



102  
2ef  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

APORTE AL ESTUDIO ELECTROQUIMICO DE  
*Arnica montana.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**  
P R E S E N T A :  
**LAURA RANGEL ORDONEZ**



MEXICO, D. F.,

1998

260273

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

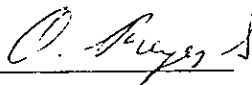
**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Miguel Saloma Terrazas
Vocal	Profra. María Antonia Dosal Gómez
Secretario	Prof. Octavio Reyes Salas
1er. Suplente	Prof. Lino Joel Reyes Trejo
2o. Suplente	Prof. José Luis Ortega Cervantes

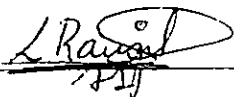
Sitio donde se desarrolló el tema:

Lab. 114, DEPg, Facultad de Química, U. N. A. M. Ciudad Universitaria

Asesor: Dr. Octavio Reyes Salas



Sustentante: Laura Rangel Ordóñez



*“Una caminata de mil millas  
empieza con un pequeño paso”*

*Lao-Tsé*

*A mi madre, como un pequeño fruto de tus esfuerzos y sacrificios, gracias por tus enseñanzas, por tu confianza y por el apoyo incondicional que has depositado en mí a lo largo de mi vida.*

*A mi padre, por haberme ayudado a comprender que "no existen atajos para llegar a algún lugar que valga la pena", también he aprendido mucho de ti.*

*A mis hermanos. Gracias por estar conmigo a pesar de las adversidades y por ayudarme a crecer a través de las invaluable enseñanzas que me han brindado a través de sus propias experiencias. Porque sigamos unidos a pesar de las distancias.*

*De manera muy especial a Rocio, por haberme enseñado el valor de la integridad; por tu invaluable apoyo desinteresado aún en los momentos difíciles y a pesar de los contratiempos. A tí y a tu familia, por haberme permitido formar una pequeña parte de ella.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*De manera muy especial agradezco al Dr. Octavio Reyes por su invaluable calidad como persona y como profesor.*

*Octavio: gracias por el apoyo, la paciencia y el interés puestos para la realización de esta investigación; porque al permitirme colaborar contigo desde los inicios de mi carrera profesional, abriste las puertas a innumerables experiencias que han sido parte importante para mi desarrollo personal y académico; porque a través de tus enseñanzas, no solo académicas, he crecido en forma profesional y espiritual. Gracias por ser la persona que eres, y por permitirme el gran gusto de conocerla un poco.*

*A los miembros del jurado por haber revisado el borrador y por las sugerencias y valiosos comentarios que hicieron para el mejoramiento de esta tesis.*

*A las personas que directa e indirectamente colaboraron para la elaboración de esta tesis, y en particular al M. en C. (próximamente Doctor) José Antonio Manzanilla, por sus consejos y desinteresado apoyo a través del desarrollo de esta tesis.*

*A mis compañeros de los laboratorios 114 y 115 de la DEPg, gracias por su compañerismo, apoyo, y por ayudarme a hacer más placentera mi estancia en el laboratorio.*

*"Aquí la vista es libre  
y el espíritu se eleva..."*

*Goethe*

	Página
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	4
Capítulo 3. Objetivos.....	8
Capítulo 4. Parte Experimental	
4.1. Reactivos.....	9
4.2. Equipo.....	9
4.3. Material.....	10
4.4. Metodología.....	11
Capítulo 5. Resultados y Discusión	
<b>I. Sistema de ácido caféico</b>	
I.A. Valoración ácido-base del ácido caféico.....	20
I.A.1. Determinación de la cantidad de grupos ácidos valorados.....	21
I.A.2. Determinación de la pureza del ácido caféico.....	22
I.A.3. Determinación de los valores de pKa condicionales del ácido caféico.....	23
I.A.4. Fuerza del ácido caféico.....	24
I.B. Estudio electroquímico	
I.B.1. Polarografía.....	25
I.B.2. Voltamperometría.....	25
I.B.2.1. Influencia del pH sobre las señales voltamperométricas.....	25
I.B.2.2. Influencia del material del electrodo.....	27
I.B.2.3. Estudio de las señales voltamperométricas sobre electrodo de platino.....	29
I.B.2.3.1. Influencia de la velocidad de giro del electrodo.....	29
I.B.2.3.2. Determinación del efecto de la concentración y límites de detección.....	35



<b>II. Sistema de árnica</b>	
II.A. Identificación del ácido caféico en las tinturas.....	37
II.B. Estudio electroquímico	
II.B.1. Polarografía.....	38
II.B.2. Voltamperometría sobre electrodo de platino a pH = 1.5.....	39
II.B.2.1. Número de señales en los voltamperogramas.....	39
II.B.2.2. Determinación de los valores de $E'_{1/2}$ .....	39
II.B.2.3. Cuantificación de ácido caféico en la tintura por medio del método de adiciones estándar.....	41
Capítulo 6. Conclusiones.....	44
Capítulo 7. Anexos	
I. Preparación de soluciones para electrolitos soporte.....	49
II. Cálculo de las concentraciones de HCl y NaOH.....	50
III. Fundamento del estudio logarítmico de los voltamperogramas.....	52
IV. Determinación de límites de detección.....	54
V. Estadística de los resultados de las curvas de valoración del ácido caféico..	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura química de los principales compuestos activos de árnica.....	6
Fig. 2. Esquema de la celda de reacción. Sistema de tres electrodos.....	12
Fig. 3. Curva de valoración ácido-base de ácido caféico.....	20
Fig. 4. Influencia del pH sobre las señales de oxidación del ácido caféico.....	26

---

Fig. 5. Influencia del material del electrodo sobre las señales de oxidación del ácido caféico.....	28
Fig. 6. Influencia de la velocidad de giro del electrodo sobre la forma de las señales de oxidación del ácido caféico.....	30
Fig. 7. Representación gráfica de la función $i_{lim} = f(\omega)$ .....	30
Fig. 8. Representación gráfica de la función $i_{lim} = f(\omega^{1/2})$ .....	31
Fig. 9. Representación gráfica de la función $i_{lim} = f([\text{ácido caféico}])$ de la primera señal de oxidación ( $E_{1/2} = 471 \text{ mV}$ ).....	35
Fig. 10. Señales de oxidación de ácido caféico en las tinturas de árnica.....	39
Fig. 11. Representación gráfica del método de adiciones patrón aplicado a la tintura A <sub>2</sub> .....	42
Fig. 12. Representación gráfica del método de adiciones patrón aplicado a la tintura A <sub>3</sub> .....	42
Fig. 13. Curva de valoración de HCl.....	50
Fig. 14. Curva de valoración de NaOH.....	51
Bibliografía.....	58

Muchos de los principios activos utilizados en el campo de la terapéutica han tenido su origen en sustancias de origen natural (mineral, vegetal, animal). Ejemplos de esto son el ácido acetilsalicílico obtenido originalmente de la especie *Filipendula ulmaria* y los analgésicos narcóticos derivados de la morfina que originalmente se obtenía de la especie *Papaver somniferum*; actualmente ambos principios activos se obtienen por medio de síntesis. Asimismo, muchos principios activos que se encuentran en forma natural también pueden ser obtenidos por medio de síntesis. Sin embargo, varias fuentes naturales de fármacos proveen compuestos que son difíciles de producir comercialmente por métodos sintéticos; estos compuestos sólo pueden ser obtenidos directamente a partir de las fuentes naturales o bien por semisíntesis (ej. antibióticos, glicósidos cardiotónicos, alcaloides del opio, alcaloides del ergot, vacunas, antitoxinas, etc.<sup>1</sup>).

En la actualidad, el uso tradicional de las plantas medicinales con fines terapéuticos es cada vez más extenso, sobre todo en países como México, cuya biodiversidad de especies y la existencia de grupos con tradición en la medicina natural, han permitido el mantenimiento y propagación de esta costumbre. De hecho, se estima que a nivel mundial el 25% de las sustancias terapéuticas utilizadas son plantas medicinales tradicionales<sup>2</sup>.

Por otro lado, se sabe que los principios activos producen acción diferente cuando se administran en su forma natural (tinturas, extractos) que cuando se administra un compuesto sintético. Esto hace pensar que el medio natural de la planta contiene otras sustancias con propiedades distintas que, al ser administradas conjuntamente con el principio activo, pueden influir en la respuesta farmacológica.

Las preparaciones galénicas (tinturas hidroalcohólicas, extractos de material de plantas) son comúnmente empleadas en muchos países, tales como China, India, Suiza, Alemania, Francia y algunos países sudamericanos. En México y Estados Unidos han recobrado popularidad como resultado del resurgimiento del interés en la medicina tradicional.

Aunque estos productos pueden presentar ventajas en proveer un número de diferentes tipos de constituyentes fisiológicamente activos, hay una frecuente dificultad para estandarizarlos, haciendo difícil tanto la identificación como la precisión en la dosis.

Salvo raras excepciones, en México y Estados Unidos no existen los estándares de calidad para medicamentos de preparación galénica. Es así que preparaciones de este tipo sólo pueden ser obtenidas de un productor que goce de buena reputación en su trabajo.

La Secretaría de Salud está próxima a editar en México la primera Farmacopea Homeopática, en la cual se mencionan algunas especificaciones para varias plantas medicinales utilizadas en el país. En la mayoría de las especificaciones existentes sólo se mencionan parámetros descriptivos para la identificación de la planta, o bien para la obtención de preparados galénicos, mas no para la cuantificación de principios activos en estos. Por otro lado, son requeridos métodos de estandarización de este tipo de preparaciones, que sean factibles de adicionar a las especificaciones ya establecidas.

Si se considera que la mayoría de las plantas medicinales utilizadas pueden tener compuestos activos con capacidad de oxidarse o reducirse directamente o de participar en reacciones de óxidorreducción, uno de los métodos de cuantificación que se presenta como óptimo es el análisis electroquímico.

El presente estudio tiene como fin contribuir al estudio de la planta *Arnica montana*.

Mediante este estudio se da inicio al desarrollo de un método de cuantificación de compuestos activos en las preparaciones galénicas de esta planta, utilizando para ello métodos electrométricos.

Este método tiene como ventaja el no requerir una separación previa de los constituyentes de la tintura para poder realizar la cuantificación de los compuestos activos, lo que implicaría un trabajo más largo, laborioso y costoso. Además, también nos permite estudiar las propiedades fisicoquímicas de las preparaciones galénicas con un mínimo de modificaciones de la mezcla original.

Se utilizó uno de los compuestos activos de la tintura (ácido caféico) como compuesto modelo para encontrar las mejores condiciones en que es posible cuantificarlo. Las condiciones encontradas se aplicaron en la cuantificación del compuesto activo en la tintura, previa identificación de éste en las tinturas por medio de cromatografía en capa fina.

Los resultados mostraron que la tintura presenta varias señales; dos de estas señales corresponden a la oxidación del ácido caféico. Se encontró que una de estas señales de

oxidación está controlada por un proceso de difusión, y es la que se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de la tintura.

Además de lograr la cuantificación del compuesto activo en la tintura, se presentan los resultados de un estudio de las propiedades ácido-base del ácido caféico, a partir del cual se obtuvieron los valores de las constantes de acidez condicionales para este compuesto. Se determinó también que estas propiedades pueden ser utilizadas para la valoración del compuesto.

## Tinturas

Se denominan tinturas a las preparaciones líquidas alcohólicas o hidroalcohólicas obtenidas mediante la extracción de material vegetal o animal, o las diluciones de los respectivos extractos. Son clasificadas en simples y compuestas según sean preparadas con una o más materias primas respectivamente.<sup>7-9</sup>

Las tinturas se obtienen principalmente por medio de maceración y percolación. En algunas preparaciones se aplica un tratamiento previo al material a ser extraído, con el fin de inactivar enzimas, triturar, desgrasar, etc.

## Ácido Caféico

Ácido 3,4-hidroxicinámico. Peso molecular, 180.16; punto de fusión, 194-198°C; cristales amarillos obtenidos a partir de soluciones acuosas concentradas. Poco soluble en agua, libremente soluble en alcohol frío; en soluciones alcalinas cambia de un color amarillo a naranja. Constituyente de plantas en las cuales se encuentra en forma de ácido clorogénico, cinarina y/o en forma libre. Se puede producir por hidrólisis del ácido clorogénico.

Este compuesto tiene varias propiedades farmacológicas. Ha sido utilizado por sus propiedades antimicrobianas y anti-inflamatorias. También se ha encontrado que posee acción antimutagénica (inhibe la peroxidación, impidiendo la formación de radicales libres)<sup>20</sup> y ayuda a combatir problemas circulatorios (inhibe la oxidación de la lipoproteína de baja densidad [LDL], evitando la formación de colesterol)<sup>21,22</sup>. Se ha mencionado en la literatura que el éster fenílico del ácido caféico (CAPE) posee actividades únicas para inhibir la HIV1-Integrasa, enzima que es necesaria para la integración del virus del SIDA al ADN humano<sup>23-25</sup>.

El ácido caféico está presente en varios productos de origen natural, como el vino tinto, ciertas plantas y algunos tés, por lo que se recomienda el consumo de estos productos sobre todo para ayudar a disminuir los problemas de circulación.

**Arnica montana**

Planta dicotiledónea de la familia de las Compuestas. La familia se divide en dos grupos: *Tubuliflorae* y *Liguliflorae*, a este último se le atribuyen propiedades estimulantes, astringentes e incluso, narcóticas.

Debido a las propiedades farmacológicas de sus constituyentes, esta planta ha sido utilizada en la medicina tradicional en forma de infusión, compresas y tinturas, principalmente en el tratamiento de golpes, torceduras e inflamaciones; también es útil para favorecer la circulación, como antiséptico, para combatir el catarro pulmonar y para mejorar casos de debilidad muscular y nerviosa, debido a su acción estimulante.

La mayoría de los estudios que han sido realizados a diferentes especies de árnica, se basan en la utilización de técnicas cromatográficas, en las que la identificación de los compuestos se realiza mediante técnicas espectroscópicas y/o por comparación con patrones<sup>3-5</sup>. Dada la complejidad de los extractos naturales, en la mayoría de los estudios se realiza un tratamiento de separación previa para separar compuestos de diferentes polaridades. Se han estudiado los componentes de esta planta en diferentes estadios de crecimiento de las plantas. Algunos compuestos que se han identificado son los siguientes:

Compuestos poliacetilénicos	trideca(1)en-pent(3,5,7,9,11)ina dienotrininas
Ésteres de fenol	4-hidroxitimoldimetileter 3-etilfenilester timolmetileter isovalerato, isobutirato, formato
Ácidos Carboxifenólicos	ácido clorogénico ácido caféico cinarina
Terpenoides	arnidiol
Otros compuestos	aminoácidos, flavonoides, taninos, resinas, aceites esenciales, carbohidratos.

Tres de los compuestos principales, cuya importancia se debe a su actividad biológica, son los ácidos carboxifenólicos.

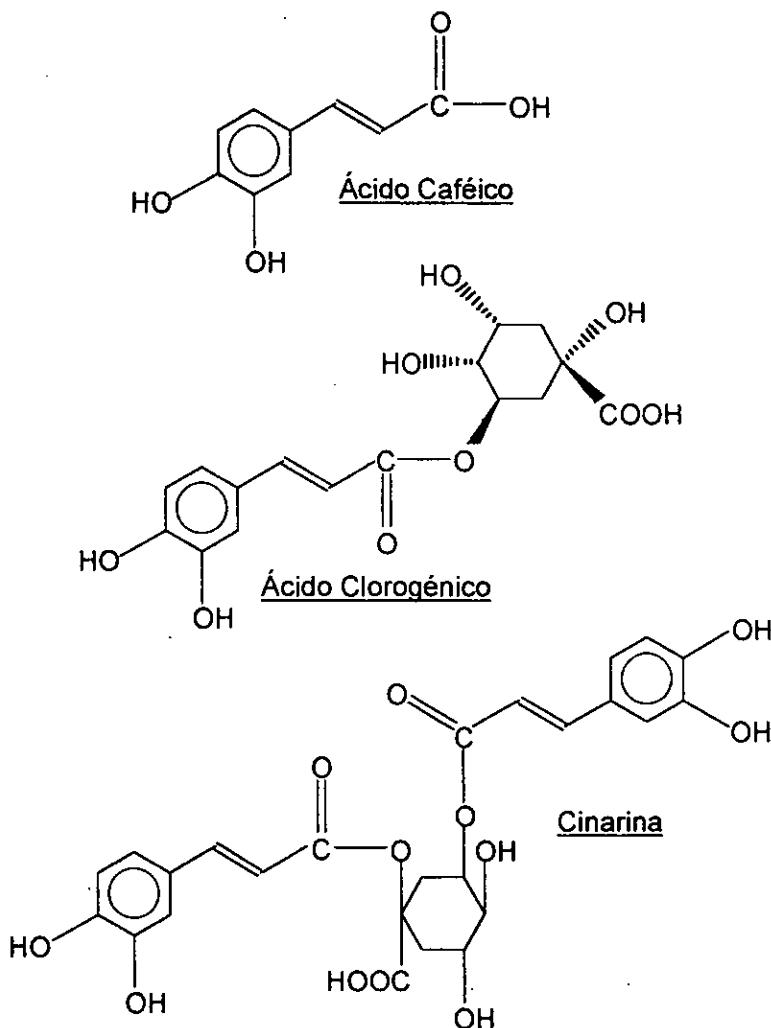


Fig. 1. Principales compuestos activos de árnica

Como se observa en la figura 1, en estos compuestos existen grupos funcionales que pueden ser oxidados o reducidos, característica que confiere a estas moléculas la capacidad



de participar en reacciones de oxidorreducción. Esta capacidad no ha sido aprovechada en los estudios que hasta ahora se han hecho sobre esta planta, y es la razón por la que se llegó a la propuesta de realizar este estudio electroquímico, ya que estos métodos se basan precisamente en la capacidad oxidorreductora de las moléculas.

Si se observa la estructura de los compuestos carboxifenólicos anteriormente mencionados, se ve que el ácido caféico es el que tiene una estructura más simple, además de formar parte de los otros dos compuestos, cinarina y ácido clorogénico. El ácido caféico puede obtenerse a partir del ácido clorogénico mediante reacciones de hidrólisis.

Existen algunas farmacopeas en las que se menciona en forma general a las tinturas; algunos parámetros que se aplican a estos preparados son densidad relativa, contenido de etanol, contenido de metanol y propanol, residuo seco, etiquetado y almacenamiento<sup>7-10</sup>. En cuanto a la planta de árnica, algunas otras farmacopeas mencionan su descripción física y la forma de preparación de la tintura<sup>10-15</sup>. En lo que se refiere a la tintura de árnica en particular, se encontró que dos farmacopeas mencionan la preparación de la tintura, algunas características físicas de ella y su forma de almacenamiento<sup>16,17</sup>. Finalmente se encontró que solamente en la farmacopea de Suiza y de Alemania (países donde la medicina tradicional tiene gran importancia), se mencionan métodos químicos y cromatográficos para las pruebas de identificación; en ellos se utiliza, entre otros compuestos, ácido caféico sintético como una de las referencias.<sup>18,19</sup>

Sin embargo, nada se menciona en relación a la forma de cuantificar o estandarizar la tintura. Esta es otra de las razones por la cual se proponen en este trabajo métodos voltamperométricos como una alternativa de estandarización de estos preparados farmacéuticos, utilizando en este caso ácido caféico como referencia para el estudio del árnica.

Este método tiene como ventajas, entre otras, el no requerir necesariamente la separación previa de los constituyentes para la identificación, además de que el parámetro de medición (intensidad de corriente en este caso) presenta respuesta aditiva. Esto facilita la cuantificación en presencia de otros constituyentes en la solución, proveniente de la mezcla original.

## **Objetivo General**

Proponer un método de cuantificación del principio activo de la tintura de árnica, basada en métodos electroquímicos de análisis, sin tener que realizar un laborioso tratamiento previo de aislamiento de los principios activos que se encuentran en la tintura.

## **Objetivos Específicos**

Utilizar el principio activo de la planta ( ácido caféico ), como compuesto modelo para la determinación cuantitativa de la tintura.

Realizar un estudio electroquímico del ácido caféico, para determinar las condiciones óptimas en que es posible cuantificarlo.

Estudiar la tintura de árnica mediante técnicas electroquímicas, y determinar el principio activo expresándolo como el contenido de ácido caféico en ella.

## 4.1. Reactivos

Ácido acético Q. P.	Merck
Ácido bórico R. A.	Mallinckrodt
Ácido caféico R. A.	Aldrich
Ácido clorhídrico R. A.	J. T. Baker
Ácido fosfórico R. A.	J. T. Baker
Ácido nítrico R. A.	Merck
Carbonato de Potasio Q. P.	Merck
Hidróxido de sodio R. A.	J. T. Baker
Nitrato de potasio R. A.	J. T. Baker
Solución Buffer pH $4 \pm 0.02$ (20°C)	Merck
Solución Buffer pH $7 \pm 0.02$ (20°C)	Merck
Solución Buffer pH $10 \pm 0.05$ (20°C)	Merck
Etanol R. A.	Merck
Metanol R. A.	J. T. Baker
Nitrógeno de alta pureza	Linde
Placas de gel de sílice 60 F <sub>854</sub> 0.2mm espesor	Merck
Tintura de árnica obtenidas a partir de la planta total	

### Marcas:

Schussler

Weleda

Agua destilada

## 4.2. Equipo

Balanza Analítica Mettler AE240

pHmetro Tacussel Beckman Century SS-1

Potenciostato Tacussel tipo PRG5

Graficador Yokohama tipo 3036X-Y-Recorder

Milivoltímetro Tacussel Electronic tipo S6N

Electrodo combinado de Ag/AgCl Metrohm

Electrodo de referencia: Ag/AgCl/ KCl<sub>sat</sub> 3M Copenhagen XR120

Electrodo auxiliar: Platino

Electrodos de trabajo:

Electrodo de Gota de Mercurio

Electrodo de Disco Giratorio de Platino (superficie teórica = 3.8 mm<sup>2</sup>)

Electrodo de Disco Giratorio de Oro (superficie teórica = 3.8 mm<sup>2</sup>)

Agitador magnético con barra

Estufa

Desecador

### 4.3. Material de laboratorio

Vasos de precipitado, vidrios de reloj, matraces volumétricos, matraces erlenmeyer, pipetas, micropipeta, bureta, probeta, espátula, celda electroquímica, soportes, anillos, etc.

#### **4.4. Metodología**

Durante este trabajo se estudiaron dos tinturas de árnica. Se utilizaron como referencia soluciones hidroalcohólicas de ácido caféico de concentración conocida. Para la preparación de cada solución de ácido caféico se pesaron cantidades adecuadas de este reactivo con el fin de obtener concentraciones del orden de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M; se disolvieron con una mezcla de etanol-agua (50:50) (ya que este reactivo no es totalmente soluble en agua), y se llevó después al aforo con esta misma mezcla. Además de ayudar a la disolución de la muestra, la mezcla de etanol-agua es adecuada para simular el entorno del compuesto en la tintura, pues el disolvente de extracción en estas últimas es precisamente una mezcla hidroalcohólica. Se utiliza el mismo procedimiento para las soluciones utilizadas en las técnicas electroanalíticas, en las cuales se trabaja en un electrolito acuoso en el que se hacen las adiciones del analito disuelto en la mezcla; también es posible trabajar todo el tiempo con la mezcla etanol-agua.

**Montaje del Equipo**

Para el trazo de las curvas Intensidad-Potencial se utilizó un sistema de tres electrodos que fueron montados según la figura 2:

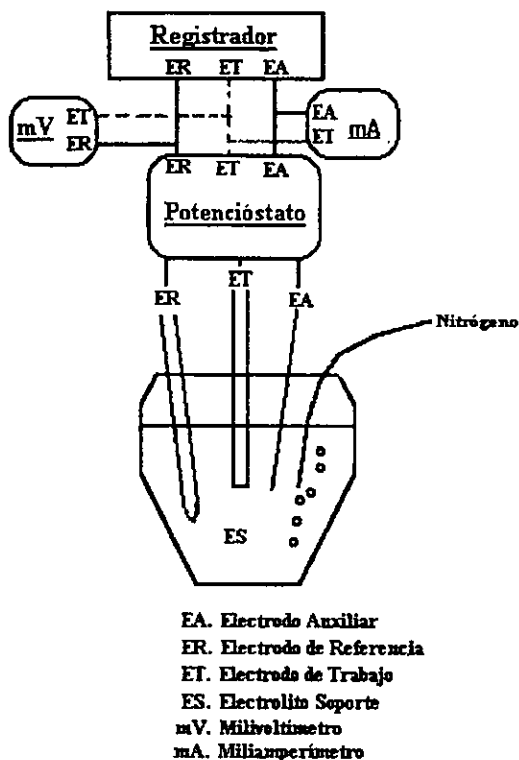


Fig. 2. Esquema de la celda de reacción. Sistema de tres electrodos.

**Determinación del dominio de electroactividad.**

En todos los casos, se coloca en la celda una cantidad conocida del electrolito soporte, se elimina el oxígeno disuelto en el electrolito mediante el burbujeo de nitrógeno durante tiempo suficiente (10-15 minutos). Después de esto, el nitrógeno se mantiene sobre la solución durante toda la sesión para mantener una atmósfera libre de oxígeno y evitar que el oxígeno se disuelva nuevamente. Posteriormente se traza el polarograma respectivo.

Cuando se utiliza el electrodo de gota de mercurio (EGM), el dominio de electroactividad está determinado por los potenciales correspondientes a la oxidación del mercurio y a la reducción del medio de reacción, respectivamente.

En el caso de la utilización de electrodo sólido las barreras están determinadas por los potenciales correspondientes a la oxidación y reducción del medio de reacción.

Se trabajaron dos electrolitos soportes (preparación descrita en el Anexo I),  $\text{KNO}_3$  0.1 M y solución reguladora Britton-Robinson, esta última a diferentes condiciones de pH.

Los potenciales de barrera experimentales para los distintos electrodos utilizados son los que se muestran en la tabla siguiente:

<b>Potenciales de barrera (vs Ag/ AgCl/ <math>\text{KCl}_{aq}</math> 3M)</b>					
<b>Electrodo</b>	<b>Electrolito soporte</b>	<b>pH</b>	<b>Barrera Catódica</b>	<b>Barrera Anódica</b>	<b><math>\Delta E</math> (mV)</b>
EGM	$\text{KNO}_3$ 0.1 M	6.0	-1800 mV	450 mV	2250 mV
EGD Grafito	$\text{KNO}_3$ 0.1 M	6.0	-1500 mV	1170 mV	2670 mV
EGD Oro	B-R 0.1 M	1.5	-330 mV	1450 mV	1780 mV
	B-R 0.1 M	3.5	-470 mV	1400 mV	1870 mV
	B-R 0.1 M	6.2	-680 mV	1200 mV	1880 mV
	B-R 0.1 M	10.7	-900 mV	900 mV	1800 mV
EGD Platino	B-R 0.1 M	1.5	-300 mV	900 mV	1200 mV
<i>EGM. Electrodo de gota de mercurio</i>					
<i>EGD. Electrodo giratorio de disco</i>					
<i>B-R. Solución reguladora Britton-Robinson</i>					

Nota: Se consideró la barrera cuando  $I = 1 \mu\text{A}$

## **Sistema de ácido caféico**

Para el sistema del ácido caféico se realizó la valoración del compuesto. Posteriormente se hizo el estudio electroquímico.

En lo que se refiere a la parte electroquímica, se realizó un estudio polarográfico para tratar de observar señales de reducción, mas no se detectó ninguna. Posteriormente se hicieron estudios voltamperométricos preliminares con distintos electrodos de disco giratorio (grafito, oro, platino). Los resultados son similares para estos tres electrodos, detectándose señales de oxidación. Con electrodo de oro se realizó un estudio de la influencia del pH sobre la forma de las curvas. Se observó que la utilización continua de los electrodos sólidos producía problemas de adsorción, y se determinó que en el electrodo de platino los problemas de adsorción interfieren menos en el aspecto de las señales. Una vez elegido el pH y el electrodo adecuado, se realizaron experimentos haciendo variar la velocidad de barrido, para determinar si las reacciones están controladas por difusión o no y en su caso, si pueden ser utilizadas para determinaciones analíticas.

Finalmente se realiza el experimento para determinar el efecto de la concentración de ácido caféico sobre la intensidad de las señales, y observar si hay una proporcionalidad lineal. También se obtuvo el límite de detección.

### **Valoración ácido-base del ácido caféico.**

Se preparó una disolución de ácido clorhídrico 0.02 M, que fue titulada volumétricamente con una cantidad conocida de  $K_2CO_3$  anhidro disuelto en 10 mL de agua.

Se preparó también una disolución 0.02 M de NaOH, normalizándola posteriormente con la solución de ácido clorhídrico anteriormente valorada.

Finalmente se llevó a cabo la valoración del ácido caféico. Para esto se pesaron cantidades convenientes de ácido caféico y se disolvieron con 10 mL de mezcla etanol:agua (50:50), con el fin de obtener concentraciones del orden de  $1 \times 10^{-2}$  M. Posteriormente se procedió a valorar con una disolución normalizada de NaOH.



## **Estudio electroquímico**

### **Polarografía**

Se utilizó  $\text{KNO}_3$  0.1 M como electrolito soporte. Se realizaron adiciones del ácido caféico trazando polarogramas a diferentes concentraciones. En el caso de ácido caféico no se detectaron señales.

### **Voltamperometria**

En el estudio voltamperométrico del compuesto modelo (ácido caféico), se determinó que los voltamperogramas se obtienen mejor bajo las condiciones siguientes:

Electrodo de platino

Solución Britton-Robinson pH 1.5 como electrolito soporte

Bajo estas condiciones se realizaron los experimentos del efecto de la concentración del analito. Se verificó que existe una relación lineal entre la intensidad de corriente y la concentración de ácido caféico; se evalúan la desviación estándar y el límite de detección.

### **Influencia del pH**

Se utilizó como electrolito soporte una solución buffer Britton-Robinson, ajustando a distintos valores de pH mediante la adición de NaOH diluido. Se realizaron experimentos realizando adiciones de ácido caféico al electrolito soporte de pH constante, observando el comportamiento de la señal sobre electrodo de oro y haciendo variar el valor de pH en cada experimento. Para cada valor de pH se observaron los cambios en la forma de las señales y el valor de  $E'_{1/2}$ . Se determinó que a pH ácido (alrededor de 1.5) se observan mejor las señales.

Influencia del material del electrodo

Se obtuvieron voltamperogramas sobre electrodos de platino y de grafito, que se compararon con los obtenidos sobre oro. Se observa que la forma de los voltamperogramas sobre el electrodo de platino es mejor que sobre los otros. Se determina el potencial de media onda de cada una de las señales de oxidación sobre este electrodo.

Estudio de las señales voltamperométricas sobre electrodo de platino*Influencia de la velocidad de giro del electrodo de platino (velocidad angular  $\omega$ ).*

Este experimento se realizó con el fin de elucidar si el proceso depende de la difusión o tiene complicaciones cinéticas.

A una concentración constante del analito y a pH ácido, se trazaron voltamperogramas sobre el electrodo de platino haciendo variar la velocidad de giro del electrodo de platino y con los datos se obtuvieron posteriormente las gráficas de las funciones  $i = f(\omega)$ ,  $i = f(\omega^{1/2})$ , ya que en régimen de difusión convectivo sobre electrodos sólidos planos, la ecuación de Levich indica que la intensidad varía proporcionalmente con la función  $\omega^{1/2}$ .

$$I = 0.62nSF D^{2/3} \cdot \omega^{1/2} \nu^{-1/6} C$$

donde:

- n. número de electrones intercambiados
- S. área del electrodo
- F. constante de Faraday
- D. coeficiente de difusión del analito
- $\omega$ . velocidad angular del electrodo
- $\nu$ . viscosidad cinemática del medio
- C. concentración del analito

*Efecto de la concentración de ácido caféico sobre la intensidad de corriente*

Se trazaron los voltamperogramas sobre el electrodo de platino, a pH = 1.5, para distintas concentraciones del analito en la celda de reacción. Se trazaron gráficas de la función  $i_{lim} = f(\text{concentración del ácido caféico})$  y se calculó a partir de los datos el límite de detección para el ácido caféico.

## **Sistema de árnica**

### **Identificación de ácido caféico en las tinturas**

En una placa de gel de sílice de 20 mm X 50mm se aplicó una muestra de cada una de las tinturas de árnica y una muestra de una solución de ácido caféico. Se utilizó metanol como disolvente de elución y luz UV como revelador. Al comparar las tinturas con el ácido caféico utilizado como referencia, se observó que, efectivamente, las tinturas contienen ácido caféico, además de otros compuestos.

### **Estudio electroquímico**

En cuanto al sistema de árnica, se realizó tanto el estudio polarográfico como el voltamperométrico. Se detectaron señales de reducción y de oxidación. La señal de oxidación se asoció con ácido caféico, debido a la similitud de su aspecto y de los valores de potencial de media onda. Por lo tanto, establecidas las condiciones para la mejor determinación de ácido caféico, se realizó su cuantificación en la tintura con el método de adiciones patrón; las medidas se realizaron sobre la señal de oxidación.

#### **Polarografía**

Se utilizó  $\text{KNO}_3$  0.1 M como electrolito soporte. Se realizaron adiciones de la tintura de árnica y se trazaron polarogramas a diferentes cantidades agregadas de tintura. Se detectaron señales de reducción y oxidación. Las señales de reducción presentaron problemas de adsorción o cinéticos, por lo que su estudio se suspendió. La señal de oxidación para la tintura de árnica está muy cerca de la barrera de oxidación del mercurio, por lo que su estudio resulta complicado.

## Voltamperometría sobre electrodo de platino a pH = 1.5

En el estudio voltamperométrico del compuesto modelo (ácido caféico), se determinó que los voltamperogramas se obtienen mejor bajo las condiciones siguientes:

Electrodo de platino

Solución Britton-Robinson pH 1.5 como electrolito soporte

Bajo estas condiciones se estudió el número de señales en los voltamperogramas de la tintura de árnica, y se determinaron los potenciales condicionales de media onda para las señales. Finalmente, bajo estas mismas condiciones se determinó la cantidad de ácido caféico en la tintura por el método de adiciones patrón.

Determinación de la cantidad de ácido caféico en las tinturas. Método de adiciones patrón .

Se trazó el voltamperograma correspondiente al electrolito soporte (pH = 1.5). Se colocó una alícuota de volumen conocido de la tintura de árnica sobre el electrolito soporte y se trazó el voltamperograma correspondiente sobre el electrodo de platino. Después de esto se realizaron adiciones de una solución de ácido caféico de concentración conocida, trazando los voltamperogramas respectivos a cada adición. Se obtuvo, a partir de los datos de los voltamperogramas, una curva de la forma  $i_{lim} = f$  (concentración de ácido caféico agregado). Se hizo corresponder el valor de intensidad de la alícuota de la tintura con un valor de concentración de ácido caféico igual a cero. A partir de los parámetros de la gráfica se determinó la cantidad de principio activo en la tintura expresando el contenido de ácido caféico en ella.

**I. Sistema de ácido caféico**

**I.A. Valoración ácido-base del ácido caféico**

Las gráficas correspondientes a las valoraciones previas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio se encuentran en el Anexo II.

A continuación se presenta el esquema de valoración del ácido caféico (figura 3):

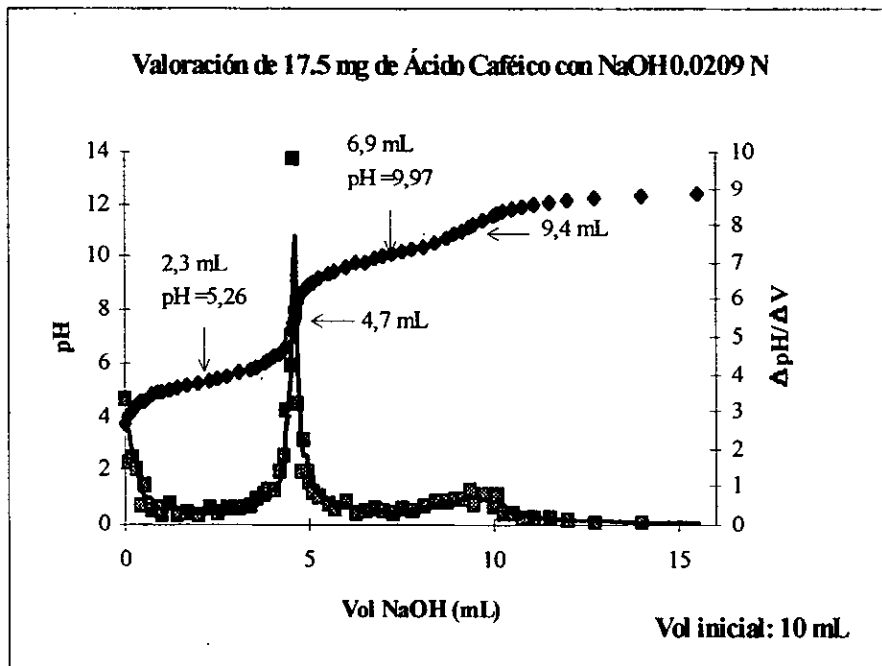
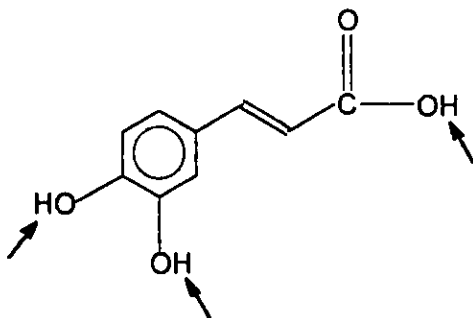


Fig. 3. Curva de valoración ácido-base del ácido caféico

La curva de valoración tiene un comportamiento que corresponde al de la valoración de un ácido diprótico, ya que se observan dos saltos importantes de pH, uno a un volumen de 4.7 mL y el otro alrededor de 9.4 mL. Esto indica que han sido neutralizados dos protones. El protón valorado en el primer punto de equivalencia tiene una fuerza ácida mayor que el valorado en el segundo.

## II.A.1. Grupos ácidos valorados

Si se considera la estructura del ácido caféico, se ven los sitios ácidos susceptibles de reaccionar en presencia de hidróxido de sodio.



Las flechas marcan los sitios de valoración susceptibles a ser neutralizados: el protón del grupo carboxílico y los protones fenólicos.

De estos dos tipos de protones, el más ácido es el protón del grupo carboxilo, por lo que podemos decir que es el que se valora en el primer punto de equivalencia.

Respecto al segundo punto de equivalencia, se observa que se gasta prácticamente el mismo volumen de iones hidroxilo que para el primero. Después del segundo salto de pH no existe otro punto de equivalencia más. Esto significa que solamente uno de los protones fenólicos es valorado, sin llegar a neutralizar el segundo grupo fenólico.

Los resultados son congruentes con el comportamiento teórico esperado, es decir, que al tener dos grupos -OH, la acidez del segundo grupo fenólico disminuye por la formación de puentes de hidrógeno con el oxígeno del fenolato formado. Además, de estos dos grupos fenólicos, el colocado en posición *para* al sustituyente R tiene un efecto resonante mayor, por lo que al ionizarse, es más estable comparado con el grupo hidroxilo en posición *meta* al sustituyente R.

**I.A.2. Cálculo de la pureza del ácido caféico**

$$9.4 \text{ mL de NaOH} * \frac{0.02091 \text{ meq NaOH}}{1 \text{ mL NaOH}} * \frac{1 \text{ meq ac. caféico}}{1 \text{ meq NaOH}} * \frac{1 \text{ mmol ac. caféico}}{2 \text{ meq ac. caféico}} = 0.0962 \text{ mmol ac. caféico}$$

Tomando en consideración el peso molecular del ácido caféico:

$$0.0962 \text{ mmol ac. caféico} * \frac{180.16 \text{ mg ac. caféico}}{1 \text{ mmol ac. caféico}} = 17.33 \text{ mg ac. caféico}$$

Esto corresponde a la cantidad de ácido caféico experimental.

Con el dato de la cantidad pesada de ácido caféico (17.5 mg) se obtiene el porcentaje de pureza:

$$\frac{17.33 \text{ mg experimentales}}{17.5 \text{ mg teóricos}} * 100 \% = 99.03 \%$$

Para poder plantear un estudio estadístico se realizaron varias valoraciones independientes. A partir de los resultados obtenidos en estos experimentos (ver Anexo V), encontramos finalmente un intervalo de pureza del analito, establecida mediante este método, que se halla en el intervalo siguiente:

$$X_M \pm \sigma = 98.54 \pm 3.40 \quad (n = 3)$$

donde:

$X_M$  = valor promedio de los datos

$\sigma$  =  $ts/\sqrt{n}$

$t$  =  $t$  de student para  $n-1$ , 90% de confianza

$s$  = desviación estándar de los datos

$n$  = número de valoraciones realizadas

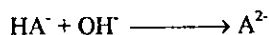
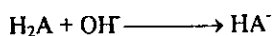


### LA.3. Obtención de valores de pKa' del ácido caféico

Los valores de pKa' para el ácido caféico no están reportados en la literatura, pero se puede obtener una aproximación de ellos al observar la curva experimental de valoración y si se considera lo mencionado respecto al orden de valoración de los protones ácidos.

En la gráfica de valoración presentada, para  $x = 0.5$  y  $x = 1.5$  ( $x$ : fracción valorada), se obtienen los valores de pH que serían los correspondientes a los valores de pKa' para las especies diprótica y monoprótica de este ácido.

Planteados los siguientes equilibrios ácido-base:



Ya que en el curso de la valoración se tiene:

$$\text{para } 0 < x < 1 \quad \text{pH} = \text{pKa}' + \log \left[ \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]} \right]$$

y justo a la mitad de la valoración  $\text{pH} = \text{pKa}'$ . Los valores de pKa' correspondientes serían, para esta curva de valoración:

$$\text{pKa}'_1 \quad \text{H}_2\text{A} / \text{HA}^- = 5.33$$

$$\text{pKa}'_2 \quad \text{HA}^- / \text{A}^{2-} = 9.97$$

A partir de las distintas curvas de valoración obtenidas, también se establece un intervalo de confianza de los valores de pKa' obtenidos en estas condiciones. Estos son los siguientes:

$$\text{pKa}'_1 \quad \text{H}_2\text{A} / \text{HA}^- :$$

$$X_M \pm \sigma_{90\%} = 5.38 \pm 0.27 \quad (n = 3)$$

$$\text{pKa}'_2 \quad \text{HA}^- / \text{A}^{2-} :$$

$$X_M \pm \sigma_{90\%} = 9.95 \pm 0.03 \quad (n = 3)$$

Con base en lo mencionado en la literatura<sup>26</sup>, el primer pKa' tiene un valor semejante al de un ácido carboxílico y el segundo al de un fenol, lo que ratifica lo planteado previamente.

**I.A.4. Fuerza del ácido caféico**

Podemos observar también que la forma de la curva obtenida por los datos experimentales, en la primera parte de la valoración, es semejante a la forma de la curva de valoración que presentan los ácidos débiles. Si esto es cierto, tomando como base la ecuación de un ácido débil al inicio de la valoración, podemos plantear para el ácido caféico:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} [ (\text{pKa}'_1 \pm \Delta\text{pKa}'_1) - \log (C_0 \pm \Delta C_0) ]$$

Si:

$$\text{pKa}'_1 \pm \Delta\text{pKa}'_1 = 5.38 \pm 0.27 \text{ y}$$

$$\log (C_0 \pm \Delta C_0) = -2.02 \pm 0.01$$

entonces:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} [ (5.38 \pm 0.27) - (-2.02 \pm 0.01) ]$$

$$\text{pH} = 3.70 \pm 0.14$$

Este es el valor teórico de pH que adoptaría un ácido débil en estas condiciones de concentración y valor de pKa. Experimentalmente se encontró que al inicio de la valoración existe un pH = 3.72. Esto es comparable con el valor obtenido con la fórmula teórica.

## I.B. Estudio Electroquímico

### I.B.1. Polarografía

No se observaron señales de reducción del ácido caféico. Se observó una señal de oxidación muy cercana a la barrera anódica, lo que dificulta su estudio y posible aplicación con fines de análisis.

Con el fin de ampliar el dominio en la región de oxidación y poder observar mejor la señal se realizó el estudio voltamperométrico con electrodo sólido.

### I.B.2. Voltamperometría

Se probaron distintos electrodos giratorios de disco: grafito, oro, platino. Los resultados en cada uno de ellos son similares. Se observan señales de oxidación en el intervalo de 100 a 800 mV con respecto al electrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{0.3}\text{M}$ , según sea el valor de pH en el medio de reacción. La utilización continua de los electrodos se ve afectada por problemas de adsorción del compuesto sobre ellos. Al utilizar un electrodo diferente o recién tratado (limpiado), la adsorción no se hace evidente al inicio, pero se manifiesta después de cierto número de experimentos. Para remover el material adsorbido de la superficie del electrodo fue necesario darle un tratamiento de exposición a ácido nítrico durante un tiempo suficiente (5 min) y un lavado posterior con agua destilada; se hizo esto antes de cada experimento.

Se realizó el estudio de la influencia de pH sobre las señales en electrodo de oro. A partir de este estudio se dedujo que el pH en el cual se observan mejor las señales es a  $\text{pH} = 1.5$ .

Se realizó también el estudio de la influencia del material del electrodo. En los resultados se observó que los problemas de adsorción sobre el electrodo de platino interfieren menos en el aspecto de las señales, por lo que el resto de los estudios se realizaron sobre este electrodo.

#### I.B.2.1. Influencia del pH

A continuación se presentan los resultados de la influencia del pH del medio de reacción sobre las señales de oxidación del ácido caféico, obtenidas sobre electrodo de oro.

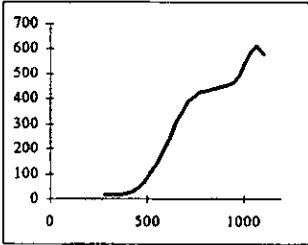
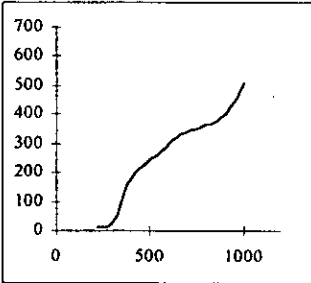
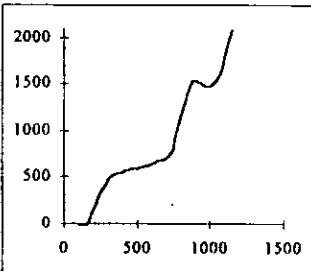
pH	Forma de los voltamperogramas [Ácido Caféico] = 4.5 ppm I (nA) vs E (mV) Velocidad de barrido: 4 mV/s Velocidad de giro del electrodo : 1500 rpm	Comentarios	E' <sub>1/2</sub> 1ª señal
1.5		Se observan dos señales de oxidación del ácido caféico. La primera señal tiene forma de meseta y la segunda forma de pico. Se obtiene el valor de E' <sub>1/2</sub> para la primer señal de oxidación.	612 mV
3.5		Se observan dos señales de oxidación, ambas tienen forma de meseta a este valor de pH. No es fácil distinguir en qué potencial se separan las dos señales. Se obtiene el valor de E' <sub>1/2</sub> para la primer señal de oxidación. Las intensidades de corriente son menores que a pH = 1.5.	358 mV
6.2		Se observan dos señales de oxidación. La primera señal tiene forma de meseta y la segunda forma de pico. Se determina el E' <sub>1/2</sub> para la primer señal.	231 mV
10.7.	Pueden observarse señales de oxidación, pero no están definidas. Al aumentar la concentración de ácido caféico en la celda no se ve efecto en la intensidad de la corriente.		No se determinó

Fig. 4. Influencia del pH sobre las señales de oxidación del ácido caféico

Los valores de  $E'_{1/2}$  mencionados en la figura 4, se determinaron realizando el estudio logarítmico de los voltamperogramas. En el anexo III se presenta la base teórica de este estudio.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se concluye que el valor de  $E'_{1/2}$  está en función del pH.

Se observa que la reacción de oxidación se realiza más fácilmente a valores alcalinos de pH, ya que la sobretensión es menor. Datos de la literatura indican que la oxidación de compuestos derivados de fenol se oxidan liberando protones<sup>31</sup>, por lo tanto un medio de reacción alcalino facilita la reacción. No obstante, se observa que a valores ácidos de pH se definen mejor las curvas de oxidación, a pesar de que la segunda curva está en forma de pico en estas condiciones y las intensidades de corriente son mayores, por ello es conveniente realizar las determinaciones de ácido caféico a un pH ácido (alrededor de 1.5).

### **I.B.2.2. Influencia del material del electrodo**

Una vez determinadas las condiciones de pH óptimas para el trazo de los voltamperogramas, se hizo la comparación de las señales de oxidación obtenidas sobre electrodo de oro con las señales obtenidas sobre electrodo de platino. Se observó que los problemas de adsorción sobre el electrodo de platino interfieren menos sobre la forma de las señales.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en este estudio.

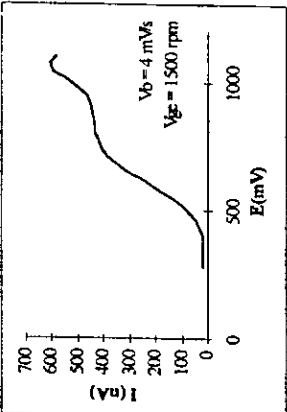
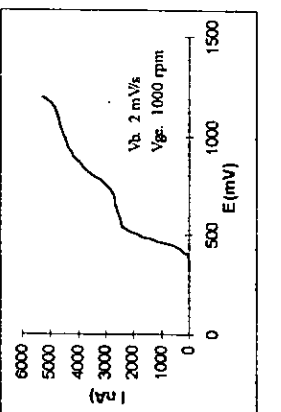
Material del electrodo	Voltamperogramas I (nA) vs E (mV)	Comentarios	$E'_{1/2}$
Oro	<p>[Ácido Caféico] = 4.4 ppm</p> 	Se observan dos señales de oxidación del ácido caféico. La primera señal tiene forma de meseta y la segunda forma de pico. Se obtiene el valor de $E'_{1/2}$ para la primer señal de oxidación.	1ª señal 612 mV
Platino	<p>[Ácido Caféico] = 18 ppm</p> 	La velocidad de barrido ( $V_b$ ) se disminuyó de 4 mV/s en oro a 2 mV/s en platino ( con el fin de disminuir la caída ohmica); la velocidad de giro del electrodo ( $V_{gc}$ ) se disminuyó de 1500 a 1000 rpm. Efectivamente, observamos que estos cambios se traducen en el hecho de que las señales de oxidación se definen mejor con respecto a las obtenidas en electrodo de oro. Ahora observamos que hay dos señales de oxidación en forma de meseta y están lo suficientemente separadas para diferenciarse una de la otra. Se determina el $E'_{1/2}$ para ambas señales.	1ª señal 471 mV  2ª señal 809 mV

Fig. 5. Influencia del material del electrodo sobre las señales de oxidación del ácido caféico

Se observa en la figura 5 que al utilizar electrodo de platino la forma de las señales se define aún más, en comparación con las obtenidas con electrodo de oro.

Observamos que con el electrodo de platino los problemas de adsorción son mucho menores en comparación con el electrodo de oro.

Se logra obtener una señal en forma de meseta con electrodo de platino para la segunda reacción de oxidación, la cual se presenta en forma de pico con oro debido a la adsorción del compuesto sobre este último electrodo.

La sobretensión sobre el electrodo de platino es menor que sobre el electrodo de oro, pues el potencial de media onda para la primer señal de oxidación es menor en el electrodo de platino que en oro; es decir, la oxidación se realiza más fácilmente sobre el electrodo de platino.

Así, para la realización de los siguientes experimentos, se ha utilizado electrodo de platino.

### **1.B.2.3. Estudio de las señales voltamperométricas sobre electrodo de platino, a pH 1.5**

#### **1.B.2.3.1. Influencia de la velocidad de giro del electrodo**

En esta serie de experimentos se hizo variar la velocidad de giro del electrodo a una concentración constante de ácido caféico, y se trazaron los voltamperogramas correspondientes a cada una de las velocidades de giro. Los voltamperogramas obtenidos se muestran en la figura 6:

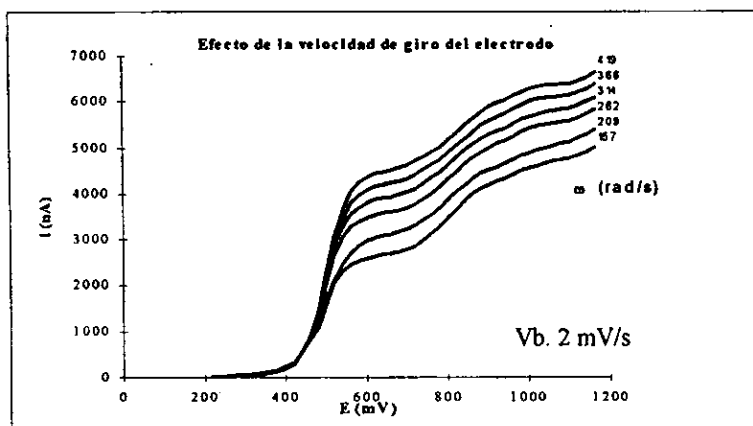


Fig. 6. Influencia de la velocidad de giro del electrodo sobre la forma de las señales de oxidación del ácido caféico.

En todos los casos se observan las dos señales. La primera de ellas crece al aumentar la velocidad de giro del electrodo. En cuanto a la segunda señal, parece no aumentar con la velocidad de giro del electrodo.

Las gráficas siguientes muestran el efecto que tuvo la velocidad de giro del electrodo sobre la intensidad de corriente de las señales al graficar tanto la función  $i = f(\omega)$  como la función  $i = f(\omega^{1/2})$ .

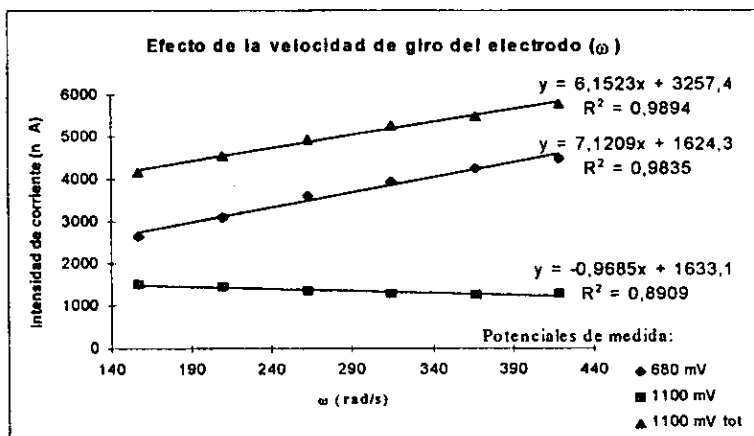


Fig. 7. Representación gráfica de la función  $i_{lim} = f(\omega)$



Se observa en la figura 7 que, aunque la intensidad de corriente aumenta con la velocidad angular del electrodo para la primer señal y la señal total, no se da este comportamiento en forma lineal. Para la segunda señal no aumenta el valor de la intensidad, sino que prácticamente se mantiene constante. Además, en ninguno de estos tres casos la constante de regresión indica un comportamiento lineal.

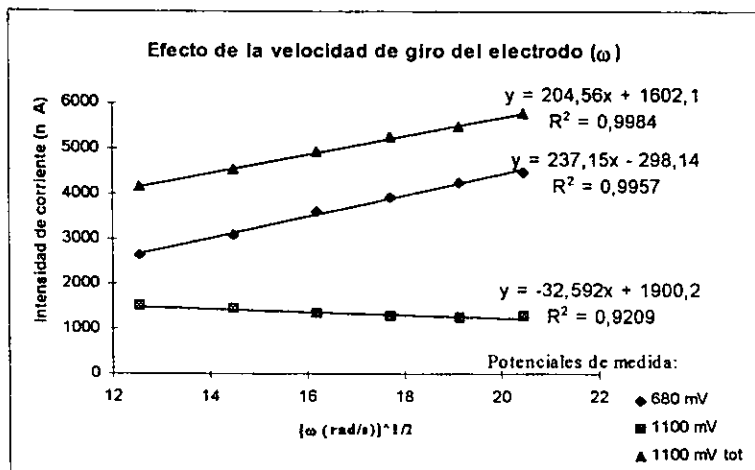


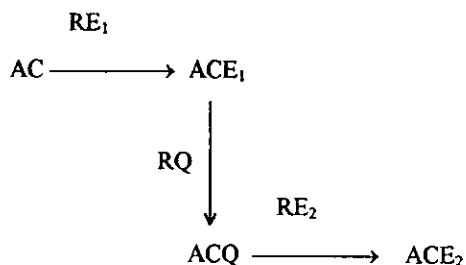
Fig. 8. Representación gráfica de la función  $i_{lim} = f(\omega^{1/2})$

En esta segunda gráfica (figura 8) se observa que la intensidad es linealmente proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad angular para la primer señal de oxidación dado que el valor de la constante de correlación para este caso es cercano a la unidad.

El hecho de que haya esta proporcionalidad con esta función de la velocidad angular ( $\omega^{1/2}$ ), implica que la reacción de oxidación que se está llevando a cabo está controlada por un proceso de difusión<sup>30</sup> y sigue la ecuación de Levich, de manera que esta señal puede ser utilizada para la determinación cuantitativa del compuesto.

En cuanto a la segunda señal, podemos observar que la intensidad atribuida a la segunda oxidación no aumenta con la velocidad angular, sino que tiende a permanecer constante o bien disminuir ligeramente. Esto nos hace a pensar que es posible que haya una reacción química acoplada y que, por lo tanto, la segunda reacción de oxidación dependa de un proceso cinético.

Puede ser posible un mecanismo de reacción como el que se propone en el siguiente esquema:



Siendo:

AC. Ácido Caféico en forma reducida

ACE<sub>1</sub>. Ácido Caféico producto de la primer oxidación electroquímica

ACQ. Producto modificado por reacción química

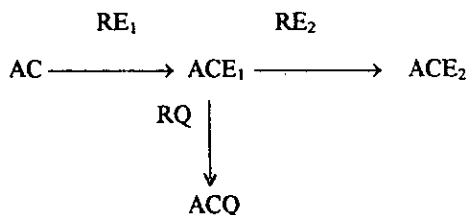
ACE<sub>2</sub>. Último producto de oxidación, obtenido por una segunda oxidación electroquímica

RE. Reacción electroquímica

RQ. Reacción química

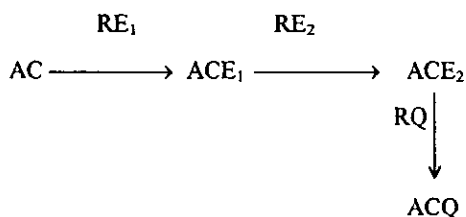
La primera reacción se lleva a cabo por una oxidación electroquímica del ácido caféico, que está controlada por un proceso de difusión, es decir, por la concentración del ácido caféico. El producto de esta primera reacción sufre una modificación debido a una segunda reacción química en disolución, lo cual implica un proceso cinético. El producto de esta reacción química es electroactivo y puede ser detectado en la segunda señal electroquímica.

Otro de los mecanismos posibles de oxidación puede ser el siguiente:



En este segundo caso, lo que se plantea es que la primera reacción electroquímica de oxidación del ácido caféico se lleve a cabo por un proceso de difusión simple para producir el primer producto de oxidación (ACE<sub>1</sub>). Una vez formado este compuesto existe la posibilidad de que pueda ser oxidado directamente a ACE<sub>2</sub> en forma electroquímica, pero también es susceptible de reaccionar químicamente en solución. Esto implica una competencia entre el segundo proceso electroquímico y la reacción química en solución.

Finalmente, se propone un último mecanismo:



En este caso, lo que se plantea es que se lleven a cabo dos reacciones electroquímicas consecutivas, y el último producto de oxidación, ACE<sub>2</sub>, sea el que reaccione químicamente en solución inmediatamente después de la oxidación, y debido a esto la segunda señal que se detecta no crece proporcionalmente, pues está desapareciendo del electrodo al reaccionar químicamente.

En la gráfica de intensidad en función de  $\omega^{1/2}$ , se observa que cuando se aumenta la velocidad de barrido, la señal correspondiente a la segunda reacción electroquímica ya no

crece, sino que se mantiene constante o bien tiende a disminuir. El que la intensidad de la segunda señal no aumente con la velocidad de giro del electrodo nos hace volver a pensar que es posible que haya una reacción química y que, por lo tanto, la segunda oxidación electroquímica involucra un proceso cinético.

Por las razones antes mencionadas, la segunda señal de oxidación no puede ser utilizada de forma simple para la cuantificación del compuesto, puesto que involucra un proceso químico. La señal total (o aditiva), presenta un comportamiento lineal al aumentar la velocidad de giro del electrodo, pero al depender de la señal no controlada por difusión, tampoco puede ser empleada por ahora para la cuantificación del compuesto.

Así pues, se muestra la conveniencia de utilizar la primer señal de oxidación del ácido caféico, que está controlada por un proceso de difusión convectiva, para la determinación cuantitativa del compuesto en las tinturas.

**I.B.2.3.2. Variación de la intensidad de corriente en función de la concentración. Límite de detección**

El experimento se realizó bajo las siguientes condiciones:

pH = 1.5

Electrodo giratorio de platino como electrodo de trabajo

Se utilizó la primer señal de oxidación, la cual es controlada por difusión convectiva.

El efecto de la concentración de ácido caféico sobre la intensidad de la corriente de estas señales de oxidación, corresponde al esquematizado en la siguiente gráfica:

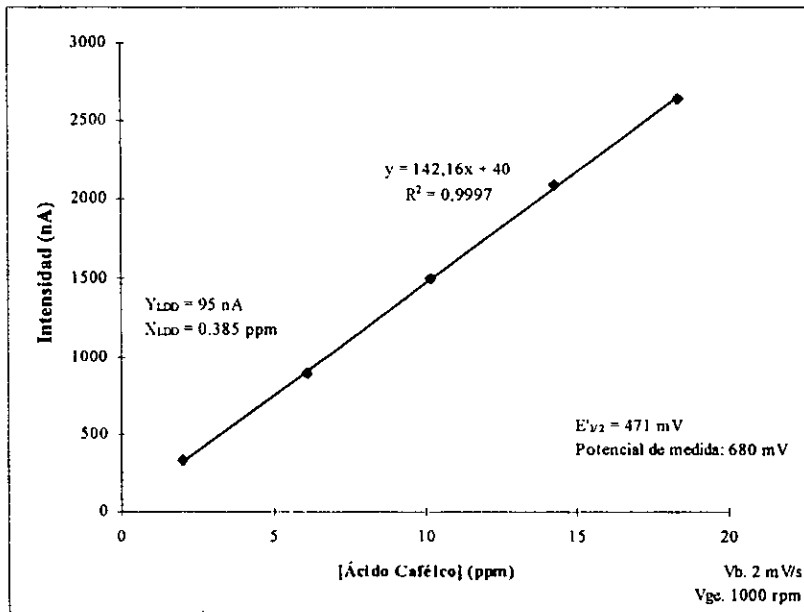


Fig. 9. Representación gráfica de la función  $i_{lim} = f([\text{ácido caféico}])$  de la primera señal de oxidación.

Se observa en la figura 9 que el valor del coeficiente de regresión es cercano a la unidad, lo que implica un comportamiento lineal.

$Y_{LDD}$  representa al límite de detección para la respuesta, que en este caso corresponde a la intensidad de corriente, y en química analítica está definida por:

$$Y_{LDD} = Y_B + 3s_B \quad \text{donde: } Y_B. \text{ Señal del blanco}$$

$s_B$ . Desviación estándar del blanco

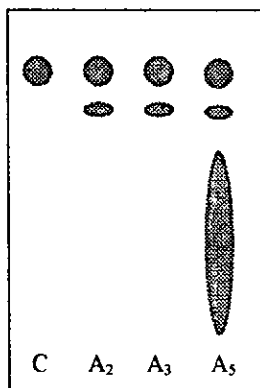
$X_{LDD}$  representa el límite de detección para la escala de  $X$ , y en este caso es la concentración del ácido caféico. En el Anexo IV se muestran los cálculos necesarios para la obtención de estos parámetros.

En lo que se refiere a límites de detección, se puede observar que pueden ser detectadas partes por billón de ácido caféico. Este límite de detección es útil ya que siendo el ácido caféico una sustancia farmacológica es deseable poder detectar cantidades pequeñas para obtener precisión de dosis, detectarlo como impureza en formas farmacéuticas, e incluso detectarlo en fluidos biológicos.

## II. Sistema de árnica

### II.A. Identificación de ácido caféico en las tinturas

Cromatoplaça:



Eluyente: Metanol

C. Ácido caféico estándar

A<sub>2</sub>. Tintura Weleda 2

A<sub>3</sub>. Tintura Weleda 3

A<sub>5</sub>. Tintura Schussler

El análisis de ácido caféico puro por medio de luz UV de la cromatoplaça muestra una mancha en la columna correspondiente a ácido caféico, con un  $R_f = 0.75$ .

En las columnas donde se colocaron las muestras A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> se observan dos manchas, una de ellas coincide con la mancha de ácido caféico. La otra mancha tiene un  $R_f = 0.62$  y se trata de un compuesto menos polar que el ácido caféico.

En la columna donde se colocó la tintura A<sub>5</sub> se observa la mancha correspondiente a ácido caféico y también la mancha de  $R_f = 0.62$  que se presentó también en la tinturas A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>. En la parte inferior de la cromatoplaça de A<sub>5</sub> se observa un corrimiento de compuestos no separados.

En lo que respecta a la apariencia física de las tinturas, la identificada como A<sub>5</sub> es de un color más oscuro (café rojizo) que las tinturas A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>, las cuales son de un color amarillento.

Los resultados de la cromatoplaça proveen una información cualitativa no concluyente acerca de la existencia de ácido caféico en las tinturas. Es interesante observar que la tintura A<sub>5</sub> presenta

más compuestos en comparación con las otras, además del compuesto de interés. En todas las tinturas utilizadas existe otro compuesto además del ácido caféico, el cual probablemente sea otro de los principios activos de la planta.

El hecho de que además de ácido caféico exista otra variedad de compuestos en la planta (sobre todo en la tintura A<sub>3</sub>), puede ser un indicio de la forma en que se obtuvieron las tinturas, además de ser un indicador de pureza del ácido caféico en ellas. Sin embargo, el que el ácido caféico esté o no en forma pura en la tintura no implica que esta sea más o menos efectiva en cuanto a la actividad farmacológica que pueda ejercer, ya que la existencia de otro tipo de compuestos en la tintura puede ayudar a que el principio activo lleve a cabo su acción terapéutica y la presencia de estos metabolitos en las tinturas puede ser deseada.

## II.B. Estudio electroquímico

### II.B.1. Estudio polarográfico

El estudio polarográfico de las tinturas de árnica indicó que existen reacciones de reducción (2 señales) y de oxidación (1 señal).

En cuanto a las señales de reducción no lograron obtenerse resultados reproducibles en este medio. Se observa que hay problemas ya sea de adsorción o bien cinéticos; al tratar de reproducir los experimentos no siempre se veían las señales o bien solo una de ellas lo que no nos permitió obtener más información acerca de ellas. Probablemente se podrían estudiar al cambiar las condiciones de trabajo, como el medio de reacción, por ejemplo.

En cuanto a la señal de oxidación, se encontró que se encontraba cercana a la barrera anódica y, aparentemente, la intensidad de esta señal aumentaba con la concentración. Esta señal resultó coincidir con la señal de oxidación que se obtuvo de un estudio polarográfico de ácido caféico. Dada esta circunstancia, se enfocó el estudio hacia esta señal para poder realizar la cuantificación de las tinturas en base a ácido caféico y para obtener un mayor intervalo en la zona de oxidación se utilizó electrodo giratorio de platino.



II.B.2. Estudio voltamperométrico sobre electrodo de platino a pH = 1.5

Los resultados después de eliminar la corriente residual se muestran en la figura 10. Los voltamperogramas inferiores corresponden a la oxidación de la tintura. Los voltamperogramas superiores corresponden a las señales de la tintura después de que se ha agregado ácido caféico.

Tintura	Voltamperogramas $I(\text{nA}) = f [ E (\text{mV}) ]$	Comentarios	$E'_{1/2}$
A <sub>2</sub>		Se observan dos señales de oxidación, correspondientes a la oxidación de ácido caféico en la tintura. Se determina el $E'_{1/2}$ para cada señal.	1ª señal 434 mV  2ª señal 781 mV
A <sub>3</sub>		Se observan dos señales de oxidación, correspondientes a la oxidación de ácido caféico en la tintura. Se determina el $E'_{1/2}$ para cada señal.	1ª señal 452 mV  2ª señal 732 mV
A <sub>5</sub>		En esta tintura se observa con claridad solamente la segunda señal correspondiente a la segunda oxidación del ácido caféico	2ª señal 757 mV

Fig. 10. Señales de oxidación de ácido caféico en las tinturas de árnic

En las tinturas  $A_2$  y  $A_3$  se observaron dos señales de oxidación, las cuales corresponden a las mismas observadas para el ácido caféico estándar utilizado. Esto se corroboró ya que la intensidad de las señales de las tinturas creció con la adición de alícuotas de una solución estándar de ácido caféico.

El potencial de media onda para la primera señal de oxidación del ácido caféico en la tintura  $A_3$  corresponde a  $E'_{1/2} = 452$  y en la tintura  $A_2$  corresponde a  $E'_{1/2} = 433$ . El análogo para la primera señal de oxidación del ácido caféico estándar es  $E'_{1/2} = 471$  mV. Existe un desplazamiento de 19 mV y 38 mV para las tinturas  $A_3$  y  $A_2$  respectivamente.

En cuanto a la segunda reacción de oxidación del ácido caféico en estas mismas tinturas, la señal tiene un potencial de media onda  $E'_{1/2} = 762$  mV para la tintura  $A_3$ , y  $E'_{1/2} = 781$  mV para la tintura  $A_2$ . El análogo correspondiente a la segunda reacción de oxidación para el ácido caféico estándar es  $E'_{1/2} = 809$  mV. Existe un desplazamiento de potencial de 47 mV y 28 mV para las tinturas  $A_3$  y  $A_2$  respectivamente..

En la tintura  $A_5$  al potencial de la primera oxidación, la intensidad de corriente leída fue muy pequeña y mal definida; se observó con claridad sólo la segunda reacción de oxidación. Esto se corroboró ya que la intensidad de la señal de la tintura creció con la adición de alícuotas de una solución estándar de ácido caféico.

En la tintura  $A_5$  no existe una señal clara y bien definida correspondiente a la primera reacción de oxidación, lo que nos hace pensar que la tintura es de otra calidad; no puede realizarse la determinación sobre la segunda señal mientras no se haya realizado un estudio más completo sobre el mecanismo de oxidación del ácido caféico, que nos permita encontrar las condiciones en que sea posible realizar la cuantificación sobre la segunda señal.

El potencial de media onda para la segunda señal de oxidación del ácido caféico en la tintura corresponde a  $E'_{1/2} = 757$  mV. El análogo para la segunda señal de oxidación del ácido caféico estándar es  $E'_{1/2} = 809$  mV. Existe un desplazamiento de 52 mV.

El que los potenciales de media onda en la tintura estén desplazados hacia potenciales un poco más negativos implica que el compuesto se oxida más fácilmente en la tintura; esto puede deberse a que el ácido caféico en la tintura se encuentra sustituida con otros grupos funcionales distintos o bien a que la presencia de los otros compuestos en la tintura modifique la sobretensión. De cualquier forma se puede realizar la cuantificación en la tintura, puesto que los grupos funcionales que se oxidan son los mismos, y las señales, en general, se comportan igual en la tintura sola y con ácido caféico.

### **I.B.2.3.2. Determinación de la cantidad de ácido caféico en las tinturas.**

#### **Método de adiciones patrón**

La cuantificación de las tinturas se realizó en las tinturas  $A_2$  y  $A_3$ , pues son las que presentan la señal controlada por difusión convectiva. En cuanto a la tintura  $A_5$  no se realizó la cuantificación, pues se observó que solamente se presenta con claridad la señal correspondiente a la segunda oxidación del ácido caféico, y esta señal no está controlada por difusión, sino que hay reacciones químicas implicadas y es posible que haya un proceso cinético de por medio y la primera señal no se define claramente.

Para la cuantificación del compuesto en las tinturas se utilizó el método de adiciones patrón. En la sección correspondiente a metodología se explica el fundamento de este estudio.

Los resultados obtenidos para las tinturas  $A_2$  y  $A_3$  se presentan a continuación:

# FE DE ERRATAS

## Errata 1:

Páginas 42 y 43

La figura 12 es incorrecta, la figura correcta es la siguiente:

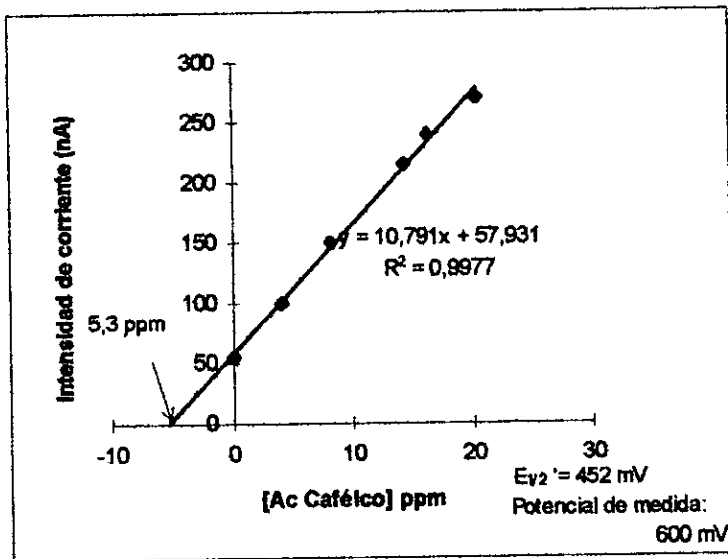


Fig. 12. Representación gráfica del método de adiciones patrón aplicado a la tintura A<sub>3</sub>

El texto que dice:

Para la tintura A<sub>3</sub>:

$$\frac{536,9 \mu\text{g Ácido caféico} * 50 \text{ mL medio de reacción}}{\text{mL medio de reacción}} = 26\ 845 \mu\text{g Ácido caféico por mL de tintura A}_3$$

1.0 mL de tintura

debe decir:

Para la tintura A<sub>3</sub>:

$$\frac{5,3 \mu\text{g Ácido caféico} * 50 \text{ mL medio de reacción}}{\text{mL medio de reacción}} = 265 \mu\text{g Ácido caféico por mL de tintura A}_3$$

1.0 mL de tintura

## Errata 2:

Página 47

El texto que dice:

tintura A<sub>3</sub>: 26 845 μg de Ácido caféico por mL de tintura (1.49 X 10<sup>-1</sup> M)

debe decir:

tintura A<sub>3</sub>: 265 μg de Ácido caféico por mL de tintura (1.47X 10<sup>-3</sup> M)

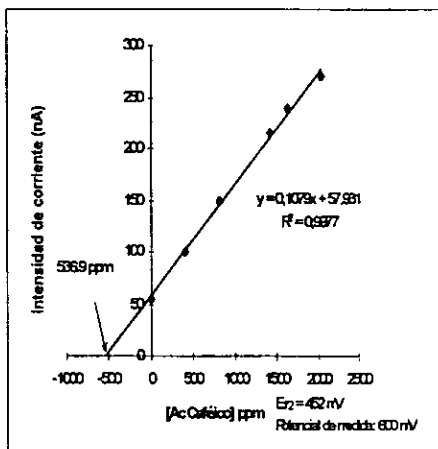
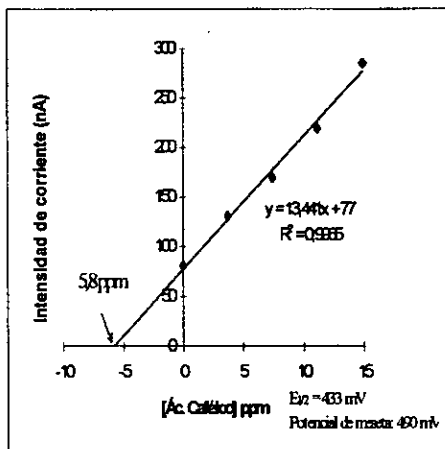


Fig. 11. Representación gráfica del método de adiciones patrón aplicado a la tintura A<sub>2</sub>.

Fig. 12. Representación gráfica del método de adiciones patrón aplicado a la tintura A<sub>3</sub>.

Las cantidades marcadas con flecha (figuras 11 y 12) son las concentraciones correspondientes en celda.

Las alícuotas correspondientes a las tinturas A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub> son: 1.8 mL y 1.0 mL respectivamente, en un volumen total de celda de 50 mL.

El cálculo final de la concentración de ácido caféico en la tintura original es:

Para la tintura A<sub>2</sub>:

$$\frac{5,8 \mu\text{g Ácido caféico} * 50 \text{ mL medio de reacción}}{1,8 \text{ mL tintura}} = 161,1 \mu\text{g Ácido Caféico por mL de tintura A}_2$$

Para la tintura A<sub>3</sub>:

$$\frac{536.9 \mu\text{g Ácido caféico} * 50 \text{ mL medio de reacción}}{1.0 \text{ mL tintura}} = 26\,845 \mu\text{g Ácido Caféico por mL de tintura A}_3$$

Con base en lo planteado como objetivo, se puede concluir que el propósito general se cumplió.

La determinación cuantitativa de la tintura se realizó por medio de métodos electroquímicos, los cuales nos permitieron realizar la cuantificación del principio activo de la tintura (ácido caféico), sin tener que hacer una separación previa de los compuestos contenidos en ella, lo que hubiese implicado un trabajo más largo y laborioso.

Se encontró que la tintura de árnica presenta señales de reducción y oxidación. Las señales de reducción se observaron en el estudio polarográfico. Se observó que estas reducciones implican procesos más complejos de reducción, estos pueden ser debidos a problemas de adsorción o bien a reacciones químicas acopladas al proceso electroquímico, por lo que se requiere de un estudio por separado de estas señales.

En cuanto a la parte de oxidación, se observaron dos señales. El estudio del principio activo de la tintura (ácido caféico) como compuesto modelo permitió determinar que las señales observadas se deben a la oxidación de este principio activo en las tinturas, y que es el compuesto que se oxida. Distintos autores han mencionado que compuestos derivados de fenol, como lo es el ácido caféico, tienen la capacidad de realizar reacciones de oxidación, las cuales dan lugar a la formación de compuestos con grupos quinónicos.<sup>23,31-33</sup>

Mediante el estudio de la influencia del pH sobre la oxidación del ácido caféico se determina que las señales de oxidación del compuesto está afectada por el pH del medio. La literatura menciona que la oxidación de fenoles a quinonas genera la liberación de protones<sup>6,31,32</sup>, por lo que un medio de reacción alcalino favorece la reacción de oxidación. Esto podemos observarlo ya que la oxidación de ácido caféico se realiza más fácilmente conforme aumenta el valor de pH. Sin embargo, a valores de pH extremos (mayores de 10) las señales de oxidación tienden a desaparecer; esto hace suponer que hay una transformación de los grupos oxidables del compuesto.

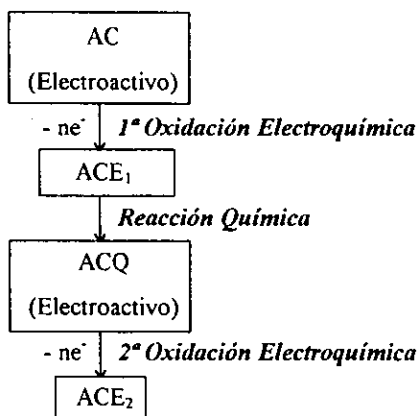
No obstante que las reacciones de oxidación electroquímica se realizan más fácilmente a valores alcalinos de pH, la forma de las curvas voltamperométricas están mejor definidas a pH ácido, por lo que valores de pH alrededor de 1.5 son óptimos para el estudio de las señales.

Se determina que sobre electrodo de platino las señales de oxidación se presentan mejor definidas y que la adsorción sobre este electrodo no afecta de manera importante la forma de las curvas, por lo que este electrodo resulta apropiado para el estudio de las curvas voltamperométricas del ácido.

Los resultados del estudio de la influencia de la velocidad de giro del electrodo muestran que sólo la primera señal de oxidación del ácido caféico está controlada por un proceso de difusión convectiva y que la segunda reacción de oxidación tiene implicaciones cinéticas, lo que significa que hay reacciones químicas acopladas.

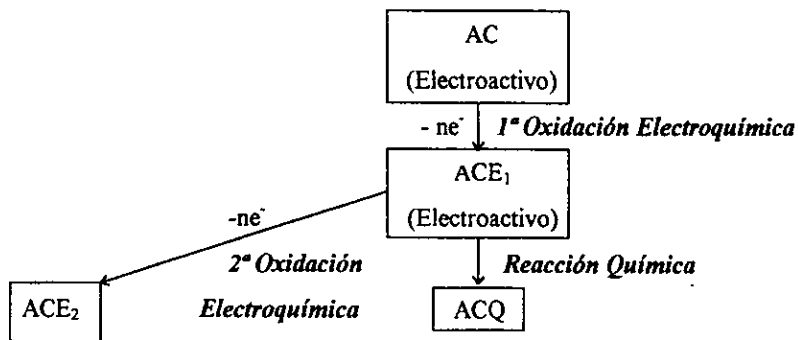
Se plantean como posibles los siguientes mecanismos, aunque se requiere realizar más estudios para poder comprobarlos o descartarlos:

Mecanismo 1

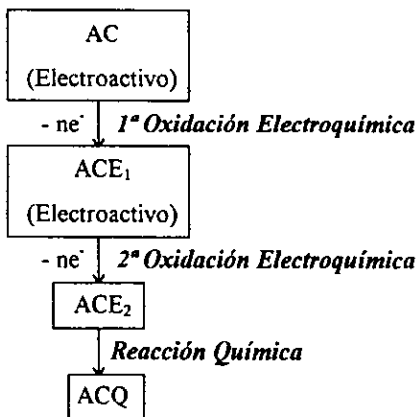




Mecanismo 2



Mecanismo 3



La literatura menciona que la oxidación de compuestos derivados de catecol producen o-quinonas, que son productos inestables que pueden dar origen a la formación de mezclas de reacción complicadas, incluyendo la formación de compuestos diméricos y sus productos de oxidación<sup>32</sup>. Puede ser posible que en el caso del ácido caféico haya un mecanismo similar y por esta razón solo la primer señal está controlada por difusión.

Por otro lado, se determinaron los potenciales de media onda para el ácido caféico a pH 1.5 sobre electrodo de platino, estos son:

Primera reacción de oxidación.  $E'_{1/2} = 471 \text{ mV/ Ag/AgCl}$

Segunda reacción de oxidación.  $E'_{1/2} = 809 \text{ mV/ Ag/AgCl}$

Los potenciales de oxidación del compuesto en la tintura son similares, un poco desplazados hacia potenciales menores, los grupos que se oxidan son los mismos tanto en el ácido caféico utilizado como referencia como en la tintura. El desplazamiento de potencial puede deberse a que el compuesto activo no se encuentra en forma libre en la tintura, que haya otros sustituyentes en la molécula o, más probablemente, a cambios en la tensión superficial provocados por la presencia de los otros componentes de la tintura.

Se cuantificaron las tinturas A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>, expresando el contenido de ácido caféico en ellas. Estos valores son:

tintura A<sub>2</sub>: 161 µg de ácido caféico por mL de tintura (8.94 X 10<sup>-4</sup> M)

tintura A<sub>3</sub>: 26 845 µg de ácido caféico por mL de tintura (1.49 X 10<sup>-1</sup> M)

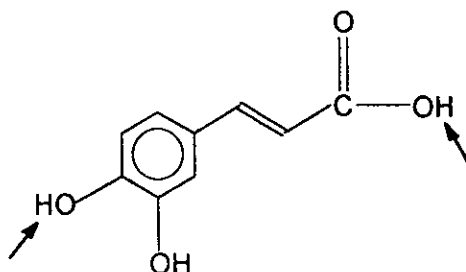
En lo que se refiere a la tintura A<sub>3</sub> no se realizó la cuantificación, puesto que sólo presenta la señal de oxidación no controlada por difusión. Esta característica puede atribuirse a que esta tintura presenta una calidad de elaboración distinta a las dos anteriores; esto puede ser determinante para su actividad farmacológica.

Existe la posibilidad de profundizar el estudio de esta segunda señal de oxidación para encontrar las posibles condiciones de su utilización con fines analíticos.

De manera adicional se realizó un estudio de las propiedades ácido-base del principio activo. Mediante este estudio se determinó la pureza del ácido caféico utilizado como referencia:

$$98.54 \pm 3.40 \quad (n=3).$$

Las curvas obtenidas en las valoraciones realizadas muestran que son valorados dos protones del ácido caféico. Uno de ellos es el protón del grupo carboxílico y el otro uno de los protones fenólicos; se piensa que el protón fenólico valorado es el que está colocado en posición *para* a la cadena lateral (y no el *meta*), pues las estructuras resonantes favorecen la ionización de este grupo.



El estudio de las curvas de valoración nos permitió obtener los valores de los pKa condicionales para el ácido caféico. Estos valores son:

$$\text{pKa}'_1 (\text{H}_2\text{A} / \text{HA}^-) = 5.38 \pm 0.27 (n = 3)$$

$$\text{pKa}'_2 (\text{HA}^- / \text{A}^{2-}) = 9.95 \pm 0.03 (n = 3)$$

Finalmente, también observamos a partir de las curvas de valoración que el comportamiento ácido-base del ácido caféico es de un ácido diprótico débil en las condiciones estudiadas.

Como comentario adicional podemos mencionar que aún hay puntos que sería interesante poder estudiar más a fondo. La determinación del número de electrones implicados en las reacciones de oxidación, el mecanismo de oxidación del ácido caféico que da origen a las características de las señales de oxidación del compuesto, el estudio de las señales de reducción presentes en las tinturas y la comparación de resultados por otros métodos.

**Preparación de electrolitos soporte**a)  $\text{KNO}_3$  0.1 M (250 mL)

$$\frac{2.525 \text{ g KNO}_3}{0.25 \text{ L}} * \frac{1 \text{ mol KNO}_3}{101.108 \text{ g KNO}_3} = 0.1 \text{ M}$$

b) Solución reguladora Britton-Robinson (250 mL)

$$\frac{2.525 \text{ g KNO}_3}{0.25 \text{ L}} * \frac{1 \text{ mol KNO}_3}{101.108 \text{ g KNO}_3} = 0.1 \text{ M}$$

$$\frac{0.6183 \text{ g Ac. bórico}}{0.25 \text{ L}} * \frac{1 \text{ mol Ac. bórico}}{61.83 \text{ g Ac. bórico}} = 0.04 \text{ M}$$

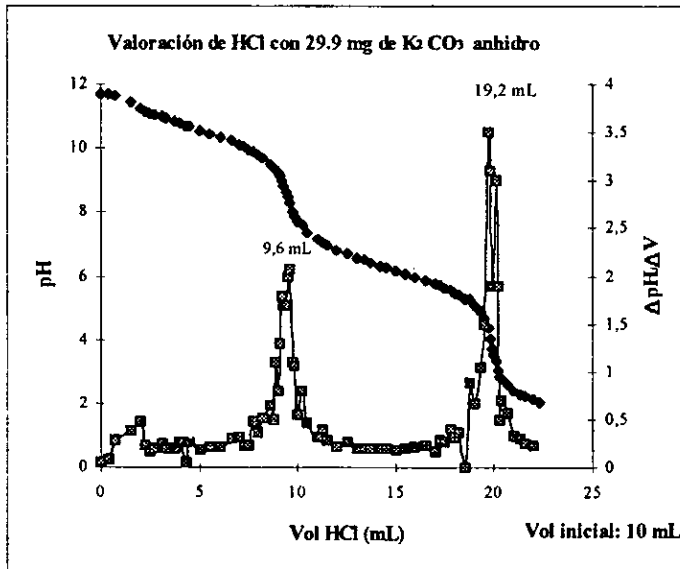
$$\frac{1.2 \text{ mL Ac. fosfórico}}{0.25 \text{ L}} * \frac{1.741 \text{ g Ac. fosfórico}}{1 \text{ mL Ac. fosfórico}} * \frac{1 \text{ mol Ac. fosfórico}}{101.02 \text{ g Ac. fosfórico}} = 0.083 \text{ M}$$

En esta segunda solución se utiliza  $\text{KNO}_3$  0.1 M como electrolito soporte, además contiene una mezcla de ácidos. Al ajustar el pH deseado con la solución de NaOH se producen las especies básicas para cada uno de los ácidos, de manera que se genera un sistema regulador en la solución, obteniendo diferentes valores de pH en función de la cantidad agregada de NaOH.

Las concentraciones de estos sistemas reguladores son de un valor alrededor de  $1 \times 10^{-2}$  M. Esta concentración es suficiente para amortiguar las soluciones problema de ácido caféico en la celda, las cuales se trabajan en una concentración máxima de  $1 \times 10^{-4}$  M.

**Cálculo de la concentración de ácido clorhídrico**

Curva de valoración:



**Fig. 13.** Curva de valoración de ácido clorhídrico

Se utilizaron 19.2 mL de HCl para valorar 29.9 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, el cálculo de la concentración de HCl es el siguiente:

$$\frac{29.9 \text{ mg K}_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1 \text{ mmol K}_2\text{CO}_3}{138 \text{ mg K}_2\text{CO}_3} \cdot \frac{2 \text{ mmol HCl}}{1 \text{ mmol K}_2\text{CO}_3} \cdot \frac{1 \text{ meq HCl}}{1 \text{ mmol HCl}}}{19.2 \text{ mL HCl}} = 0.0226 \text{ N}$$

### Cálculo de la concentración de NaOH

Curva de valoración:

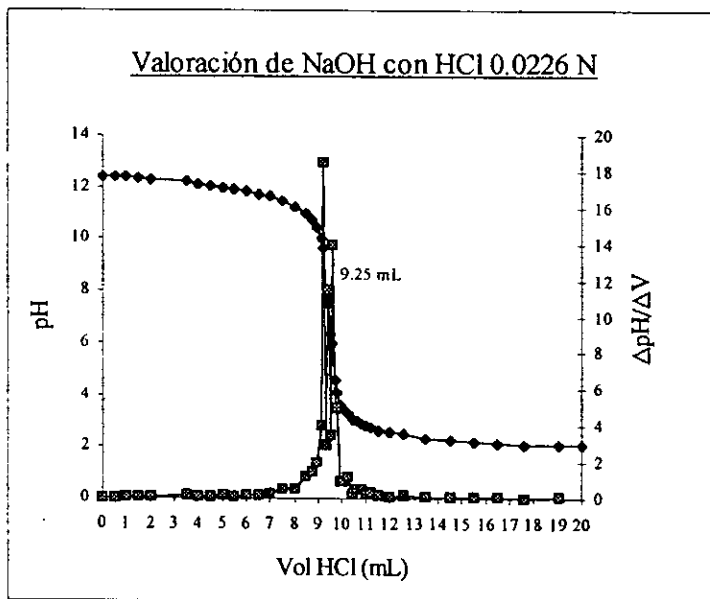


Fig. 14. Curva de valoración de hidróxido de sodio

Se utilizaron 9.25 mL de HCl 0.0226 N para valorar una alícuota de 10 mL de NaOH, el cálculo de la concentración de NaOH es el siguiente:

$$\frac{9.25 \text{ mL HCl} \cdot 0.0226 \text{ meq HCl} \cdot 1 \text{ meq NaOH}}{1 \text{ mL HCl} \quad 1 \text{ meq HCl}} = 0.0209 \text{ N}$$

10 mL NaOH

### Estudio logarítmico de los voltamperogramas<sup>27</sup>

Para la oxidación de una sustancia reducida se tiene la ecuación:

$$E = E'_{1/2} - \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{I_a - I}{I}$$

donde:

- E. Potencial medido en la región logarítmica
- $E'_{1/2}$ . Potencial de media onda condicional
- R. Constante de los gases
- T. Temperatura de trabajo
- $I_a$ . Corriente de oxidación medida en la meseta
- I. Corriente correspondiente al potencial medido
- $\alpha$ . Coeficiente de transferencia
- n. Número de electrones intercambiados
- F. Constante de Faraday

Si se tiene una serie de datos de intensidad de corriente y los potenciales correspondientes a estas intensidades, se puede trazar una gráfica de la forma

$$Y = bX + a$$

donde:

$$Y = E$$

$$b = - RT/\alpha nF$$

$$X = \ln (I_a - I/I)$$

$$a = E'_{1/2}$$

La representación gráfica permite determinar los valores de la pendiente y la ordenada. A partir del valor de los parámetros constantes ( $R$ ,  $T$ ,  $F$ ,  $\alpha$ ,  $b$ ), es posible conocer el número de electrones intercambiados en la reacción.



**Determinación de límites de detección**

El límite de detección de un analito (X) es aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento (Y) significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco o “señal de fondo” <sup>28</sup>.

$Y_{LDD}$  representa al límite de detección para la respuesta, que en este caso corresponde a la intensidad de corriente.  $X_{LDD}$  representa el límite de detección para la escala de X, y en este caso es la concentración del ácido caféico.

Para obtener estos parámetros, se requiere de una serie de datos X y Y. A partir de estos datos se realizan una serie de cálculos que permiten obtener los valores de límites de detección para X y Y.

Concentración Intensidad  
(ppm) (nA)

Xi	Yi	Y <sub>calc</sub>	(Yi-Y <sub>calc</sub> ) <sup>2</sup>	(Yi-Y <sub>prom</sub> ) <sup>2</sup>	Xi <sup>2</sup>	(Xi-X <sub>prom</sub> ) <sup>2</sup>
2,04	340	330	100	1322500	4,1616	66,5856
6,12	890	910	400	360000	37,4544	16,6464
10,2	1490	1490	0	0	104,04	0
14,28	2090	2070	400	360000	203,9184	16,6464
18,36	2640	2650	100	1322500	337,0896	66,5856

r	0,999702823		$t_{(n-2, 95\%)} * s$	Límite inferior	Límite Superior
P <sub>end</sub>	142,1568627	+/-	3,636740666	138,5201221	145,7936034
Ord	40	+/-	42,61862856	-2,618628556	85,23725711
X <sub>prom</sub>	10,2				
Y <sub>prom</sub>	1490				
ΣXi	51				
ΣYi	7450				
Σ(Yi-Y <sub>calc</sub> ) <sup>2</sup>	1000				
Σ(Xi <sup>2</sup> )	686,664				
Σ(Xi-X <sub>prom</sub> ) <sup>2</sup>	166,464				
Σ(Yi-Y <sub>prom</sub> ) <sup>2</sup>	3365000				
Σ(Xi*Yi)	99654				
S <sub>yx</sub>	18,25741858				

$S_{Pend}$	1,415074189
$S_{Ord}$	16,58312395
$t (n-2, 95\%)$	2,57
$Y_{LDD}$	94,77225575
$X_{LDD}$	0,385294489

El significado de los símbolos se dan en la tabla siguiente:

n	número de datos X-Y
r	Coefficiente de correlación de la recta
Pend	Pendiente de la recta
Ord	Intercepto
Xprom	Valor promedio de los valores de X
Yprom	Valor promedio de los valores de Y
$\Sigma X_i$	Suma de los valores de X
$\Sigma Y_i$	Suma de los valores de Y
$\Sigma (Y_i - Y_{i,calc})^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor ajustado de Y
$\Sigma X_i^2$	Sumatoria del cuadrado de los valores de X
$\Sigma (X_i - X_{prom})^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor promedio de X
$\Sigma (Y_i - Y_{prom})^2$	Sumatoria del cuadrado de la diferencia entre el valor experimental y el valor promedio de Y
$S_{y/x}$	Desviación estándar de la recta
$S_{Pend}$	Desviación estándar de la pendiente
$S_{Ord}$	Desviación estándar del intercepto
t	t de student
$X_{LDD}$	Límite de detección para la concentración del analito
$Y_{LDD}$	Límite de detección para la respuesta del equipo

Asimismo:

$$S_{y/x} = \{ \Sigma (Y_i - Y_{\text{prom}})^2 / n - 2 \}^{1/2}$$

$$S_{\text{Pend}} = S_{y/x} / \{ \Sigma (X_i - X_{\text{prom}})^2 \}^{1/2}$$

$$S_{\text{Ord}} = S_{y/x} / \{ \Sigma X_i^2 / n - \Sigma (X_i - X_{\text{prom}})^2 \}^{1/2}$$

$$Y_{\text{LDD}} = Y_B + 3s$$

$$X_{\text{LDD}} = 3s / S_{\text{Pend}}$$

NOTA: Para obtener  $Y_{\text{LDD}}$  se consideró  $Y_B = \text{Ord}$ .

Datos obtenidos de las valoraciones

Valoración No.	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	% pureza
1	5.25	9.93	96.32
2	5.56	9.94	100.26
3	5.33	9.97	99.03

X <sub>M</sub>	5.38	9.95	98.54
s	0.16	0.02	2.02
σ <sub>90%</sub>	0.27	0.03	3.40

$$X_M \pm \sigma_{90\%}$$

$$\sigma_{90\%} = t_{(n-1, 90\%)} * s / \sqrt{n}$$

$$t_{(n-1, 90\%)} = 2.92$$

1. Cox, P. A., Balick, M. J. The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *Sci. Am.*, Jun (1994), 82-87.
2. Trease, G. E., Evans, W. C. Pharmacognosy. ed. Baillière Tindall-London. U. S. A., 1972.
3. Brunner H. Dünnschichtchromatographie zur Prüfung Arzneidrogen. *Dtsch. Apt. Ztg.*, 44, (1969) 1723-26.
4. Marini, D., Balestrieri, F. Determinazione quantitativa degli estratti di arnica e solano e dell'olio di giusquiamo in miscela. *Boll. Chim. Pharm.* 123(2), (1984) 83-94.
5. Rossetti, V., Lombard, A., Sancin, P., et. al. Characterization of *Arnica montana* L. Dried Roots. *Int. Journal of Crude Drug Research*, 22(2), (1984) 53-60.
6. Kortüm, T. Treatise on Electrochemistry, 2nd ed. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, 1965.
7. *European Pharmacopea*, 3rd. ed., 1997, 1647-48.
8. *Real Farmacopea Española*, 1a. ed. Ministerio de Salubridad y Consumo, Madrid, 1997.
9. *Farmacopeia Brasileira*, 4a. ed. Athenen ed. Sao Paulo Ltda., 1988.
10. *British Pharmacopoeia*, Health Minister. London, 1993
11. *Farmacopea Latinoamericana*, 1a. ed., Herma A. ed., México, 1921.
12. *Farmacopea Homeopática de Elaboración Artesanal*, Miraguayo ed., Madrid, 1987.
13. *Farmacopea Homeopática*, 2a. ed., B. Jain Publ., México, 1990.
14. *Pharmacopée Française*, X ed., Ministère de la Sante, Janvier, 1989.
15. *Martindale. The Extra Pharmacopeia*, 28th ed., The Pharmaceutical Press, London, 1982.
16. *Pharmacopoea Gallica*, VII ed.
17. *Dispensatory*, 24th ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1947.
18. *Deutsches Arzneibuch*, 9 ausgabe, Germany, 1986.
19. *Pharmacopoea Helvetica* T. VII, 7a. ed., Conseil fédéral Suisse, Berne, 1991.

20. Wood, A. W., Huang, M., Chang, R. L., *et. al.* Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: Exceptional activity of ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 (1982) 5513-17.
21. Serafini, M., Ghiselli, A., Ferro-Luzzi, A. Red wine, tea, and antioxidants. *Lancet*, 344 (1994) 626.
22. Castelluccio, C., Paganga, G., Melikian, N., *et. al.* Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*, 368 (1995) 188-92.
23. Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteurtre, F., Pommier, Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90 (1993) 2399-2403.
24. Burke, T. R., Fesen, M. R., Mazumder, A., *et. al.* Hydroxylated Aromatic Inhibitors or HIV-1 Integrase. *Med. Chem.* 38 (1995) 4171-78.
25. Grunberger, D., Banerjee, R., Oltz, E. M., *et. al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44 (1988) 230-32.
26. Morrison, R. T, Boyd, R. N., Química Orgánica, 5ª ed. Addison Wesley Iberoamericana, U. S. A., 1990
27. Plambeck, J. A. Electroanalytical Chemistry. John Wiley and Sons. U. S. A., 1976 pp 258
28. Miller J. C., Miller H. N. Estadística para química analítica. 2º. ed. inglés, 1º ed. esp. Addison-Wesley Iberoamericana, U. S. A., 1993.
29. Chemical Abstracts, Vol 123, 1995, 338424t.
30. Bard, A. J., Faulkner L. R. Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications. John Wiley and Sons. U. S. A., 1980.
31. Fessenden, R. J., Fessenden, J. S. Organic Chemistry, 2nd ed. PWs Publishers. U.S.A. 1982.
32. Henning L., Baker, M. editors, Organic Electrochemistry. An Introduction and a Guide. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc., U.S.A., 1991.
33. Milner G.W.C., Tye Principles and Applications of Polarography and other Electroanalytical Processes. Longmans, Green and Co. Ltd. London, 1957.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA