2979	11	
		1249	1704	1.3643	12	
GV-024	5.04	1177	1657	1.4078	12	13.856
		1019	1987	1.9500	16	
		1269	2133	1.6809	14	
GV-025	5.09	1190	1268	1.0655	9	10.566
		1267	1553	1.2257	11	
		1142	1571	1.3757	12	
GV-026	5.11	1261	998	0.7914	7	6.534
		1295	750	0.5792	6	
		1254	771	0.6148	6	
GV-027	5.14	1441	908	0.6301	6	6.546
		1333	877	0.6579	7	
		1260	885	0.7024	7	
GV-028	5.19	1392	1896	1.3621	12	10.885
		1277	1375	1.0767	10	
		1263	1719	1.3610	12	
GV-029	5.19	1278	1821	1.4249	12	12.354
		1263	1847	1.4624	12	
		1219	1859	1.5250	13	
GV-030	5.41	1177	1664	1.4138	12	11.256
		1365	1863	1.3648	12	
		1314	1545	1.1758	10	
GV-031	5.12	1343	1403	1.0447	9	9.341
		1205	1292	1.0722	9	
		1205	1252	1.0390	9	
GV-032	5.14	1271	2363	1.8592	15	15.836
		1320	2731	2.0689	17	
		1316	2548	1.9362	16	
GV-033	5.33	1277	1430	1.1198	10	9.392
		1214	1115	0.9185	8	
		1150	1310	1.1391	10	
GV-034	5.14	1387	1117	0.8053	8	7.386

		1581	1092	0.6907	7	
		1643	1388	0.8448	8	
GV-035	5.17	1602	1572	0.9813	9	9.760
		1458	1680	1.1523	10	
		1328	1590	1.1973	10	
GV-036	5.27	1091	980	0.8983	8	7.899
		1124	840	0.7473	7	
		1102	1002	0.9093	8	
GV-037	5.15	1424	625	0.4389	5	5.723
		1428	798	0.5588	6	
		1433	931	0.6497	6	
GV-038	5.17	1420	2105	1.4824	12	13.824
		1292	2310	1.7879	15	
		1294	2271	1.7550	14	
GV-039	5.18	1314	1366	1.0396	9	9.017
		1192	1369	1.1485	10	
		1347	1122	0.8330	8	
GV-040	5.19	1294	1114	0.8609	8	9.248
		1172	1245	1.0623	9	
		1196	1428	1.1940	10	
GV-041	10	1233	2945	2.3885	19	20.090
		1124	2731	2.4297	19	
		1024	2888	2.8203	22	
GV-042	5.01	771	2588	3.3567	26	23.397
		796	2390	3.0025	23	
		831	2209	2.6582	21	
GV-043	5.04	1079	1087	1.0074	9	9.841
		986	1248	1.2657	11	
		1040	1135	1.0913	10	
GV-044	5.09	1090	1398	1.2828	11	11.180
		1003	1380	1.3758	12	
		1019	1288	1.2640	11	
GV-045	5.01	1120	2026	1.8090	15	15.059
		1113	2076	1.8657	15	
		1108	2067	1.8656	15	
GV-046	5.19	1237	1994	1.6120	13	13.732
		1343	1975	1.4705	12	
		1109	2112	1.9044	15	
GV-047	5.27	1103	2725	2.4702	20	19.806
		1062	2851	2.6846	21	
		1263	2987	2.3650	19	
GV-048	5.17	1248	2587	2.0729	17	16.288
		1309	2488	1.9007	15	
		1285	2672	2.0792	17	

GV-049	5.14	1515	3397	2.2420	18	17.268
		1418	2929	2.0656	17	
		1346	2899	2.1538	17	
GV-050	5.17	1248	2588	2.0737	17	16.689
		1345	2678	1.9911	16	
		1376	2966	2.1554	17	
GV-051	5.27	1457	3099	2.1270	17	19.082
		1329	3333	2.5076	20	
		1238	3198	2.5832	20	
GV-052	5.15	1200	1788	1.4900	12	12.571
		1206	1836	1.5222	13	
		1260	1878	1.4906	12	
GV-053	5.17	1231	1770	1.4377	12	11.715
		1169	1550	1.3265	11	
		1200	1658	1.3820	12	
GV-054	5.18	1194	2100	1.7592	14	14.123
		1314	2018	1.5361	13	
		1057	1960	1.8550	15	
GV-055	5.19	1378	1628	1.1821	10	11.772
		1191	1746	1.4665	12	
		1204	1831	1.5210	13	
GV-056	5.21	1234	1760	1.4272	12	12.045
		1242	1679	1.3517	11	
		1176	1769	1.5047	13	
GV-057	4.96	1292	1776	1.3746	12	11.011
		1264	1659	1.3123	11	
		1334	1554	1.1654	10	
GV-058	5.24	1257	1532	1.2193	11	10.185
		1322	1603	1.2128	10	
		1371	1475	1.0758	10	
GV-059	5.11	1254	652	0.5199	6	6.387
		1064	698	0.6560	6	
		1239	927	0.7482	7	
GV-060	4.99	1176	633	0.5383	6	6.480
		1217	870	0.7149	7	
		1189	844	0.7098	7	
GV-061	5.33	1101	518	0.4705	5	5.953
		1145	806	0.7039	7	
		1255	714	0.5689	6	
GV-062	5.13	1097	1368	1.2470	11	10.524
		1192	1457	1.2223	11	
		1228	1449	1.1800	10	
GV-063	5.22	1171	652	0.5568	6	6.010
		1167	595	0.5099	5	

		1105	774	0.7005	7	
GV-064	5.31	1177	1145	0.9728	9	9.521
		1181	1452	1.2295	11	
		1220	1255	1.0287	9	
GV-065	5.12	1222	958	0.7840	7	8.406
		1123	961	0.8557	8	
		1155	1301	1.1264	10	
GV-066	5.51	1188	2441	2.0547	17	15.012
		1320	2507	1.8992	15	
		1433	2245	1.5666	13	
GV-067	5.41	1182	1558	1.3181	11	11.529
		1215	1634	1.3449	11	
		1159	1629	1.4055	12	
GV-068	5.12	1194	923	0.7730	7	6.940
		1283	762	0.5939	6	
		1187	935	0.7877	7	
GV-069	5.15	1217	951	0.7814	7	7.536
		1191	932	0.7825	7	
		1126	945	0.8393	8	
GV-070	5.19	1089	1778	1.6327	14	12.924
		1211	1665	1.3749	12	
		1130	1856	1.6425	14	
GV-071	5.16	1294	1068	0.8253	8	8.012
		1207	1120	0.9279	8	
		1249	1060	0.8487	8	
GV-072	5.18	1228	1367	1.1132	10	10.760
		1072	1434	1.3377	11	
		1229	1594	1.2970	11	
GV-073	5.19	1286	2045	1.5902	13	14.118
		1245	2140	1.7189	14	
		1335	2455	1.8390	15	
GV-074	5.21	1212	1343	1.1081	10	10.025
		1270	1251	0.9850	9	
		1112	1499	1.3480	11	
GV-075	5.31	1126	913	0.8108	8	7.580
		1260	1180	0.9365	9	
		1152	777	0.6745	7	
GV-076	5.12	1164	2038	1.7509	14	13.909
		1213	1874	1.5449	13	
		1188	2097	1.7652	14	
GV-077	5.31	1137	1420	1.2489	11	10.525
		1229	1580	1.2856	11	
		1225	1366	1.1151	10	
GV-078	4.91	1179	1411	1.1968	10	9.386

		1234	1313	1.0640	9	
		1257	1149	0.9141	8	
GV-079	4.99	1312	727	0.5541	6	6.468
		1049	768	0.7321	7	
		1233	828	0.6715	7	
GV-080	4.96	1250	564	0.4512	6	6.333
		1179	400	0.3393	6	
		1322	511	0.3865	7	
GV-081	5.03	1255	687	0.5474	6	5.261
		1263	590	0.4671	5	
		1486	654	0.4401	5	
GV-082	4.31	1387	1441	1.0389	9	8.503
		1298	1202	0.9260	8	
		1313	1105	0.8416	8	
GV-083	5.1	1512	995	0.6581	7	6.970
		1520	1036	0.6816	7	
		1438	1190	0.8275	8	
GV-084	5.13	1413	1069	0.7565	7	6.516
		1400	922	0.6586	7	
		1432	806	0.5628	6	
GV-085	5.14	1503	1490	0.9914	9	9.218
		1469	1433	0.9755	9	
		1474	1677	1.1377	10	
GV-086	5.2	1597	1205	0.7545	7	7.887
		1632	1473	0.9026	8	
		1473	1315	0.8927	8	
GV-087	5.31	1717	1475	0.8591	8	8.138
		1697	1498	0.8827	8	
		1575	1437	0.9124	8	
GV-088	5.13	1975	1345	0.6810	7	7.234
		1859	1286	0.6918	7	
		1738	1572	0.9045	8	
GV-089	5.14	2107	1476	0.7005	7	6.172
		2140	1096	0.5121	5	
		2000	1244	0.6220	6	
GV-090	5.44	2641	3937	1.4907	12	11.817
		2741	3184	1.1616	10	
		2718	4175	1.5361	13	
GV-091	5.14	1170	1987	1.6983	14	13.676
		1054	1996	1.8937	15	
		1345	1845	1.3717	12	
GV-092	5.17	908	862	0.9493	9	7.571
		955	698	0.7309	7	
		904	667	0.7378	7	

GV-093	5.18	918	788	0.8584	8	7.778
		951	808	0.8496	8	
		854	680	0.7963	8	
GV-094	5.22	1010	925	0.9158	8	8.884
		948	885	0.9335	8	
		948	1058	1.1160	10	
GV-095	5.21	854	851	0.9965	9	9.444
		909	1056	1.1617	10	
		863	898	1.0406	9	
GV-096	5.05	892	777	0.8711	8	8.996
		928	1058	1.1401	10	
		903	904	1.0011	9	
GV-097	5.11	909	756	0.8317	8	7.261
		1002	774	0.7725	7	
		1018	697	0.6847	7	
GV-098	5.43	931	390	0.4189	6	6.000
		913	453	0.4962	6	
		969	374	0.3860	6	
GV-099	5.41	910	912	1.0022	9	9.707
		986	1267	1.2850	11	
		925	945	1.0216	9	
GV-100	5.11	995	647	0.6503	6	6.929
		1024	719	0.7021	7	
		1004	801	0.7978	8	
GV-101	5.1	1058	1455	1.3752	12	11.461
		1020	1507	1.4775	12	
		934	1109	1.1874	10	
GV-102	5.15	1004	1802	1.7948	15	12.981
		1134	1632	1.4392	12	
		1100	1584	1.4400	12	
GV-103	5.18	992	1010	1.0181	9	9.257
		992	1152	1.1613	10	
		1045	984	0.9416	9	
GV-104	5.12	1099	551	0.5014	5	4.909
		971	391	0.4027	5	
		1023	413	0.4037	5	
GV-105	4.91	1297	756	0.5829	6	6.194
		1151	734	0.6377	6	
		1268	790	0.6230	6	
GV-106	4.93	1410	767	0.5440	6	5.964
		1327	849	0.6398	6	
		1220	688	0.5639	6	
GV-107	5.11	1360	1558	1.1456	10	10.008
		1349	1695	1.2565	11	

		1410	1455	1.0319	9	
GV-108	5.01	1492	2227	1.4926	13	13.703
		1602	2911	1.8171	15	
		1386	2308	1.6652	14	
GV-109	5.01	1527	888	0.5815	6	6.467
		1382	840	0.6078	6	
		1316	1011	0.7682	7	
GV-110	5.12	1421	2243	1.5785	13	12.669
		1371	2080	1.5171	13	
		1388	2010	1.4481	12	
GV-111	5.12	1508	987	0.6545	6	6.127
		1395	879	0.6301	6	
		1497	795	0.5311	6	
GV-112	5.07	1539	1237	0.8038	8	8.229
		1598	1468	0.9186	8	
		1462	1418	0.9699	9	
GV-113	5.09	1467	2015	1.3736	12	12.682
		1227	2101	1.7123	14	
		1412	2066	1.4632	12	
GV-114	5.12	1641	1718	1.0469	9	8.629
		1522	1391	0.9139	8	
		1521	1366	0.8981	8	
GV-115	5.11	1732	2504	1.4457	12	11.116
		1632	1708	1.0466	9	
		1731	2430	1.4038	12	
GV-116	5.34	2050	1690	0.8244	8	7.570
		1934	1552	0.8025	8	
		1872	1480	0.7906	7	
GV-117	4.91	2539	1344	0.5293	6	6.052
		2234	1218	0.5452	6	
		2042	1450	0.7101	7	
GV-118	4.12	1478	699	0.4729	5	4.950
		1369	633	0.4624	5	
		1455	567	0.3897	5	
GV-119	5.12	1366	2781	2.0359	16	16.096
		1411	2807	1.9894	16	
		1333	2596	1.9475	16	
GV-120	5.41	1444	2914	2.0180	16	15.230
		1578	2699	1.7104	14	
		1481	2789	1.8832	15	

Fuente: Autor
Elaboración: Autor