



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Variabilidad en el contenido de fenoles totales y
arbutina en poblaciones naturales de gayuba
(*Arctostaphylos uva-ursi*)

Autor

Marina Ribalta Bardají

Director/es

Esther Asensio Casas

Ester Sales Clemente

Escuela Politécnica Superior

2016

Agradecimientos

Agradezco a mis directoras Esther Asensio y Ester Sales por su gran ayuda, apoyo y disponibilidad durante la realización de todo el proyecto.

A la colaboración de los doctores José Casanova, Clara Martí, Celia Montaner y Juan Viruel en la recolección del material vegetal y en los análisis de suelo.

A José Antonio Manso, Asunción Callizo y Belén Aguado por su colaboración en la parte analítica de esta investigación.

Índice

Resumen.....	1
Abstract	3
1- Introducción	5
1.1- La gayuba, <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	5
1.2- Usos de la gayuba.....	8
1.3- Caracterización fitoquímica de la gayuba	9
1.4- Métodos de análisis para la determinación de fenoles en gayuba	12
2- Antecedentes	17
3- Objetivos	19
4- Material y métodos.....	21
4.1- Material vegetal	21
4.2- Preparación de los extractos de hoja.....	23
4.3- Determinación de fenoles totales en extractos de hoja de gayuba	24
4.4- Determinación de arbutina en extractos de hoja de gayuba	24
4.5- Análisis estadístico	25
5- Resultados.....	27
5.1- Contenido de fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba secadas a diferentes temperaturas.....	27
5.2- Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de gayuba recolectadas en septiembre	27
5.3- Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de gayuba recolectadas en noviembre	32
6- Discusión	35
6.1- Efecto de la temperatura de secado de las hojas de gayuba en el contenido de fenoles totales y arbutina.....	35
6.2- Factores que influyen en la variabilidad en el contenido de fenoles totales y arbutina de las hojas de gayuba de poblaciones naturales españolas	35
7- Conclusiones	43
8- Bibliografía	45
Anexo.....	51

Índice de figuras

Figura 1. <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> . Detalle hojas (A) y planta con fruto (B)	5
Figura 2. Distribución de la gayuba en España (A) y Aragón (B)	7
Figura 3. Estructura química de la arbutina	11
Figura 4. Localización de las 12 poblaciones naturales de gayuba incluidas en el estudio ...	21
Figura 5. Plantas de gayuba muestreadas en las localidades de Pina de Montalgrao (A) y Albarracín (B).....	23
Figura 6. Distribución de los valores medios de fenoles totales determinados en extractos de hojas de 80 plantas de gayuba muestreadas en diez poblaciones naturales en septiembre de 2015	28
Figura 7. Distribución de los valores medios de arbutina determinados en extractos de hoja de 80 plantas de gayuba muestreadas en diez poblaciones naturales en septiembre de 2015	30
Figura 8. Variabilidad encontrada para el contenido en fenoles totales (mg EAG/g PS) y en arbutina (mg/g PS) en los extractos de hojas recolectadas en septiembre de 2015 en 80 plantas de gayuba (A) y en las hojas recolectadas en noviembre de 2015 en 28 plantas (B)	37

Índice tablas

Tabla 1. Localización y altitud de las doce poblaciones naturales de gayuba muestreadas en este trabajo	22
Tabla 2. Tipo y pH de suelo en cuatro poblaciones de gayuba muestreadas en este trabajo	23
Tabla 3. Gradiente empleado en la determinación de arbutina en los extractos metanólicos de hoja de gayuba	25
Tabla 4. Contenido en fenoles totales de 80 plantas de gayuba recolectadas en septiembre en 10 poblaciones naturales (8 individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no difirieron significativamente (Test de Tamhane)	29
Tabla 5. Contenido en arbutina en hojas de 80 plantas de gayuba recolectadas en septiembre en 10 poblaciones naturales (8 individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no difirieron significativamente (Test de Tamhane)	31
Tabla 6. Contenido en fenoles y arbutina en hojas de 28 plantas de gayuba recolectadas en noviembre de 2015 en 4 poblaciones naturales (individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane	33

Resumen

La gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) se distribuye en los sistemas montañosos del norte y este de la Península Ibérica. Tradicionalmente se ha utilizado como tratamiento de antiséptico en infecciones urinarias y en la actualidad se emplea fundamentalmente como agente blanqueante (inhibe síntesis de melanina) en cosmética; recientemente, además se ha propuesto su uso como aditivo antioxidante. Los principios activos de la gayuba son fenoles, siendo la arbutina (hidroquinona β -D-glucopiranosido) el más importante.

En este trabajo se ha estudiado la variabilidad fitoquímica (fenoles totales y arbutina) de las hojas (brotación de otoño) de *A. uva-ursi* en 12 poblaciones naturales españolas distribuidas en un amplio rango de altitud y latitud. Se detectó una gran variabilidad en los contenidos en compuestos fenólicos de las 94 plantas analizadas, sobre todo en el contenido en arbutina (rango de variación en 80 muestras recogidas en septiembre entre $87,1 \pm 0,4$ y $211,5 \pm 5,9$ mg/g PS), así como diferencias significativas entre las localidades estudiadas. Las plantas con mayores contenidos en fenoles totales mostraron también contenidos superiores en arbutina, aunque la correlación observada entre ambas variables fue baja. Las plantas de localidades aragonesas situadas a mayor latitud (42°) mostraron mayor contenido de fenoles totales que las de dos poblaciones andaluzas (latitud 37°) cuando se recolectaron en noviembre, y mayores contenidos en arbutina que las plantas de localidades situadas en el paralelo 40 cuando se muestrearon en septiembre. Cuando se compararon los contenidos fenólicos de poblaciones ubicadas en la misma latitud y altitud, pero que crecían en suelos con diferente pH, se encontró que en las plantas desarrolladas a menor pH acumularon menor contenido en fenoles totales pero este factor no influyó en el contenido en arbutina. El contenido en arbutina de las plantas de poblaciones ubicadas en el norte de Aragón se incrementó con la altitud (coeficiente de Pearson 0,306; $P = 0,036$), pero este parámetro no afectó al contenido en fenoles totales.

Palabras clave: altitud, compuestos fenólicos, latitud, pH de suelo, variación fitoquímica.

Abstract

Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) is distributed in mountain ranges of the north and east of the Iberian Peninsula. Traditionally it has been used as an antiseptic in urinary infections, and at present it is mainly used as a bleaching agent (since it inhibits melanin synthesis) in cosmetic. Furthermore, it has been recently proposed as an antioxidant additive. Phenols are the main active compound in bearberry, being arbutin (hydroquinone β -D-glucopyranoside) the most important.

In the present work we have studied the phytochemical variation (total phenolics and arbutin) in leaves (autumn growth) of *A. uva-ursi* sampled in 12 natural Spanish populations, distributed in a wide range of altitude and latitude. We detected a wide range of variation on phenolic compounds contents in the 94 analysed plants, especially in arbutin content (range of variation in 80 samples gathered in September ranged from 87.1 ± 0.4 y 211.5 ± 5.9 mg/g PS), as well as significant differences among mean contents of leaves taken in different locations. Plants showing higher total phenolics levels also showed higher arbutin contents, although the correlation between both variables was low. Plants sampled in the north of Aragon (latitude 42°) showed highest levels of total phenolics that the two Andalusian populations (latitude 37°) that were collected in November, and also those plants accumulated in September on average higher arbutin contents that plants sampled in the four populations located around latitude 40° . In this group of four populations located in similar latitude and altitude, we found differences in total phenolics levels of plants growing in soils with a lower pH, since in these conditions the sampled leaves accumulated less phenolics than those sampled in populations stablished on higher pH soils. However, we didn't found differences in the mean arbutin content of plants growing on different substrates. Arbutin content of bearberry leaves also depended on altitude, since we estimated a positive significant correlation between these parameters (Pearson coefficient 0.306, $p = 0.036$).

Keywords: altitude, phenolic compounds, latitude, soil pH, phytochemical variation.

1.- Introducción

1.1.- La gayuba, *Arctostaphylos uva-ursi*

1.1.1.- Caracteres diagnósticos

La gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel) es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las Ericáceas, de corteza rugosa de color grisácea o pardo-rojizo. Presenta tallos de más de 2 m, tendidos y radicantes, ramas de hasta 20 (35) cm, siendo las vegetativas postradas con entrenudos largos y las reproductivas más o menos erectas con entrenudos más cortos y hojas de (12) 17-25(35) x (6) 7-12 (17) mm de color verde oscuro que pueden ser erecto-patentes o patentes, obovales u oblongo-lanceoladas, ovales, enteras, obtusas o emarginadas. Las hojas (Figura 1A) presentan un nervio bien marcado y nervios secundarios finamente reticulados (Villar, 1993).

Los racimos contienen de 5 a 7 (10) flores, éstas son axiales, ligeramente distales y presentan pedicelos provistos de brácteas. El cáliz compuesto de 5 lóbulos contiene piezas ovadas más o menos persistentes de color blanquecino, con cilios muy cortos. La corola es urceolada, blanquecina rosada y encierra 10 estambres con 2 apéndices en sus anteras (American Herbal Pharmacopoeia, 2008).



Figura 1. *Arctostaphylos uva-ursi*. Detalle hojas (A) y planta con fruto (B).

Las flores son hermafroditas, poseen ovario súpero y unicarpelar con un único estilo y estigma capitado. Los frutos de (5)7-10(14) mm son de tipo drupa y de color rojo (Figura 1B), subglobosos y contienen en torno a 5-6 semillas de 4-5 x 2 mm (Villar, 1993).

La gayuba presenta un patrón fenológico secuenciado, ya que la planta empieza a brotar desde finales de abril hasta principios de mayo y el segundo crecimiento lo realiza de agosto a septiembre. El periodo de floración se da entre los meses de abril y julio, mientras que la fructificación se produce entre mayo y septiembre. La forma biológica que presenta es caméfito sufruticosa, nanofanerófito perennifolio (Valladares, 2004; Gómez-García, 2005).

1.1.2.- Distribución geográfica

Arctostaphylos uva-ursi está presente dentro de la región circumboreal con una distribución continua a través de América del Norte, Europa y Asia (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Es una especie relativamente abundante, aunque varios países europeos, como Alemania, Francia o Bulgaria, han adoptado medidas legales de protección con el objetivo de preservar su continuidad, debido a la elevada recolección de material silvestre de esta especie para fines medicinales (Renobales & Sallés, 2001).

En Europa se han encontrado poblaciones de gayuba en 22 países y en España hasta 28 en provincias (Gómez-García, 2005). La distribución de esta planta en la Península Ibérica se presenta por el Norte (Figura 2A), desde la depresión media del Ebro a 300 m de altitud hasta los 2500 m en el Pirineo, y por el Este, más aislada en áreas montañosas meridionales. Esta especie presenta características de tolerancia al estrés que le permite florecer en periodos muy fríos (Renobales & Sallés, 2001; Valladares, 2004).

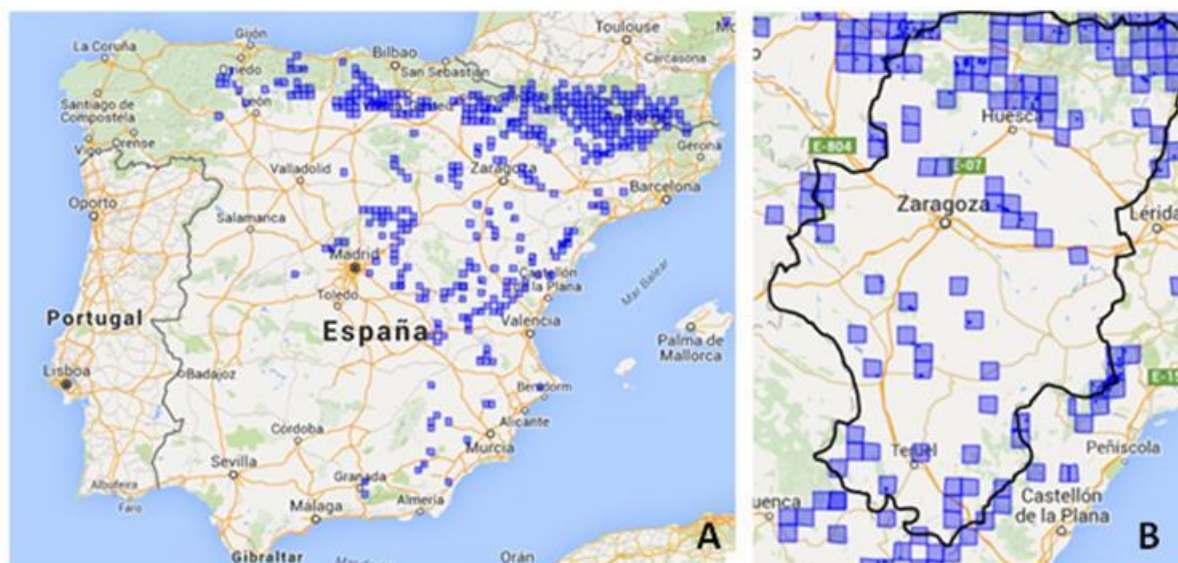


Figura 2. Distribución de la gayuba en España (A) y Aragón (B). Fuente: SIVIM

En Aragón, (Figura 2B) *Arctostaphylos uva-ursi* se encuentra en los Pirineos, en el Sistema Ibérico y en las sierras cercanas a la Depresión del Ebro, aunque en esta última zona las poblaciones presentan pocos individuos. Aparece entre los 550 m y 2350 m, haciéndolo con menos frecuencia en altitudes menores a los 370 m y en mayores hasta los 2500 m (Gómez-García, 2005). Las zonas donde aparece con más frecuencia son en la baja Ribagorza y parte de Sobrarbe hasta el Pirineo, en los Monegros y en gran parte de los montes turolenses (Gran Enciclopedia Aragonesa, 2000).

1.1.3.- Hábitat

Arctostaphylos uva-ursi habita en zonas de matorrales, bosques claros y taludes, en suelos pedregosos, crioturbados y con ambientes luminosos en clima continentalizado (Gómez-García, 2005; Castroviejo & Valdés Bermejo, 1993). Al tratarse de una especie heliófila, es decir, que exige insolación intensa durante todas las estaciones, evita los lugares largamente innivados. Sin embargo, tolera su ubicación en zonas de sombra, presentando un mejor desarrollo cuando se encuentra en zonas frescas y húmedas (Baudière & Fromard, 1988).

La gayuba es indiferente a la naturaleza química del substrato aunque presenta dificultad de desarrollo en suelos de textura arcillosa o limoso-arcillosa con alta capacidad de retención hídrica y es incapaz de instalarse en suelos encharcados temporal o

permanentemente (Baudière & Fromard, 1988). En zonas montañosas la gayuba crece en áreas sobre suelos jóvenes con poca profundidad (Recasens et al., 2008).

1.2.- Usos de la gayuba

El principal uso de la gayuba es como planta medicinal, como antiséptico de las vías urinarias, y por ello está incluida en la Real Farmacopea Española y en la European Pharmacopoeia (Benítez et al., 2015). Hay evidencias históricas de su uso que datan de varios siglos, tanto en Europa como en América; por ejemplo, era utilizada por los nativos de tribus americanas como alimento, ya que los frutos son comestibles y tienen sabor farináceo, mientras que las hojas eran utilizadas como medicamento y como ingrediente para fumar (Castroviejo & Valdés Bermejo, 1993; American Herbal Pharmacopoeia, 2008).

Las hojas de la gayuba son aún hoy utilizadas en medicina, pues contienen abundantes principios activos. Los elevados niveles en arbutósido y metil arbutósido son los principales responsables de su actividad para combatir las infecciones de las vías urinarias, ya que liberan por hidrólisis hidroquinona, un compuesto antiséptico que accede al hígado y se combina con derivados glucurónidos y ésteres de sulfato, que finalmente se eliminan a través de la orina. Para que la hidroquinona ejerza su acción es necesario que la orina tenga reacción alcalina, ya que el principio activo se inactiva cuando el pH es ácido (Hernández, 2008; Puente & Benito, 2014).

Las hidroquinonas, y sobre todo la arbutina, también se utilizan para fines de cosmética industrial, ya que tienen acción inhibidora de la tirosinasa, enzima que regula la síntesis de melanina por lo que previenen la formación de manchas y pecas y poseen un efecto blanqueante de la piel (Seo et al., 2012; Kai & Matsuno, 2015).

Otros usos menos frecuentes de la gayuba en medicina son para tratar problemas relacionados con el sistema circulatorio, el sistema endocrino-metabólico y el sistema respiratorio, ya que las infusiones realizadas con las hojas ayudan a reducir la tensión, controlar el colesterol, adelgazar y en el caso del sistema respiratorio, aliviar el catarro. Además del uso medicinal de la gayuba, esta especie tiene otros usos como son la alimentación animal, el uso como combustible, la elaboración de bebidas alcohólicas y como planta ornamental (Benítez et al., 2015).

Actualmente, hay un interés creciente de los consumidores en la compra de productos percibidos como más saludables o “naturales”. En este contexto se ha incrementado el uso de antioxidantes de origen natural, sobre todo de vegetales, ya que existe cierta preocupación sobre posibles efectos perjudiciales de los antioxidantes sintéticos (Brewer, 2011). La acción antioxidante de extractos de muchos vegetales, como el té, el romero, el clavo, la salvia, el tomillo, etc., se debe a la presencia de compuestos fenólicos, con anillos aromáticos hidroxilados en su estructura química, que confieren la capacidad para neutralizar radicales libres (Karre et al., 2013; Kim et al., 2013; Maqsood et al., 2013). Dado que la gayuba posee un alto contenido en compuestos fenólicos, se ha propuesto también como alternativa a los antioxidantes convencionales de síntesis sobre todo en alimentación y cosmética (Dykes et al., 2003; Amarowicz et al., 2004).

Aparte de los usos de esta especie por parte del hombre, la gayuba también tiene un alto valor ecológico ya que presenta una alta capacidad de extensión y eficaz protección del suelo contra la erosión. Debido a ello es muy utilizada en la revegetación de cuencas y laderas (Craighead et al., 1963). Además, la planta permite el crecimiento de pinos jóvenes ya instalados, que a su vez quedan protegidos del ganado bovino. Sin embargo, una vez instalada, la gayuba tiene cierta dificultad para la regeneración natural a partir de semillas (Baudière & Fromard, 1988).

Se han realizado estudios en España sobre su capacidad de rebrote tras cortes y quemas (Del Barrio et al., 1999; Calvo et al., 2002) y se obtuvieron resultados positivos sobre la capacidad de rebrote y germinación. Según Salemaa et al., (1999) la recuperación de la cubierta vegetal puede deberse por un lado al rebrote de yemas latentes tras la muerte de la yema principal del tallo y por la plasticidad en el crecimiento horizontal de las ramas.

1.3.- Caracterización fitoquímica de la gayuba

La gayuba sintetiza fenoles y polifenoles derivados de la fenilalanina, como parte del metabolismo secundario de la planta. Como se ha mencionado anteriormente, estos compuestos fenólicos son un grupo de sustancias diferentes que tienen en común una característica estructural, un anillo aromático que tiene al menos un sustituyente hidroxilo. Entre los compuestos con un solo anillo aromático se encuentran los ácidos fenólicos, normalmente presentes en las plantas en su forma glicosilada. Los flavonoides (flavonas,

isoflavonas, antocianinas, antocianidinas, catequinas, etc.) poseen dos subunidades en su estructura, mientras que entre las sustancias con al menos tres anillos fenólicos se encuentran los taninos (Leopoldini et al., 2011).

Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas y, por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde el punto de vista metabólico. Las dos rutas básicas implicadas son la ruta del ácido siquímico y la del ácido malónico (Taiz & Zeiger, 2006).

Las funciones de los fenoles en las plantas son muy diversas: actúan como defensa contra herbívoros o patógenos, como soporte mecánico, para la atracción de polinizadores y de dispersantes de frutos, así como para la absorción de radiación ultravioleta dañina y también en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas, lo que se conoce como alelopatía (Taiz & Zeiger, 2006). Los polifenoles que contienen los tejidos celulares varían en cantidad debido a factores genéticos o ambientales, como por ejemplo el momento de recolección o el ataque de algún patógeno. Otro factor que afecta al contenido de polifenoles es la altitud (Seigler, 1998).

La composición general de la gayuba suele contener abundantes taninos, como los taninos gálicos, elágicos, catéquicos y proantocianidinas oligoméricas; glucósidos flavonoides, como el hiperósido y la quercetina, y triterpenos como el ácido ursólico y el uvaol (Hernández-Torres, 2008). En contraste con otras especies de la familia Ericaceae, la gayuba contiene menos taninos condensados (CTs), y de acuerdo con Hänsel et al., (1993), la cantidad limitada de CTs se atribuye a la enorme capacidad de la planta para sintetizar taninos hidrolizables (Naczki et al., 2011).

Existen estudios que han demostrado que los compuestos fenólicos de la gayuba se acumulan en cantidades diferentes en las distintas partes de la planta, según se trate de la parte aérea, el tallo, las raíces y las hojas, y además los compuestos predominantes en estas últimas son la arbutina (glucósido), la catequina (flavonoide) y la corilagina (tanino) (Olennikov & Chekhirova, 2013).

Como ya se ha comentado, el principio activo principal presente en las hojas de gayuba es la arbutina (hidroquinona β -D-glucopiranosido) (Figura 3). Sin embargo, *Arctostaphylos uva-ursi* presenta otros componentes menos abundantes como puede ser la acetofenona, que es un compuesto similar a arbutina pero su estructura básica no es una

hidroquinona (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Por otro lado, hay que señalar que este compuesto no es exclusivo de la gayuba, sino que se encuentra en las especies de varias familias del reino vegetal, como Asteraceae, Rosaceae, Lamiaceae y Apiaceae (Migas & Krauze-Baranowska, 2015). Sin embargo, la fuente preferida de arbutina es la gayuba (Seo et al., 2012).

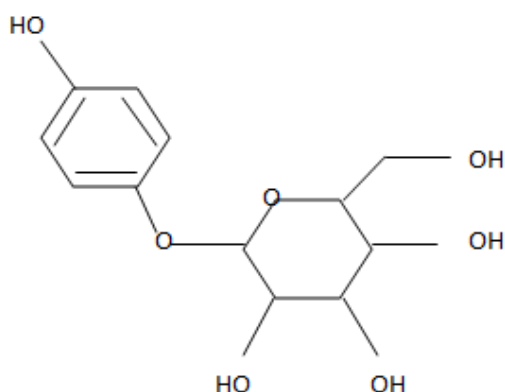


Figura 3. Estructura química de la arbutina.

Para los preparados comerciales de hojas de gayuba se requiere un contenido mínimo de arbutina del 7% respecto a peso seco; sin embargo, el contenido de arbutina en las hojas de gayuba es muy variable. Numerosos estudios realizados en las últimas décadas han descrito un amplio rango de variación en los niveles de arbutina, desde el 0% hasta el 18% en distintas subespecies de *Arctostaphylos uva-ursi*, debido a que estas subespecies presentan diferentes quimiotipos (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Además, a lo largo del año el contenido en arbutina y metilarbutina en hojas de gayuba varía entre el 5% y el 15% con un promedio de 8% respecto al peso seco (Naczek et al., 2011). Esto conlleva variación en el contenido de arbutina de las hojas en función del momento de recolección, y generalmente se encuentran los mayores niveles en otoño (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). La acumulación de arbutina depende del estado vegetativo de la planta (Migas & Krauze-Baranowska, 2015), de forma que, por ejemplo en el estudio de Lubsandorzhieva et al. (1999) el contenido en arbutina se incrementó desde 9,8% hasta 14,6% según se tomaron las muestras en la etapa de vegetación, floración o en el comienzo y final del periodo de fructificación. La concentración de arbutina también puede variar en función de la temperatura de secado de las hojas: según la American Herbal Pharmacopoeia

(2008) el secado rápido de las hojas se traduce en un mayor contenido de arbutina. De hecho, en el trabajo de Lubsandorzheva et al. (1999) se menciona un contenido máximo en arbutina del 22% en hojas de *Bergenia crassifolia* (Saxifragaceae) secadas a 80-100 °C.

En un estudio reciente en el que se analizaron preparados comerciales y muestras de plantas de gayuba se obtuvieron los mayores contenidos de arbutina en hojas procedentes de España, de hasta un 19 % en peso seco (Sonnenschein & Tegtmeier, 2012). Este resultado es muy superior al referido por otros autores (8,2 %) que analizaron el contenido en arbutina de plantas de gayuba de poblaciones naturales del norte de Cataluña (Parejo et al., 2001; 2002). En otro estudio realizado en Cataluña se encontró que la recolección repetitiva de brotes de gayuba afecta negativamente a la producción de biomasa, por lo que para que fuera sostenible se debería realizar la recolección de una misma población pasados dos años. Se recomienda la recolección en otoño, una vez terminado el periodo vegetativo activo, de no más del 25% de la biomasa de la planta, y las poblaciones con mejor recuperación se encuentran orientadas al sur y con menor cobertura arbórea, debido a la mayor insolación recibida (Recasens et al., 2008).

1.4.- Métodos de análisis para la determinación de fenoles en gayuba

Existe una gran variedad de métodos de análisis para la determinación de fenoles en plantas, tanto totales como individuales. La elección del método de análisis depende en gran parte de la naturaleza de la matriz de la muestra (hojas, tallo, semillas, etc.) y de las propiedades químicas de los compuestos fenólicos a estudiar.

En primer lugar se requiere realizar la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la parte de la planta a analizar. En el caso de las hojas de gayuba, los extractantes más utilizados son el metanol y el etanol, la utilización de cualquiera de estos disolventes a diferentes proporciones acuosas puede afectar a la determinación del contenido de compuestos fenólicos. Además, la eficacia de la extracción depende de la temperatura (Dykes et al., 2003; Amarowicz et al., 2004; American Herbal Pharmacopoeia, 2008; Parejo et al., 2001).

Para la determinación de fenoles totales en extractos vegetales el procedimiento analítico más empleado es un ensayo colorimétrico redox que consiste en la oxidación de estos compuestos mediante el reactivo Folin-Ciocalteu (FC). Este reactivo presenta un color

amarillento y está formado por una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Cuando se reduce, por la presencia de fenoles, da lugar a una coloración azul susceptible de ser cuantificada mediante Espectrofotometría de absorción molecular en el UV/Visible. Esta determinación, mide la absorción de radiación visible por parte de determinadas moléculas, de forma que la correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular del compuesto que la absorbe (Valladares, 1994) y se realiza, en el caso del reactivo Folin-Ciocalteu, a 765 nm. Para la cuantificación de fenoles totales mediante este procedimiento analítico se realiza una comparación con una recta patrón basada en algún compuesto fenólico como es el caso del ácido gálico o de la catequina (García et al., 2015; Martínez, 2007; Morillas-Ruíz & Delgado-Alarcón, 2012). Este procedimiento se ha aplicado a la determinación de fenoles totales en gayuba (Amarowicz et al., 2004).

En cuanto a la metodología analítica utilizada para la determinación individual de fenoles se pueden emplear distintas técnicas instrumentales. En primer lugar, la Cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) puede ser utilizada como un ensayo preliminar, que normalmente sirve como apoyo a otros métodos de identificación. Para llevar a cabo esta técnica se utilizan unos soportes (placas cromatográficas) que pueden ser de celulosa, sílice o poliamidas dependiendo de los tipos de fenoles a identificar. Sobre la placa cromatográfica se coloca una pequeña cantidad de extracto a analizar y se introduce en un solvente (fase móvil) que asciende por capilaridad, arrastrando y separando a lo largo de la placa los diferentes compuestos presentes en la muestra. La observación de las “manchas” (compuestos) en la placa cromatográfica puede hacerse, según la naturaleza de los compuestos estudiados, directamente a la luz visible, bajo luz ultravioleta (UV) o, en ambos casos, tras el empleo de un revelador. Como resultado se obtiene el Factor de retención ($R_f = \text{distancia solvente}/\text{distancia compuesto}$) de cada compuesto separado del extracto (Hinojosa-Dávalos et al., 2013). Un procedimiento basado en esta técnica de análisis puede encontrarse en la American Herbal Pharmacopoeia, (2008) para la determinación de compuestos fenólicos en hojas de gayuba. Además, estudios como el de Alam et al. (2011) han desarrollado y validado este procedimiento analítico para la cuantificación de la arbutina.

Sin embargo, la técnica instrumental más utilizada para el análisis de compuestos fenólicos individuales en material vegetal es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), dado que permite una mejor identificación y cuantificación (mayor selectividad y mayor sensibilidad) de los compuestos fenólicos presentes en los extractos vegetales. El fundamento de la cromatografía líquida de alta resolución se basa en la distribución de los componentes presentes en la muestra, entre la fase móvil (un único disolvente o una mezcla de disolventes) y la fase estacionaria (soporte sólido empaquetado en la columna). La fase móvil actúa como portadora de la muestra dentro de la columna cromatográfica y los componentes se distribuyen de acuerdo a las interacciones que se establecen con la fase estacionaria y/o con la fase móvil, permitiendo la separación de los mismos mediante un único análisis de muestra (Faraldos & Goberna, 2002). Esta técnica instrumental ha sido ampliamente utilizada para la determinación de fenoles presentes en hojas de gayuba. En concreto, la American Herbal Pharmacopoeia (2008) recoge un protocolo de análisis mediante cromatografía HPLC estandarizado y validado para la determinación de arbutina en hojas de gayuba, desarrollado a partir de la Farmacopea Europea. Dicho procedimiento consiste en la separación cromatográfica en una columna de C₁₈ utilizando un gradiente de fase móvil de metanol y agua; y ha sido utilizado en diferentes estudios por varios autores (Miaw-Ling & Chur-Min, 2003; Amarowicz et al., 2009; Olennikov & Chekhirova, 2013; Boros et al., 2014). Parejo et al. (2001) también propusieron un método sencillo para la determinación del contenido en arbutina de hojas de gayuba mediante cromatografía HPLC con un detector de fotodiodos en serie.

Además, de los métodos descritos en este apartado, existen otras técnicas instrumentales que también se aplican al análisis de material vegetal, si bien no son tan generalizadas, es el caso de la Electroforesis capilar (EC). Este método de separación se basa en las diferencias de movilidad de los analitos cuando estos están bajo la influencia de un campo eléctrico. Los analitos se encuentran en un medio conductor (electrolito soporte o buffer) y el campo eléctrico es generado en el medio conductor al aplicar una diferencia de potencial entre los electrodos situados cada uno en el extremo del tubo capilar. El potencial de corriente aplicado impulsa a los iones de la muestra a migrar hacia uno u otro de los electrodos: las moléculas con una carga neta negativa se desplazarán hacia el ánodo (electrodo positivo) y las moléculas con una carga neta positiva migrarán hacia el cátodo

(electrodo negativo). Además de su carga, también dependen del peso molecular y estructura tridimensional (González-Jiménez, 2010; García, 2000). Este método también se ha aplicado en extractos de gayuba para conocer su contenido fenólico (González-Crevillén, 2009).

2.- Antecedentes

En un estudio desarrollado en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Zaragoza, en el marco de un proyecto financiado por la Comunidad de Trabajo de los Pirineos y desarrollado en coordinación con la Universidad Politécnica de Cataluña, se determinó el contenido en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de muestras de hoja de gayuba de diferentes poblaciones de la provincia de Huesca. Se obtuvieron valores elevados para estos parámetros, lo que corrobora el interés de esta especie como aditivo conservante natural. Igualmente se observó variabilidad en el contenido en fenoles de los diferentes individuos muestreados, así como variación en el contenido fenólico de las plantas en diferentes fechas de muestreo, por lo que se decidió abordar un estudio más amplio en el que se pudiera estudiar el efecto de la localidad (principalmente la altitud) y del genotipo.

En 2014 se realizó este estudio en 80 plantas de 10 poblaciones del norte de Aragón, situadas a diferentes altitudes. Se recolectaron muestras en marzo y en septiembre, en las que se encontraron elevados contenidos de fenoles totales y de arbutina, observándose una amplia variación entre las poblaciones y entre individuos en cada población. En este estudio se encontró además que la altitud influye en el contenido en arbutina de las plantas de gayuba. En base a estos resultados, se decidió realizar un nuevo estudio con el fin de caracterizar de forma más detallada la variabilidad fitoquímica de las poblaciones españolas de gayuba y para confirmar los resultados del estudio anterior.

3.- Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es evaluar el potencial de plantas de gayuba, de poblaciones naturales de España, como fuente de material vegetal de interés para la industria fitofarmacológica y para uso como aditivo antioxidante en la industria cosmética y alimentaria. Así mismo, se pretende estudiar la variabilidad fitoquímica existente en dichas poblaciones.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Determinar mediante ensayo Folin-Ciocalteu el contenido en fenoles totales en hojas de gayuba recogidas en otoño (septiembre y noviembre de 2015) en 94 plantas de gayuba de 12 poblaciones naturales.
- Determinar mediante cromatografía HPLC el contenido en arbutina de hojas en gayuba recogidas en otoño (septiembre y noviembre de 2015) en 94 plantas de gayuba de 12 poblaciones naturales.
- Analizar la variación fitoquímica inter e intrapoblacional: efecto de la localidad y del individuo; efecto de la latitud, de la altitud y del pH del suelo.
- Estudiar el efecto de la temperatura de secado de las muestras de hoja en el contenido de fenoles de los extractos de gayuba.

4.- Material y métodos

4.1.- Material vegetal

Las muestras de hoja de gayuba se recolectaron durante la brotación de otoño en doce poblaciones naturales del este de España distribuidas en un amplio rango de altitud y latitud (Figura 4, Tabla 1). Diez poblaciones fueron muestreadas en septiembre de 2015: cinco ubicadas en la provincia de Huesca (Lierna, Agüero, Loarre, Pico del Águila y Salto de Roldán), una en la de Zaragoza (Santa Eulalia de Gállego), una en Teruel (Albarracín), dos en Castellón (El Toro y Pina de Montalgrao) y una en Valencia (Chelva). En noviembre del mismo año se muestrearon, de nuevo, las poblaciones oscenses de Loarre y Salto de Roldán, así como dos poblaciones andaluzas: una en Granada (Huétor) y otra en Almería (Los Vélez).

En cada localidad se tomaron muestras de ocho plantas (individuos), excepto en Huétor donde se recolectaron solo seis, debido a que no se encontraron más individuos.



Figura 4. Localización de las 12 poblaciones naturales de gayuba incluidas en el estudio.

Tabla 1. Localización y altitud de las doce poblaciones naturales de gayuba muestreadas en este trabajo.

Localización	Provincia	Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (m)
Agüero (AG)	Huesca	42º 21'	0º 47'	738
Albarracín (AL)	Teruel	40º 24'	1º 26'	1337
Chelva (CH)	Valencia	39º 44'	0º 59'	984
El Toro (TO)	Castellón	39º 58'	0º 44'	999
Huétor (HU)	Granada	37º 16'	3º 30'	1354
Lierta (LI)	Huesca	42º 12'	0º 28'	590
Loarre (LO)	Huesca	42º 20'	0º 36'	1401
Los Vélez (VE)	Almería	37º 41'	2º 12'	1369
Pico del Águila, Arguís (PA)	Huesca	42º 18'	0º 24'	1410
Pina de Montalgrao (PI)	Castellón	40º 10'	0º 39'	1278
Salto de Roldán, Nueno (SR)	Huesca	42º 15'	0º 23'	1016
Santa Eulalia de Gállego (SE)	Zaragoza	42º 17'	0º 45'	538

En la recolección de las muestras se cogieron 8-10 brotes terminales de cada planta. Se separaron las hojas de las ramas (15-20 g) y se secaron en estufa a 60 °C durante 72 h. Parte de las muestras de las poblaciones de Loarre y Agüero también fueron secadas a 80 °C. Una vez determinado el peso seco, se procedió al molido en mortero de las hojas, hasta su homogenización. Las muestras se conservaron en tubos cerrados a 4 °C hasta su análisis.

En las poblaciones de El Toro, Chelva, Albarracín y Pina se tomaron además muestras de suelo, en concreto, los 5-10 cm superficiales. Estas cuatro poblaciones se encuentran a similar latitud y altitud, pero dos de ellas, Pina y Albarracín, se asientan sobre sustratos silíceos con pH menor a 7,5, mientras que las otras dos (El Toro y Chelva) lo hacen sobre sustratos calizos con pH mayor a 7,5 (Tabla 2). La población de Pina se encuentra en una microrreserva de flora según el Decreto 218/1994 de la Conselleria de Medio Ambiente de la Generalidad Valenciana (Orden, de 16 de octubre de 1994, DOCV 2-12-1994). Se trata de un enclave elevado situado dentro del piso bioclimático supramediterráneo subhúmedo que se sustenta sobre sustratos de rodano que son facies silíceas de areniscas rojas triásicas del Buntsandstein (Figura 5A). Sobre este mismo tipo de sustrato se ubica la población de gayuba de Albarracín, que se encuentra en el Paraje Protegido de los Pinares de Rodano (Figura 5B) declarado así por el Decreto 91/1995 del Gobierno de Aragón, del 2 de mayo, siendo el primer espacio natural protegido en la provincia de Teruel.



Figura 5. Plantas de gayuba muestreadas en las localidades de Pina de Montalgrao (A) y Albarracín (B).

Los análisis realizados mostraron diferencias en el valor del pH de los suelos muestreados, como se recoge en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipo (World Reference Base) y pH de suelo en cuatro poblaciones de gayuba muestreadas en este trabajo.

Población	Tipo de suelo (WRB)	Sustrato	pH
Albarracín	Cambisol	Silíceo	6,9 ± 0,01
Chelva	Regosol	Calizo	7,9 ± 0,03
El Toro	Cambisol	Calizo	8,6 ± 0,06
Pina	Leptosol	Silíceo	5,4 ± 0,14

4.2.- Preparación de los extractos de hoja de gayuba

Para la preparación de los extractos de hoja de gayuba, se pesaron en balanza analítica 50 mg de la muestra de hoja seca molida. Se realizaron extractos por triplicado, de cada planta, extrayendo dicho material con 10 mL de metanol al 80% (MeOH/H₂O) en tubos de vidrio. Para favorecer la extracción de los compuestos fenólicos, las muestras se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, los extractos se filtraron empleando filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro. Los extractos filtrados se conservaron en tubos de plástico de 15 mL a 4 °C hasta su análisis.

4.3.- Determinación de fenoles totales en extractos de hoja de gayuba

Para la determinación del contenido de fenoles totales en hojas de gayuba se siguió un protocolo basado en el reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando como patrón ácido gálico para la obtención de la curva de calibrado. En base a esta curva se calculó la concentración de fenoles totales en los extractos de hojas de gayuba, por lo que los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de muestra (mg EAG/g PS).

Para la obtención de la curva de calibrado de ácido gálico se preparó una disolución de ácido gálico de 1000 µg/g controlada gravimétricamente, y a partir de ella se prepararon los diferentes puntos de la curva de calibración de 40, 100, 160, 220, 280 y 340 µg/g. Todas las disoluciones se prepararon en metanol.

Para la preparación y lectura de la curva de calibración, en un tubo de ensayo de vidrio ámbar de 15 mL se adicionaron 0,5 mL de disolución patrón, 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 8 mL de agua destilada. Esta mezcla se agitó manualmente durante 30 s y se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de Na₂CO₃ al 20% y se mantuvo la reacción durante 30 min en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia de esta disolución en el espectrofotómetro UV/Vis a 760 nm, empleando como blanco de calibrado una muestra preparada con 0,5 mL de metanol en lugar de la disolución patrón.

Para la determinación de los fenoles totales presentes en los extractos de gayuba se siguió el mismo protocolo, si bien en este caso se tomó 0,1 mL de extracto metanólico y 0,4 mL de metanol al 80% (dilución 1:5), para después continuar con la adición de reactivo Folin-Ciocalteu y seguir el mismo procedimiento descrito anteriormente.

En el Anexo se muestran los resultados obtenidos del análisis de fenoles totales de todas las muestras sometidas a estudio.

4.4.- Determinación de arbutina en extractos de hoja de gayuba

La determinación del contenido de arbutina en los extractos metanólicos de hojas de gayuba se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV/Vis.

Las condiciones cromatográficas seguidas fueron optimizadas en el estudio previo de Toa (2015) y se muestran en la Tabla 3, siendo la fase móvil A metanol (MeOH) y la fase móvil B acetonitrilo (ACN); un flujo de 1 mL/min e inyección de 20 μ L.

Tabla 3. Gradiente empleado en la determinación de arbutina en extractos metanólicos de hoja de gayuba.

Condiciones cromatográficas		
Columna	Kinetex 5 μ m-EVO C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm)	
Flujo fase móvil	1 mL/min	
Volumen inyectado	20 μ L	
Detector	220 nm	
Tiempo	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0 min	0	100
5 min	25	75
6 min	100	0
10 min	100	0
11 min	0	100
14 min	0	100
20 min	0	100

En el Anexo se muestran los resultados obtenidos del análisis de arbutina en todas las muestras sometidas a estudio.

4.5.- Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones analíticas efectuadas en los extractos de hoja de gayuba se sometieron a análisis estadísticos empleando el programa SPSS 15.0 (IBM).

En concreto, se estudió la variación encontrada en el contenido en fenoles totales y en arbutina en las plantas de gayuba analizadas. En primer lugar, se comprobó si los datos de ambas variables se ajustaban a una distribución normal teórica ($p > 0,05$), mediante el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. Además, se comprobó la homogeneidad de la varianza entre poblaciones mediante el test de Levene ($p > 0,05$). Se realizaron análisis de varianza (ANOVAs) para estudiar el efecto de la población y del individuo en el contenido en fenoles totales y en arbutina, de los extractos de gayuba. Para la comparación de medias de las variables, cuyos datos mostraron una distribución normal y homocedasticidad, se empleó el análisis de Tukey-b, mientras que las variables sin homocedasticidad se estudiaron

mediante el test T2 de Tamhane. Los datos que no mostraron una distribución normal se analizaron mediante el test H de Kruskal-Wallis y la comparación entre medias por pares se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Finalmente, se analizaron las posibles correlaciones entre la altitud y los fenoles totales, entre la altitud y la arbutina y entre los fenoles totales y la arbutina mediante el coeficiente de Pearson.

5.- Resultados

5.1.- Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de gayuba a diferentes temperaturas de secado de las hojas

El porcentaje de peso seco de las muestras de hoja de gayuba secadas a 60 °C fue del $50,6 \pm 3,1\%$, y fueron similares a los resultados de las muestras secadas a 80 °C. En los extractos de gayuba preparados a partir de 16 muestras de hoja secadas a 80 °C se determinaron contenidos en fenoles totales significativamente inferiores a los determinados en las mismas muestras secadas a 60 °C (promedio de $145,0 \pm 16,9$ mg EAG/g PS frente a $162,2 \pm 20,5$ mg EAG/g PS; $P < 0,001$). Sin embargo, la temperatura de secado de las hojas no afectó al contenido en arbutina de los extractos ($P = 0,764$).

5.2.- Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de gayuba recolectadas en septiembre

En el análisis de los fenoles totales en los extractos de hoja de 80 plantas de gayuba muestreadas en septiembre de 2015 se determinaron contenidos que variaron de forma continua (Figura 6) siguiendo una distribución normal. El análisis de la varianza encontró diferencias estadísticamente significativas en el contenido en fenoles totales entre los 80 individuos ($P < 0,001$). El rango de variación encontrado entre plantas fue muy amplio, puesto que el menor valor se detectó en el individuo 4 de la población de Pina ($110,5 \pm 3,6$ mg EAG/g PS), mientras que el máximo nivel de fenoles totales se encontró en el individuo 4 de la población de Loarre ($200,9 \pm 9,8$ mg EAG/g PS). Esto implica un coeficiente de variación del 11,7%.

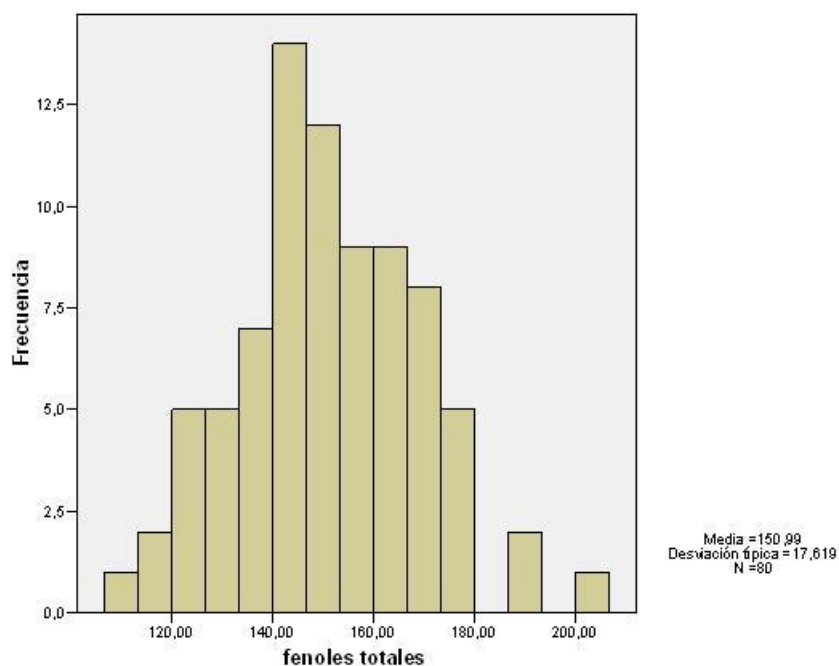


Figura 6. Distribución de los valores medios de fenoles totales determinados en extractos de hoja de 80 plantas de gayuba muestreadas en diez poblaciones naturales en septiembre de 2015.

Como se muestra en la Tabla 4, el contenido en fenoles totales de las plantas de gayuba analizadas también dependió de la población estudiada ($P < 0,001$), aunque las diferencias en el contenido de fenoles totales de los individuos se mantuvieron entre los muestreados en una misma población, para todas las localidades estudiadas ($P < 0,001$). En promedio, los mayores contenidos en fenoles totales se determinaron en las hojas muestreadas en las localidades de Chelva y Loarre ($167,2 \pm 10,2$ y $171,9 \pm 19,4$ mg EAG/g PS, respectivamente) y los menores en las hojas recolectadas en Albarracín, Pina, Salto de Roldán y Santa Eulalia.

Tabla 4. Contenido en fenoles totales en hojas de 80 plantas de gayuba recolectadas en septiembre, en 10 poblaciones naturales (individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no difirieron significativamente (Test de Tamhane).

Población	Planta	Fenoles Totales (mg EAG/g PS)	Población	Planta	Fenoles Totales (mg EAG/g PS)
Pina	1	118,1 ± 4,7 ^{bc}	Albarracín	1	138,9 ± 6,1 ^b
	2	154,7 ± 6,3 ^a		2	147,0 ± 9,6 ^{ab}
	3	129,0 ± 4,0 ^b		3	144,3 ± 3,3 ^{ab}
	4	110,5 ± 3,6 ^c		4	140,4 ± 1,6 ^b
	5	167,5 ± 11,0 ^a		5	154,1 ± 4,2 ^a
	6	126,3 ± 3,9 ^{bc}		6	153,7 ± 1,7 ^a
	7	130,9 ± 7,3 ^b		7	147,1 ± 1,5 ^{ab}
	8	130,5 ± 8,9 ^b		8	141,7 ± 5,1 ^{ab}
	<i>Promedio</i>	<i>133,5 ± 18,8^d</i>		<i>Promedio</i>	<i>145,9 ± 6,8^{cd}</i>
Chelva	1	162,1 ± 2,3 ^{bc}	El Toro	1	155,3 ± 4,4 ^{ab}
	2	172,7 ± 5,1 ^{ab}		2	122,5 ± 4,7 ^c
	3	177,5 ± 6,0 ^a		3	144,7 ± 5,1 ^b
	4	174,5 ± 2,1 ^{ab}		4	144,5 ± 3,9 ^b
	5	156,9 ± 9,4 ^{cd}		5	167,5 ± 5,7 ^a
	6	177,4 ± 2,2 ^a		6	149,7 ± 8,2 ^b
	7	166,5 ± 0,9 ^{abc}		7	148,2 ± 7,3 ^b
	8	149,6 ± 4,9 ^d		8	142,4 ± 3,8 ^b
	<i>Promedio</i>	<i>167,2 ± 10,2^{ab}</i>		<i>Promedio</i>	<i>146,9 ± 13,0^c</i>
Santa Eulalia	1	144,6 ± 2,1 ^b	Salto Roldán	1	139,6 ± 6,4 ^{bcd}
	2	164,1 ± 6,2 ^a		2	131,7 ± 2,2 ^{cd}
	3	169,1 ± 8,7 ^a		3	166,9 ± 6,3 ^a
	4	144,0 ± 8,2 ^b		4	131,1 ± 7,1 ^{cd}
	5	139,1 ± 3,6 ^{bc}		5	141,3 ± 8,6 ^{bcd}
	6	125,8 ± 6,9 ^{cd}		6	125,9 ± 9,3 ^d
	7	138,0 ± 7,8 ^{bc}		7	159,2 ± 13,2 ^{ab}
	8	120,3 ± 5,3 ^d		8	151,7 ± 8,1 ^{abc}
	<i>Promedio</i>	<i>143,1 ± 16,9^{cd}</i>		<i>Promedio</i>	<i>143,4 ± 15,5^{cd}</i>
Loarre	1	191,9 ± 4,1 ^a	Agüero	1	168,8 ± 6,2 ^a
	2	159,9 ± 4,9 ^b		2	153,2 ± 3,7 ^{cd}
	3	152,5 ± 9,8 ^b		3	161,5 ± 6,0 ^{ab}
	4	200,9 ± 9,8 ^a		4	174,3 ± 9,7 ^a
	5	161,9 ± 6,8 ^b		5	149,6 ± 3,2 ^{bc}
	6	154,1 ± 9,0 ^b		6	119,2 ± 2,6 ^d
	7	163,6 ± 3,1 ^b		7	149,5 ± 6,1 ^{bc}
	8	190,3 ± 7,9 ^a		8	144,1 ± 4,8 ^c
	<i>Promedio</i>	<i>171,9 ± 19,4^a</i>		<i>Promedio</i>	<i>152,5 ± 16,9^c</i>
Pico del Águila	1	136,6 ± 7,1 ^c	Lierta	1	148,2 ± 13,6 ^{bc}
	2	151,4 ± 9,4 ^b		2	173,5 ± 3,9 ^a
	3	142,7 ± 4,5 ^{bc}		3	136,7 ± 4,5 ^c
	4	146,6 ± 5,8 ^{bc}		4	152,3 ± 5,3 ^{abc}
	5	142,9 ± 1,1 ^{bc}		5	160,4 ± 7,4 ^{ab}
	6	171,4 ± 4,4 ^a		6	163,8 ± 6,9 ^{ab}
	7	167,9 ± 3,0 ^a		7	164,9 ± 9,7 ^a
	8	136,1 ± 2,6 ^c		8	154,7 ± 9,1 ^{abc}
	<i>Promedio</i>	<i>149,4 ± 13,6^c</i>		<i>Promedio</i>	<i>156,1 ± 13,4^{bc}</i>

En cuanto a la variabilidad encontrada en el contenido en arbutina, de nuevo los resultados obtenidos para las 80 plantas analizadas siguieron una distribución continua y normal (Figura 7). Respecto al rango de variación observado, el menor valor se detectó en el individuo 2 de la población de El Toro ($87,1 \pm 0,4$ mg/g PS), mientras que el máximo valor de arbutina se observó en el individuo 2 de la población de Lierta ($211,5 \pm 5,9$ mg/g PS). El coeficiente de variación estimado para este parámetro fue del 17,1%.

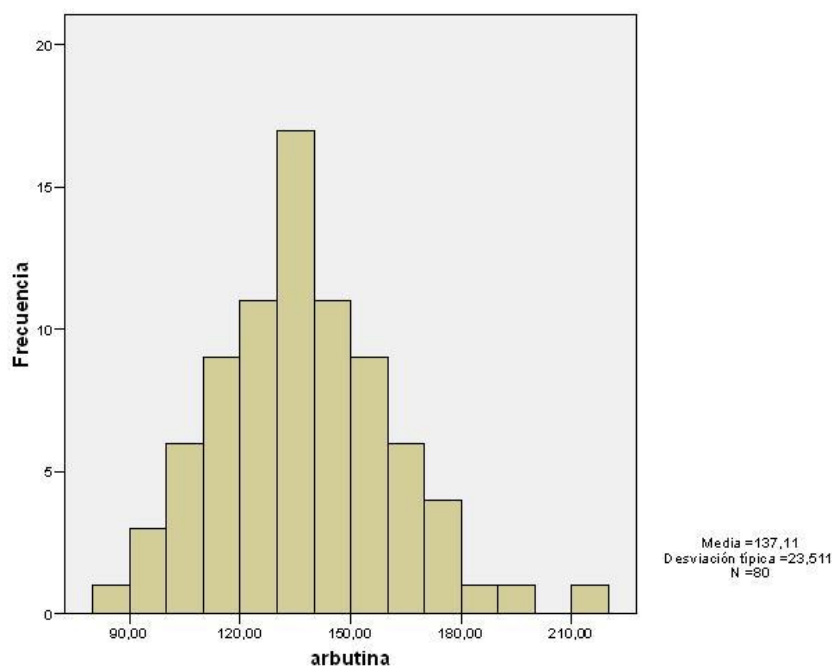


Figura 7. Distribución de los valores medios de arbutina determinados en extractos de hoja de 80 plantas de gayuba muestreadas en diez poblaciones naturales en septiembre de 2015.

El análisis de la varianza nuevamente encontró que el contenido en arbutina en las plantas dependió del individuo ($P < 0,001$) y también de la localidad muestreada (Tabla 5). En promedio, las poblaciones que menos contenido en arbutina presentaron fueron las de Albarracín y El Toro ($109,0 \pm 12,5$ y $113,3 \pm 16,3$ mg/g PS, respectivamente) frente a las poblaciones recolectadas en Lierta y Pico del Águila ($162,1 \pm 23,8$ y $161,7 \pm 13,3$ mg/g PS, respectivamente), aunque éstas no difirieron significativamente de los contenidos de arbutina determinados en las hojas de gayuba recolectadas en Loarre ($157,1 \pm 22,0$ mg/g PS). Como ocurrió para el contenido en fenoles totales, se observaron diferencias significativas en el contenido de arbutina entre individuos de la misma localidad, excepto en las poblaciones de Pico del Águila y Salto de Roldán (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido en arbutina en hojas de 80 plantas de gayuba recolectadas en 10 poblaciones naturales (individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no difirieron significativamente (Test de Tamhane).

Población	Planta	Arbutina (mg/g PS)	Población	Planta	Arbutina (mg/g PS)
Pina	1	131,1 ± 2,7 ^a	Albarracín	1	100,1 ± 7,7 ^{bc}
	2	145,7 ± 13,3 ^a		2	104,6 ± 3,7 ^{bc}
	3	127,6 ± 6,4 ^a		3	107,9 ± 6,0 ^{bc}
	4	102,8 ± 5,7 ^b		4	117,1 ± 5,7 ^{ab}
	5	132,5 ± 11,6 ^a		5	107,6 ± 3,8 ^{bc}
	6	134,1 ± 15,5 ^a		6	130,7 ± 13,4 ^a
	7	130,6 ± 0,8 ^a		7	91,8 ± 5,8 ^c
	8	125,5 ± 8,9 ^a		8	112,4 ± 2,5 ^b
	<i>Promedio</i>	<i>128,7 ± 13,9^d</i>		<i>Promedio</i>	<i>109,0 ± 12,5^f</i>
Chelva	1	98,5 ± 4,4 ^b	El Toro	1	124,4 ± 2,1 ^a
	2	115,9 ± 3,1 ^b		2	87,0 ± 0,4 ^c
	3	138,7 ± 6,6 ^a		3	125,2 ± 3,2 ^a
	4	114,1 ± 1,2 ^b		4	119,8 ± 14,6 ^a
	5	115,3 ± 3,2 ^b		5	126,1 ± 9,7 ^a
	6	139,7 ± 18,3 ^a		6	109,6 ± 8,3 ^{ab}
	7	135,4 ± 5,0 ^a		7	92,7 ± 9,1 ^{bc}
	8	133,9 ± 1,7 ^a		8	121,8 ± 9,5 ^a
	<i>Promedio</i>	<i>123,9 ± 15,6^{de}</i>		<i>Promedio</i>	<i>113,3 ± 16,3^{ef}</i>
Santa Eulalia	1	114,8 ± 3,9 ^{bc}	Salto Roldán	1	147,0 ± 1,4
	2	156,0 ± 7,9 ^a		2	129,3 ± 3,8
	3	137,3 ± 4,7 ^{ab}		3	127,6 ± 4,4
	4	126,5 ± 8,6 ^{bc}		4	141,1 ± 14,9
	5	110,2 ± 11,1 ^c		5	144,9 ± 8,3
	6	119,2 ± 8,7 ^{bc}		6	135,7 ± 12,0
	7	133,2 ± 11,3 ^{abc}		7	128,9 ± 5,0
	8	137,1 ± 11,5 ^{ab}		8	145,4 ± 8,0
	<i>Promedio</i>	<i>129,3 ± 16,0^d</i>		<i>Promedio</i>	<i>137,5 ± 10,4^{cd}</i>
Loarre	1	139,4 ± 9,3 ^e	Agüero	1	157,5 ± 3,4 ^{ab}
	2	181,3 ± 2,3 ^b		2	140,5 ± 6,2 ^{bc}
	3	143,5 ± 5,6 ^{de}		3	146,7 ± 1,2 ^{bc}
	4	158,6 ± 9,1 ^c		4	136,0 ± 10,6 ^{bc}
	5	130,4 ± 7,3 ^e		5	128,4 ± 7,6 ^c
	6	161,7 ± 1,9 ^c		6	140,6 ± 1,4 ^{bc}
	7	151,0 ± 3,2 ^{cd}		7	150,4 ± 9,3 ^{abc}
	8	195,6 ± 1,1 ^a		8	173,6 ± 23,1 ^a
	<i>Promedio</i>	<i>157,1 ± 22,0^{ab}</i>		<i>Promedio</i>	<i>146,7 ± 15,9^{bc}</i>
Pico del Águila	1	172,2 ± 24,2	Lierta	1	156,8 ± 4,5 ^{bc}
	2	162,5 ± 11,1		2	211,5 ± 5,9 ^a
	3	165,2 ± 8,5		3	142,5 ± 5,8 ^c
	4	156,6 ± 21,3		4	161,3 ± 6,8 ^{bc}
	5	171,8 ± 9,1		5	163,7 ± 10,2 ^{bc}
	6	152,4 ± 3,0		6	173,4 ± 19,3 ^b
	7	157,8 ± 6,3		7	139,6 ± 7,7 ^c
	8	155,4 ± 9,3		8	147,8 ± 16,7 ^{bc}
	<i>Promedio</i>	<i>161,7 ± 13,3^a</i>		<i>Promedio</i>	<i>162,1 ± 23,8^a</i>

5.3.- Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de gayuba recolectadas en noviembre

El análisis de la varianza encontró diferencias significativas ($P < 0,001$) en el contenido de fenoles totales de las 28 plantas muestreadas en noviembre de 2015 en cuatro poblaciones naturales, dos en Huesca (Loarre y Salto de Roldán) y dos en Andalucía, concretamente en las provincias de Granada (Huétor) y Almería (Los Vélez). El menor contenido de fenoles totales se detectó en el individuo 2 de la población de Huétor ($120,7 \pm 2,5$ mg EAG/g PS), mientras que en las hojas del individuo 3 de Loarre se encontró el mayor contenido ($189,3 \pm 1,7$ mg EAG/g PS). Así mismo, el análisis de la varianza detectó diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6) entre los contenidos medios de las cuatro poblaciones muestreadas ($P < 0,001$) ya que en promedio, las hojas recolectadas en la población de Loarre acumularon significativamente más compuestos fenólicos que las de las otras tres poblaciones, mientras que en la localidad de Los Vélez se determinó en promedio el menor contenido en fenoles totales ($145,5 \pm 11,3$ mg EAG/g PS), aunque este valor no difirió significativamente del encontrado en las muestras de la otra población andaluza, Huétor, que a su vez mostró similar nivel promedio de fenoles totales que las muestras recolectadas en la población oscense de Salto de Roldán. Las diferencias en el contenido de fenoles totales entre las distintas plantas analizadas se observaron también cuando las plantas se muestrearon en una misma localidad, para las cuatro poblaciones (Tabla 6).

Respecto al contenido de arbutina, los valores determinados en estos individuos (Tabla 6) no siguieron una distribución normal (estadístico Kolmogorov-Smirnov 0,131; $P < 0,001$), encontrándose diferencias significativas entre los niveles de arbutina de las 28 plantas estudiadas (Prueba de Kruskal-Wallis; $P < 0,001$). El individuo 2 de Huétor fue el que acumuló menos arbutina ($138,2 \pm 3,0$ mg/g PS), mientras que el mayor contenido de este compuesto se encontró en las hojas del individuo 6 de Salto de Roldán ($212,0 \pm 10,2$ mg/g PS). El test de Kruskal-Wallis no encontró, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos medios de los extractos obtenidos a partir de hojas recolectadas en cada localidad ($P = 0,067$) aunque, cuando se realizaron los tests para comparar las medias sí se detectaron diferencias significativas entre las muestras de la localidad de Huétor y las recolectadas en Los Vélez o en Salto de Roldán (Prueba U de Mann-Whitney $P = 0,025$ y $P = 0,021$, respectivamente). La variabilidad debida al individuo,

se mantuvo cuando se estudió el contenido en arbutina de las plantas recolectadas en una misma población (Test de Tamhane $P < 0,001$), para las cuatro localidades estudiadas (Tabla 6).

Tabla 6. Contenido de fenoles totales y arbutina en hojas de 28 plantas de gayuba recolectadas en noviembre de 2015 en 4 poblaciones naturales (individuos analizados por triplicado). Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane.

Población	Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
Loarre	2	175,0 ± 7,7 ^{ab}	172,8 ± 7,2 ^a
	3	189,3 ± 1,7 ^a	149,4 ± 4,5 ^b
	5	164,3 ± 2,7 ^b	139,8 ± 2,3 ^b
	6	171,5 ± 4,0 ^{ab}	167,5 ± 2,1 ^a
	7	173,9 ± 5,0 ^{ab}	146,8 ± 5,1 ^b
	8	188,3 ± 14,2 ^a	177,2 ± 2,5 ^a
	<i>Promedio</i>	177,1 ± 11,0 ^a	158,9 ± 15,0 ^{ab}
	Salto de Roldán	1	163,9 ± 1,9 ^{bc}
2		141,0 ± 8,4 ^d	140,8 ± 4,5 ^d
3		139,1 ± 7,4 ^d	146,7 ± 3,1 ^d
4		142,3 ± 1,9 ^d	153,2 ± 1,7 ^{cd}
5		151,4 ± 7,9 ^{cd}	178,0 ± 3,4 ^b
6		189,2 ± 7,8 ^a	212,0 ± 10,2 ^a
7		160,8 ± 6,8 ^{bc}	152,5 ± 16,3 ^{cd}
8		170,3 ± 8,3 ^b	164,8 ± 10,8 ^{bcd}
<i>Promedio</i>	157,2 ± 17,5 ^b	165,9 ± 23,2 ^a	
Huétor	1	159,4 ± 5,5 ^a	162,0 ± 7,0 ^a
	2	120,7 ± 2,5 ^b	138,2 ± 3,0 ^c
	3	163,7 ± 9,6 ^a	153,4 ± 0,2 ^{ab}
	4	166,7 ± 7,2 ^a	152,0 ± 4,4 ^{abc}
	5	151,1 ± 3,7 ^a	143,5 ± 4,6 ^{bc}
	6	166,3 ± 4,2 ^a	145,7 ± 9,3 ^{bc}
	<i>Promedio</i>	154,6 ± 17,3 ^{bc}	149,1 ± 9,2 ^b
Los Vélez	1	145,7 ± 12,5 ^b	172,6 ± 14,9 ^{ab}
	2	146,2 ± 4,1 ^b	162,4 ± 7,8 ^{abc}
	3	143,9 ± 9,8 ^b	153,6 ± 5,6 ^{bcd}
	4	126,3 ± 4,8 ^c	140,0 ± 7,6 ^d
	5	142,3 ± 4,2 ^b	167,1 ± 2,6 ^{abc}
	6	164,3 ± 6,5 ^a	146,6 ± 6,5 ^{cd}
	7	148,5 ± 2,8 ^b	151,4 ± 4,7 ^{bcd}
	8	146,3 ± 2,6 ^b	182,2 ± 9,8 ^a
<i>Promedio</i>	145,5 ± 11,3 ^c	159,5 ± 15,2 ^a	

6.- Discusión

6.1.- Efecto de la temperatura de secado de las hojas de gayuba en el contenido de fenoles totales y arbutina

La temperatura de secado de las muestras de gayuba influyó significativamente en el contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos preparados, dado que en los extractos procedentes de muestras secadas a 80 °C se determinaron contenidos significativamente inferiores a los determinados en los procedentes de muestras secadas a 60 °C. Sin embargo, el contenido en arbutina de los extractos no se vio afectado por la temperatura de secado de las hojas. Por lo tanto, aunque se haya citado un mayor contenido de arbutina en hojas de otra especie secadas a más de 60 °C (Lubsandorzheva et al., 1999), en el caso de la gayuba el secado de las hojas a 60 °C parece ser suficientemente rápido puesto que al aumentar la temperatura de secado a 80 °C no se mejora la extracción de arbutina y sin embargo se producen pérdidas en el contenido en fenoles totales.

6.2.- Factores que influyen en la variabilidad en el contenido de fenoles totales y arbutina en las hojas de gayuba de poblaciones naturales españolas

Las concentraciones de metabolitos secundarios son muy variables en los vegetales, lo cual se suele achacar tanto a factores genéticos como ambientales (Covelo & Gallardo, 2001). En el estudio realizado en este TFG, se analizaron extractos de hoja de 94 plantas de gayuba pertenecientes a doce poblaciones naturales que se encuentran distribuidas en el este de la Península Ibérica, desde Huesca hasta Almería, en un amplio rango de latitud y altitud (desde 538 hasta 1410 m). Las hojas se recolectaron en 2015 en los meses de septiembre y noviembre. En las muestras obtenidas se determinaron niveles de fenoles totales muy variables, lo que se tradujo en diferencias estadísticamente significativas, tanto cuando se compararon las plantas entre sí como cuando se estudiaron los promedios de las 12 poblaciones, para las dos fechas de muestreo. Estas diferencias en el contenido de fenoles totales de los individuos se mantuvieron también cuando se compararon individuos muestreados en una misma población, para todas las localidades estudiadas, tanto en septiembre como en noviembre.

Este mismo comportamiento se observó respecto al contenido de arbutina de los extractos de hoja: las 80 plantas recolectadas en septiembre y las 28 muestreadas en noviembre mostraron diferencias significativas en el contenido de arbutina entre ellas y entre localidades, así como entre individuos de una misma población, excepto entre los individuos de las poblaciones de Pico del Águila y Salto de Roldán muestreadas en septiembre.

La variabilidad en el contenido de metabolitos fenólicos de las plantas de gayuba recolectadas en septiembre, expresada como coeficientes de variación, fue mayor para los contenidos en arbutina que para los niveles de fenoles totales. En concreto en las 80 plantas analizadas en septiembre se estimó un CV del 11,7% para fenoles totales y del 17,1% para la arbutina. Cuando se estudió la variabilidad entre poblaciones también se encontró mayor variación en los contenidos medios de arbutina (CV = 14,2%) entre las 10 poblaciones analizadas que para los contenidos en fenoles totales (CV = 7,6%). Mientras que en el caso de las plantas de gayuba recolectadas en noviembre la variabilidad encontrada tanto para fenoles totales como para arbutina fue similar.

Por otro lado, en los análisis de las hojas de las 80 plantas de gayuba muestreadas en septiembre se encontró correlación positiva significativa entre el contenido en fenoles totales y en arbutina, con un coeficiente de Pearson de 0,288 ($P < 0,001$), es decir, las plantas con mayor contenido de fenoles totales mostraron mayores contenidos en arbutina, aunque se trata de una correlación baja. Estos resultados se observaron también en las muestras de las 28 plantas recolectadas en noviembre, puesto que se estimó una correlación positiva significativa entre el contenido de fenoles totales y en arbutina, con un coeficiente de Pearson de 0,319 ($P = 0,003$).

A pesar de que los contenidos en fenoles totales y en arbutina de las muestras de gayuba variaron en función de la localidad en que se recolectaron las hojas, el amplio rango de variación entre individuos se tradujo en la no existencia de un patrón claro de variación poblacional tanto cuando se compararon los resultados de las muestras de septiembre (Figura 8A), como en las de noviembre (Figura 8B).

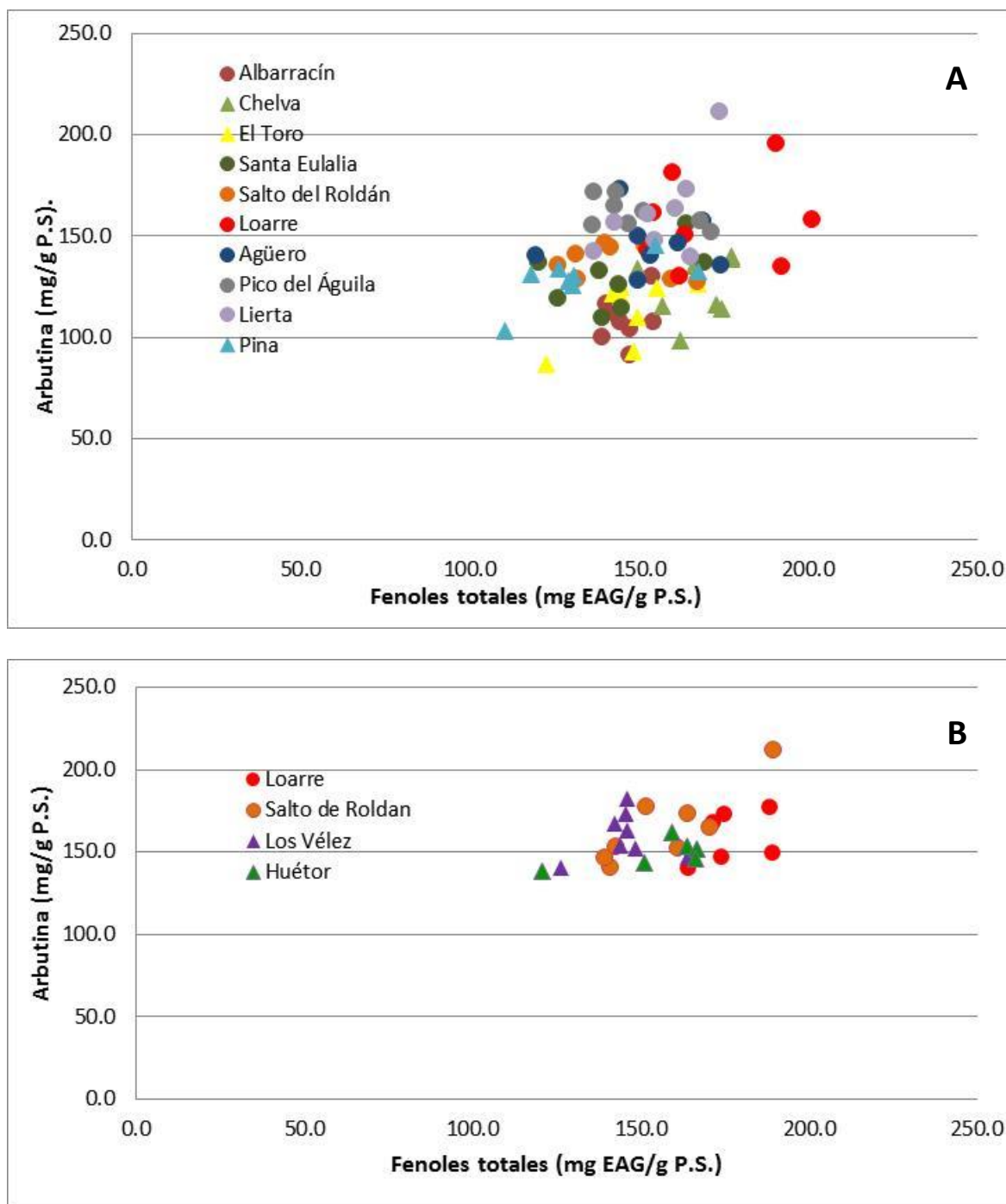


Figura 8. Variabilidad encontrada para el contenido en fenoles totales (mg EAG/g PS) y en arbutina (mg/g PS) en los extractos de hojas de gayuba recolectadas en septiembre de 2015 en 80 plantas (A) y en noviembre de 2015 en 28 plantas (B).

Los contenidos en fenoles totales obtenidos en este estudio fueron similares a los determinados en el estudio realizado con muestras recolectadas en 2014 (Toa, 2015). De hecho, cuando se compararon los resultados de las seis poblaciones de la provincia de Huesca que se muestrearon en septiembre de 2014 y 2015, no se detectaron diferencias

significativas entre los resultados de los dos años ($P = 0,467$). Además, los niveles de fenoles totales encontrados en las hojas de gayuba de 12 poblaciones naturales españolas son similares a los referidos en extractos acuosos de otras especies de conocido potencial antioxidante que se emplean en la industria agroalimentaria como es el caso del romero (185 mg EAG/g PS), el té (149,3 mg EAG/g PS) o la guayaba (154,4 mg EAG/g PS) (Chen et al., 2008). Por lo tanto, nuestros resultados confirmarían el potencial de esta especie como aditivo antioxidante.

En el caso del contenido en arbutina en las hojas recolectadas en septiembre, las variaciones entre promedios de localidades coinciden con el rango de variación descrito en la bibliografía para esta especie (American Herbal Pharmacopoeia, 2008) y con el estudio de Toa (2015). De hecho, tal y como cabría esperar, el valor promedio de arbutina que se obtuvo es muy similar al de este trabajo ($143,9 \pm 24,1$ frente a $137,1 \pm 23,5$ mg/g PS, respectivamente). Sin embargo, cuando se comparan estos resultados con el único estudio realizado en poblaciones naturales españolas (Parejo et al., 2001) se observa que en varias localidades catalanas se determinaron menores contenidos en arbutina, con valores comprendidos entre 6-9%, es decir, entre 60-90 mg/g PS. Esta diferencia en el contenido en arbutina puede explicarse por la variación fitoquímica poblacional y también podría deberse al secado de las muestras a 60 °C que se ha realizado en este estudio, ya que en el trabajo de Parejo et al. (2001) no se especifica cómo se realizó el proceso de secado. Finalmente, estos autores emplearon como solvente una mezcla agua:metanol (95:5) para la extracción de arbutina, lo cual también pudo afectar a los resultados analíticos. Por otro lado, los datos obtenidos en este trabajo coinciden con los del estudio de Sonnenschein & Tegtmeier (2012), quienes refirieron porcentajes de arbutina respecto a peso seco de hasta el 19% (190 mg/g PS) en hojas de gayubas españolas.

Para el caso de las hojas de gayuba recolectadas en septiembre, aunque no se aprecie una separación completa de las poblaciones, en la Figura 7A sí se puede observar que los individuos de las poblaciones situadas más al sur se encuentran en la parte inferior del gráfico (Albarracín, Pina, El Toro y Chelva). Cuando se compararon mediante un ANOVA los resultados de las poblaciones recolectadas en las provincias de Huesca y Zaragoza, en el paralelo 42º, con los obtenidos en las cuatro poblaciones del sur de Aragón y norte de la Comunidad Valenciana, en el paralelo 40º, se encontraron contenidos en fenoles totales

similares ($P = 0,274$), pero en las muestras estas cuatro poblaciones se encontraron en promedio contenidos de arbutina significativamente inferiores ($P < 0,001$) a los determinados en las poblaciones de Huesca y Zaragoza ($118,7 \pm 15,3$ frente a $149,0 \pm 19,8$ mg/g PS, respectivamente).

Este mismo análisis estadístico se realizó con los resultados de las cuatro poblaciones muestreadas en noviembre, ya que las dos poblaciones andaluzas (Huétor y Los Vélez) se ubican en el paralelo 37º, a una latitud aún menor. En este caso, por el contrario, el análisis de la varianza detectó diferencias significativas en el contenido de fenoles totales ($P < 0,001$) entre los dos grupos de poblaciones que, en promedio, fueron mayores en las hojas de gayuba que crecían a una latitud de 42º frente a las muestreadas en el sur de España ($165,7 \pm 17,9$ frente a $149,4 \pm 14,7$ mg EAG/g PS, respectivamente). La prueba U de Mann-Whitney, sin embargo, no detectó diferencias significativas entre los contenidos de arbutina de las hojas recolectadas en noviembre en las dos latitudes ($P = 0,138$).

Algunos estudios apuntan a que las plantas que crecen en latitudes superiores acumulan, en general, mayores contenidos de metabolitos secundarios como flavonoides y antocianinas debido a la mayor duración de los días y las menores temperaturas nocturnas (Jakaola & Hohtola, 2010). Por ejemplo Martz et al. (2009) demostraron que las acículas de enebro acumulan significativamente más fenoles solubles a medida que aumentan la latitud y la altitud y, Yang et al. (2013) encontraron que a mayor latitud se acumulaban mayores contenidos de fenoles (con incrementos del orden del 10-19%) en las bayas de tres cultivares de grosellas cultivadas en dos localidades finlandesas, relacionando los menores contenidos en estos compuestos con los mayores niveles de radiación y temperatura. El patrón de variación latitudinal de los flavonoides en *Silene littorea*, (Caryophyllaceae) también fue estudiado, tanto a nivel intra como interpoblacional, por Del Valle et al. (2015). En nuestro estudio no detectamos diferencias entre los promedios de los contenidos en fenoles totales de las poblaciones de gayuba ubicadas en el norte de Aragón y los de las plantas de poblaciones situadas en el paralelo 40. Sin embargo, como hemos mencionado, la mayor latitud si se tradujo en mayores contenidos en arbutina en las muestras recolectadas en septiembre y en mayores contenidos en fenoles totales en las muestras recolectadas en noviembre.

Este comportamiento diferente de plantas de gayuba de localidades situadas en distintas latitudes respecto a los contenidos de fenoles totales y arbutina podría deberse en parte, a que dos de las poblaciones situadas en el paralelo 40º (Albarracín y Pina) se encuentran sobre un sustrato silíceo con un pH menor a 7,5. Generalmente las plantas que crecen en suelos pobres y con pH mayoritariamente ácidos suelen mostrar mayores contenidos en compuestos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2006), aunque en el trabajo de Kraus et al. (2004) determinaron que para cinco especies diferentes la influencia más determinante en este sentido es la disponibilidad de nutrientes, más que la variación de pH en sí. Sin embargo, en nuestro trabajo el análisis de la varianza detectó diferencias significativas ($P < 0,001$) en el contenido en fenoles totales de las hojas de gayubas que crecieron en un suelo con menor pH, que acumularon niveles inferiores (promedio de $139,7 \pm 15,3$ mg EAG/g PS) a los determinados en las hojas de las otras dos poblaciones de esta zona que se desarrollan sobre sustrato calizo con pH mayor a 7,5 (promedio $157,0 \pm 15,6$ mg EAG/g PS), mientras que los contenidos medios de arbutina de las plantas no se vieron afectados por el tipo de sustrato en estas cuatro poblaciones ($P = 0,870$). En el estudio de Parejo et al. (2002) sobre variabilidad en el contenido de arbutina de cuatro poblaciones de gayuba situadas en el norte de Cataluña incluyeron una población que se encuentra en sustrato silíceo y tampoco detectaron diferencias significativas debidas a este factor. Por lo tanto, el tipo de suelo no parece explicar el menor contenido promedio en arbutina de las poblaciones situadas en el paralelo 40º. De hecho, si analizamos los resultados obtenidos en las muestras de septiembre en las cinco poblaciones que se encuentran en similares condiciones de pH de suelo y altitud, es decir, descartamos los datos de las poblaciones que se encuentran sobre sustratos silíceos con pH menor a 7,5 (Albarracín y Pina) y a una altitud inferior a 1000 m (Agüero, Lierta y Santa Eulalia), corroboramos que las 40 plantas de gayuba acumularon similares contenidos en fenoles totales ($P = 0,548$), pero diferente contenido en arbutina, ya que en promedio las hojas de las poblaciones de Loarre, Pico del Águila y Salto de Roldán mostraron un contenido en arbutina de $152,1 \pm 19,0$ mg/g PS frente a una media de $118,6 \pm 16,7$ mg/g PS en las plantas de Chelva y El Toro. Sin embargo, como se ha mencionado, el contenido en arbutina de las muestras recolectadas en noviembre en dos poblaciones andaluzas fue similar al encontrado en dos poblaciones oscenses, aunque sí se encontraron diferencias significativas en el contenido en fenoles totales.

Otro factor que podría explicar esta variación encontrada en el contenido fenólico de hojas de gayuba recolectadas en diferentes regiones de España es la fecha de muestreo. Las hojas de las dos poblaciones oscenses muestreadas en septiembre y en noviembre (Loarre y Salto de Roldán) mostraron en promedio mayores contenidos en fenoles totales, aunque en el límite de significación ($P = 0,047$), en noviembre que en septiembre ($165,7 \pm 17,4$ frente a $152,1 \pm 17,2$ mg EAG/g PS, respectivamente), y lo mismo sucedió con el contenido en arbutina ($P = 0,027$), ya que las plantas en promedio acumularon mayor cantidad de este compuesto en noviembre respecto a los niveles encontrados en hojas recolectadas en septiembre ($162,8 \pm 20,1$ frente a $147,3 \pm 19,7$ mg/g PS, respectivamente). Sin embargo, la variación en el contenido de arbutina en función de la fecha de muestreo dependió de la población analizada, ya que en las muestras recogidas en Loarre se determinaron niveles similares de arbutina en los dos muestreos, mientras que en Salto de Roldán aumentó el contenido en arbutina en noviembre respecto a septiembre ($165,1 \pm 23,2$ mg/g PS frente a $137,5 \pm 10,4$ mg/g PS, respectivamente). Probablemente esto se explique por las temperaturas más suaves de lo habitual que se dieron en el otoño de 2015 en toda España, que permitieron a las plantas de gayuba que crecen en el norte de la península extender el periodo de actividad vegetativa.

Como se ha mencionado, la acumulación de compuestos fenólicos en las plantas también se ve afectada por la altitud. Monschein et al. (2010) por ejemplo, refirieron una mayor acumulación de flavonoides en poblaciones situadas a mayor altitud de otra Ericácea, *Calluna vulgaris*. En este trabajo, el efecto de este parámetro se estudió en las 48 plantas de seis poblaciones ubicadas en el paralelo 42º, que son las que se distribuyen en un rango de altitud más amplio, dado que las poblaciones de gayuba de latitudes inferiores se encuentran todas a partir de prácticamente 1000 m. En los análisis efectuados se encontró correlación, aunque baja, entre la altitud y el contenido en arbutina, con un coeficiente de Pearson de 0,306 ($P = 0,036$), mientras que la altitud no afectó al contenido en fenoles totales. Estos resultados, corroboran los obtenidos en el estudio realizado en 2014, que incluía, entre otras, esas mismas seis poblaciones de la provincia de Huesca. Esto podría indicar un papel de la arbutina en la defensa de la planta frente a niveles mayores de radiación ultravioleta, aunque sería necesario desarrollar un estudio más amplio para confirmar dicha hipótesis.

7.- Conclusiones

- El secado de las hojas de gayuba a 80 °C no incrementó el contenido en arbutina de los extractos metanólicos de las mismas, por el contrario se encontraron contenidos de fenoles totales significativamente inferiores a los determinados en extractos de hojas de las mismas plantas secadas a 60 °C.
- Se encontró una gran variabilidad en el contenido de fenoles totales y en el contenido de arbutina en los 94 individuos analizados, incluso entre las plantas de una misma población, tanto en las poblaciones muestreadas en el mes de noviembre como en septiembre, exceptuando en este mes las poblaciones de Pico del Águila y Salto de Roldán.
- Con independencia de la fecha de recolección, la localidad de muestreo también afectó al contenido en fenoles totales y en arbutina de los extractos de hoja de gayuba. En el muestreo realizado en septiembre, las hojas de las poblaciones de Loarre y Chelva, en promedio, acumularon contenidos significativamente mayores en fenoles totales ($171,9 \pm 19,4$ y $167,2 \pm 10,2$ mg EAG/g PS, respectivamente) que el resto de las poblaciones ($146,4 \pm 6,9$ mg EAG/g PS). En cuanto al contenido en arbutina, en promedio las hojas recolectadas en las poblaciones de Lierta, Pico del Águila y Loarre (en promedio $160,3 \pm 2,8$ mg/g PS) mostraron contenidos significativamente superiores a los encontrados en otras poblaciones, sobre todo respecto a las hojas de Albarracín y El Toro donde se determinaron contenidos de arbutina significativamente inferiores ($111,2 \pm 3,1$ mg/g PS). En el muestreo realizado en noviembre, nuevamente los mayores contenidos de fenoles totales se encontraron en las hojas de la población de Loarre, ($177,1 \pm 11,0$ mg EAG/g PS), siendo la población de Los Vélez la que acumulo significativamente menos que el resto ($145,5 \pm 11,3$ mg EAG/g PS).
- Las plantas de localidades situadas a mayor latitud, en el norte de Aragón, acumularon en promedio mayores contenidos en fenoles totales que las plantas de las dos localidades andaluzas estudiadas. En el muestreo realizado en septiembre, se encontraron diferencias debidas a la latitud para el contenido en arbutina, ya que las plantas de las seis poblaciones situadas más al norte acumularon mayor cantidad de

este compuesto, en promedio, que las de las cuatro poblaciones ubicadas en el paralelo 40.

- La altitud no afectó al contenido de fenoles totales en las seis poblaciones recolectadas en el norte de Aragón en septiembre, pero sí influyó en el contenido arbutina, ya que las plantas de poblaciones situadas a mayor altitud presentaron en promedio mayores niveles de este compuesto (coeficiente de Pearson de 0,306; $P = 0,036$).
- El pH del suelo influyó en el contenido en fenoles totales de las plantas de gayuba analizadas, ya que las hojas muestreadas en dos localidades con suelos silíceos y valores de pH menores a 7,5 (Albarracín y Pina) acumularon significativamente menos fenoles totales que las recolectadas en dos poblaciones cercanas que se encuentran sobre suelos calizos a mayor pH (Chelva y El Toro). Sin embargo, este parámetro no afectó al contenido de arbutina de estas plantas.
- La fecha de recolección influyó en el contenido en fenoles totales y en arbutina de los extractos obtenidos a partir de hojas de dos poblaciones oscenses, ya que en las hojas recolectadas en noviembre se determinaron mayores contenidos de estos compuestos que en las recogidas en septiembre.

8. - Bibliografía

Alam, P., Alqasoumi, S., Shakeel, F. & Abdel-Kader, M. 2011. HPTLC densitometry analysis of arbutin in bulk drug and methanolic extracts of *Arctostaphylos uva-ursi*. *Natural Products Research* 25:1671-1675.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B. & Weil, J.A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84:551–562.

Amarowicz, R. Pegg, R.B. & Koisinska, A. 2009. SE-HPLC Separation of myosin complex with tannins of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) leaves. *Food Science* 5:386-391.

American Herbal Pharmacopoeia. 2008. Uva Ursi Leaf. *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics.

Baudière, A. & Fromard, F. 1988. Estudio experimental de la regeneración del pino en los matorrales de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel) del bosque de Barrès (Pirineos Orientales, Francia). Instituto de Estudios Altoaragoneses, C.S.I.C, Jaca.

Benítez, G., González, R., Molero, J. & Casares, M. 2015. Ficha MAGRAMA. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventariosnacionales/iect_arctostaphylos_uvaursi_tcm7-364380.pdf [Consultado: 07-04-16].

Boros, B., Jakabová, S., Madarász, T., Molnár, R., Galambosi, B., Kilár, F., Felinger, A. & Farkas, A. 2014. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin and gallic acid in leaves of different *Bergenia* species. *Chromatographia*, 77:1129-1135.

Brewer, M.S. 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10:221-247.

Calvo, L., Tárrega, R. & De Luis, E. 2002. The dynamics of Mediterranean shrubs species over 12 years following perturbations. *Plant Ecology* 160:25-42.

Chen, H.Y., Lin, Y.C. & Hsieh, C.L. 2008. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry* 104:1418-1424.

Covelo, F & Gallardo, A. 2001. Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain. *Canadian Journal of Botany* 79: 1262-1269.

Craighead, J., Craighead, F. & Davis, R. 1963. A field guide to rocky mountain wildflowers. Ed. The Riverside Press, Boston.

Del Barrio, J.; Luis-Calabuig, E. & Tárrega, R. 1999. Vegetative response of *Arctostaphylos uva-ursi* to experimental cutting and burning. *Plant Ecology* 145:191-195.

Del Valle, J.C., Buide M.L., Casimiro-Soriguer I., Whittall J.B. & Narbona E. 2015. On flavonoid accumulation indifferent plant parts: variation patterns among individuals and populations in the shore campion (*Silene littorea*). *Frontiers in Plant Science* 6: 939.

Dykes, G.A., Amarowicz, R. & Pegg, R.B. 2003. An antioxidant bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extract modulates surfaces hydrophobicity of a wide range of food-related bacteria: Implications for functional food safety. *Food Control* 14:515-118.

Faraldos, M. & Goberna, C. 2002. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

García, E., Fernández, I. & Fuentes, A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. ETSIAMN; Universidad Politécnica de Valencia.

García-Pérez, M.H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG* 1:31-41.

Gómez-García, D. 2005. Atlas de la Flora de Aragón. Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón e Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC).

González-Crevillén, A. 2009. Nuevas estrategias electrocinéticas y nuevas aportaciones a la detección electroquímica en microchips de electroforesis capilar basadas en el empleo de nanotubos de carbono y otras nanoestructuras. Universidad de Alcalá.

González-Jiménez, F.E. 2010. Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica L.*), mediante electroforesis capilar. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México D.F.

Gran Enciclopedia Aragonesa. 2000. Disponible en http://www.encyclopedia-aragonesa.com/voz.asp?voz_id=6250&tipo_búsqueda=1&nombre=Gayuba&categoria_id=&subcategoria_id=&conImgenes. [Consultado: 10-03-2016].

Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H. & Schneider, G. 1993. In hagers handbuch der pharmazeutischen praxis. *Springer-Verlag* 4:330-336.

Hernández-Torres, A. 2008. Gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*). La planta eficaz para combatir infecciones de orina. *Rehalda* 7:63-67.

Hinojosa-Dávalos, J., Gutiérrez-Lomelí, M., Siller-López, F., Rodríguez-Sahagún, A., Morales-Del Río, J., Guerrero-Medina, P. & Del Toro-Sánchez, C. 2013. Phytochemical Screening and antiinflammatory capacity of leaves from *Tithonia tubaeformis*. *Biotechnia*. Vol XV 2:53-60.

Jakaaola, L. & Hohtola, A. 2010. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell and Environment* 33: 1239-1247.

Kai, H. & Matsuno, K. 2015. Assessment of the effect of arbutin isomers and kojic acid on melanin production, tyrosinase activity, and tyrosinase expression in B16-4A5 and HMV-II melanoma cells. *Planta Medica Letters* 2:39-41.

Karre, L.; Lopez, K. & Getty, K.J. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat Science* 94:220-227.

Kim, S.J., Cho, A.R. & Han, J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control* 29:112-120.

Kraus T.E.C., Zasoski R.J. & Dahlgren R.A. 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* 262: 95-109.

Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125:288-306.

Lubsandorzheeva, P.B., Zhigzhitov, B.S., Dargaeva, T.D., Bazarova, Zh.G. & Nagaslaeva, L. A., 1999. Chromatospectrophotometric determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 34:261-264.

Maqsood, S., Benjakul, S. & Shahidi, F. 2013. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products. *Food Science and Nutrition* 53:162-179.

Martínez, M. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Facultad de Química Universidad Oaxaca, México.

Martz, F., Peltola, R., Fontanay, S., Duval, R.E., Julkunen-Tiitto, R. & Stark, S. 2009. Effect of latitude and altitude on the terpenoid and soluble phenolic composition of juniper (*Juniperus communis*) needles and evaluation of their antibacterial activity in the boreal zone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9575-9584.

Miaw-Ling, C. & Chur-Min, C. 2003. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agent in cosmetic product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33:617-626.

Migas, P. & Krauze-Baranowska, M. 2015. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters* 13:35-40.

Monschein, M., Iglesias, J., Kunert, O. & Bucar, F. 2010. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* L. Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochemistry Reviews* 9:205-215.

Morillas-Ruiz, J.M. & Delgado-Alarcón, J.M. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 32:8-20.

Nacz, M., Pegg, RB. & Amarowicz, R. 2011. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics. *Food Chemistry* 124:1507-1513.

Olennikov, D.N. & Chekhirova, G.V. 2013. Galloylpicein and other phenolic compounds from *Arctostaphylos uva-ursi*. *Chemistry of Natural Compounds* 49:1-7.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. 2001. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 12:336-339.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. 2002. Variation of the arbutin content in different wild populations of *Arctostaphylos uva-ursi* in Catalonia, Spain. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 9:329-333.

Puente, J. & Benito, JL. 2014. Guía imprescindible de las flores del Prepirineo. Jolube Consultor Botánico y Editor, Jaca.

Recasens, J., Ninot, P., Cristóbal, R. & Aymerich, P. 2008. Sustainable Wild Harvesting of *Arctostaphylos uva-ursi* in the Pyrenees as a Conservation Practice. *Journal of Herbs, Spices and Medical Plants* 14:1-12.

Renobales, G. & Sallés, J. 2001. Plantas de interés farmacéutico. Universidad del País Vasco UPV/EHU. Facultad de Farmacia.

Salemaa, M., Vanha-Majamaa, I. & Gardner, P. J. 1999. Compensatory growth of two clonal dwarf shrubs, *Arctostaphylos uva-ursi* and *Vaccinium uliginosum* in a heavy metal polluted environment. *Plant Ecology* 141:79-91.

Seigler, D. 1998. Plant secondary metabolism. Editorial Kluwer, Dordrecht, Holanda.

Seo, D.H., Jung, J.H., Lee, J.E., Jeon, E.J., Kim, W. & Park C.S. 2012. Biotechnological production of arbutins (α - and β -arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:1417-1425.

Shah, M.A.; Don Bosco, S.J. & Mir, S.A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science* 98:21–33.

Sonnenschein, M. & Tegtmeier, M. 2012. Experiments on the domestication of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng). *Journal of Medicinal and Spice Plants* 17:124-128.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). Fisiología Vegetal. Edición en castellano de la Universitat Jaume I, Castellón. Vol 1.

Toa, A. (2015). Determinación de compuestos antioxidantes en poblaciones naturales de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) de la provincia de Huesca. Universidad de Zaragoza.

Valladares, S. 1994. Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta visible. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Departamento de Pesca. Food and Agriculture Organization of the United Nation.

Valladares, F. 2004. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Edita el Ministerio de medio ambiente. Disponible en:
https://issuu.com/ferherlo/docs/ecologia_bosque_mediterraneo_1.

Villar, L. 1993. *Flora ibérica*. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Ericaceae 4.

Yang, B., Zheng, J., Laaksonen, O., Tahvonen, R. & Kallio, H. 2013. Effects of latitude and weather conditions on phenolic compounds in currant (*Ribes* spp.) cultivars. *J. Agric. Food Chemistry* 61: 3517–3532.

Anexo. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba analizados en este trabajo

Tabla I. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Albarracín en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Albarracín		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	131,90	108,88
1	143,18	96,82
1	141,58	94,58
2	149,99	107,15
2	154,68	100,34
2	136,23	106,19
3	144,01	107,90
3	141,13	101,93
3	147,66	113,99
4	142,02	119,17
4	138,82	121,50
4	140,26	110,62
5	158,50	111,94
5	153,78	104,79
5	150,07	106,03
6	152,36	122,08
6	153,19	123,78
6	155,64	146,12
7	148,34	95,85
7	147,58	85,17
7	145,52	94,25
8	145,98	113,00
8	136,05	109,72
8	143,00	114,57

Tabla II. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Agüero en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C y 80 °C.

Agüero				
Planta	60 °C		80 °C	
	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	165,26	155,60	161,58	161,90
1	175,93	155,45	137,74	155,89
1	165,26	161,49	159,84	157,81
2	150,93	133,41	130,76	148,70
2	157,50	143,75	128,19	135,73
2	151,14	144,46	121,19	139,56
3	163,68	147,68	153,46	140,28
3	166,12	147,09	150,17	146,48
3	154,68	145,31	150,64	139,50
4	165,39	123,98	157,16	138,27
4	184,69	139,85	154,98	136,82
4	172,69	144,18	164,84	161,04
5	151,52	137,03	153,08	127,00
5	151,35	125,36	130,06	129,85
5	145,97	122,88	133,82	126,27
6	116,57	140,98	105,32	125,99
6	121,72	139,10	115,01	122,23
6	119,32	141,74	106,20	124,20
7	142,43	142,48	125,08	133,70
7	152,93	148,07	131,23	146,68
7	153,22	160,66	116,23	137,05
8	148,42	158,90	140,43	145,13
8	138,94	200,26	132,80	143,22
8	144,95	161,75	145,41	144,01

Tabla III. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Chelva en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Chelva		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	162,35	103,57
1	164,23	95,95
1	159,70	95,88
2	177,27	119,36
2	173,67	115,05
2	167,21	113,26
3	170,69	132,00
3	179,46	138,88
3	182,29	145,09
4	177,01	112,77
4	173,27	114,98
4	173,31	114,54
5	167,64	116,97
5	153,42	117,43
5	149,78	111,62
6	179,74	139,44
6	177,06	121,58
6	175,39	158,13
7	167,00	140,86
7	165,48	134,08
7	166,94	131,21
8	155,16	134,83
8	145,89	134,98
8	147,74	131,89

Tabla VI. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en El Toro en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

El Toro		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	151,05	123,18
1	159,76	126,81
1	155,17	123,10
2	126,08	87,07
2	117,23	86,67
2	124,30	87,38
3	141,01	122,99
3	142,61	123,72
3	150,47	128,87
4	141,98	135,73
4	142,54	116,78
4	149,04	107,02
5	172,64	130,77
5	168,57	115,01
5	161,44	132,65
6	158,94	114,65
6	143,45	100,03
6	146,60	114,23
7	153,35	82,62
7	151,50	95,24
7	139,84	100,21
8	146,72	121,62
8	140,69	131,36
8	139,82	112,44

Tabla V. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Lierta en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Lierta		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	150,67	157,24
1	150,57	152,06
1	127,02	161,07
2	177,96	216,47
2	170,82	205,00
2	171,78	213,13
3	139,47	138,59
3	139,13	139,74
3	131,46	149,13
4	156,50	169,04
4	146,35	158,62
4	154,17	156,38
5	159,81	157,28
5	153,35	158,40
5	168,04	175,46
6	170,89	190,88
6	163,39	176,62
6	157,08	152,61
7	171,56	146,96
7	169,43	140,27
7	153,81	131,56
8	144,68	134,56
8	162,37	142,29
8	156,93	166,54

Tabla VI. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Loarre en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C y 80 °C.

Loarre				
Planta	60 °C		80 °C	
	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	187,29	125,35	176,89	123,18
1	193,25	143,92	177,04	136,40
1	195,24	135,49	168,46	138,76
2	165,47	181,07	143,13	174,32
2	157,50	183,64	143,74	182,67
2	156,62	179,06	145,07	192,76
3	154,64	140,40	136,59	140,97
3	161,10	149,99	139,39	150,00
3	141,75	140,12	142,17	152,19
4	200,27	149,52	154,85	183,33
4	191,46	167,69	155,16	168,52
4	211,07	158,56	153,75	170,17
5	169,28	134,90	146,72	142,21
5	155,89	121,97	150,62	147,44
5	160,61	134,18	144,76	154,13
6	153,97	163,81	131,13	181,76
6	163,17	160,82	145,26	168,91
6	145,11	160,39	141,78	176,93
7	161,31	147,35	158,60	159,03
7	162,33	152,76	149,87	160,53
7	167,11	152,92	145,56	162,24
8	193,77	194,58	172,36	206,22
8	181,35	196,82	165,49	205,78
8	195,91	195,44	166,58	208,55

Tabla VII. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Pico del Águila en el mes de septiembre.

Muestras secadas a 60 °C.

Pico del Águila		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	140,08	200,17
1	128,49	156,62
1	141,26	159,95
2	161,06	170,23
2	142,41	149,76
2	150,62	167,42
3	146,65	170,48
3	143,68	169,61
3	137,88	155,39
4	143,55	137,39
4	153,34	152,98
4	142,90	179,49
5	142,23	181,36
5	144,10	170,79
5	142,32	163,27
6	166,43	151,25
6	172,96	155,73
6	174,74	150,10
7	164,64	151,16
7	168,65	158,48
7	170,41	163,76
8	134,69	156,45
8	134,52	145,68
8	139,13	164,17

Tabla VIII. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Pina de Montalgrao en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Pina de Montalgrao		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	117,21	133,24
1	113,89	131,92
1	123,17	128,11
2	156,06	137,79
2	147,87	160,81
2	160,31	137,64
3	125,86	133,90
3	127,65	121,17
3	133,49	127,68
4	106,92	100,31
4	110,27	98,80
4	114,17	109,31
5	154,90	145,32
5	174,60	129,45
5	173,15	122,76
6	122,79	122,09
6	130,46	151,66
6	125,74	128,63
7	135,69	131,34
7	122,51	130,70
7	134,49	129,79
8	123,30	127,46
8	127,80	115,85
8	140,52	133,32

Tabla IX. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Salto de Roldán en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Salto de Roldán		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	145,90	145,53
1	139,87	148,35
1	133,13	147,07
2	133,97	125,84
2	129,54	133,33
2	131,45	128,81
3	161,67	125,49
3	173,96	132,68
3	165,21	124,65
4	125,80	157,89
4	128,29	136,08
4	139,19	129,42
5	142,88	147,91
5	149,02	135,60
5	132,00	151,29
6	127,97	125,83
6	115,80	149,01
6	133,97	132,23
7	160,99	130,61
7	171,47	123,28
7	145,24	132,75
8	142,49	136,74
8	155,13	152,51
8	157,47	147,03

Tabla X. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Santa Eulalia en el mes de septiembre. Muestras secadas a 60 °C.

Santa Eulalia		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	142,37	116,28
1	146,55	117,64
1	144,90	110,34
2	166,69	152,94
2	168,55	150,21
2	156,96	164,98
3	178,12	132,21
3	160,79	141,52
3	168,31	138,21
4	139,60	136,17
4	139,03	123,39
4	153,45	119,84
5	141,98	115,31
5	135,01	117,85
5	140,17	97,51
6	132,16	115,46
6	120,28	112,95
6	125,04	129,15
7	147,03	136,16
7	133,61	120,69
7	133,49	142,76
8	117,80	145,25
8	116,72	123,89
8	126,44	142,08

Tabla XI. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 6 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Huétor en el mes de noviembre. Muestras secadas a 60 °C.

Huétor		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	164,34	166,97
1	160,26	165,09
1	153,52	154,04
2	122,42	135,40
2	121,91	137,80
2	117,86	141,35
3	174,69	153,48
3	156,80	153,68
3	159,56	153,19
4	174,62	147,87
4	160,75	156,68
4	164,66	151,39
5	147,51	139,51
5	150,85	142,50
5	154,89	148,56
6	163,31	143,62
6	171,11	155,89
6	164,40	137,64

Tabla XII. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 6 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Loarre en el mes de noviembre. Muestras secadas a 60 °C.

Loarre		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
2	166,88	174,11
2	175,95	165,01
2	182,23	179,26
3	187,54	154,62
3	189,30	146,70
3	191,03	146,79
5	164,80	137,96
5	161,41	139,05
5	166,76	142,39
6	166,97	167,97
6	173,36	169,36
6	174,29	165,21
7	168,56	144,09
7	178,51	152,58
7	174,59	143,60
8	172,52	174,46
8	199,88	179,31
8	192,62	177,95

Tabla XIII. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Los Vélez en el mes de noviembre. Muestras secadas a 60 °C.

Los Vélez		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	158,32	185,20
1	145,52	176,49
1	133,41	156,19
2	143,49	165,02
2	150,91	168,62
2	144,09	153,60
3	132,83	147,55
3	147,90	158,59
3	151,09	154,73
4	125,75	135,56
4	121,85	135,64
4	131,42	148,82
5	143,54	164,33
5	137,59	167,40
5	145,80	169,55
6	156,85	139,26
6	169,12	151,85
6	166,95	148,69
7	146,43	156,36
7	151,65	147,08
7	147,35	150,62
8	148,57	189,38
8	143,46	171,02
8	146,99	186,30

Tabla XIV. Contenido en fenoles totales y arbutina de los extractos de hojas de gayuba de 8 plantas (analizadas por triplicado) recolectadas en Salto de Roldán en el mes de noviembre. Muestras secadas a 60 °C.

Salto de Roldán		
Planta	Fenoles totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
1	163,76	163,40
1	162,05	178,32
1	165,94	177,80
2	132,45	137,34
2	141,21	139,21
2	149,30	145,86
3	131,13	148,95
3	145,73	144,52
3	140,35	perdida
4	143,83	152,38
4	140,17	155,18
4	142,79	151,97
5	142,72	174,20
5	158,16	178,66
5	153,28	180,99
6	181,81	217,40
6	197,36	218,28
6	188,51	200,17
7	154,42	138,39
7	160,02	170,14
7	167,96	148,01
8	171,45	177,18
8	177,89	159,79
8	161,41	157,34