



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“*Prunus serotina*: una fuente natural de ácido clorogénico.

Desarrollo y validación de un método analítico por CLAE

para cuantificar hemateína en la infusión de la especie

medicinal *Haematoxylon brasiletto*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BLANCA ESTELA NIEVES SOTO



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: Dra. Inés Fuentes Noriega
Vocal: Dr. Arturo Navarro Ocaña
Secretario: Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
1er. suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente: Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111. Conjunto E
Facultad de Química UNAM

Asesor

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Asesor Técnico

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sustentante

Blanca Estela Nieves Soto

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, por la educación que recibí para forjarme como profesionalista.

A mi asesora la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado, por la paciencia, asesoramiento e interés de este trabajo. Además de su incondicional amistad.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su ayuda y revisión en el desarrollo experimental.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega y al Dr. Arturo Navarro Ocaña por su tiempo invertido en la revisión del presente trabajo y por sus valiosos consejos.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos PAIP 1960-12 y PAPIIT IN-205709.



INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Antecedentes de la especie <i>Prunus serotina</i> Ehrenb	8
2.1.1 Descripción botánica	8
2.1.2 Nombres comunes.....	9
2.1.3 Distribución geográfica	9
2.1.4 Usos y propiedades medicinales.....	10
2.1.5 Antecedentes fitoquímicos de <i>Prunus serotina</i> Ehrenb	11
2.2 Antecedentes de la especie <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	14
2.2.1 Descripción botánica.....	14
2.2.2 Nombres comunes.....	14
2.2.3 Distribución geográfica	15
2.2.4 Usos y propiedades medicinales.....	15
2.2.5 Antecedentes fitoquímicos de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	16
3. OBJETIVOS	18
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	19
4.1 Material vegetal	19
4.2 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	19
4.3 Preparación de los extractos a partir de las hojas del capulín.....	20
4.4 Determinación del contenido de ácido clorogénico en los extractos de trabajo.....	21
4.5 Preparación de la infusión de trabajo a partir de la corteza de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst	21
4.6 Determinación del contenido de hemateína y hematoxilina en la infusión	21
4.7 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico	23
4.7.1 Selectividad y estabilidad analítica de la muestra	23
4.7.2 Linealidad	24
4.7.2.1 Linealidad del sistema	24
4.7.2.2 Linealidad del método	24
4.7.3 Exactitud.....	25
4.7.4 Precisión.....	25



4.7.4.1 Precisión del sistema	25
4.7.4.2 Precisión del método (Repetibilidad)	25
4.7.4.3 Precisión intermedia (Reproducibilidad intralaboratorio).....	26
4.7.5 Robustez del método	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1 Diseño factorial 2 ³	31
5.2 Validación del método	40
5.2.1 Adecuabilidad del sistema	42
5.2.2 Especificidad del método	43
5.2.3 Linealidad del sistema	47
5.2.3.1 Linealidad del método. Exactitud.....	52
5.2.4 Precisión.....	59
5.2.4.1 Precisión del sistema	59
5.2.4.2 Precisión del método	60
5.2.4.3 Precisión intermedia	61
5.2.5 Robustez.....	62
6. CONCLUSIONES	76
7. PERSPECTIVAS	76
8. REFERENCIAS	77
ANEXO I.....	87



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales para preparar los extractos vegetales.....	20
Tabla 2. Condiciones experimentales para evaluar la especificidad metodología analítica	24
Tabla 3. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/g peso seco), en pulpas de diferentes especies de manzanas.....	28
Tabla 4. Contenido de ácido clorogénico (% ácido clorogénico/peso seco), en plantas utilizadas en la medicina oriental.....	29
Tabla 5. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/Kg peso fresco), en frutos de diferentes especies.....	29
Tabla 6. Contenido de ácido clorogénico (% ácido clorogénico/peso seco), en granos de diferentes especies de café.....	30
Tabla 7. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/100g peso seco), en hojas de diferente especies.....	30
Tabla 8. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/g peso fresco), en frutos de diferentes especies.....	30
Tabla 9. Resultados obtenidos utilizando como disolvente de extracción MeOH.....	32
Tabla 10. Análisis de varianza del modelo factorial utilizando MeOH como disolvente.....	34
Tabla 11. Resultados obtenidos utilizando como disolvente EtOH.....	36
Tabla 12. Análisis de varianza del modelo factorial utilizando EtOH como disolvente.....	38
Tabla 13. Resultados obtenidos durante la evaluación de la adecuabilidad del sistema.....	43
Tabla 14. Resultados para especificidad de la hemateína y hematoxilina.....	44
Tabla 15. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hemateína... ..	48
Tabla 16. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hematoxilina.....	49
Tabla 17. Parámetros estadísticos determinados con los datos de linealidad del sistema para la hemateína.	50
Tabla 18. Parámetros estadísticos determinados con los datos de linealidad del sistema para la hematoxilina.....	50
Tabla 19. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo propuesto de la hemateína (n=15, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).	51



Tabla 20. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo propuesto de la hematoxilina ($n=15$, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).....	51
Tabla 21. Valores de F calculados para cada compuesto.....	51
Tabla 22. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando hemateína.....	53
Tabla 23. Cantidad recuperada y cantidad adicionada para la hemateína (linealidad del método).....	54
Tabla 24. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando hematoxilina.....	55
Tabla 25. Cantidad recuperada y cantidad adicionada para la hematoxilina.....	56
Tabla 26. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (hemateína).....	57
Tabla 27. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (hematoxilina).....	57
Tabla 28. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método para hemateína ($n=15$, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).....	58
Tabla 29. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método para hematoxilina ($n=15$, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).....	58
Tabla 30. Datos experimentales obtenidos durante la evaluación de precisión del sistema.....	60
Tabla 31. Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método.....	61
Tabla 32. Resultados obtenidos de la hemateína para evaluar precisión intermedia.....	61
Tabla 33. Resultados obtenidos de la hematoxilina para evaluar precisión intermedia.....	62
Tabla 34. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método utilizando una solución de hemateína.....	63
Tabla 35. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para la hemateína.....	64
Tabla 36. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método utilizando una solución solución de hematoxilina.....	69
Tabla 37. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para la hematoxilina.....	70
Tabla 38. Área bajo la curva de la hemateína presente en la infusión de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	75
Tabla 39. Distribución t de Student.....	87



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor y hojas de <i>Prunus serotina</i> Ehrenb.....	8
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Prunus serotina</i> en la República Mexicana.....	9
Figura 3. Flores (izquierda) y árbol (derecha) de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.....	14
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst. en la República Mexicana.....	15
Figura 5. Cromatograma obtenido con la infusión de trabajo.	22
Figura 6. Cromatograma obtenido con la hemateína.....	22
Figura 7. Cromatograma obtenido con la co-elución de la infusión y la hemateína.....	22
Figura 8. Cromatograma obtenido con la hematoxilina.....	23
Figura 9. Cromatograma obtenido con la co-elución de la infusión y la hematoxilina.....	23
Figura 10. Representación geométrica del diseño 2^3 para el experimento con MeOH	32
Figura 11. Representación geométrica del diseño 2^3 para el experimento con EtOH.....	36
Figura 12. Cromatograma obtenido con una solución de 1.0 mg/mL de hemateína.....	42
Figura 13. Cromatograma obtenido con una solución de 1.0 mg/mL de hematoxilina.....	42
Figura 14. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación.	44
Figura 15. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de NaOH 1 M.....	44
Figura 16. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de HCl 1 M.....	45
Figura 17. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de H ₂ O ₂ al 5%.....	45
Figura 18. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación.	45
Figura 19. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de NaOH 1 M.....	46
Figura 20. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de HCl 1 M.....	46



Figura 21. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de H ₂ O ₂ al 5%.....	46
Figura 22. Cromatograma del estándar de hemateína 1.0 mg/mL.....	59
Figura 23. Cromatograma del estándar de hematoxilina 1.0 mg/mL.	59
Figura 24. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación (λ =285 nm; velocidad de flujo= 0.5 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:H ₂ O (TFA 1%) (90:10) y volumen de inyección=10 μ L).....	64
Figura 25. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 280 nm como longitud de onda de detección.	65
Figura 26. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 290 nm como longitud de onda de detección.	65
Figura 27. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 5 μ L de volumen de inyección.	65
Figura 28. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 15 μ L de volumen de inyección.	66
Figura 29. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.400 mL/min.	66
Figura 30. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.600 mL/min.	66
Figura 31. Cromatograma de la solución estándar hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H ₂ O (TFA 1%) en una proporción 95:5.	67
Figura 32. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H ₂ O (TFA 1%) en una proporción 85:15.	67
Figura 33. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 20°C.	67
Figura 34. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 30°C.	68
Figura 35. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación (λ =285 nm; velocidad de flujo= 0.5 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:H ₂ O (TFA 1%) (90:10) y volumen de inyección=10 μ L).....	70



Figura 36. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 280 nm como longitud de onda de detección.	71
Figura 37. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 290 nm como longitud de onda de detección.	71
Figura 38. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección.	71
Figura 39. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección.	72
Figura 40. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.400 mL/min.	72
Figura 41. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.600 mL/min.	72
Figura 42. Cromatograma de la solución estándar hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H ₂ O (TFA 1%) en una proporción 95:5.	73
Figura 43. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H ₂ O (TFA 1%) en una proporción 85:15.	73
Figura 44. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 20°C.	73
Figura 45. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 30°C.	74



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos aislados de la especie <i>Prunus serotina</i> Ehrenb.	12
Cuadro 2. Constituyentes químicos de la especie <i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst.	17

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfica de probabilidad normal para el experimento con MeOH.	35
Gráfico 2. Gráfica de residuos para el experimento con MeOH.	35
Gráfico 3. Gráfica de probabilidad normal para el experimento con EtOH.	39
Gráfico 4. Gráfica de residuos para el experimento con EtOH.	39
Gráfico 5. Gráfica de linealidad para la hemateína.	48
Gráfico 6. Gráfica de linealidad para la hematoxilina.	49
Gráfico 7. Gráfica de linealidad del método para la hemateína.	54
Gráfico 8. Gráfica de linealidad del método para la hematoxilina.	56



1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres (RL) son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados y son capaces de existir independientemente. Se pueden formar por diversos mecanismos como ganancia o pérdida de un electrón o por la ruptura homolítica de una molécula. Son altamente reactivos e inestables, y tienden a remover un electrón de otras moléculas. Para obtener mayor estabilidad se adicionan a otra molécula y actúan como agentes oxidantes o reductores (Houghton y Mukherjee, 2009; Halliwell, 2006).

Los RL más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y del carbono, así como, los formados por metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros. La expresión “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) es un término que involucra no solo a los RL derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que además son muy reactivos. Las principales ERO son los que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno [oxígeno atómico (O), ozono (O₃) y singulete de oxígeno (¹O₂)] y las parcialmente reducidas [anión superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (OH[•])] (Sawyer, 1988; Moure *et al.*, 2001; Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2005).

A continuación se describen las especies reactivas y los RL de mayor importancia a nivel biológico.

➤ Singulete de oxígeno (¹O₂)

El ¹O₂ se forma cuando uno de los electrones desapareados del oxígeno absorbe energía e invierte su rotación. Existen dos formas del singulete de oxígeno; la sigma (Σ) que conserva dos electrones desapareados en los orbitales moleculares externos 2π* y es un RL, y la delta (Δ) que posee dos electrones, apareados en un solo orbital 2π* y no es un RL. Se ha estimado que la vida media de este radical es de 10⁻⁶ s. Dependiendo de la naturaleza de la matriz que se encuentre a su alrededor puede interactuar con otras moléculas por la



transferencia de su energía de excitación. Por combinación química es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares y puede oxidar directamente a las proteínas, al DNA y a los lípidos (Diplock, 1998; Halliwell, 2006).

➤ **Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)**

El $O_2^{\bullet-}$ se forma por la reducción univalente del O_2 y es la primera especie reactiva que se forma durante dicha reducción. En condiciones normales el $O_2^{\bullet-}$ es producido por diversos sistemas enzimáticos tales como el sistema xantina/xantina oxidasa (OX), la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa, la óxido nítrico sintasa y el citocromo P450. Sin embargo, la cadena de transporte de electrones es la fuente más importante de generación del $O_2^{\bullet-}$ (Xiong *et al.*, 2007).

➤ **Radical hidroxilo (OH^{\bullet})**

El radical OH^{\bullet} es altamente reactivo, es la principal ERO que ocasiona daño celular ya que reacciona rápidamente con casi todas las moléculas biológicas. Ésta especie se puede formar por la ruptura homolítica de la molécula de agua; por radiación de alta energía (rayos X); durante la división del H_2O_2 por la reacción de Haber-Weiss o cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado de un metal de transición formándose el OH^{\bullet} y el ion hidroxilo (OH^-) (M'bemba *et al.*, 2007).

➤ **Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)**

El H_2O_2 no es un RL sin embargo, su importancia reside en que el H_2O_2 participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres. Posee una gran lipofilicidad que le permite atravesar con facilidad las membranas biológicas y difundirse a los organelos, dando lugar a una reacción de oxidación que genera el OH^{\bullet} (Cheeseman y Slater, 1993; Frei, 1994). Las principales fuentes de formación de H_2O_2 son la reducción univalente del oxígeno molecular y la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997).



➤ **Óxido nítrico (NO)**

Es sintetizado por la óxido nítrico sintasa, aunque es un RL poco reactivo, es precursor de otras especies reactivas de nitrógeno entre las que se encuentran el peroxinitrito, el ácido peroxinitroso, el dióxido de nitrógeno y el trióxido de dinitrógeno. Además, es capaz de formar complejos con los iones metálicos del grupo hemo. El óxido nítrico a concentraciones elevadas genera metabolitos que pueden reaccionar con el O_2 , el H_2O_2 y el $O_2^{\bullet-}$ inactivando enzimas y reaccionando con los ácidos nucleicos (Bredt *et al.*, 1991; Lamas *et al.*, 1992).

➤ **Anión peroxinitrito (ONOO⁻)**

El NO^{\bullet} reacciona con el $O_2^{\bullet-}$ formando el anión $ONOO^-$, un intermediario oxidante que puede protonarse y descomponerse con facilidad. Éste anión tiene la capacidad de modificar moléculas biológicas por oxidación o por nitración (Cassina y Radi, 1996; Turrens, 2003).

Durante su descomposición a pH fisiológico, el $ONOO^-$ puede producir algunos RL. Estos productos se forman por medio de dos mecanismos, el primero implica la protonación del $ONOO^-$ para formar el ácido peroxinitroso ($ONOOH$); este ácido por descomposición homolítica genera el radical dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) y el OH^{\bullet} . El segundo mecanismo implica una reacción entre el $ONOO^-$ y el dióxido de carbono (CO_2) para formar nitrosoperoxocarbonato ($ONOCO_2^-$), el cual se descompone para dar lugar al NO_2 y al radical carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) (Xiong *et al.*, 2007; Pacher *et al.*, 2007).

Finalmente, el anión superóxido es uno de los principales RL producidos por los organismos aeróbicos como un subproducto durante la reducción del oxígeno molecular en las mitocondrias. En promedio, una célula utiliza 10^{13} moléculas de O_2 por día y se estima que el 1% del oxígeno molecular formará ERO, por lo tanto, aproximadamente 10^{11} ERO se producen por cada célula en un día. Las células normalmente emplean múltiples mecanismos de defensa contra el daño inducido por los RL (Houghton y Mukherjee, 2009).



Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce un estrés oxidativo capaz de inducir daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo es un desequilibrio en la generación de especies oxidantes (RL y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa. Se presenta en diversos estados patológicos en los que se altera la funcionalidad celular contribuyendo, de esta manera, al desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, cataratas, retinopatía diabética, asma, infarto al miocardio, hipertensión, miocardiopatía, cirrosis hepática, pancreatitis, insuficiencia renal, nefrotoxicidad, isquemia y cáncer, entre otras (Gutteridge y Halliwell, 1990).

Por otra parte, para evitar los efectos tóxicos de las ERO las células cuentan con defensas antioxidantes. Se conoce como antioxidante a cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable retrasa o inhibe significativamente la oxidación de este sustrato (Diplock *et al.*, 1998). Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas: el sistema enzimático y el sistema no enzimático (endógeno y exógeno, respectivamente). Ambos sistemas actúan tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (Clarkson y Thompson, 2000; Houghton y Mukherjee, 2009).

El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas está formado por agentes antioxidantes de bajo peso molecular como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la diaforasa (DT) y el glutatión (GSH). Algunos sistemas enzimáticos tales como SOD y CAT actúan específicamente contra las ERO mientras que, algunos otros reducen tioles (Houghton y Mukherjee, 2009).

Cabe mencionar que estos sistemas enzimáticos antioxidantes dependen de otros nutrientes esenciales por ejemplo, la glutatión peroxidasa requiere cantidades adecuadas de selenio, la superóxido dismutasa depende de un aporte



adecuado de cobre y zinc y la actividad de la glutatión reductasa requiere de riboflavina.

Cuando la actividad de estos sistemas enzimáticos es insuficiente se produce una sobre producción tanto de iones superóxido como de peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical hidroxilo (OH^\bullet) que es altamente tóxico.

Por otra parte, el sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno se considera útil cuando el sistema endógeno se satura. Está conformado por una serie de compuestos llamados depuradores de RL que logran retrasar la producción de los estos (Combs, 2000). Ejemplos de antioxidantes hidrosolubles son la vitamina C o ácido ascórbico, el glutatión reducido (GSH) y el ácido úrico. Entre los antioxidantes liposolubles se encuentran la vitamina E, los carotenoides y la bilirrubina. Cuando los sistemas fisiológicos anteriores se saturan ya sea, por producción excesiva de radicales (radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, ejercicio físico extenuante, entre otros), o por descenso de la capacidad de los sistemas endógenos antioxidantes se involucran otros sistemas celulares como las membranas, los ácidos nucleicos y las proteínas (Child *et al.*, 1998).

La literatura científica describe el uso de plantas medicinales que pueden utilizarse para tratar los desórdenes donde las ERO juegan un papel importante. Un gran número de constituyentes aislados a partir de plantas han sido evaluados para demostrar sus propiedades antioxidantes. Muchos de estos compuestos se encuentran ya incorporados a preparados medicinales destinados a reducir los síntomas asociados con los altos niveles de ERO. Una importante fuente de antioxidantes es la dieta incluyendo las especies y los condimentos. En este sentido, la familia Lamiaceae posee diversas especies con potentes propiedades antioxidantes.

Los antioxidantes fenólicos como los flavonoides, taninos, cumarinas, xantanos y sus procianidinas poseen capacidad para eliminar de manera dosis dependiente los RL representando por lo tanto, potenciales recursos terapéuticos para las patologías relacionadas con los RL.



Normalmente, la dieta suministra una cantidad suficiente de antioxidantes que pueden ayudar a prevenir o retardar la ocurrencia de cambios patológicos asociados con el estrés oxidativo. Cuando la dieta no aporta la cantidad suficiente de dichos antioxidantes los suplementos alimenticios pueden ayudar a prevenir dichas alteraciones. A continuación se describen algunos ejemplos selectos de plantas con actividad antioxidante:

➤ ***Gingko biloba* (ginkgo)**

Gingko biloba (ginkgo) es ampliamente utilizado en la medicina tradicional para tratar desórdenes circulatorios especialmente en el cerebro y como antioxidante. Así, esta especie ha demostrado un efecto protector contra la isquemia cardiaca y la lesión por reperfusión miocárdica. Un gran número de estudios han permitido confirmar el carácter antioxidante de los extractos y sus fitoconstituyentes. De tal manera que el extracto de las hojas preparado con n-butanol y los flavonoides aislados a partir de este, fueron bioactivos en un ensayo con DDPPH y provocaron la reducción del citocromo C en un cultivo de células HL60 (Sloley *et al.*, 2000).

➤ ***Mangifera indica* (mango)**

Desde el punto de vista biológico el extracto acuoso de la corteza de mango presentó un efecto inhibitor significativo sobre la peroxidación de lípidos en cerebro de rata. El extracto también elimina los radicales hidroxilo y el ácido hipocloroso y, posee propiedades quelantes del ion hierro.

En cuba la decocción de la corteza de mango se utiliza a nivel industrial como ingrediente para los suplementos alimenticios, los productos cosméticos y los fitomedicamentos. Finalmente, uno de los flavonoides mayoritarios de esta especie, la magniferina, mantiene el equilibrio oxidante/antioxidante (Ghosal *et al.*, 1996; Rai *et al.*, 2007).



➤ ***Allium sativum* (ajo)**

La propiedad inhibitoria del ajo sobre la generación de ERO y la peroxidación lipídica se ha reportado en varios estudios *in vitro*. Banerjee y colaboradores (2002) demostraron que la ingesta de ajo aumenta la cantidad de antioxidantes endógenos lo que podría tener importantes efectos citoprotectores sobre el corazón. El sulfuro de dialilo confiere el sabor del ajo y atenúa la peroxidación lipídica. Su capacidad antioxidante se debe a que recoge intermediarios de RL. Otro componente importante es la alicina ya que puede tener múltiples mecanismos actuando como un antioxidante y como un inhibidor de ERO (Grudzinski *et al.*, 2001).

➤ ***Punica granatum* (granada)**

El jugo de la granada fermentada y el aceite de las semillas contienen flavonoides con una potente actividad antioxidante (Schubert *et al.*, 1999). Tres principales antocianidinas aisladas del fruto presentaron actividad atrapadora de RL y efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica (Noda *et al.*, 2002).



2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes de la especie *Prunus serotina* Ehrenb

2.1.1 Descripción botánica

El árbol del capulín (*Prunus serotina* Ehrenb, subespecie *capuli* (Cav) McVaugh) es un miembro de la familia Rosaceae (Figura 1) que crece en las serranías mexicanas y en otras regiones del continente americano (Martínez, 2007). Dicho árbol mide de 5.15 a 38.0 m de altura; la corteza es de una coloración café o grisácea, con tronco largo y recto; las hojas son estipuladas, simples, alternas, ovadas a lanceoladas, con flores de color blanco que se agrupan en racimos axilares colgantes y largos, de 10 a 15 cm de largo; de olor característico, su fruto es globuloso de color negro rojizo de 2 a 20 mm de diámetro; su sabor es agridulce y ligeramente astringente; con una sola semilla esférica y de sabor amargo (Martínez, 1989).



Figura 1. Flor y hojas de *Prunus serotina* Ehrenb.



2.1.2 Nombres comunes

La especie se conoce popularmente con los nombres de capulín (México y Puebla), cerezo, shencua, shengua, xengua (Michoacán), cusabi, uasiqui, jeco (Chihuahua), pakshumk, t-nundaya, capuli taunday, paté shimal-ma-lu (Oaxaca) y tzu'uri (Nayarit) (McVaugh, 1951; Sanchez, 2000).

2.1.3 Distribución geográfica

El capulín es un árbol originario de América y habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Está asociado a los bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, al matorral xerófilo, a los bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto.

En la República Mexicana la especie se distribuye principalmente en los Estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Figura 2) (Lara y Márquez, 1996).

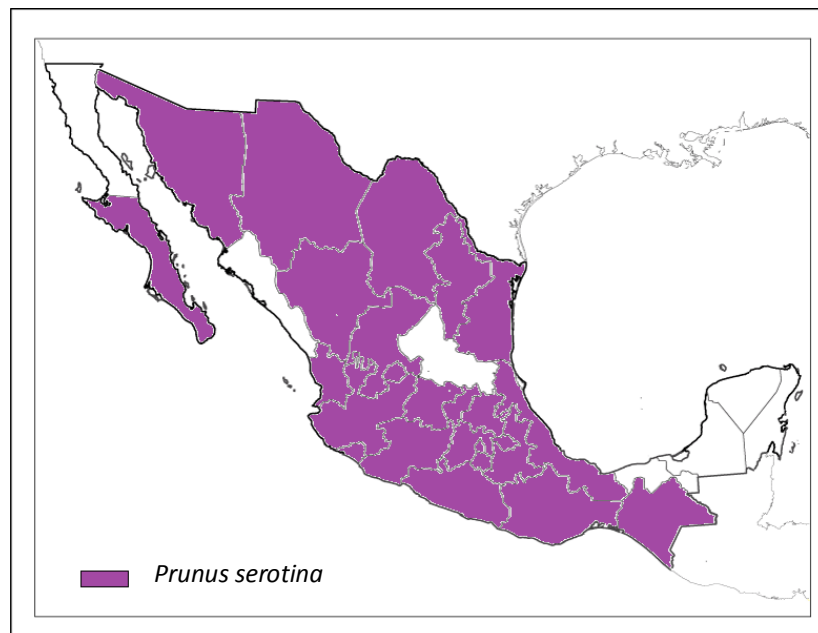


Figura 2. Distribución geográfica de *Prunus serotina* en la República Mexicana.



2.1.4 Usos y propiedades medicinales

La corteza, las hojas y el fruto de la especie *P. serotina* se han utilizado desde tiempos prehispánicos como alimento y remedio (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999). En los Estados de Aguascalientes, Hidalgo, Michoacán, Morelos y Estado de México, se emplea para el tratamiento de la tos un jarabe preparado a partir del fruto o la infusión de las hojas, cada ocho horas (Anales, 1961; Argueta, 1994; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, 2009). También se emplea como antioxidante en la elaboración de cosméticos y medicamentos herbolarios (Olszewska, 2008).

En el Distrito Federal comúnmente se utilizan las hojas para elaborar una infusión para tratar la diarrea; la corteza, las hojas y la miel de abeja son de utilidad para el tratamiento del dolor abdominal. Por otro lado, las ramas se utilizan como agente fortificante para "hojearse" en el temazcal (Anales, 1961).

En el Estado de Sonora las hojas y la corteza son empleadas en el tratamiento de la diarrea, el catarro, las nubes en los ojos, y las fiebres periódicas; el cocimiento de la corteza puesto al sol se utiliza para el tratamiento de las cámaras de sangre, se sabe también que el cocimiento del fruto es utilizado para tratar el mal del orín y las hojas se utilizan también como agente antiespasmódico (Anales, 1961; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, 2009).

En los siglos XVI y XX, la especie aparece consignada para los siguientes usos: tratamiento de la dermatosis, la dispepsia, la neumonía, la disentería y, como agente antiprurítico, antidiarréico, antiespasmódico y antipalúdico (Anales, 1961; Martínez, 1989; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, 2009).

Otros usos importantes que se le atribuyen a la especie se centran en los frutos los cuales, se utilizan para algunos padecimientos cardiacos, mareos y dolor de dientes, además es el producto más apreciado del árbol por su valor comestible en la preparación de jaleas, dulces regionales, mermeladas, tamales y para preparar licores (Hernández, 1946; Kim *et al.*, 2005; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional, 2009).



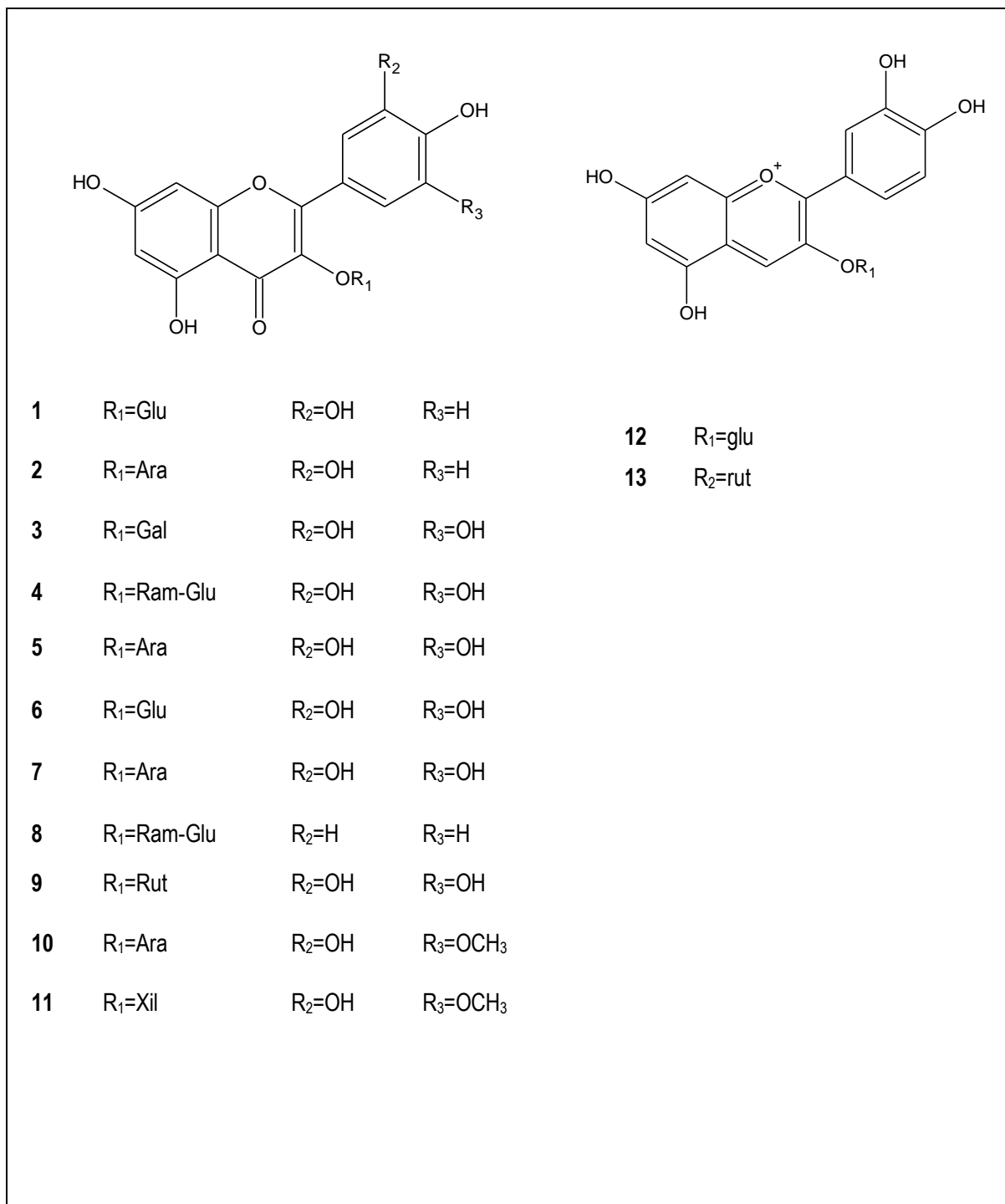
2.1.5 Antecedentes fitoquímicos de *Prunus serotina* Ehrenb

Los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre la especie han permitido el aislamiento y la caracterización de once flavonoides, cuatro triterpenoides, dos glicósidos cianogénicos, dos antocianinas, un compuesto aromático simple y un fenilpropanoide (Cuadro 1).

Los flavonoides se caracterizaron como: la astragalina (1), la juglamina (2), la hiperina (3), el neohesperósido (4), la guaijaverina (5), la isoquercetina (6), la avicularina (7), la rutina (8), la isoramnetina (9), el xilopiranósido de la isoramnetina (10) y el ramnopiranosil-galactopiranósido de quercetina (11). Las dos antocianinas aisladas fueron caracterizadas como el glucósido (12) y el rutinósido de la cianidina (13). El ácido clorogénico (14) y el benzoato de glucopiranosilo (15) fueron identificados en la especie y pertenecen a las categorías de los fenilpropanoides y los compuestos aromáticos simples, respectivamente. Finalmente, la prunasina (16), la amigdalina (17), el ácido ursólico (18) y tres derivados del mismo han sido caracterizados en la especie [aldehído ursólico (19), ácido 2 α ,3 α -dihidroxiuro-12-en-28-oico (20) y ácido corosólico (21)]. (Biessels *et al.*, 1974; Horsley y Meinwald, 1981; Santamour *et al.*, 1998; Hass *et al.*, 1999; Ordaz *et al.*, 1999; Olszewska y Wolbis, 2002; Sang *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2002; Kayano *et al.*, 2004; Deineka *et al.*, 2005; Lv *et al.*, 2005; Olszewska *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005; Amico *et al.*, 2006; Wijeratne *et al.*, 2006; Olszewska, 2007; Olszewska, 2008).



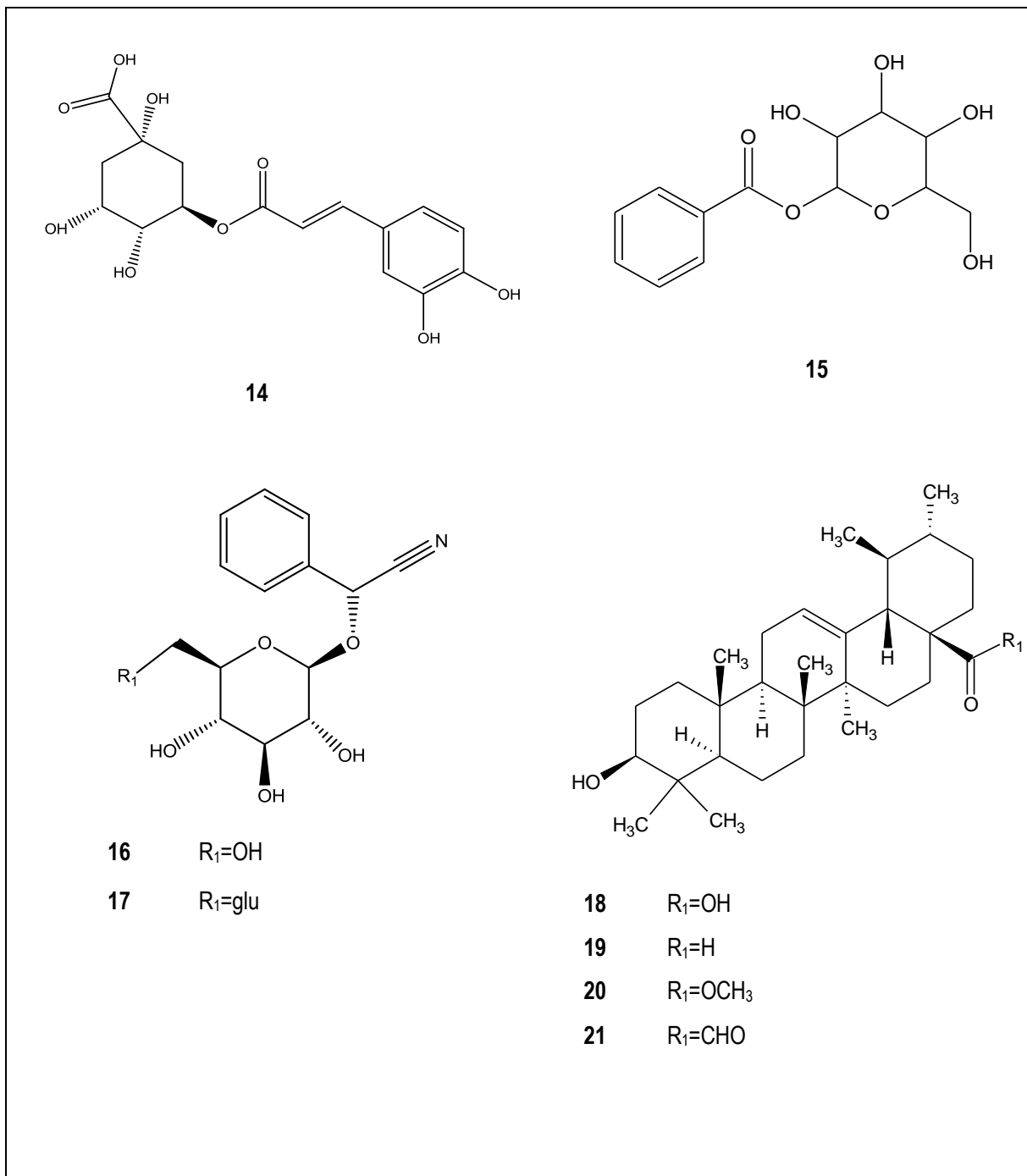
Cuadro 1. Metabolitos aislados de la especie *Prunus serotina* Ehrenb.





Cuadro 1. Metabolitos aislados de la especie *Prunus serotina* Ehrenb

(continuación).



2.2 Antecedentes de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst

2.2.1 Descripción botánica

Haematoxylon brasiletto es un árbol de 7 a 15 m de altura; las ramas poseen espinas duras de 1 a 3 cm de largo. La corteza es de café claro a rojiza y el centro del tallo es café oscuro o rojo intenso. Las hojas se encuentran dispuestas en forma de moño (opuestas) y están divididas en seis hojuelas. Las flores son amarillas y se encuentran formando racimos muy vistosos y ligeramente desiguales en tamaño (Figura 3). Los frutos son legumbres aplanadas más largas que anchas y no abren al madurar; las semillas son de forma alargada.



Figura 3. Flores (izquierda) y árbol (derecha) de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

2.2.2 Nombres comunes

En México la especie es conocida popularmente con los nombres de “azulillo”, “corteza de Brasil”, “palo de tinta”, “palo tinto”, “guichachaco”, “yowi” y “kakoameé”, entre otros (Argueta *et al.*, 1994).



2.2.3 Distribución geográfica

H. brasiletto es originario del norte de Granada y habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Es una planta silvestre y está asociada a bosques tropicales (caducifolio y subcaducifolio), espinosos, mesófilo de montaña, de encino y de pino. Ésta especie se distribuye principalmente en los Estados de: Baja California Sur, Sonora, Morelos, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y en el Estado de México (Figura 4) (Argueta *et al.*, 1994).

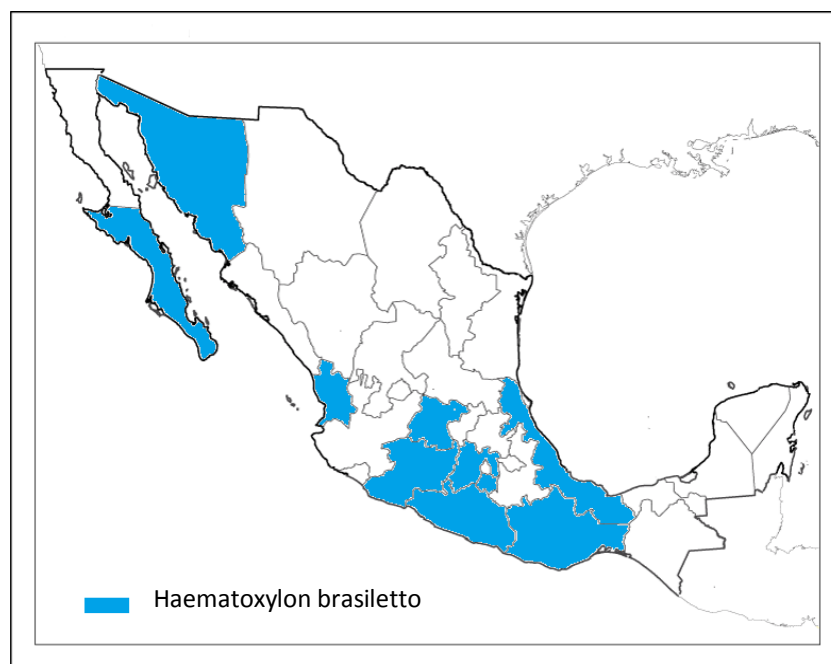


Figura 4. Distribución geográfica de *Haematoxylon brasiletto* Karst. en la República Mexicana.

2.2.4 Usos y propiedades medicinales

En el siglo XVI, el Códice Florentino señala que ciertas partes de la planta eran utilizadas para combatir las fiebres. Francisco Hernández señala, en su obra, la utilidad de la especie para quitar la fiebre y detener la diarrea (Argueta *et al.*, 1994).



En México, la corteza, la madera o el "corazón" del tronco se utiliza para tratar padecimientos del sistema cardiovascular. En Baja California Sur y en el Estado de México el macerado del corazón del tallo se utiliza para tratar la presión arterial. En el Estado de Morelos la infusión de la corteza y/o la madera junto con la especie *Citrus sp.* se utiliza para disminuir el nerviosismo. La infusión de la corteza y el tronco también es de utilidad para tratar padecimientos renales, trastornos gastrointestinales (dolor de estómago, úlcera gástrica y diarrea), dolor de bazo y de dientes. La infusión de las flores se emplea para aliviar el dolor de espalda, el resfriado y la tos. La especie aparece también señalada para tratar los ataques epilépticos, la diabetes, la anemia, la fiebre y la inflamación (Paris y Rousselet, 1958; Lolor y Martin, 1959; Argueta *et al.*, 1994).

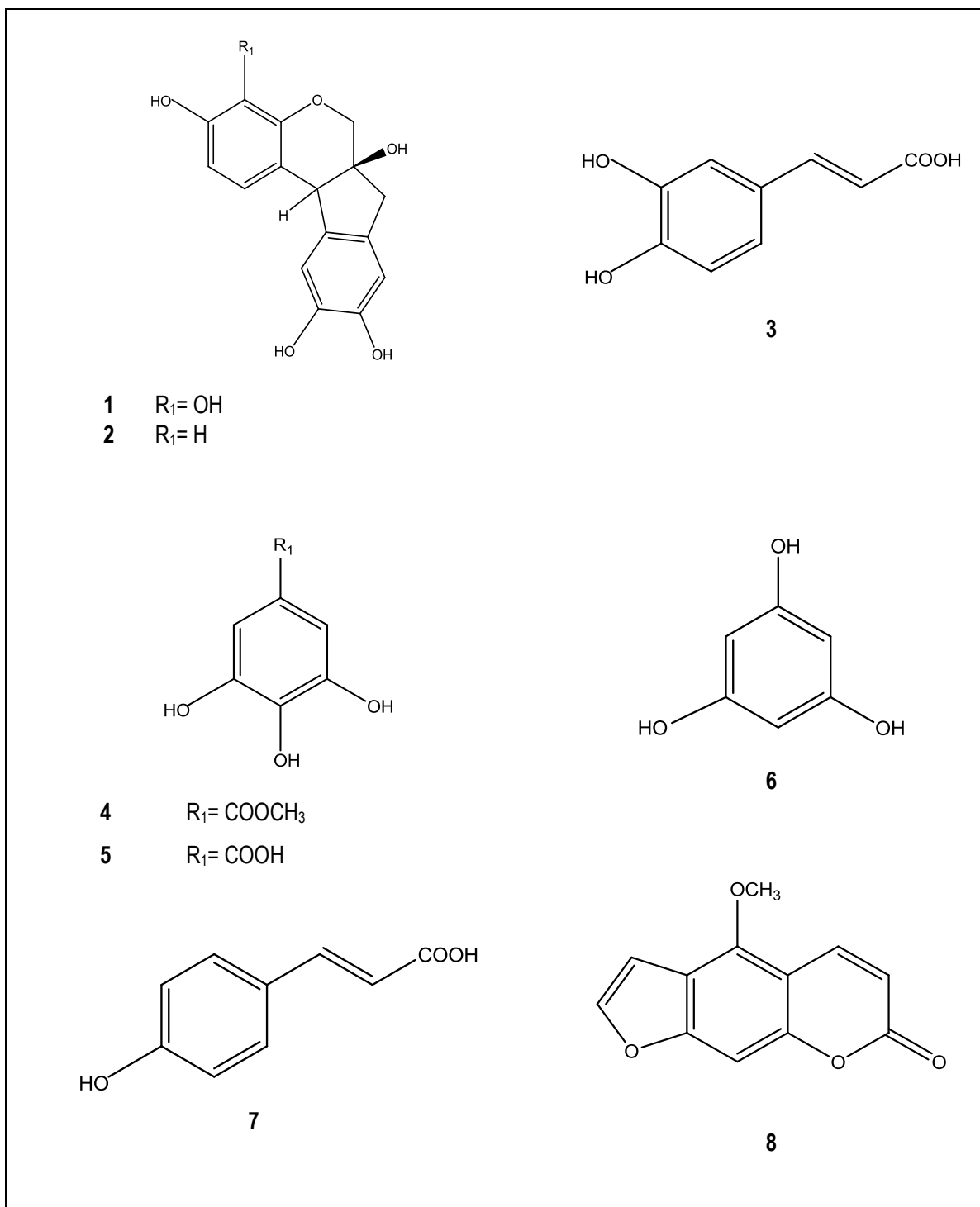
2.2.5 Antecedentes fitoquímicos de *Haematoxylon brasiletto* Karst

Los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre la especie *H. brasiletto* han permitido el aislamiento y la caracterización de dos bencilcromenos [hematoxilina (1) y brazilina (2)], cinco compuestos aromáticos simples [ácido caféico (3), galato de metilo (4), ácido gálico (5), floroglucinol (6) y ácido 4-hidroxi cinámico (7)] y una furanocumarina lineal [(5-metoxisoraleno (8)] (Cuadro 2) (Sánchez *et al.*, 1958 ;Pratt y Yuzuriha, 1959; Rivero, 2008).

Desde el punto de vista biológico el extracto acuoso de la madera presentó actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhosatus* y *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, el extracto del tallo obtenido con éter fue activo contra las especies *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brusella suis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* (Sánchez *et al.*, 1958; Pratt y Yuzuriha, 1959; Rivero, 2008).



Cuadro 2. Constituyentes químicos de la especie *Haematoxylon brasiletto* Karst.





3. OBJETIVOS

- Encontrar las mejores condiciones de extracción para el ácido clorogénico presente en las hojas frescas y secas de *Prunus serotina* Ehrenb.
- Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), que permita identificar y cuantificar el contenido de hemateína y hematoxilina en la infusión y el extracto metanólico de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Material vegetal

Las hojas de *Prunus serotina* Ehrenb. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh fueron recolectadas en Ciudad Universitaria, en el mes de agosto de 2010. El material vegetal fue identificado por comparación de sus características macroscópicas y sus perfiles cromatográficos en capa delgada y CLAE con una muestra auténtica.

La corteza de *Haematoxylon brasiletto* fue adquirida en el mercado de Sonora, México, D.F, en el mes de septiembre de 2010. De nueva cuenta, el material vegetal fue identificado siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

4.2 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, la adquisición, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC).

El análisis del contenido de ácido clorogénico se realizó en una columna C18 (Fortis™ Technologies Ltd.), con un tamaño de partícula de 5 µm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). La concentración de las muestras oscila entre 100-1000 µg/mL del analito. Por otra parte, el análisis de la hemateína y la hematoxilina se llevó a cabo en una columna C18 (Waters™ BEH Technology), de 50 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. El volumen de inyección utilizada fue de 10 µL en ambos casos. La elución se realizó con un sistema isocrático y la fase móvil consistió en una mezcla binaria



constituida por MeOH:Buffer de acetatos (Acetato de sodio 0.01M: Ácido acético (94:6); pH= 2,66) en la proporción 12:88 para el análisis del ácido clorogénico y de una mezcla de MeOH:Agua (TFA 0.1%) 90:10 para analizar el contenido de hemateína y hematoxilina. La velocidad de flujo utilizado fue de 0.5 mL/min, la temperatura empleada para los análisis fue de 25°C. La longitud de onda empleada para la detección de los compuestos fue de 254 nm y 285 nm. Todos los disolventes empleados durante el análisis fueron grado HPLC.

4.3 Preparación de los extractos a partir de las hojas del capulín

Los extractos vegetales se prepararon utilizando las condiciones experimentales descritas en la Tabla 1. Para ello, 20 g de material vegetal fragmentado se extrajeron con 250 mL del disolvente apropiado durante 30 min en un matraz bola o Erlenmeyer de 500 mL; la solución resultante se filtró para su posterior análisis. Se trabajaron tres réplicas independientes para cada experimento realizado.

Tabla 1. Condiciones experimentales para preparar los extractos vegetales.

Experimento	Disolvente ⁽¹⁾	Método de extracción	Material vegetal
1	70:30	Sonicación	Seco
2	100	Sonicación	Seco
3	70:30	Soxhlet	Seco
4	100	Soxhlet	Seco
5	70:30	Sonicación	Fresco
6	100	Sonicación	Fresco
7	70:30	Soxhlet	Fresco
8	100	Soxhlet	Fresco

⁽¹⁾El disolvente de extracción consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH o EtOH con agua en proporción 70:30.



4.4 Determinación del contenido de ácido clorogénico en los extractos de trabajo

Las soluciones preparadas conforme a lo descrito en el punto 4.3 fueron analizadas mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia utilizando la metodología analítica previamente validada en el laboratorio (Rosas, 2010).

Antes de analizar las muestras se evaluó, en primer lugar, la adecuabilidad del método analítico. Para ello, se realizó el análisis por sextuplicado de una solución estándar que contenía 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogénico. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la DER debe ser menor del 2% para considerar que el método es adecuado para la aplicación que se pretende.

Posteriormente, se preparó una curva de calibración utilizando cinco niveles de concentración diferentes (100 $\mu\text{g/mL}$ – 1000 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y se calcularon los parámetros estadísticos b , m , r , r^2 y los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen $IC(\beta_1)$ e $IC(\beta_0)$, respectivamente.

4.5 Preparación de la infusión de trabajo a partir de la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst

Para preparar la infusión de trabajo a partir de la corteza del palo de Brasil, 13 g de material vegetal fragmentado se extrajeron con 250 mL de agua en ebullición durante una hora en un matraz Erlenmeyer de 500 mL; la solución resultante se enfrió y se filtró cuantitativamente para su posterior uso.

4.6 Determinación del contenido de hemateína y hematoxilina en la infusión

Para evaluar los parámetros de calidad del método analítico 100 mg de hemateína o hematoxilina se trasvasaron por separado, a un matraz volumétrico de 20 mL y se disolvieron con MeOH. A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias para que un mL de la misma contenga 2.5, 2.0, 1.0, 0.5 y



0.25 mg/mL de hemateína o hematoxilina. La concentración seleccionada como 100% fue de 1 mg/mL para los dos compuestos.

La presencia de la hemateína y la hematoxilina en la infusión de la corteza de *H. brasiletto* se corroboró por medio de la co-elución de una muestra de la matriz de trabajo con muestras auténticas de los productos naturales. Los cromatogramas obtenidos se ilustran en las Figuras 5-9.

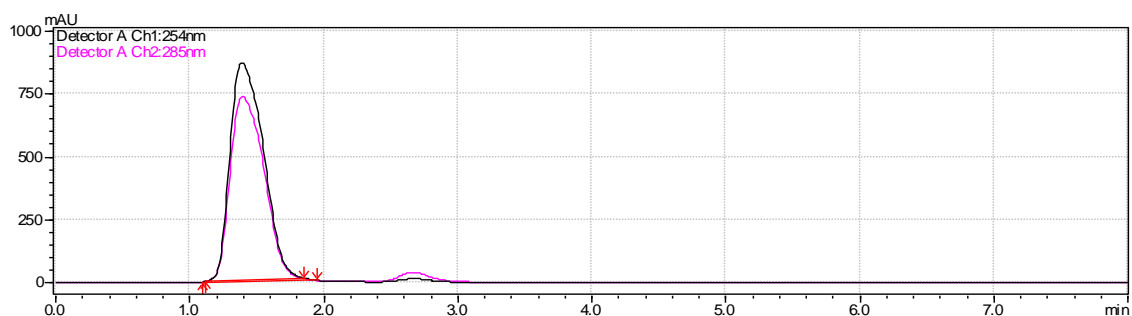


Figura 5. Cromatograma obtenido con la infusión de trabajo.

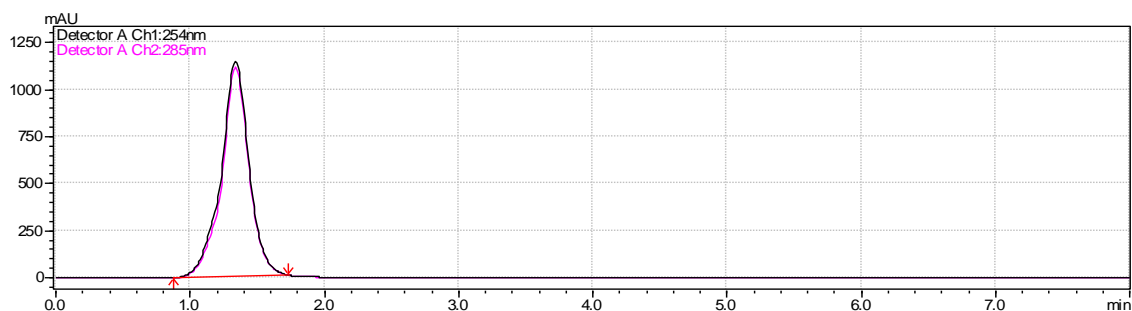


Figura 6. Cromatograma obtenido con la hemateína.

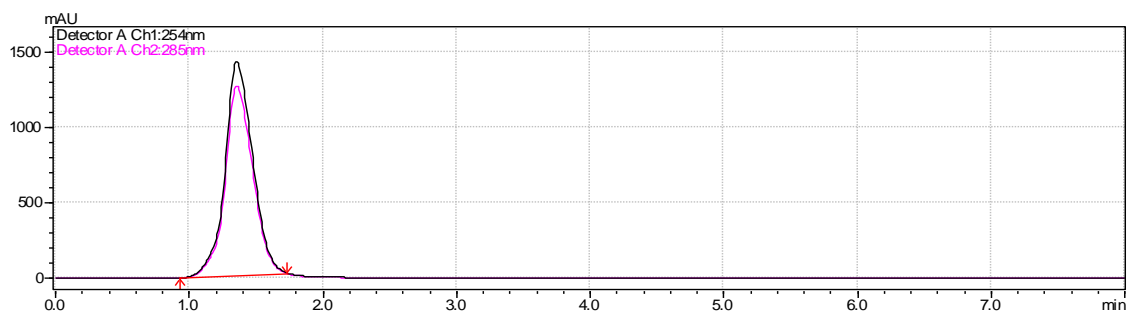


Figura 7. Cromatograma obtenido con la co-elución de la infusión y la hemateína.

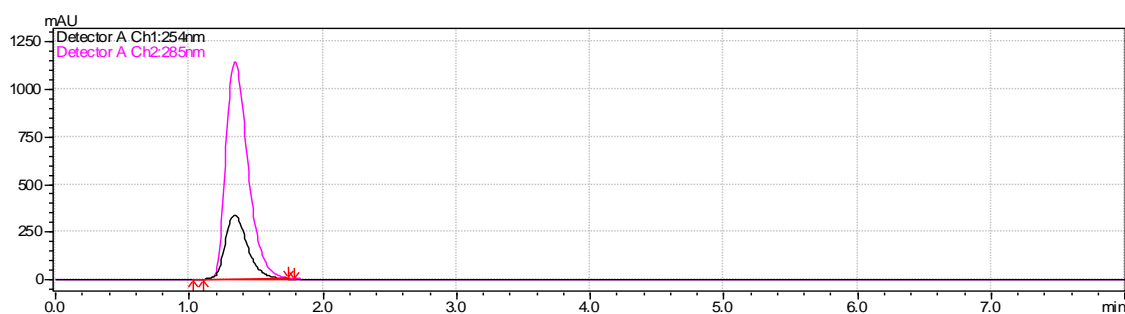


Figura 8. Cromatograma obtenido con la hematoxilina.

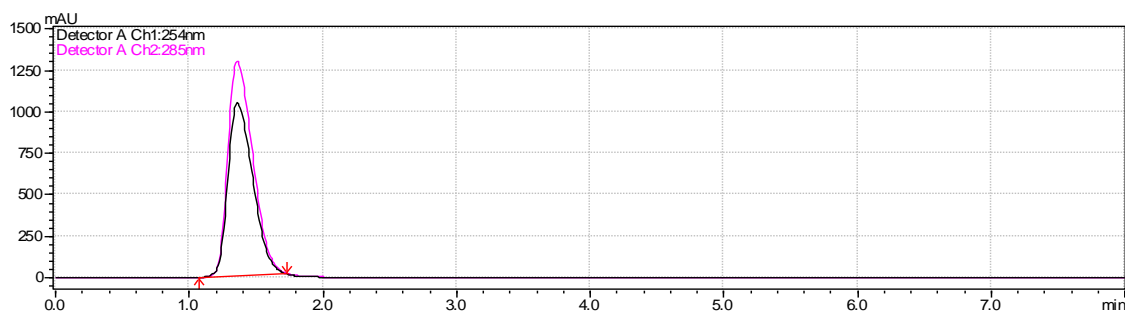


Figura 9. Cromatograma obtenido con la co-elución de la infusión y la hematoxilina.

4.7 Evaluación de los parámetros de desempeño del método analítico

4.7.1 Selectividad y estabilidad analítica de la muestra

Para evaluar la selectividad y la estabilidad del producto natural se registraron los cromatogramas de las soluciones estándar antes y después de someterlas a las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

Para la preparación de las soluciones estándar 5 mg de hemateína o de hematoxilina se disolvieron en 5 mL de MeOH. Las soluciones resultantes contienen 1.0 mg/mL de los compuestos por analizar.



Tabla 2. Condiciones experimentales para evaluar la especificidad de la metodología analítica.

Factor a evaluar	Procedimiento
Basicidad	1 mL de la solución estándar de hemateína o hematoxilina y 1 mL de NaOH 1 M se sometieron a reflujo durante 30 min.
Acidez	1 mL de la solución estándar de hemateína o hematoxilina y 1 mL de HCl 1 M se sometieron a reflujo durante 30 min.
Oxidación	1 mL de la solución estándar de hemateína o hematoxilina y 1 mL de H ₂ O ₂ al 5% se sometieron a reflujo durante 30 min.

4.7.2 Linealidad

4.7.2.1 Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó, por triplicado, una curva de calibración utilizando cinco niveles de concentración. Para ello, 100 mg de hemateína se disolvieron en 20 mL de MeOH. A partir de esta solución se prepararon las diluciones necesarias para que cada mililitro de la misma contenga entre 0.25 mg/mL y 2.5 mg/mL.

El análisis de la hematoxilina se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para la hemateína.

Con los resultados obtenidos se calculó la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r) mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $r^2 > 0.999$, $r > 0.999$, $m \neq 0$ y $b = 0$.

4.7.2.2 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó mediante la preparación, por triplicado, de una serie de soluciones estándar que contenían diferentes concentraciones de hemateína o de hematoxilina (0.25 mg/mL y 2.5 mg/mL) en un volumen constante de la matriz de trabajo (1 mL de infusión). Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se realizaron mediante un análisis de



regresión lineal simple y se calculó el coeficiente de determinación (r^2), la desviación estándar de la regresión ($s_{x/y}$), el coeficiente de variación de la regresión ($CV_{x/y}$) y los intervalos de confianza para la pendiente IC (β_1) y la ordenada al origen IC (β_0).

Los criterios estadísticos empleados son: $r^2 > 0.99$, $r \geq 0.99$, $m \neq 0$, $b = 0$, el IC (β_1) debe incluir la unidad y el IC (β_0) debe incluir el cero.

4.7.3 Exactitud

La exactitud del método analítico para ambos compuestos se evaluó utilizando la misma metodología del punto anterior. Los resultados obtenidos se expresaron en términos de la cantidad recuperada del analito (% de recobro).

Para que el método analítico sea exacto el porcentaje de recuperación deberá encontrarse entre el 98% y el 102% y la DER deberá ser menor del 2%.

4.7.4 Precisión

4.7.4.1 Precisión del sistema

10 mg de hemateína o hematoxilina se disolvieron en 10 mL de metanol. Se prepararon seis muestras independientes por dilución y se analizaron cada una de ellas por CLAE. Los resultados así obtenidos se expresaron en términos de desviación estándar relativa (DER). El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la DER deberá ser menor del 2% para considerar que el método es preciso.

4.7.4.2 Precisión del método (Repetibilidad)

La repetibilidad del método se determinó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describió en el punto anterior. La repetibilidad del método también se expresa en términos de coeficiente de variación (DER).



4.7.4.3 Precisión intermedia (Reproducibilidad intralaboratorio)

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución estándar que contenía 1.0 mg/mL de hemateína o de hematoxilina preparada por dos diferentes analistas y en dos diferentes días.

4.7.5 Robustez del método

Para evaluar este parámetro de desempeño se preparó una solución estándar de hemateína o de hematoxilina a una concentración de 1.0 mg/mL. Los factores instrumentales y no instrumentales que se modificaron en las condiciones normales de operación fueron la velocidad de flujo, la proporción de la fase móvil y el volumen de inyección. El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por duplicado de las muestras. Con los resultados obtenidos se determinó la media aritmética de la condición normal de operación y de las condiciones modificadas.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años, la búsqueda de fuentes ricas en antioxidantes naturales, ha sido de gran interés, debido a que algunos antioxidantes sintéticos llegan a generar efectos nocivos a la salud. De manera general, los antioxidantes naturales forman parte de la dieta nutricional diaria ya que estos se encuentran presentes en la mayoría de los alimentos que ingerimos.

Entre los compuestos con actividad antioxidante aislados a partir de plantas se encuentran los compuestos fenólicos como los flavonoides, los taninos y las cumarinas, entre otros. Uno de los compuestos más abundantes es el ácido clorogénico (Yuki *et al.*, 2010).

El ácido clorogénico es un éster del ácido caféico con el ácido quínico (Sang *et al.*, 2009). Anteriormente, el término ácido clorogénico se refería específicamente al ácido-5-*O*-cafeoilquínico, sin embargo, en la actualidad dicho término se refiere a una familia de ésteres trans. Estos compuestos inducen una amplia gama de respuestas incluyendo: antibacteriana (Li y Steffens, 2002), antifúngica (Ma *et al.*, 2007), antiinflamatoria (Moreira *et al.*, 2000), hipoglucemiante (Andrade y Wiedenfeld, 2001), antioxidantes, analgésica, antipiréticos y antimutagénicos (Jiang *et al.*, 2000; Marinova, 2009).

El mecanismo de acción antioxidante del ácido clorogénico se debe a su capacidad para interactuar con las ERO y los metales eliminando principalmente al radical OH^\bullet (Shi *et al.*, 2007). Estructuralmente, la capacidad antioxidante de esta molécula se debe a la presencia del anillo aromático y al doble enlace conjugado con el grupo catecol (Kono *et al.*, 1997).

Cuando los grupos $-\text{OH}$ situados en el anillo del ácido caféico no se modifican, el producto conserva su capacidad antioxidante. Sin embargo, en estudios recientes se propone que la esterificación de la cadena alifática permitiría la producción de nuevos agentes antioxidantes (Xiang y Ning, 2008).

Cabe mencionar que el ácido clorogénico, también inhibe la carcinogénesis en el colon, el hígado y la lengua además, protege contra el estrés oxidativo, actúa como captador de nitrito y supresor de la formación de nitrosaminas en el



compartimiento gástrico (Mori *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1996). *In vivo* se ha comprobado que modula los niveles de la glucosa-6-fosfatasa involucrada en el metabolismo de la glucosa (Hemmerle *et al.*, 1997) también, reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular y disminuyen la oxidación de los lípidos de baja densidad, el principal determinante de la aterosclerosis (Nardini *et al.*, 1995). Sin embargo, debido a su baja solubilidad, solo se pueden utilizar en ambientes acuosos, lo cual es un factor clave para su aplicación y modificación química (Shi *et al.*, 2007).

Por otro lado, este ácido se encuentra presente en la mayoría de las plantas, en cantidades muy pequeñas para inducir una respuesta biológica. Sin embargo, se acumula en los frutos o en las semillas en cantidades suficientes para mostrar un efecto fisiológico.

Con base en estos antecedentes y considerando el alto contenido de ácido clorogénico en sus partes aéreas, se seleccionó a la especie *Prunus serotina* Ehrenb como fuente natural para extraer dicho producto.

En las siguientes Tablas (3-8) se resumen la concentración de ácido clorogénico encontrada en diferentes especies de manzanas, de plantas utilizadas en la medicina oriental, en granos de café, en hojas y en frutos de diferentes especies.

Tabla 3. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/g peso seco), en pulpas de diferentes especies de manzanas.

Especie	Parte utilizada	mg ácido /g peso seco	Referencia
Pinova		0.082±0.004	
Reinders		0.1±0.005	
Jonagold	Pulpa	0.176±0.009	Gordana <i>et al.</i> , 2007
Iduna		0.13±0.004	
Braeburn		0.083±0.001	



Tabla 4. Contenido de ácido clorogénico (% ácido clorogénico/peso seco), en plantas utilizadas en la medicina oriental.

Especies/ Nombre común	Parte utilizada	% ácido/peso seco	Referencia
<i>Vaccinium myrtillus</i> (arándanos)		7.60%	Bagchi <i>et al.</i> , 2004
<i>Crataegus laevigata</i> (espinos)	Frutos	15%	Lee, 2008
<i>Lonicera caerulea</i> (madreselva azul)		25%	
<i>Artemisia vulgaris</i> (artemisia)	Hojas	15%	Moon <i>et al.</i> , 2009
<i>Cynara scolymus</i> (alcachofa)			
<i>Coffea arabica</i> (café)	Granos	6-7%	Ky <i>et al.</i> , 1997

Tabla 5. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/Kg peso fresco), en frutos de diferente especies.

Especie/ Nombre común	Parte utilizada	mg ácido/Kg peso fresco	Referencia
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón)	Frutos	46.38	García <i>et al.</i> , 2004
<i>Physalis peruviana</i> (aguaymanto)		4.27	Ivanova <i>et al.</i> , 2005
<i>Myrciaria dubia</i> (camu-camu)		1.36	
<i>Prunus serotina</i> (capulín)		52.54	Cieslik <i>et al.</i> , 2006
<i>Morinda citrifolia</i> (noni)		14.87	
<i>Cyphomandra betacea</i> (tomate de árbol)		81.47	

Tabla 6. Contenido de ácido clorogénico (% ácido clorogénico/peso seco), en granos de diferentes especies de café.

Especie/ Nombre común	Parte utilizada	% ácido/peso seco	Rango de concentración	Referencia
<i>C. umblotiana</i>	Granos	1	0.90-1.09	Campa, 2004
<i>C. salvatrix</i>		2.18	1.74-3.00	
<i>C. eugenioides</i>		5.17	4.55-6.08	
<i>C. racemosa</i>		5.33	4.78-5.57	
<i>C. heterocayx</i>		6.25	6.11-6.52	



Tabla 7. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/100g peso seco), en hojas de diferente especies.

Muestra/ Nombre común	Parte utilizada	mg ácido/100g peso seco	Referencia
<i>I. paraguariensis</i> (yerba mate)		1599.6 ±77.3	
<i>P. anisum</i> (anis)		87.1±4.8	
<i>A. satureioides</i> (marcela)	Hojas	33.6±1.2	Marques y Farah, 2009
<i>C. sinensis</i> (te)		49.5±1.7	
<i>C. citrates</i> (cañuela de limón)		44.9±0.3	
<i>C. oblonga</i> (membrillo)		33.1±0.2	

Tabla 8. Contenido de ácido clorogénico (mg ácido clorogénico/g peso fresco), en frutos de diferentes especies.

Especie/ Nombre común	Parte utilizada	mg ácido /g peso fresco	Referencia
<i>Tagetes terniflora</i> (clavel turco)		1.68	Bravo, 1998
<i>Ullucus tuberosus</i> (olluco)		14.71	
<i>Dioscorea trifida</i> (aji)	Frutos	5.40	Dreosti, 1996
<i>Eryngium foetium</i> (culantro)		13.57	
<i>Physalis pubescens</i> (uchuva)		1.37	
<i>Pasiflora quadrangularis</i> (granadilla)		93.26	Hernández <i>et al.</i> , 1999

Con base en estas consideraciones el presente trabajo de tesis, se planteó un diseño de experimentos para optimizar el método de extracción del ácido clorogénico a partir de una fuente natural.



5.1 Diseño factorial 2^3

Los diseños de experimentos consisten en una serie de pruebas en las que se hacen cambios en las variables de un proceso para poder estimar e identificar los cambios correspondientes en la respuesta de salida. El diseño experimental puede aplicarse entonces, para mejorar el desempeño o bien, para obtener procesos robustos a las fuentes de variabilidad externas. El diseño experimental aplicado en las primeras etapas del desarrollo de un proceso tiene las siguientes ventajas: un mejor rendimiento, una variabilidad reducida, un tiempo de desarrollo más corto y la disminución de los costos.

En este marco de referencia, el experimento de caracterización seleccionado se centra en determinar cuáles son las variables del proceso de extracción que afectan el rendimiento del ácido clorogénico a partir de su fuente natural. De acuerdo con los datos reportados en la literatura se sabe que las variables más importantes del proceso que influyen en el rendimiento son el método de extracción y el disolvente empleado.

Así, para establecer el rendimiento óptimo se utilizó un experimento factorial 2^3 , en que se pueden variar conjuntamente el método de extracción, el disolvente y el tipo de material vegetal. Para esta experimentación se utilizaron como variables fijas el volumen del disolvente y la cantidad de material vegetal. La cuantificación del ácido clorogénico se realizó utilizando un método por cromatografía de líquidos previamente validado (Brown *et al*, 2010).

En el diseño factorial seleccionado cada uno de los factores tiene 2 niveles [alto (+) y bajo (-)], de tal manera que permite 8 combinaciones entre los niveles y los factores. Geométricamente, el diseño es un cubo (Figuras 10 y 11) y cada una de las 8 corridas forman los vértices del cubo.

En la Tabla 9 se resumen los resultados de las 8 corridas en forma tabular (matriz de prueba) para el diseño factorial utilizando MeOH como disolvente.



Tabla 9. Resultados obtenidos utilizando como disolvente de extracción MeOH.

Experimento	Factores del diseño			Cantidad de ácido clorogénico ($\mu\text{g/mL}$)		
	Disolvente	Método de extracción	Material vegetal	1	2	3
1	70-30	Sonicación	Seco	550.991692	549.880559	549.774144
2	100	Sonicación	Seco	327.933246	325.802434	324.582481
3	70-30	Soxhlet	Seco	488.707611	476.107	490.539946
4	100	Soxhlet	Seco	342.279664	341.003218	341.136031
5	70-30	Sonicación	Fresco	109.865955	110.923822	108.93867
6	100	Sonicación	Fresco	100.993605	99.369992	97.2831187
7	70-30	Soxhlet	Fresco	134.429569	135.002999	138.856974
8	100	Soxhlet	Fresco	133.002947	133.976692	135.407069

(1-3) Resultados obtenidos a partir de tres réplicas independientes para cada experimento.

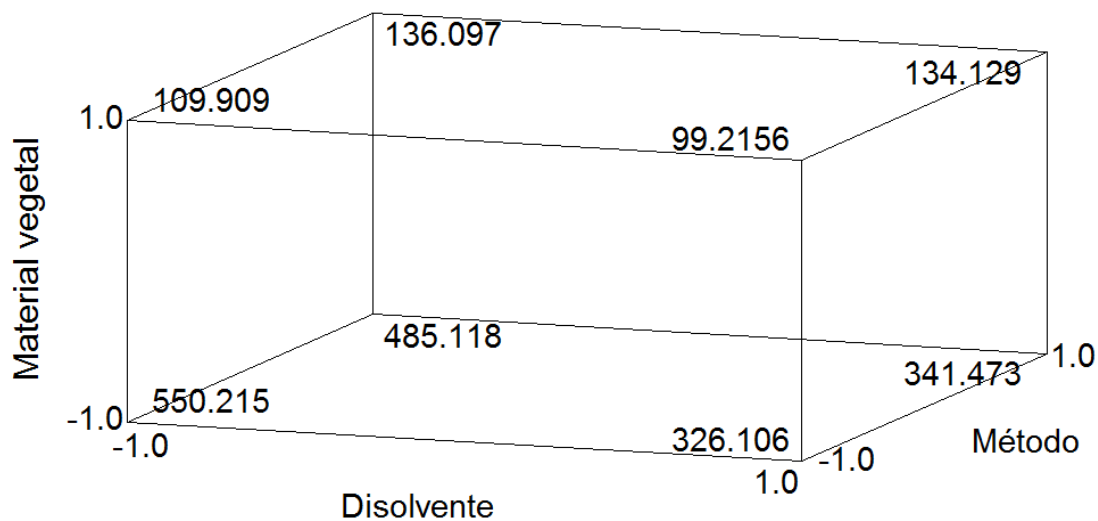


Figura 10. Representación geométrica del diseño 2^3 para el experimento con MeOH.



Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa STATGRAPHICS. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

$$\begin{aligned} \text{Concentración} & \\ \text{ácido clorogénico} & = \mu + \text{efecto A} + \text{efecto B} + \text{efecto C} + \text{efecto AB} + \text{efecto AC} + \text{efecto BC} + \text{efecto ABC} \\ & = 272.783 - 47.552 * \text{Disolvente} + 1.42125 * \text{Método} - 152.945 * \text{Material vegetal} + \\ & 11.1488 * \text{Disolvente} * \text{Método} + 44.3866 * \text{Disolvente} * \text{Material vegetal} + \\ & 13.8538 * \text{Método} * \text{Material vegetal} - 8.96724 * \text{Disolvente} * \text{Método} * \text{Material vegetal} \end{aligned}$$

El modelo calculado indica que el efecto del método de extracción es positivo, esto es, cuando se utiliza la sonicación (nivel bajo) como método de extracción el rendimiento se incrementa. Por otra parte, los efectos del disolvente y el material vegetal tienen un valor negativo sugiriendo entonces, que al utilizar MeOH al 100% y material fresco la cantidad de ácido clorogénico se reduce. Por último, el efecto de las interacciones disolvente-material vegetal, método-material vegetal y disolvente-método son mayores que la obtenida con el efecto principal.

La magnitud de estos efectos fue confirmada con el análisis de varianza (Tabla 10). Como se observa en la Tabla 10 el tipo de material vegetal es el factor más importante durante la extracción del ácido clorogénico en las condiciones experimentales realizadas. De la Tabla 10 también se observa que todos los efectos son significativos ya que sus valores de P son pequeños. Por otra parte, el valor de R^2 ajustada indica que el 99.97 % de la variabilidad total se encuentra explicada por el modelo propuesto. Finalmente, se construyeron los intervalos de confianza para cada uno de los coeficientes. Este análisis indicó que todos los factores son importantes, debido a que los valores calculados no incluyen al cero.



Tabla 10. Análisis de varianza del modelo factorial utilizando MeOH como disolvente.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Intervalo de confianza
A:Disolvente	54268.7	1	54268.7	5618.62	0.0000	54268.7±13.6245
B:Método	48.4788	1	48.4788	5.02	0.0396	48.4788±13.6245
C:Material vegetal	561414	1	561414	58125.09	0.0000	561414±13.6245
AB	2983.1	1	2983.1	308.85	0.0000	2983.1±13.6245
AC	47284.2	1	47284.2	4895.49	0.0000	47284.2±13.6245
BC	4606.29	1	4606.29	476.91	0.0000	4606.29±13.6245
ABC	1929.87	1	1929.87	199.81	0.0000	1929.87±13.6245
Error total	154.54	16	9.65872			
Total (corr.)	672689	23				

R-cuadrada = 99.977 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.967 porciento

En la Gráfica 1 se puede observar que los efectos que siguen el comportamiento lineal (sobre la recta) no son significativos, mientras que los efectos grandes están apartados de ella. Así, los efectos más importantes que surgen de este análisis son: disolvente, material vegetal y la interacción disolvente-material vegetal. Por otra parte la Gráfica 2 ilustra la varianza homogénea del modelo debido a la distribución paralela de los puntos. De lo anterior se desprende que el modelo describe la relación lineal entre las variables y no presenta datos atípicos.

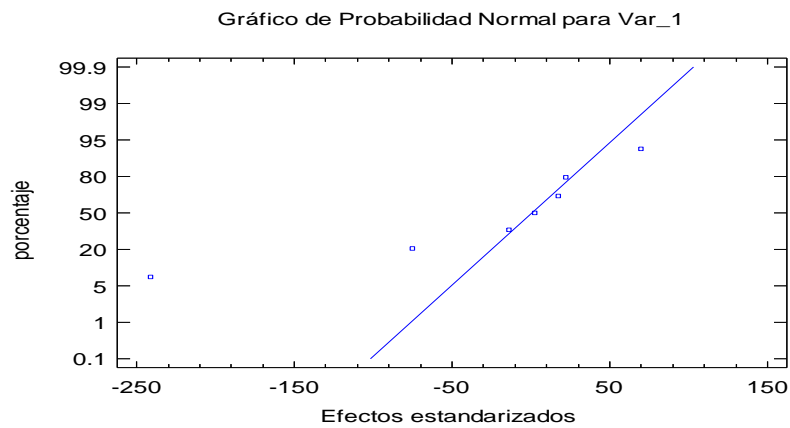


Gráfico 1. Gráfica de probabilidad normal para el experimento con MeOH.

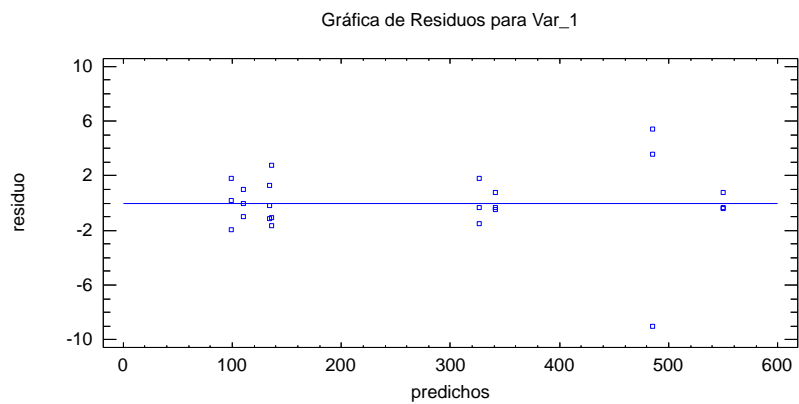


Gráfico 2. Gráfica de residuos para el experimento con MeOH.



En la Tabla 11 se resumen los resultados de las 8 corridas (matriz de prueba) empleando EtOH como disolvente de extracción.

Tabla 11. Resultados obtenidos utilizando como disolvente EtOH.

Experimento	Factores del diseño			Cantidad de ácido clorogénico ($\mu\text{g/mL}$)		
	Disolvente	Método de extracción	Material vegetal	1	2	3
1	70-30	Sonicación	Seco	436.010217	437.014995	440.156275
2	100	Sonicación	Seco	114.117547	115.332748	115.415287
3	70-30	Soxhlet	Seco	380.605708	383.274458	385.458067
4	100	Soxhlet	Seco	284.881262	282.136191	281.947238
5	70-30	Sonicación	Fresco	110.966294	110.653386	112.09444
6	100	Sonicación	Fresco	56.6393632	58.1394317	58.3904501
7	70-30	Soxhlet	Fresco	84.1409909	85.2175721	82.1177081
8	100	Soxhlet	Fresco	98.5164471	98.429098	96.2044256

(1-3) Resultados obtenidos a partir de tres réplicas independientes para cada experimento.

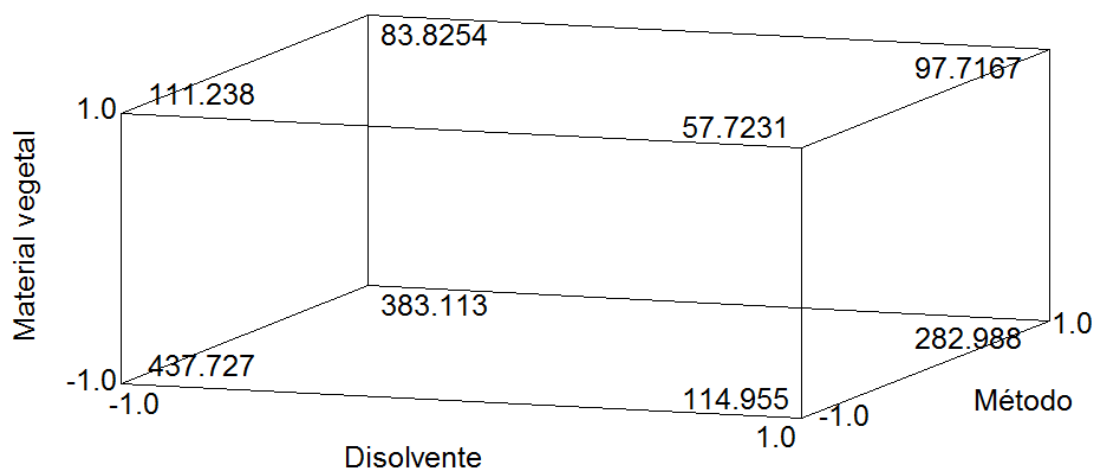


Figura 11. Representación geométrica del diseño 2^3 para el experimento con EtOH.



El mismo procedimiento descrito en los párrafos anteriores se siguió para evaluar el modelo utilizando etanol como disolvente de extracción. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

$$\begin{aligned} \text{Concentración} &= \mu + \text{efecto A} + \text{efecto B} + \text{efecto C} + \text{efecto AB} + \text{efecto AC} + \text{efecto BC} + \text{efecto ABC} \\ \text{ácido clorogénico} &= 196.161 - 57.815 * \text{Disolvente} + 15.7499 * \text{Método} - 108.535 * \text{Material vegetal} + \\ &36.2567 * \text{Disolvente} * \text{Método} + 47.9091 * \text{Disolvente} * \text{Material vegetal} - \\ &12.6047 * \text{Método} * \text{Material vegetal} - 19.4052 * \text{Disolvente} * \text{Método} * \text{Material vegetal} \end{aligned}$$

Del modelo anterior se desprende que el efecto del método de extracción es positivo, esto es, cuando se utiliza la sonicación (nivel bajo) como método de extracción el rendimiento se incrementa. De nueva cuenta los efectos del disolvente y el material vegetal son negativos sugiriendo que al utilizar EtOH al 100% y material fresco la cantidad de ácido clorogénico disminuye. Por último el efecto de las interacciones disolvente-método y disolvente-material vegetal son mayores con respecto al efecto principal (método de extracción).

La magnitud de estos efectos fue confirmada con el análisis de varianza (Tabla 12). Como se observa en la Tabla 12 el disolvente es el efecto principal que afecta el rendimiento de ácido clorogénico durante su extracción. De la Tabla 12 también se desprende que todos los efectos son significativos ya que sus valores de P son pequeños. Por otra parte el valor de R^2 ajustada indica que el 99.98 % de la variabilidad total se encuentra explicada por el modelo propuesto. Finalmente, se construyeron los intervalos de confianza para cada uno de los coeficientes; este análisis indicó que todos los factores son importantes, debido a que los valores calculados no incluyen al cero.



Tabla 12. Análisis de varianza del modelo factorial utilizando EtOH como disolvente.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Intervalo de confianza
A:Disolvente	80221.9	1	80221.9	32956.34	0.0000	80221.9±13.6245
B:Método	5953.46	1	5953.46	2445.77	0.0000	5953.46±13.6245
C:Material vegetal	282716	1	282716	116144.12	0.0000	282716±13.6245
AB	31549.2	1	31549.2	12960.87	0.0000	31549.2±13.6245
AC	55086.8	1	55086.8	22630.46	0.0000	55086.8±13.6245
BC	3813.09	1	3813.09	1566.47	0.0000	3813.09±13.6245
ABC	9037.44	1	9037.44	3712.72	0.0000	9037.44±13.6245
Error total	38.947	16	2.43419			
Total (corr.)	468417	23				

R-cuadrada = 99.9917 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 99.988 porciento

En la Gráfica 3 se puede observar que los efectos no significativos siguen un comportamiento lineal, mientras que los efectos grandes se encuentran apartados de la recta. Los efectos más importantes que surgen de este análisis son: disolvente, material vegetal y la interacción disolvente-material vegetal. Nuevamente, en la Gráfica 4 nos proporciona una suposición de varianza homogénea debido a la distribución paralela de los puntos.

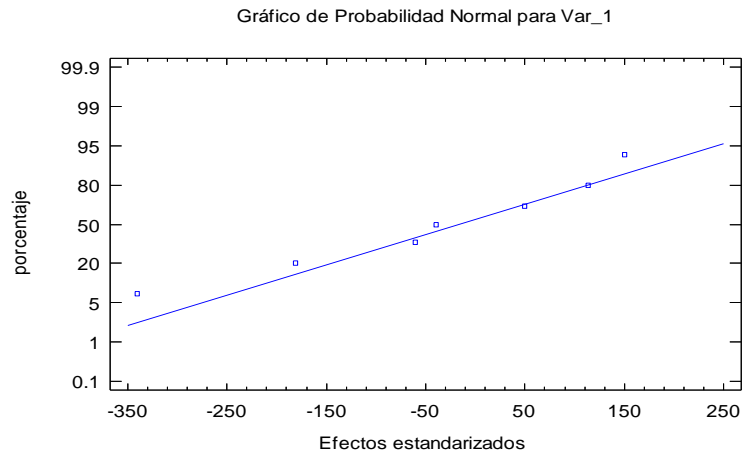


Gráfico 3. Gráfica de probabilidad normal para el experimento con EtOH.

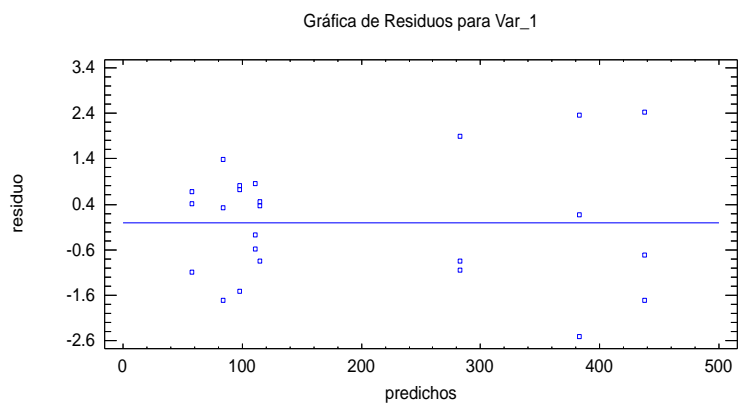


Gráfico 4. Gráfica de residuos para el experimento con EtOH.



5.2 Validación del método

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como, con otros documentos normativos nacionales e internacionales (ICH, 1995; ICH, 1996; FEUM, 2008). La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos es el documento legal instituido por la Ley General de Salud donde se establecen los métodos de análisis y los requisitos de identidad, pureza, potencia y otras características de calidad que garanticen que los fármacos, aditivos, medicamentos, radiofármacos y productos biológicos sean eficaces y seguros (FEUM,2008).

La validación de un método analítico se define como el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.

Los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías, ya que requieren diferentes esquemas de estudio.

- CATEGORÍA I. Método analítico para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.
- CATEGORÍA II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.
- CATEGORÍA III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico (liberación controlada de tabletas, disolución de cápsulas, etc.).
- CATEGORÍA IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés (FEUM, 2008).



Desde el punto de vista farmacológico la hematoxilina posee propiedades antiinflamatorias (Hikino *et al.*, 1977), antimicrobianas, antihipertensivas, antioxidantes, anticonvulsivantes, analgésicas y anti-aterogénicas (Takechi y Tanaka, 1982). También, se ha utilizado con éxito en las técnicas de tinción biológica.

Otras investigaciones con la hematoxilina permitieron el descubrimiento de uno de sus principales productos de oxidación: la hemateína. Ambos compuestos junto con la brazilina son considerados como los principales antibacterianos de la especie *Haematoxylon brasiletto*.

Considerando que cuando se prepara una infusión se propician las condiciones favorables para que la hematoxilina presente en la droga cruda se oxide a hemateína se desarrollo un método analítico para la valoración de la misma en la matriz vegetal. Adicionalmente las condiciones analíticas encontradas fueron de utilidad para cuantificar a la hematoxilina en los extractos orgánicos

Así, para el desarrollo del método analítico se probaron varias columnas de fase reversa, C8 y C18 con diferentes proporciones de disolventes como fase móvil. En todos los casos, se observó que las señales correspondientes a la hemateína y a la hematoxilina se presentaban en un tiempo de retención de 1,3 min. La única diferencia observada fue la longitud máxima de absorción para ambos compuestos. Por este motivo, y con la finalidad de expresar los resultados en términos de hematoxilina o hemateína presente en la infusión o los extractos orgánicos, respectivamente, se utilizaron ambos compuestos para demostrar la validez del método analítico.

A continuación se discute el análisis de resultados de cada característica de desempeño evaluada.



5.2.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad consiste en la verificación del sistema establecido con la finalidad de corroborar que dicho sistema funciona correctamente. Este parámetro de calidad se determinó mediante la inyección directa de una solución estándar de hemateína o hematoxilina (1.0 mg/mL) según sea el caso en el cromatógrafo de líquidos. Los resultados obtenidos mediante estos experimentos permitieron estimar que la resolución del componente mayoritario es mayor a 2 (Tabla 13). En las Figuras 12 y 13 se ilustran unos ejemplos de los cromatogramas obtenidos. Como se desprende de los resultados obtenidos en la Tabla 13, la DER es menor al 2% por lo tanto, el sistema funciona correctamente durante el uso rutinario del método.

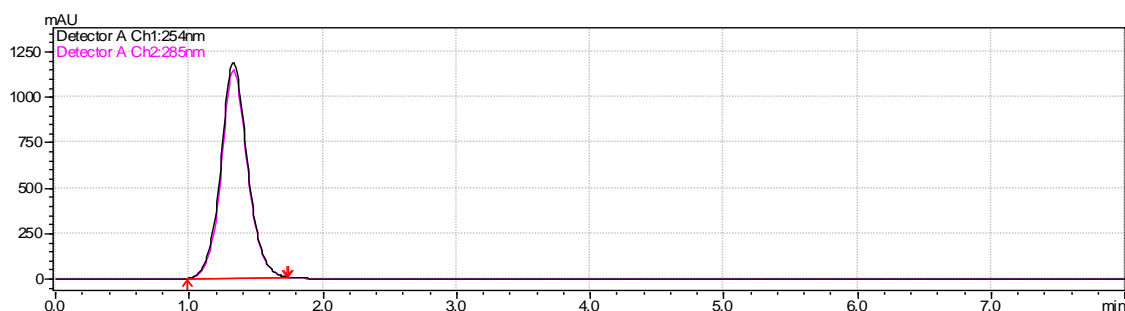


Figura 12. Cromatograma obtenido con una solución de 1.0 mg/mL de hemateína.

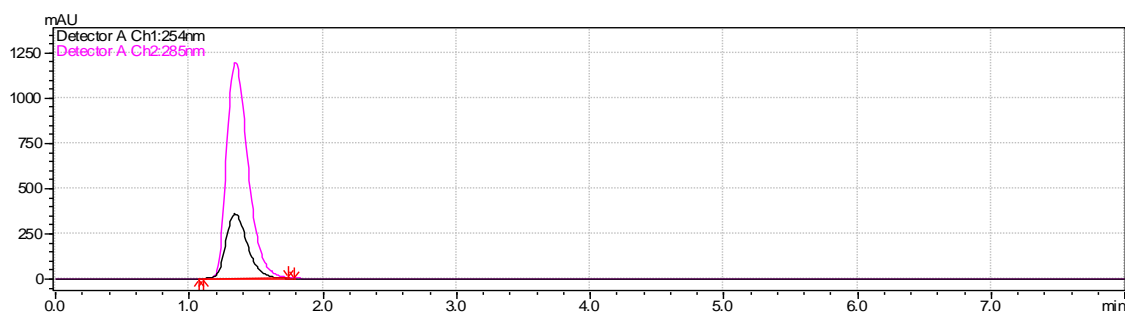


Figura 13. Cromatograma obtenido con una solución de 1.0 mg/mL de hematoxilina.



Tabla 13. Resultados obtenidos durante la evaluación de la adecuabilidad del sistema.

No. de réplica Hemateína (1.0 mg/mL)	Área	No. de réplica Hematoxilina (1.0 mg/mL)	Área
1	17365031	1	13273471
2	17424538	2	13308585
3	17463853	3	13340015
4	17399166	4	13372717
5	17473011	5	13359527
6	17461689	6	13208144
\bar{y}	17431214.7	\bar{y}	13310409.8
S	42878.5539	S	61639.6838
DER	0.24598718	DER	0.46309381

5.2.2 Especificidad del método

La especificidad, es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra (especificidad) o bien, componentes que pudieran presentarse por efectos ambientales (productos de degradación, impurezas) y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad).

Para evaluar la especificidad del método propuesto se determinó la respuesta de las sustancias de degradación tanto, de la hemateína como de la hematoxilina, originadas por la influencia de factores como la hidrólisis y la oxidación. Los cromatogramas resultantes al inicio y al término de los experimentos se resumen en las Figuras 14 a 21 y en la Tabla 14.



Tabla 14. Resultados para especificidad de la hemateína y hematoxilina.

Factor a evaluar	Hemateína 1.0 mg/mL	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC) (uA)	Hematoxilina 1.0 mg/mL	Tiempo de retención (t _R)	Área bajo la curva (ABC) (uA)
Estándar	1	1.331	16712998	1	1.342	15324242
	2	1.33	16730918	2	1.344	15404673
	3	1.329	16760645	3	1.343	15373524
Basicidad	1	1.284	11292535	1	1.303	12561639
	2	1.289	11318403	2	1.302	12786482
Acidez	1	1.342	10993982	1	1.349	8100377
	2	1.343	10996759	2	1.35	8091731
Oxidación	1	1.357	14164004	1	1.375	9999388
	2	1.357	14085159	2	1.375	9886953

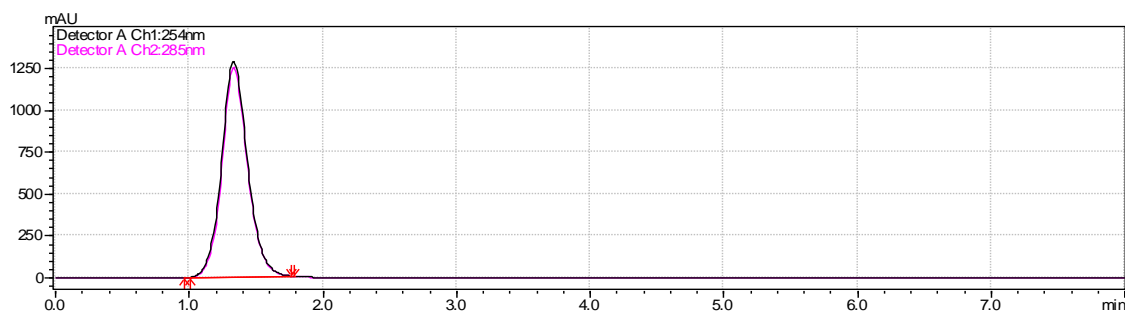


Figura 14. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación.

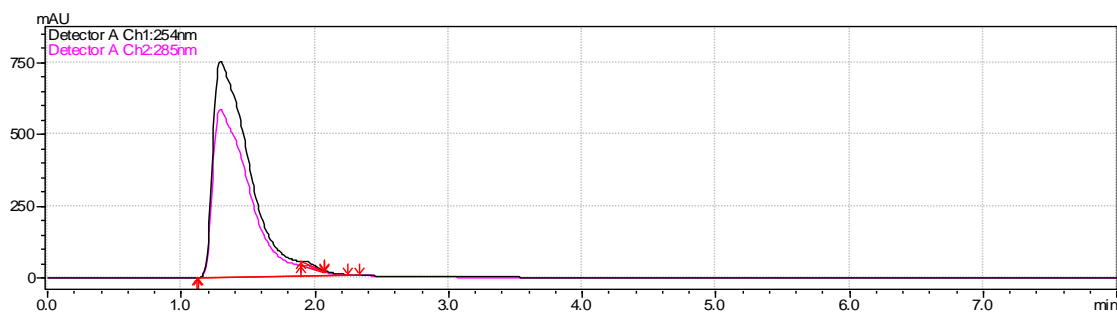


Figura 15. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de NaOH 1 M.

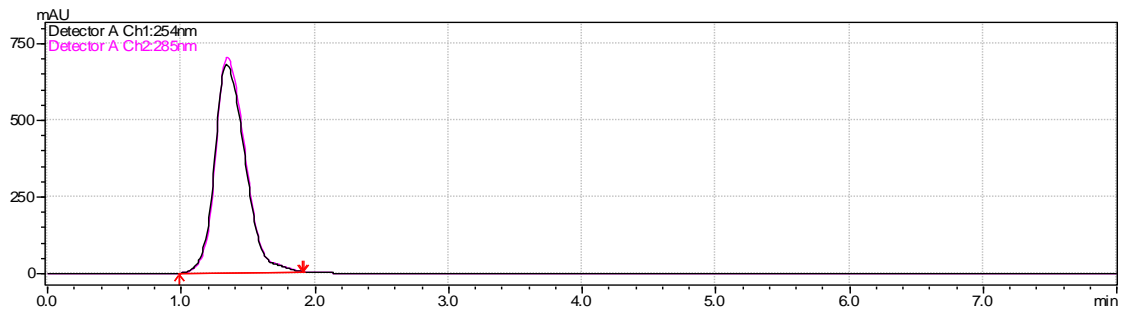


Figura 16. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de HCl 1 M.

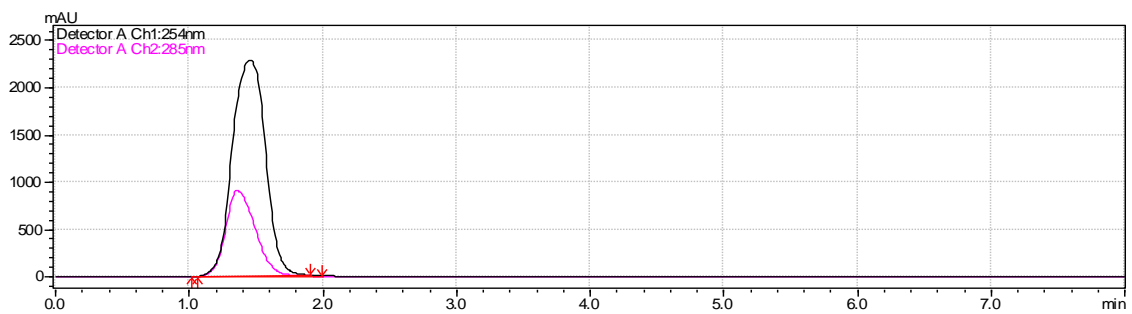


Figura 17. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de H₂O₂ al 5%.

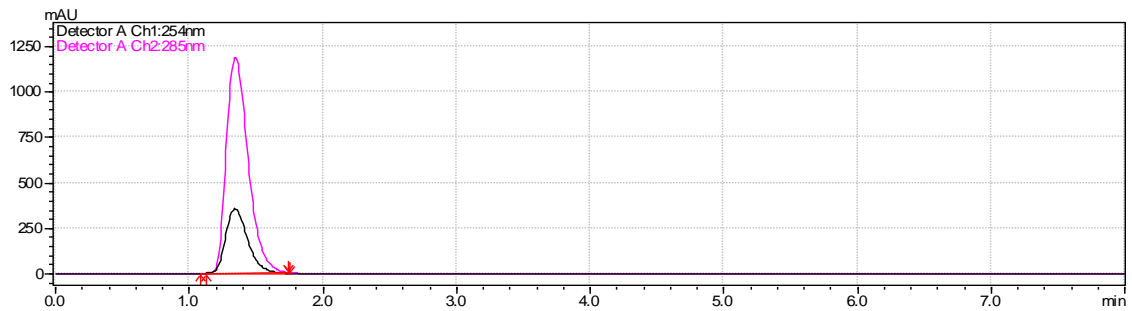


Figura 18. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación.

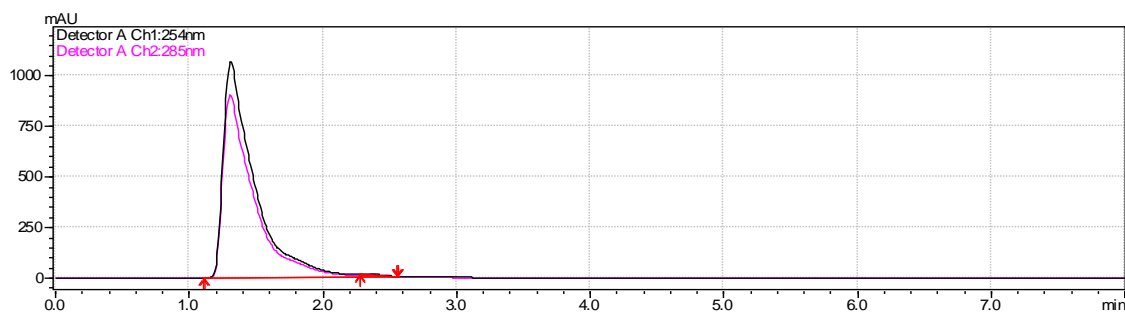


Figura 19. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de NaOH 1 M.

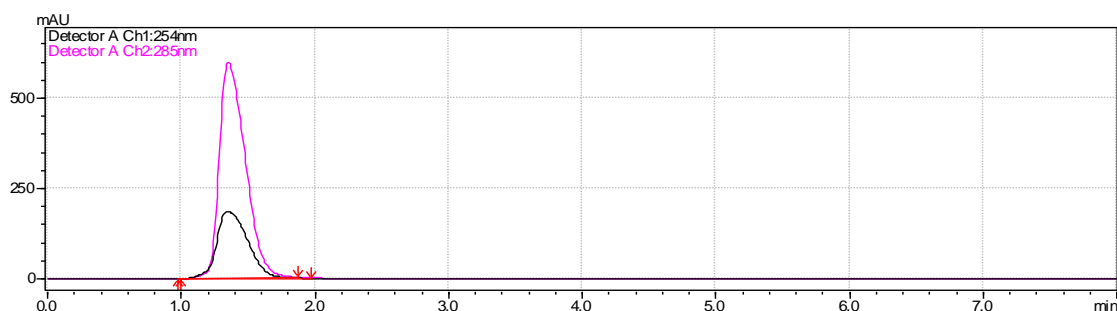


Figura 20. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de HCl 1 M.

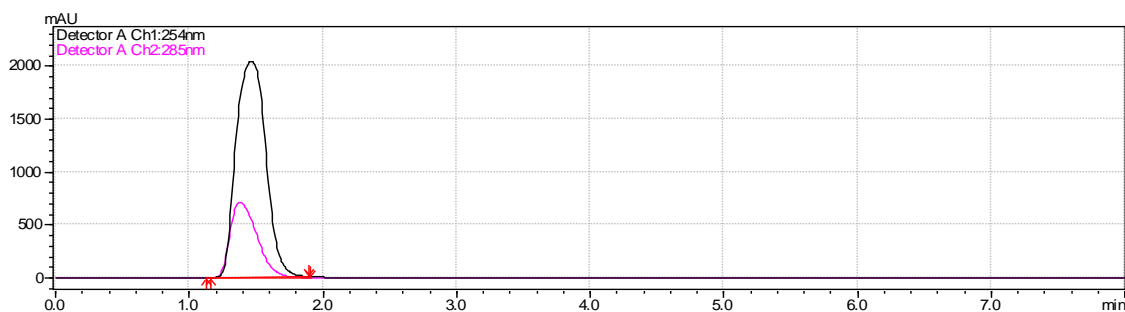


Figura 21. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) sometida a reflujo durante media hora en solución de H₂O₂ al 5%.

Como se desprende de las Figuras 14 a 21, la hemateína y la hematoxilina sólo se degradan en condiciones básicas. Dichas condiciones provocaron un 67.5% de degradación para la hemateína, y un 81.9% para hematoxilina. Con base en estos resultados se concluye que la respuesta obtenida por los



compuestos en la matriz de trabajo se debe a la presencia de la hemateína y la hematoxilina. Por lo tanto, el método analítico propuesto es selectivo pero no específico.

5.2.3 Linealidad del sistema

La linealidad de un procedimiento analítico se caracteriza por generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un determinado rango. El rango de trabajo comprende del 20 al 200 % de la concentración encontrada como 100% en ensayos previos con la infusión de trabajo. Los resultados de estos experimentos se resumen en las Tablas 15 y 16, y en las Gráficas 5 y 6.

El manejo de los datos se realizó por medio de una regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados fueron la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente [IC (β_1)]. Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar las siguientes ecuaciones de regresión:

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 1E+06 + 1E+07x \text{ (concentración de hemateína)}$$

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 2E+06 + 9E+06x \text{ (concentración de hematoxilina)}$$



Tabla 15. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hemateína.

No de réplica	Concentración de Hemateína (mg/mL)	Área	Concentración real de Hemateína (mg/mL)	
1	1.0	17418709	1.6418709	Parámetros de Adecuabilidad del Sistema $\bar{y}=1.63896135$ $S=0.00672492$ $DER=0.4103162$
2	1.0	17357155	1.6357155	
3	1.0	17322524	1.6322524	
4	1.0	17342070	1.6342070	
5	1.0	17389496	1.6389496	
6	1.0	17507727	1.6507727	
1	2.5	38267661	3.7267661	
2	2.5	37718176	3.6718176	
3	2.5	37731811	3.6731811	
1	2.0	31345543	3.0345543	
2	2.0	31403745	3.1403745	
3	2.0	31412548	3.0412348	
1	1.0	16510533	1.5510533	
2	1.0	16348791	1.5348791	
3	1.0	16281739	1.5281739	
1	0.5	8944211	0.7944211	
2	0.5	8976718	0.7976718	
3	0.5	8958976	0.7958976	
1	0.25	4523826	0.3523826	
2	0.25	4519829	0.3519829	
3	0.25	4509460	0.3509460	

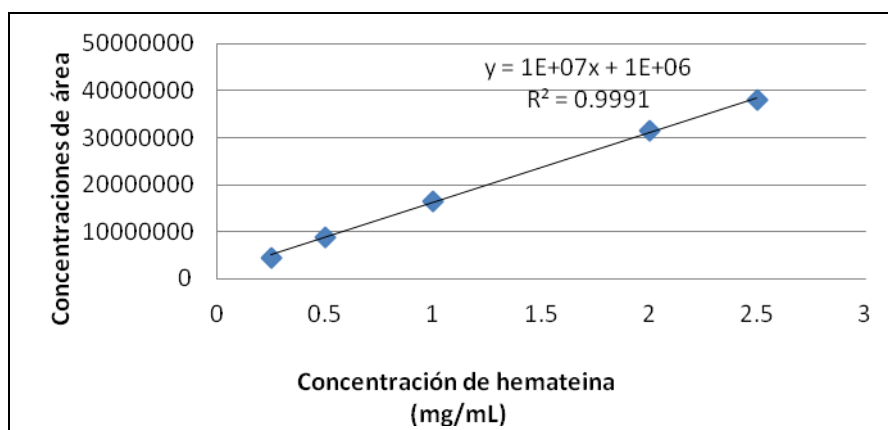


Gráfico 5. Gráfica de linealidad para la hemateína.



Tabla 16. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hematoxilina.

No. de réplica	Concentración de Hematoxilina (mg/mL)	Área	Concentración real de Hematoxilina (mg/mL)	Parámetros de Adecuabilidad del Sistema
1	1.0	13336669	1.259629889	
2	1.0	13363850	1.262650000	
3	1.0	13286750	1.254083333	
4	1.0	13287649	1.254183222	
5	1.0	13264788	1.251643111	
6	1.0	13246566	1.249618444	
1	2.5	25090324	2.565591556	
2	2.5	24943134	2.549237111	
3	2.5	25044981	2.560553444	
1	2.0	20888286	2.098698444	
2	2.0	20800982	2.088998000	
3	2.0	20909551	2.101061222	
1	1.0	11683774	1.075974889	
2	1.0	11728700	1.080966667	
3	1.0	11701250	1.077916667	
1	0.5	6680702	0.520078000	
2	0.5	6668089	0.518676555	
3	0.5	6663633	0.518181444	
1	0.25	3607614	0.178623777	
2	0.25	3615844	0.179538222	
3	0.25	3609814	0.178868222	

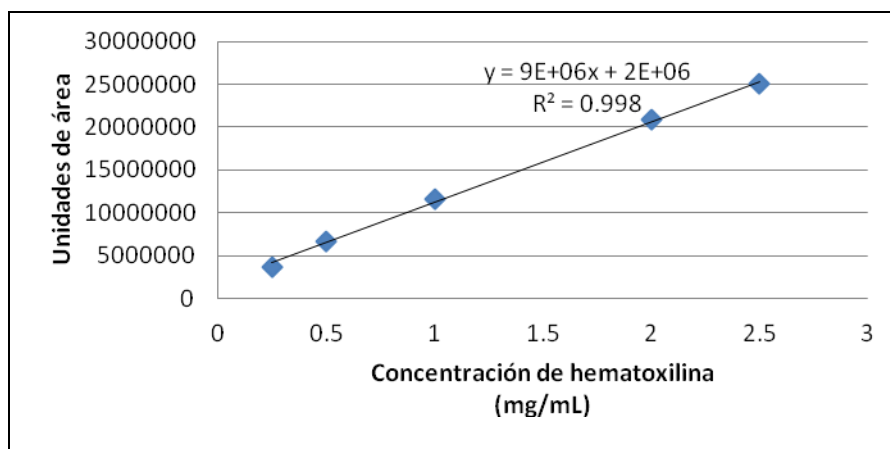


Gráfico 6. Gráfica de linealidad para la hematoxilina.



Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada para los compuestos se presentan en las Tablas 17 y 18.

Tabla 17. Parámetros estadísticos determinados con los datos de linealidad del sistema para la hemateína.

Estadístico	Resultado
b_0	1E+06
b_1	1E+07
r	0.99949035
r^2	0.99898096
r^2 ajustado	0.99890257
Error típico	440441.643
IC (β_1) ($t_{0.975,13}=2.160$)	$14540323.98 \leq \beta_1 \leq 15107698.69$

Tabla 18. Parámetros estadísticos determinados con los datos de linealidad del sistema para la hematoxilina.

Estadístico	Resultado
b_0	2E+06
b_1	9E+06
r	0.98307979
r^2	0.96644588
r^2 ajustado	0.9638648
Error típico	1780135.21
IC (β_1) ($t_{0.975,13}=2.160$)	$9123273.341 \leq \beta_1 \leq 11416434.57$

Para evaluar si las ecuaciones de regresión describen adecuadamente la relación lineal entre las variables se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) a los modelos propuestos. Los resultados derivados de dichos análisis se resumen en las Tablas 19 y 20.



Tabla 19. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo propuesto de la hemateína (n=15, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2.4722E+15	2.4722E+15	12744.0437	7.76378E-21
Residuos	13	2.52185E+12	1.93989E+11		
Total	14	2.47472E+15			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepto	1300223.633	199688.4673	6.51126052	1.9687E-05
Variable X 1	14824011.33	131314.3272	112.8895198	7.7638E-21

Tabla 20. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo propuesto de la hematxilina (n=15, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1.18654E+15	1.18654E+15	374.433829	5.75948E-11
Residuos	13	4.11955E+13	3.16888E+12		
Total	14	1.22773E+15			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepto	1570435.756	807081.8833	1.94581961	0.07362186
Variable X 1	10269853.96	530733.7772	19.35029274	5.7595E-11

En la tabla 21 se resumen los valores de F obtenidos para los compuestos.

Tabla 21. Valores de F calculados para cada compuesto.

Compuesto	F
Hemateina	12744.0437
Hematxilina	374.433829



Como se desprende de los resultados indicados en la Tabla 21, el valor estadístico de F calculado ($F_{0.05,1,15}$) para los dos modelos supera su valor crítico, por lo tanto, se concluye que la variación en la respuesta se encuentra explicada por los modelos propuestos.

Por otra parte, las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión demostraron que las pendientes de las rectas son diferentes de cero.

Asimismo, los intervalos de confianza calculados al 95% para la pendiente de ambos modelos (Tablas 17 y 18) no incluye el cero por lo tanto, los modelos estadísticos propuestos cumplen con los criterios establecidos en las Guías de validación emitidas por la ICH.

Finalmente, los coeficientes de determinación para ambos modelos indican que el 99% y 96,7% de la variación total de las variables se encuentran descritos por un modelo de regresión lineal para la hemateína y la hematoxilina, respectivamente. Con base en estas evidencias se estableció que el método analítico desarrollado es lineal en el intervalo de concentraciones establecido para la hemateína y la hematoxilina.

5.2.3.1 Linealidad del método. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia a analizar.

En las Tablas 22-23 y en la Gráfica 7 se ilustran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método respecto a la hemateína, y en las Tablas 24-25 y en la Gráfica 8 se muestran los resultados obtenidos para la hematoxilina.



Tabla 22. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando hemateína.

No. de réplica	Concentración de Hemateína (mg/mL)	t_R	Área	Concentración real de Hemateína (mg/mL)	% Recobro
1	2.5	1.34	37978681	2.52734446	100.992786
2	2.5	1.34	37768971	2.51338902	100.435126
3	2.5	1.341	37741951	2.51159094	100.363274
1	2.0	1.341	31718598	2.0393017	101.863222
2	2.0	1.34	31742610	2.04084552	101.940335
3	2.0	1.341	31758337	2.04185666	101.990842
1	1.0	1.338	16489671	1.01653922	101.552369
2	1.0	1.339	16334043	1.00694521	100.593927
3	1.0	1.339	16552575	1.02041706	101.939766
1	0.5	1.337	9005955	0.50708933	101.316549
2	0.5	1.338	8997900	0.50663578	101.225930
3	0.5	1.338	9004121	0.50698606	101.295916
1	0.25	1.338	4650478	0.2596635	100.256176
2	0.25	1.338	4632474	0.25865823	99.8680414
3	0.25	1.388	4645415	0.2593808	100.147027
				\bar{y}	101.118752
				S	0.73022727
				DER	0.72219314



Tabla 23. Cantidad recuperada y cantidad adicionada para la hemateína (linealidad del método).

No. de réplica	Concentración de Hemateína (mg/mL)	Cantidad recuperada Concentración (mg/mL)	Cantidad adicionada Concentración (mg/mL)
1	2.5	2.5025	2.52734446
2	2.5	2.5025	2.51338902
3	2.5	2.5025	2.51159094
1	2.0	2.002	2.0393017
2	2.0	2.002	2.04084552
3	2.0	2.002	2.04185666
1	1.0	1.001	1.01653922
2	1.0	1.001	1.00694521
3	1.0	1.001	1.02041706
1	0.5	0.5005	0.50708933
2	0.5	0.5005	0.50663578
3	0.5	0.5005	0.50698606
1	0.25	0.25025	0.2596635
2	0.25	0.25025	0.25865823
3	0.25	0.25025	0.2593808

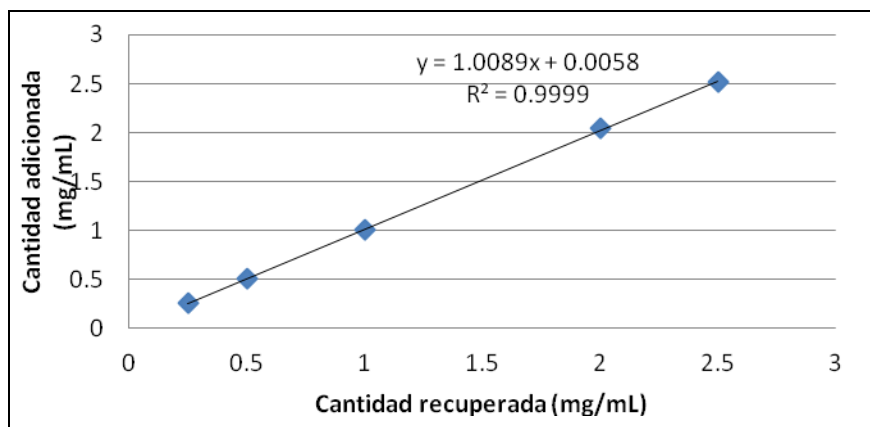


Gráfico 7. Gráfica de linealidad del método para la hemateína.



Tabla 24. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando hematoxilina.

No. de réplica	Concentración de Hematoxilina (mg/mL)	t_R	Área	Concentración real de Hematoxilina (mg/mL)	% Recobro
1	2.5	1.346	25155903	2.51547508	100.619003
2	2.5	1.348	25236309	2.52351531	100.940612
3	2.5	1.346	25239228	2.52380719	100.952288
1	2.0	1.345	21212631	2.03523108	101.761554
2	2.0	1.347	21218887	2.03583130	101.791565
3	2.0	1.347	21211377	2.03511076	101.755538
1	1.0	1.343	11664838	0.99993632	99.9936315
2	1.0	1.344	11693201	1.00236766	100.236766
3	1.0	1.345	11665662	1.00000695	100.000695
1	0.5	1.342	6743272	0.50593686	101.187371
2	0.5	1.344	6746574	0.50618460	101.236920
3	0.5	1.344	6751674	0.50656725	101.313449
1	0.25	1.344	3594442	0.24909624	99.6384963
2	0.25	1.344	3602936	0.24968488	99.8739513
3	0.25	1.343	3619853	0.25085723	100.342893
				\bar{y}	100.776316
				S	0.73264147
				DER	0.72699768



Tabla 25. Cantidad recuperada y cantidad adicionada para la hematoxilina.

No. de réplica	Concentración de Hematoxilina (mg/mL)	Cantidad recuperada Concentración (mg/mL)	Cantidad adicionada Concentración (mg/mL)
1	2.5	2.5	2.51547508
2	2.5	2.5	2.52351531
3	2.5	2.5	2.52380719
1	2.0	2.0	2.03523108
2	2.0	2.0	2.0358313
3	2.0	2.0	2.03511076
1	1.0	1.0	0.99993632
2	1.0	1.0	1.00236766
3	1.0	1.0	1.00000695
1	0.5	0.5	0.50593686
2	0.5	0.5	0.5061846
3	0.5	0.5	0.50656725
1	0.25	0.25	0.24909624
3	0.25	0.25	0.24968488
4	0.25	0.25	0.25085723

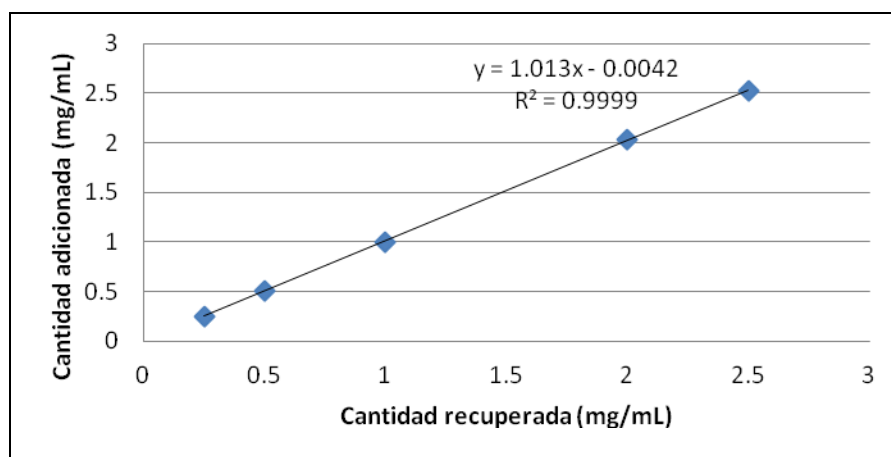


Gráfico 8. Gráfica de linealidad del método para la hematoxilina.

Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada para la hemateína y hematoxilina se muestran en la Tablas 26 y 27.



Tabla 26. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (hemateína).

Estadístico	Resultado
b_0	0.005
b_1	1.008
r	0.99927155
r^2	0.99854362
r^2 ajustado	0.99843159
Error típico	526583.096
IC (β_1) ($t_{0.975,13}=2.160$)	$14482895.04 \leq \beta_1 \leq 15161236.74$

Tabla 27. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (hematoxilina).

Estadístico	Resultado
b_0	-0.004
b_1	1.013
r	0.99994652
r^2	0.99989304
r^2 ajustado	0.99988481
Error típico	0.00974639
IC (β_1) ($t_{0.975,13}=2.160$)	$1.006703468 \leq \beta_1 \leq 1.019258714$

De acuerdo con los resultados indicados en las Tablas 22 y 24 los porcentajes de recobro para la hemateína y la hematoxilina se encuentran dentro de los límites establecidos en las guías Q2A y Q2B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH, International Conference on Harmonisation) para métodos cromatográficos (98-102%). De nueva cuenta, el ajuste de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. La pendiente calculada para los modelos es diferente de cero y el coeficiente de correlación indica que el 99.9% de los datos se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal. Una vez más se realizó el análisis de varianza para evaluar los



modelos de regresión. Los resultados derivados de este análisis se resumen en las Tablas 28 y 29. El ANDEVA para $n=15$ y $\alpha=0,05\%$ permite calcular un valor para la distribución ($F_{0,05,1,15}$) de 8913.25177 para hemateína y de 121525.655 para hematoxilina, los cuales son mayores que el valor crítico de ($F_{0,05,1,15}$) 4,54, por lo tanto, los modelos estadísticos calculados son adecuados. Nuevamente, los intervalos de confianza calculados al 95% para la pendiente de ambos modelos (Tablas 26 y 27) no incluyen el cero por lo tanto, los modelos estadísticos propuestos cumplen con los criterios establecidos en las Guías de validación emitidas por la ICH.

Tabla 28. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método para hemateína ($n=15$, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2.47155E+15	2.47155E+15	8913.25177	7.91009E-20
Residuos	13	3.60477E+12	2.7729E+11		
Total	14	2.47516E+15			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepto	1407202.972	238743.4818	5.894204783	5.2862E-05
Variable X 1	14822065.89	156996.7465	94.41001942	7.9101E-20

Tabla 29. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método para hematoxilina ($n=15$, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15} = 4,54$).

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	11.5439703	11.5439703	121525.655	3.36227E-27
Residuos	13	0.0012349	9.4992E-05		
Total	14	11.5452052			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	-0.004157265	0.004418839	-0.9408047	0.363959184
Variable X 1	1.012981091	0.002905811	348.6052991	3.36227E-27



5.2.4 Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales. Para evaluar la precisión del método analítico se realizaron diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetibilidad), la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). De manera general, estos resultados se expresan en términos de desviación estándar relativa (DER). En las Figuras 22 y 23 se ilustran ejemplos de los cromatogramas obtenidos para cada compuesto.

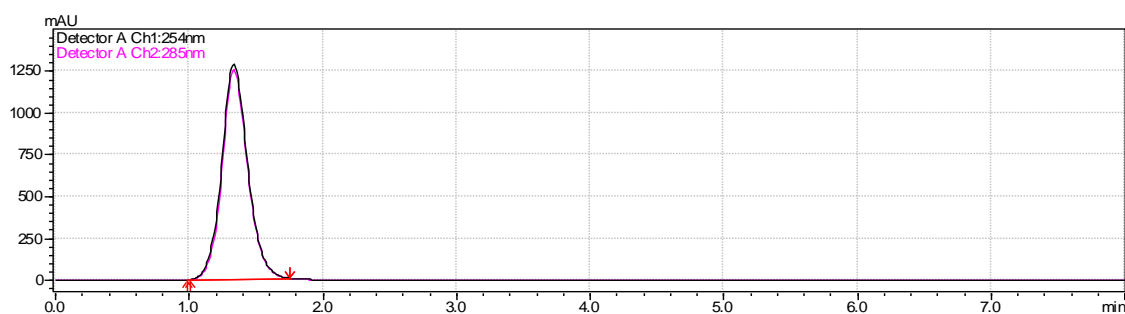


Figura 22. Cromatograma del estándar de hemateína 1.0 mg/mL.

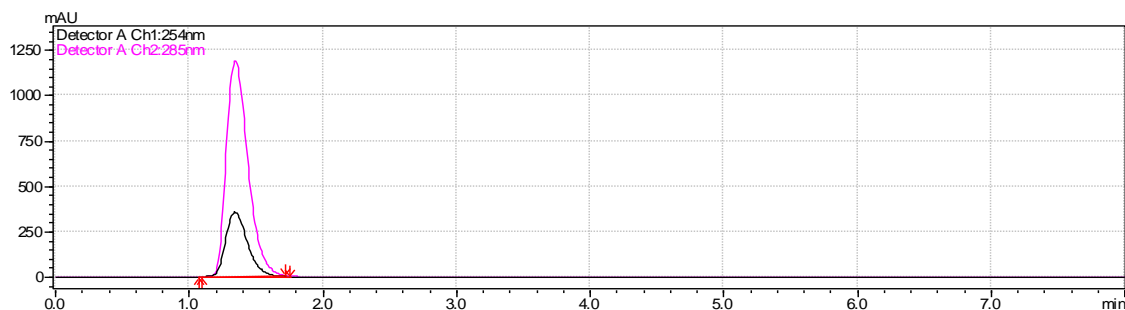


Figura 23. Cromatograma del estándar de hematoxilina 1.0 mg/mL.

5.2.4.1 Precisión del sistema

La precisión del sistema se evaluó midiendo la concordancia entre los resultados analíticos individuales aplicando el procedimiento repetidamente a una muestra. Los resultados de estas determinaciones se resumen en la Tabla 30.

Considerando que la DER calculada para ambos compuestos es de 0.50% para la hemateína y 0.69% para la hematoxilina se concluye que el sistema es reproducible bajo las condiciones de ensayo.



Tabla 30. Datos experimentales obtenidos durante la evaluación de precisión del sistema.

No. de réplica Hemateína (1.0 mg/mL)	Área	No. de réplica Hematoxilina (1.0 mg/mL)	Área
1.1	13391965	1.1	13432087
1.2	13283397	1.2	13454668
1.3	13244295	1.3	13432600
2.1	13217750	2.1	13244588
2.2	13120665	2.2	13541322
2.3	13260556	2.3	13432306
3.1	13210377	3.1	13472309
3.2	13278803	3.2	13536828
3.3	13126301	3.3	13486523
4.1	13121040	4.1	13481033
4.2	13175449	4.2	13626200
4.3	13246155	4.3	13564248
5.1	13237061	5.1	13622065
5.2	13202495	5.2	13663813
5.3	13256104	5.3	13521714
6.1	13182499	6.1	13657283
6.2	13187502	6.2	13601348
6.3	13189017	6.3	13740005
\bar{y}	13218412.8	\bar{y}	13538830.7
S	66760.5843	S	94694.0691
DER	0.50505749	DER	0.69942576

5.2.4.2 Precisión del método

La precisión del método se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una solución que contenía 1.0 mg/mL de hemateína o de hematoxilina, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 31. Nuevamente, la DER para ambos compuestos es menor del 2% por lo tanto el método analítico es preciso.

**Tabla 31.** Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método.

No. de réplica Hemateína (1.0 mg/mL)	Área	No. de réplica Hematoxilina (1.0 mg/mL)	Área
1	16202997	1	12764345
2	16155104	2	12752369
3	16116635	3	12742662
4	16111425	4	12745389
5	16384262	5	12759466
6	16150792	6	12744709
\bar{y}	16186869.2	\bar{y}	12751490
S	102136.463	S	8840.56546
DER	0.63098344	DER	0.06932967

5.2.4.3 Precisión intermedia

Por último, la reproducibilidad del método se evaluó por medio del análisis de una solución de hemateína o hematoxilina a una concentración de 1.0 mg/mL. Este ensayo se realizó por dos analistas en dos días diferentes. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 32 y 33. En los ensayos realizados, la DER fue menor de 2% por lo tanto, se concluye que el método analítico propuesto es repetible y reproducible.

Tabla 32. Resultados obtenidos de la hemateína para evaluar precisión intermedia.

	Analista		DER analista	
	1	2	1	2
Dia 1	14760450	14763199	0.20295343	0.44842939
	14818268	14633499		
	14775434	14719055		
Dia 2	15232441	14713250	DER analista	
	15229515	14702258	1	2
	15261308	14710818	0.11529388	0.0392533
	\bar{y}	14859957.9		
	S	234388.352		
	DER	1.57731504		



Tabla 33. Resultados obtenidos de la hematoxilina para evaluar precisión intermedia.

	Analista		DER analista	
	1	2	1	2
Dia 1	12253910	12315271	0.81261191	0.91780975
	12406786	12536723		
	12443374	12379709		
Dia 2	11939189	12438886	DER analista	
	11915012	12391555	1	2
	11837150	12375334	0.44818686	0.26625466
	\bar{y}	12269408.3		
	S	235768.607		
	DER	1.92159721		

5.2.5 Robustez

La robustez del método analítico se determinó realizando pequeñas variaciones de los parámetros propuestos en la metodología experimental. El principal objetivo es identificar las variables controlables que puedan contribuir a determinar cambios significativos.

Las variables que se modificaron en este parámetro fueron velocidad de flujo, proporción de la fase móvil, temperatura de la columna y longitud de onda. El criterio de aceptación indica que la diferencia entre la condición normal y modificada no debe de ser mayor al 2%. Los resultados obtenidos para este parámetro se resumen en las Tablas 34 a 37 y en las Figuras 24 a 45.



Tabla 34. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método utilizando una solución de hemateína.

No. de réplica	Muestra / condición modificada	t_R	Área	
1	Hemateína 1.0 mg/mL	1.339	16838278	Parámetros de Adecuabilidad \bar{y} = 16881427.5 S = 34177.8212 DER = 0.20245812
2		1.338	16850385	
3		1.339	16870509	
4		1.338	16908533	
5		1.338	16894956	
6		1.339	16925904	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 280 nm	1.34	16964778	
2		1.34	16968036	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 290 nm	1.337	16213951	
2		1.336	16369069	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 5 μ L	1.331	8522623	
2		1.332	8644555	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 15 μ L	1.345	24352316	
2		1.342	24422770	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 0.400 mL	1.663	21636687	
2		1.663	21897204	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 0.600 mL	1.125	14521191	
2		1.124	14602699	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 95:5 (MeOH:H ₂ O+TFA)	1.341	17209236	
2		1.341	17271385	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 85:15 (MeOH:H ₂ O+TFA)	1.340	16750763	
2		1.399	16876868	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 20°C	1.338	17187865	
2		1.339	17061437	
1	Hemateína 1.0 mg/mL 30°C	1.338	17182568	
2		1.338	17124613	



Tabla 35. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para la hemateína.

Condición	Condición modificada (\bar{y}_i)	Condición normal (\bar{y}_0)	$ di = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $	%
Media aritmética de la condición normal de operación		16881427.5		
Media aritmética de 280 nm	16966407	-	84979.5	0.50
Media aritmética de 290 nm	16291510	-	589917.5	3.49
Media aritmética de 5 μ L	8583589	-	8297838.5	49.15
Media aritmética de 15 μ L	24397543	-	7516115.5	44.52
Media aritmética de 0.400 mL/min de flujo	21766945.5	-	4885518	28.94
Media aritmética de 0.600 mL /min de flujo	14561945	-	2319482.5	13.74
Media aritmética de proporción (95:5) MeOH:H ₂ O+TFA	17240310.5	-	358883	2.13
Media aritmética de proporción (85:15) MeOH:H ₂ O+TFA	16813815.5	-	67612	0.40
Media aritmética a 20°C	17124651	-	243223.5	1.44
Media aritmética a 30°C	17153590.5	-	272163	1.61

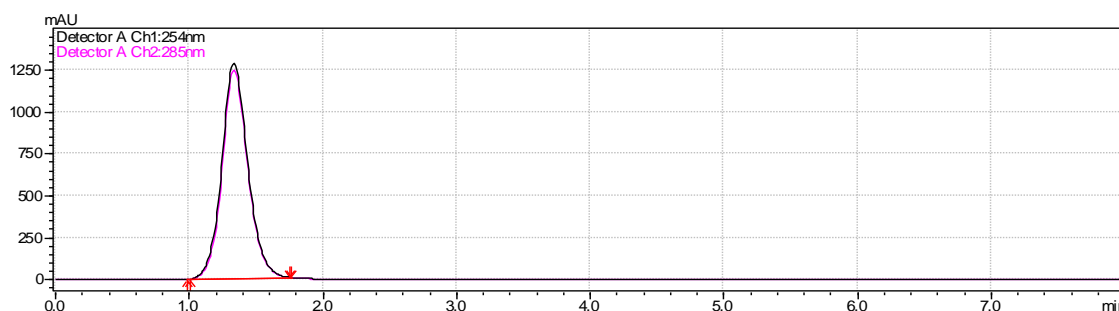


Figura 24. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda = 285$ nm; velocidad de flujo= 0.5 mL/min; temperatura= 25°C; fase móvil MeOH:H₂O (TFA 1%) (90:10) y volumen de inyección= 10 μ L).

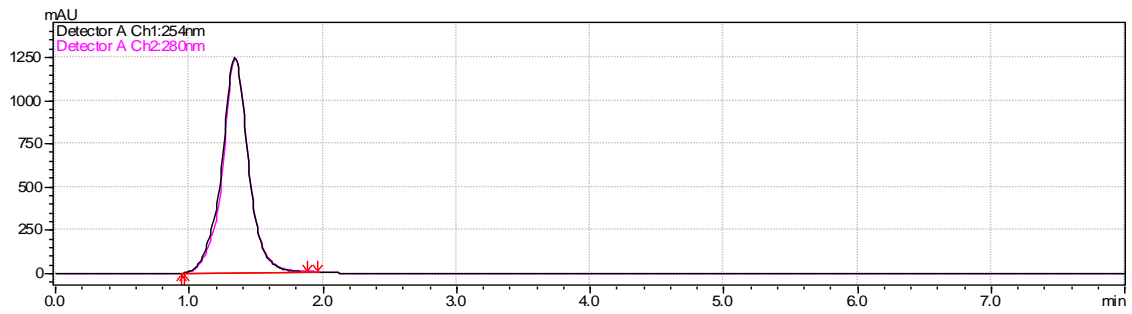


Figura 25. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 280 nm como longitud de onda de detección.

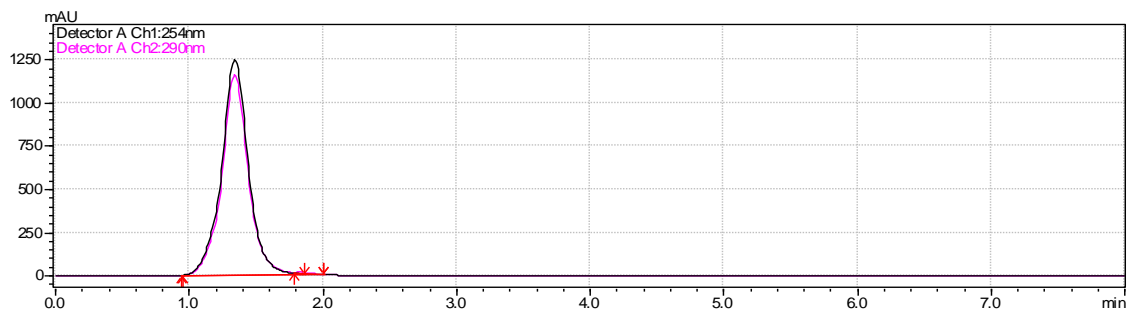


Figura 26. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 290 nm como longitud de onda de detección.

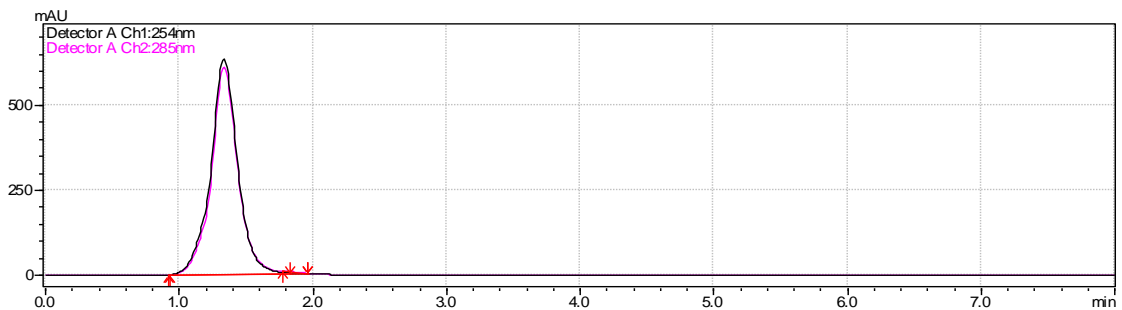


Figura 27. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 5 μ L de volumen de inyección.

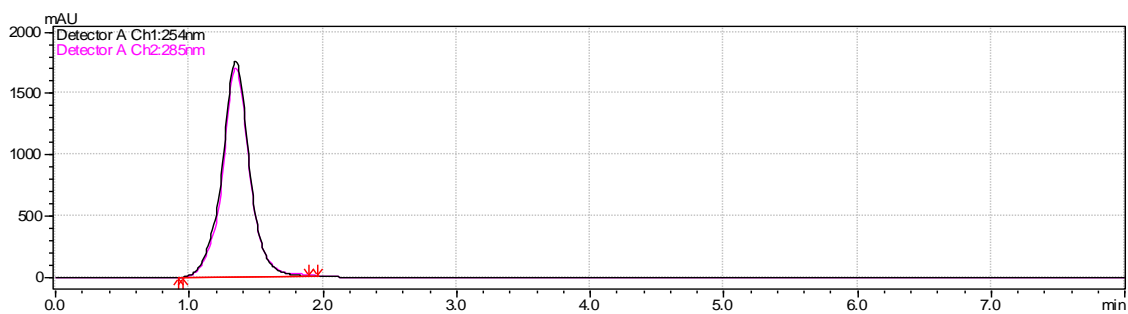


Figura 28. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando 15 μ L de volumen de inyección.

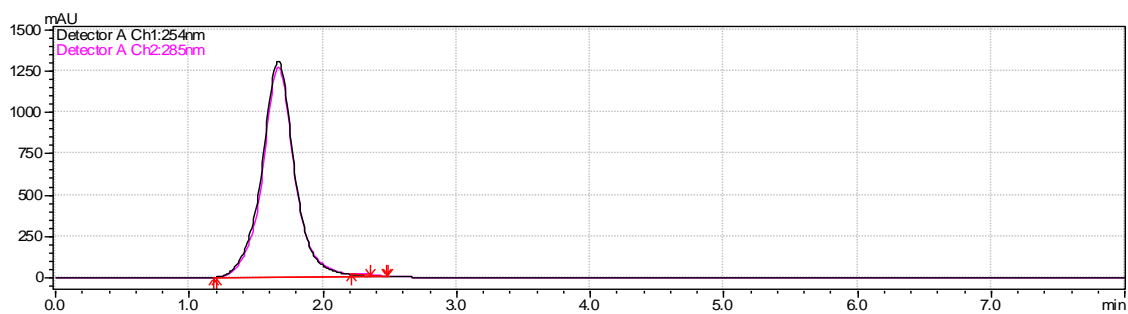


Figura 29. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.400 mL/min.

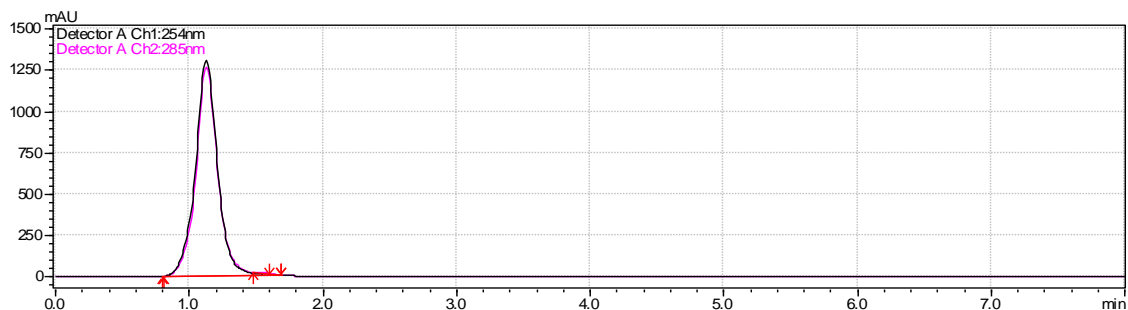


Figura 30. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.600 mL/min.

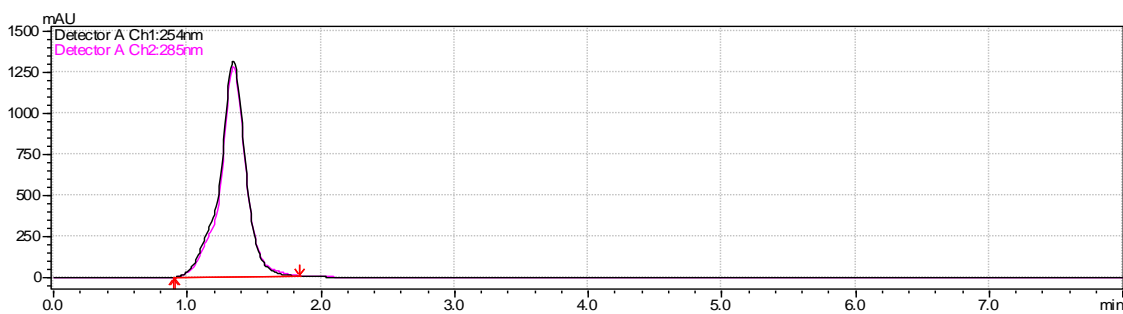


Figura 31. Cromatograma de la solución estándar hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H₂O (TFA 1%) en una proporción 95:5.

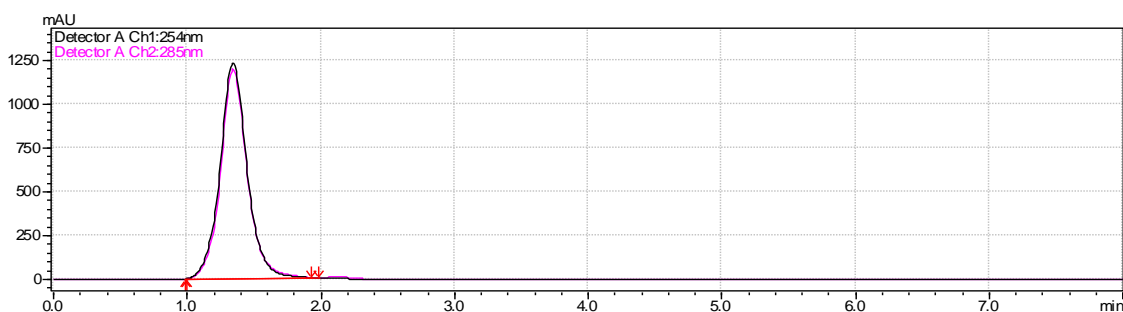


Figura 32. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H₂O (TFA 1%) en una proporción 85:15.

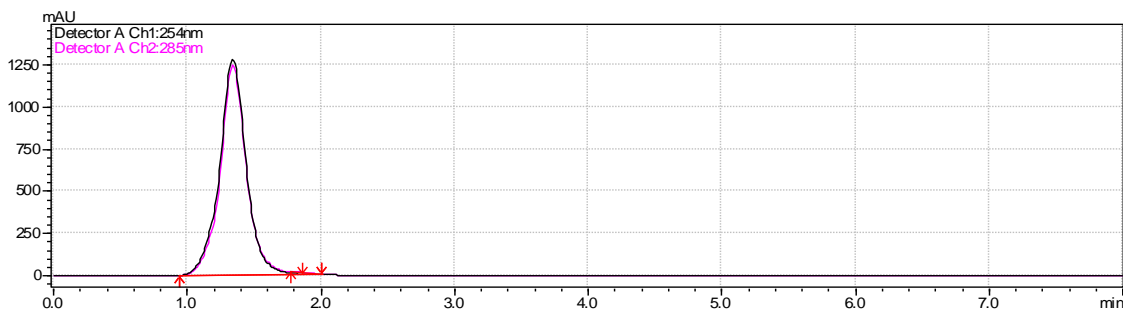


Figura 33. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 20°C.

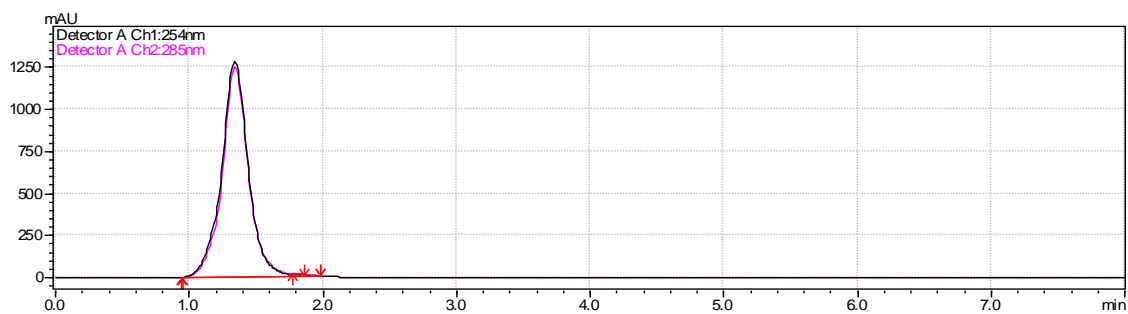


Figura 34. Cromatograma de la solución estándar de hemateína (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 30°C.



Tabla 36. Resultados obtenidos para evaluar la robustez del método utilizando una solución de hematoxilina.

No. de replica	Muestra / condición modificada	t _R	Área	
1		1.339	16838278	
2		1.338	16850385	Parámetros de Adecuabilidad \bar{y} =13055573.2 S=47608.2803 DER=0.36465868
3	Hematoxilina 1 mg/mL	1.339	16870509	
4		1.338	16908533	
5		1.338	16894956	
6		1.339	16925904	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 280 nm	1.340	16964778	
2		1.340	16968036	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 290 nm	1.337	16213951	
2		1.336	16369069	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 5 μ L	1.331	8522623	
2		1.332	8644555	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 15 μ L	1.345	24352316	
2		1.342	24422770	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 0.400 mL/min	1.663	21636687	
2		1.663	21897204	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 0.600 mL/min	1.125	14521191	
2		1.124	14602699	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 95:5 (MeOH:H ₂ O+TFA)	1.341	17209236	
2		1.341	17271385	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 85:15 (MeOH:H ₂ O+TFA)	1.340	16750763	
2		1.399	16876868	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 20°C	1.338	17187865	
2		1.339	17061437	
1	Hematoxilina 1 mg/mL 30°C	1.338	17182568	
2		1.338	17124613	



Tabla 37. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para la hematoxilina.

Condición	Condición modificada (\bar{y}_i)	Condición normal (\bar{y}_0)	$ di = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $	%
Media aritmética de la condición normal de operación		13055573.2		
Media aritmética de 280 nm	10754674.5	-	2300898.7	17.62
Media aritmética de 290 nm	14540980.5	-	1485407.3	11.38
Media aritmética de 5 μ L	6899033	-	6156540.2	47.16
Media aritmética de 15 μ L	18340935	-	5285361.8	40.48
Media aritmética de 0.400 mL/min de flujo	1648565	-	11407008.2	87.37
Media aritmética de 0.600 mL /min de flujo	11008000	-	2047573.2	15.68
Media aritmética de proporción (95:5) MeOH:H ₂ O+TFA	12929390	-	126183.2	0.97
Media aritmética de proporción (85:15) MeOH:H ₂ O+TFA	10085169.5	-	2970403.7	22.75
Media aritmética a 20°C	13116307	-	60733.8	0.47
Media aritmética a 30°C	13117719.5	-	62146.3	0.48

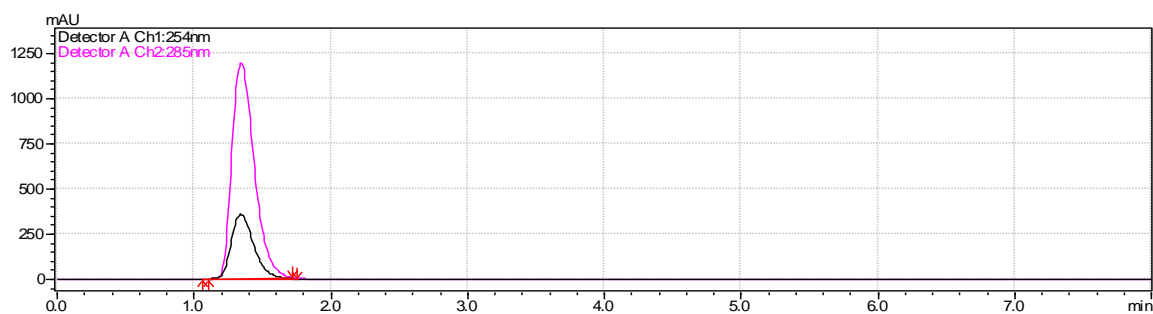


Figura 35. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda=285$ nm; velocidad de flujo= 0.5 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:H₂O (TFA 1%) (90:10) y volumen de inyección=10 μ L).

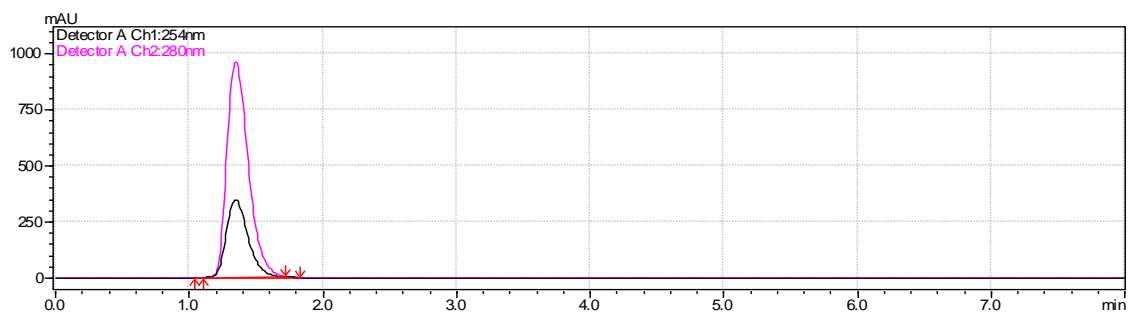


Figura 36. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 280 nm como longitud de onda de detección.

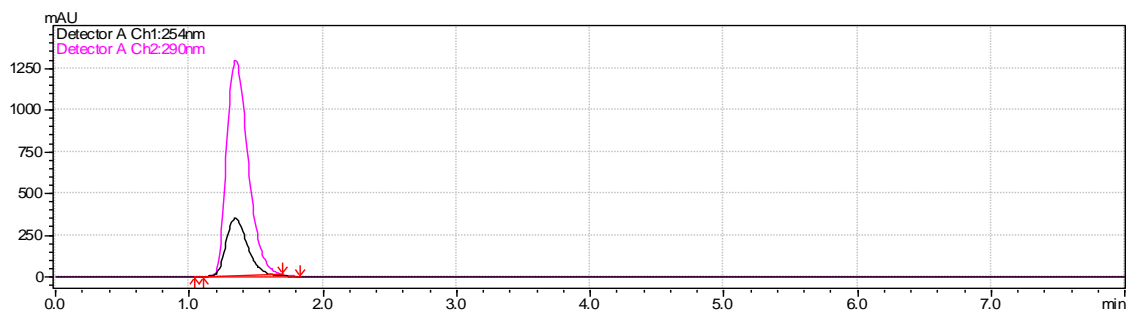


Figura 37. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 290 nm como longitud de onda de detección.

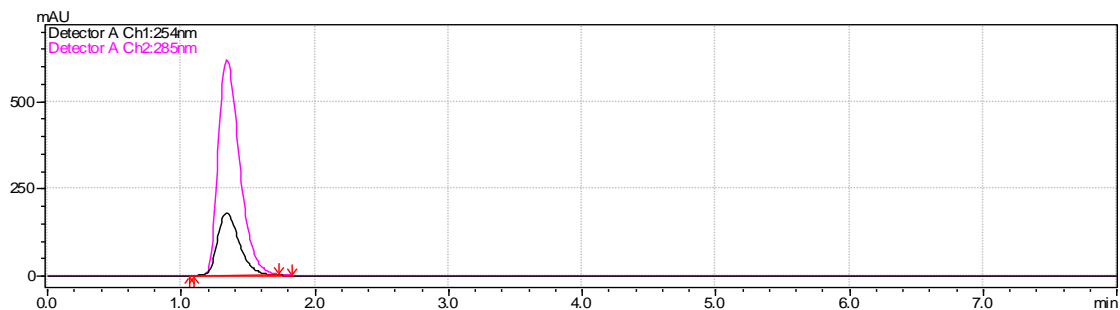


Figura 38. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección.

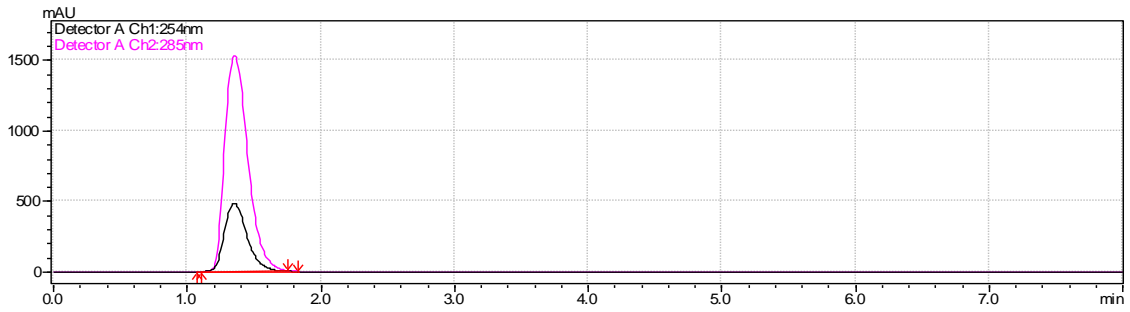


Figura 39. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección.

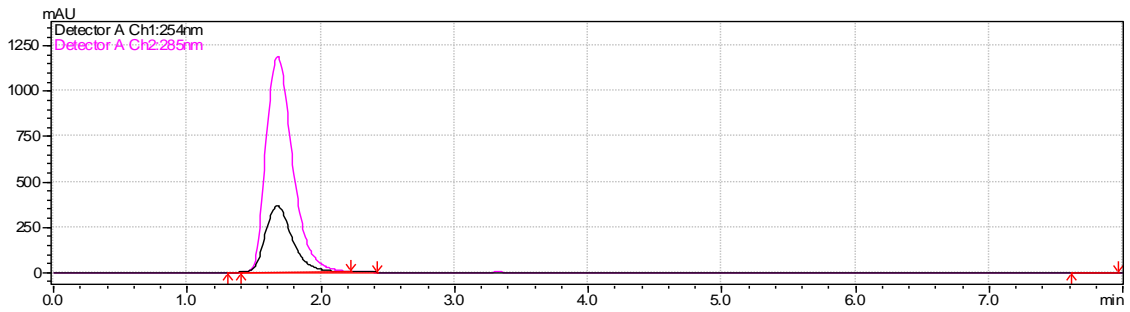


Figura 40. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.400 mL/min.

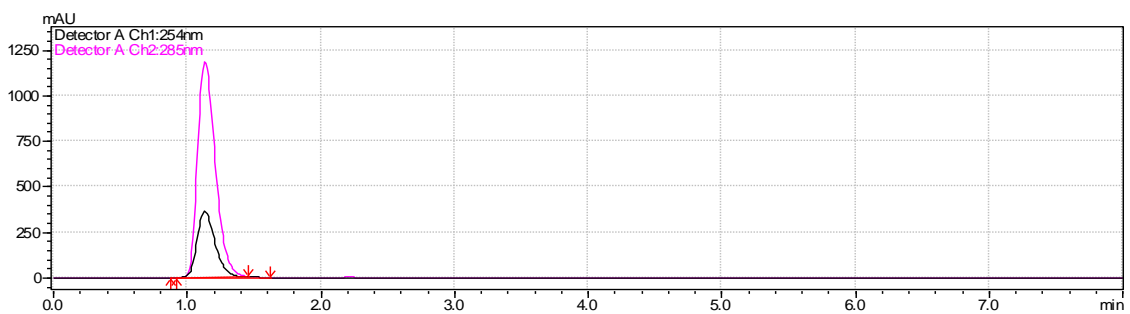


Figura 41. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 0.600 mL/min.

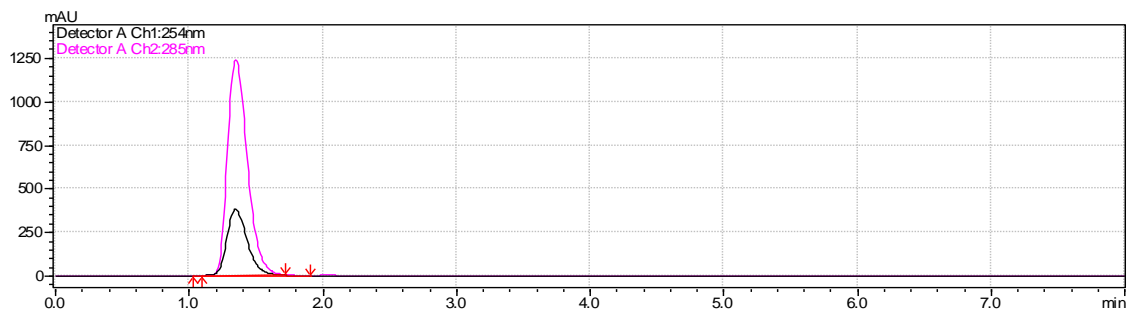


Figura 42. Cromatograma de la solución estándar hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H₂O (TFA 1%) en una proporción 95:5.

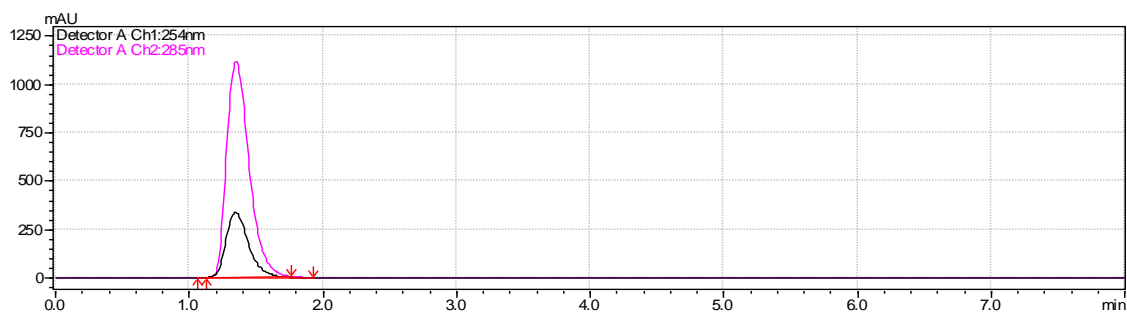


Figura 43. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH: H₂O (TFA 1%) en una proporción 85:15.

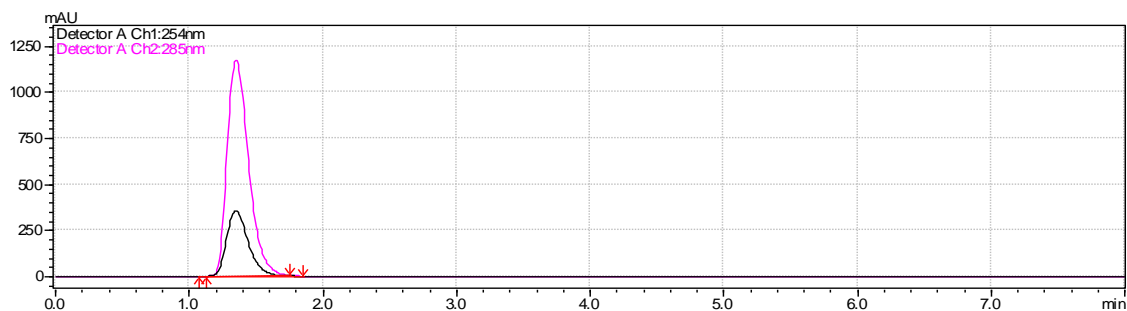


Figura 44. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 20°C.

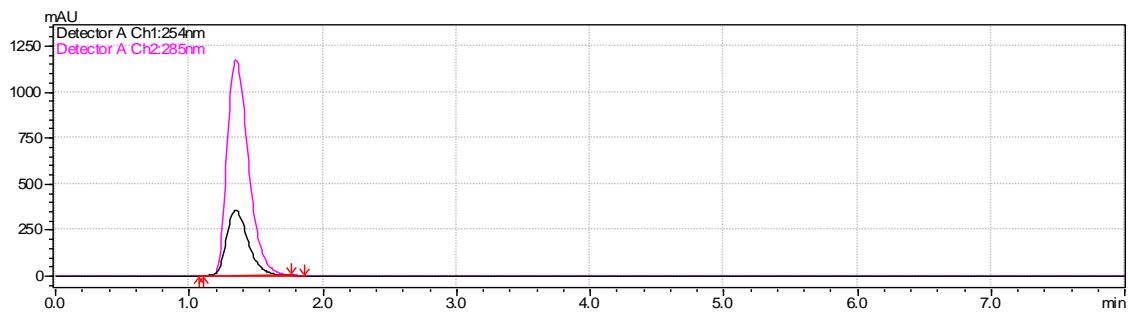


Figura 45. Cromatograma de la solución estándar de hematoxilina (1.0 mg/mL) utilizando una temperatura en la columna de 30°C.

De acuerdo con los datos obtenidos tanto para la hematoxilina como para la hemateína, se concluye que el método analítico no es robusto debido a que la diferencia, expresada en porcentaje, entre la condición modificada y la normal es mayor al 2%.



Una vez validado el método analítico, se analizaron las concentraciones de los metabolitos presentes en la infusión, los resultados se resumen en la Tabla 38.

Tabla 38. Área bajo la curva de la hemateína presente en la infusión de *Haematoxylon brasiletto* Karst.

No. de réplicas	Hemateína		
	t_R	Área	C [mg/mL]
1	1.338	16489671	1.00747197
2	1.339	16334043	0.99796354
3	1.339	16552575	1.01131522
4	1.338	16535689	1.01028354
5	1.337	16450555	1.00508209
6	1.338	16310641	0.99653374
		\bar{y}	1.00477502
		S	0.00624181
		DER	0.6212143

Esos resultados se encuentran expresados en mg y representan el promedio de 6 réplicas.

En síntesis, la concentración promedio de hemateína encontrada en las diferentes infusiones preparadas con la corteza de *Haematoxylon brasiletto* Karst es de 1.0 mg/mL.



6. CONCLUSIONES

- Mediante el empleo de un diseño factorial 2^3 se estableció que la mayor concentración de ácido clorogénico a partir de las hojas de *Prunus serotina* Ehrenb se obtiene utilizando como disolvente metanol-agua (70:30), material vegetal seco y como método de extracción sonicación.
- El modelo también es útil para predecir la cantidad del ácido clorogénico a obtenerse en cualquier punto de la región experimental.
- El método analítico desarrollado es de utilidad para evaluar el contenido de hemateína en la infusión de *Haematoxylon brasiletto* Karst y hematoxilina en los extractos orgánicos derivados de su corteza.
- El método analítico desarrollado es selectivo, lineal, exacto y preciso.

7. PERSPECTIVAS

- Conocer la proporción de hemateína y hematoxilina en la infusión y en los extractos metanólicos de *Haematoxylon brasiletto* Karst.
- Emplear el método analítico desarrollado para cuantificar la hemateína y/o la hematoxilina en preparados farmacéuticos elaborados con la especie. Esta actividad permitirá comprobar si las condiciones experimentales desarrolladas son de utilidad para diferentes matrices farmacéuticas.



8. REFERENCIAS

- Amico, V., Barresi, V., Condorelli, D., Spatafora, C., Tringali, C. Antiproliferative terpenoids from almond hulls (*Prunus dulcis*): identification and structure-activity relationships. *J Agric Food Chem.* 2006, **54**, 810-814.
- Anales del Instituto Medico Nacional. México, 1894-1914. Tomo I (1894), II (1896), III (1897), IV (1900), V (1903), VI (1903), VI bis (1904), VII (1905), VIII (1906), IX (1907), X (1908), XI (1909), XII (1912-14). Imprenta de la Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento, México. Índice de contenidos en: Francisco Fernández del Castillo, Historia Bibliográfica del Instituto Médico Nacional de México, Imprenta Universitaria, México, 1961.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H. Hypoglycemic effect of *Cecropi obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2001, **78**, 145-149.
- Argueta, V., Cano, A., Rodarte, M. E. Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana. México D.F. 1994, 772 ,1099-1100.
- Bagchi D., Sen CK., Bagchi M., Atalay, M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry.* 2004, **69**, 75-80.
- Banerjee, S.K., Maulik, M., Mancahanda, S.C. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. 2002, **70**, 1509-1518.
- Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?!=3&t=Capulín&id=7046>.
- Biessels, H. W. A., Van Der Kerk-Van Hoof, A. C., Kettens-Van Den Bosch, J. J. y Salemink, C. A. Triterpenes of *Prunus serotina* and *Prunus lusitanica*. *Phytochem.* 1974, **13**, 203-207.
- Boyer, J., Liu, R.H. Apple phytochemicals and their health benefits. *J Nutr.* 2004, **3**, 1-15.
- Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998. **56** ,317-333.



- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Synder, S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*.1991, **951**, 714-718.
- Brown, Paula. N., Chan, Michael., Betz, Joseph, M. Betz. Optimization and single-laboratory validation study of a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of phenolic Echinacea constituents. *Anal Bioanal Chem*. 2010, **397**, 1883-1892.
- Campa, S., Doubeau, S., Dussert, S., Hamon, M. Noirot. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild coffee species. *Food Chem*. 2004, **93**, 135-139.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 2005, **17**, 165-173.
- Cassina, A., Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996, **309**, 316-328.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993, **49**, 481-493.
- Child, R., Wilkinson, D., Fallowfield, J., Donnelly, A. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sport Exerc*. 1998, **30**, 1603-1607.
- Cieslik, E., Greda, A., Adamus, W. Contents of phenolics in fruit and vegetables. *Food Chem*. 2006, **94**, 135 -142.
- Clarkson, P., Thompson, H. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *J Clin Nutr*. 2000, **72**, 637S-646S.
- Combs, G. Vitaminas. En *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Mahan L, Escott Stump, S. Editores. México D.F. Mc. Graw-Hill. 2001, 73-88.
- Deneika, V. I., Deneika, L. A., Sirotnin, A. A. Anthocians from fruit of certain plants of the genus *Prunus*. *Chem Nat Compd*. 2005, **41**, 230-231.



- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña Ribes, J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Brit J Nutr.* 1998, **80**, S77-S112.
- Dreosti, LE. Bioactive ingredients: Antioxidants and Polyphenols in tea. 1996. *Nutr Rev.* **54** (11), 51-58.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 9ª Ed. México, Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2008, **Vol II**, 2427-2434.
- Frei, B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *J Med Food.* 1994, **97**, 5S-13S.
- Fridovich, I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997, **272**, 18515-18517.
- García-Alonso, M., De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo J.C. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. *Food Chem.* 2004, **84**, 13 -18.
- Ghosal, S., Tripathi, V.K., Clauhan, S. Active constituents of *Embllica Officinallis*: Part 1. The chemistry and antioxidative effects of two hydrolysable tannis, Emblocannin A and B. *J Chem.* 1996, **35B**, 941-948.
- Gordana, Cetkovic., Jasna Canadanovic, Brunet., Sonja, Djilas., Sladjana, Savatovic., Anamarija, Mandic., Vesna, Tumbas. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of Apple pomace. *Food Chem.* 2008, **109**, 340-347.
- Grudzinski, I.P., Frankiewicz-Jozco, A., Bany, J. Diallyl sulfide a flavor component from garlic (*Allium sativum*) attenuates lipid peroxidation in mice infected with *Thichinella spiralis*. *Phytomedicine.* 2001, **8**, 174-177.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Biochem Sci.* 1990, **15**,129-135.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine, 4ª Ed. Clarendon Press, Oxford, 2006.



- Hass, M. A., Nowak, D. M., Leonova, E., Levin, R. M, Longhurst, P. A. Identification of components of *Prunus africana* extract that inhibit lipid peroxidation. *Phytomedicine*.1999, **6**, 379-388.
- Hemmerle, H., Berger, H.J., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P.W., Paulus, E., Herling, A.W. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-translocase. *J Med Chem*, 1997, **40**, 137-145.
- Hernández, Francisco. Historia de las Plantas de Nueva España, Tomo III, Imprenta Universitaria. 1946.
- Hernández, M., Prieto, E.A. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Invest Biomed*. 1999, **18**(1), 4-12.
- Hikino, H., Taguchi, T., Fujimura H., Hiramatsu, Y. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* odd and of *Haematoxylon campechianum* Wood. *Planta Med*. 1997, **31**, 220-241.
- Horsley, S. B., Meinwald, J. Glucose-1-benzoate and prunasin from *Prunus serotina*. *Phytochem*.1981, **20**, 1127-1128.
- Houghton P., Mukherjee P.K. Evaluation of Herbal Medicinal Products. 2009, 261-281.
- International Conference on Harmonisation (ICH Q2B). Guideline Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996,71-76.
- International Conference on Harmonisation (ICH Q2A). Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures. 1995, 1-7.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* .2005, **96**, 145 -150.
- Jiang, Y., Satoh, K., Kusama, K., Watanabe, S., Sakagami, H. Interaction between chlorogenic acid and antioxidants. *Anticancer Res*. 2000, **20**, 2473–2476.



- Kayano, S. I., Kikuzaki, H., Ikami, T., Mitani, T. y Nakatani, N. A new bypyrrole and some phenolics constituents in prunes (*Prunus domestica L.*) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004, **68**, 942-944.
- Kim, D., Heo, H., Kim, Y., Yang, H., Lee, C. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J Agric Food Chem.* 2005, **53**, 9921-9927.
- Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys* 1997, **3**, 335–342.
- Ky, C.L., Noirot, M., Hamon, S. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans. *J Food Chem.* 1997, **45**, 786-790.
- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P., Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Acta Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, **89**, 6348-6352.
- Lara, O. F., Márquez, A. C. Plantas medicinales de México; composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1996, 27.
- Lee, J.H., Park, J.H., Kim, Y.S., Han, Y. Chlorogenic acid, a polyphenolic compound, treats mice with septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Immunopharmacol.* 2008, **12**, 1681-1685.
- Li, L., Steffens, J.C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta.* 2002, **215**, 239-247.
- Lolor, G. C., Martin, S. L. Haematoxylin and hemateína, the coloring principles of logwood 1. *J Soc Dyers Colour.* 1959, **75**, 513-517.



- Lv, W.F., Ding, M. Y. y Zheng, R. Isolation and quantitation of amygdalin in Apricot-Kernel and *Prunus tomentosa Thunb*, by HPLC with solid-phase extraction. *J Chromatogr Sci.* 2005, **43**, 383-387.
- Ma, C., Kully, M., Khan, J.K., Hattori, M., Daneshtalab, M. Synthesis of chlorogenic acid derivatives with promising antifungal activity. *Bioorganic Med Chem.* 2007, **15**, 6830-6833.
- M'bemba-Meka, P., Lemieux, N., Chakrabarti, S.K. Role of oxidative stress and intracellular calcium in nickel carbonate hydroxide-induced sister-chromatid exchange, and alterations in replication index and mitotic index in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol.* 2007, **81**, 89-99.
- Marinova, E. M. N., Toneva, A. Yanishlieva. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. *Food Chem.* 2009, **114**, 1498-1499.
- Marques, Viviane., Adriana, Farah. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* 2009, **113**, 1370-1376.
- Martínez, M. Las plantas medicinales de México. México, 6^a Edición, Botas, 1989, 61-63.
- Martínez, V.A. Estudio químico y biológico de la infusión y del extracto hexánico de las hojas de *Prunus serotina* Ehrh. 2007, 49.
- McVaugh *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh. *Brittonia.* 1951, **7** (1) 299.
- Moon, J.K., Yoo, H.S., Shibamoto, T. Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. *J Agric Food Chem.* 2009, **57**, 5365-5369.
- Moreira, A.S., Spitzer, V., Schapoval, E.E., Schenkel, E.P. Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytother.* 2000, 638-640.



- Mori, H., Tanaka, T., Shima, H., Kunniyasu, T., Takahashi, M. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methlazoxy-methanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer*. 1986, **30**, 49-50.
- Moure, Andres., Cruz, J. M. Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nuñez, M. J., Parajó, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*. 2001, **72**, 145-171.
- Nardini, H., Aquino, M.D., Tomassi, G., Gentili, V., Di-Felice, M., Scaccini, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by cafoxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biomed. Med*. 1995, **19**, 542-552.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*. 2002, **50**, 166-171.
- Ordaz-Galindo, A., Wesche-Ebeling, P., Wrolstad, R. R., Rodriguez-Saona, L., Argaiiz-Jamet, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina Ehrh*) Anthocyanins. *Food Chem*. 1999, **65**, 201-206.
- Olszewska, M. y Wolbis, M. Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol Pharm*. 2002, **59**, 133-137.
- Olszewska, M. High-performance liquid chromatographic identification of flavonoid monoglycosides from *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Pol Pharm*. 2005, **62**, 435,441.
- Olszewska, M. Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves and Inflorescences of *Prunus serotina Ehrh*, *Acta Chromatogr*. 2007, **19**, 253-269.
- Olszewska, M. Optimization and Validation of an HPLC-UV Method for Analysis of Corosolic, Oleanolic, and Ursolic Acids in Plant Material: Application to *Prunus serotina Ehrh*. *Acta Chromatogr*. 2008, **20**(4), 463-459.



- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol.* 2007, **87**, 315-424.
- Paris, R. R., Rousset, R. Characterization of dyes of vegetable origin by paper chromatography. *Acta Pharmacol* 1958, **16**, 747-756.
- Pratt, R., Yuzuriha, Y. Antibacterial activity the heartwood of *Haematoxylon brasiletto*. *J Am Pharm.* 1959, **48**, 69-72.
- Rai, S., Basak, S., Mukherjee, K. Oriental Medicine *Mangifera indica* a review. *Orient Pharm Exp Med.* 2007, **7**, 1-10.
- Rivero-Cruz, J. Fausto. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J Ethnopharmacol.* 2008, **119**, 99-103.
- Rosas Guerrero, Marisol. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la valoración de los constituyentes mayoritarios presentes en la infusión de *Prunus serotina* Ehrenb. subs. capuli (Cav.) McVaugh. (Tesis de Licenciatura) 2010.
- Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., Tomás- Barberán, F.A. Characterization and quantitation of phenolics compounds in New Apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *J Agric Food Chem.* 2005, **53**, 9544-9552.
- Sánchez, M. A., Ligeia-Garcia, Mendez, M. Brazilin antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. *Rev Latinoam Microbiol* 1958, **1**, 225-232.
- Sánchez, M. Estudio químico de *Prunus serotina* Ehrh. 2000, 6-15.
- Santamour, F. S. Amygdalin in *Prunus* leaves. *Phytochem.* 1998, **47**, 1537-1538.
- Sang-Min, Kim., Ya, F. Sheng., Byung-Hun, Um. Preparative Separation of Chlorogenic Acid by Centrifugal Partition Chromatography from Highbush Blueberry Leaves (*Vaccinium corymbosum* L.). *Phytochem Anal.* 2009, 1-2.
- Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W., Lachance, P., Ho, C., Rosen, R. Antioxidative phenolics compounds isolated from almonds skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem.* 2002, **50**, 2459-2463.



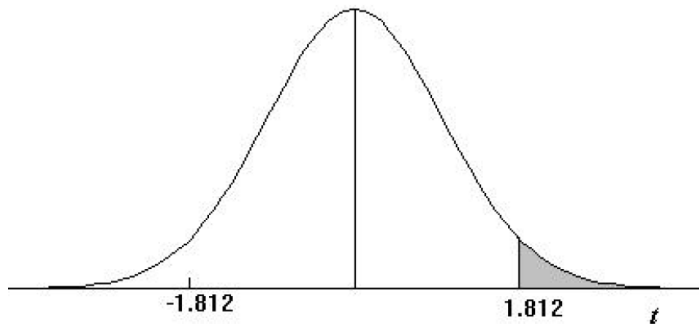
- Sawyer, D.T. The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , O_2^- , HOO^\cdot , $HOOH$, and HOO^-) and monooxygen species (O , O^- , OH^\cdot , and OH^-) in water and aprotic solvents. *Biochemistry*. 1988, **49**, 11-20.
- Schubert, S.Y., Lanslay, E.P., Neeman, I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1999, **71**, 23-43.
- Shi, Guorong., Rao, Liqn., Yu, Huazhong., Xiang, Hua., Pen, Guoping., Long, Sang., Yang, Chen. *J Food Eng*. 2007, **80**, 1060-1067.
- Sloyed, B.D., Urichuk, L.J., Morley, P. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of *Ginko biloba* leaves. *J Pharm Pharmacol*. 2000, **52**, 451- 459.
- Takechi, M., y Tanaka, Y. *Haematoxylon campechianum*. *Planta Med*. 1982, **10**, 252.
- Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Wang, A., Suzui, M., Okamoto, K., Mori, H. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic acid and ferulic acids. *Carcinogenesis*. 1993, **14**, 1321-1325.
- Tsuchiya, T., Suzuki, O., Igarashi, K. Protective effects of chlorogenic acid on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996, **60**, 765-768.
- Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003, **335-344**,552.
- Wijeratne, S. S. K., Abou-Zaid, M.M., Chahidi, F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem*. 2006, **54**, 312-318.
- Xiang, Zhinan., Ning, Zhenxiang. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT*. 2008, **41**, 1189-1203.
- Xiong, Y., Rabchevsky, A. G., Hall, E. D. Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J Neurochem*. 2007, **100 (3)**, 639-649.



-
- Yuki, Sato., Shirou, Itagaki., Toshimitsu, Kurokawa., Jiro, Ogura., Masaki, Kobayashi., Takeshi, Hirano., Mitsuru, Sugawara., Ken, Iseki. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *J Pharma.* 2010, 1-3.
 - Yoshikawa, M., Murakami, T., Ishiwada, T., Morikawa, T., Kagawa, M., Higashi, Y., Matsuda, H. New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers *Prunus mume*. *J Nat Prod.* 2002, **65**, 1151-1155.



ANEXO I
Tabla 39. DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT



Ejemplo

Para $r = 10$ grados de libertad:

$$P[t > 1.812] = 0.05$$

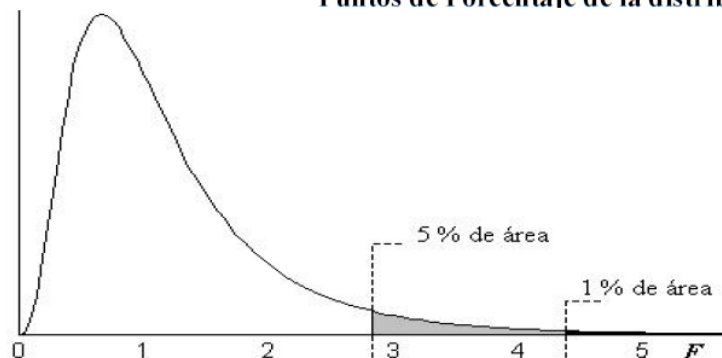
$$P[t < -1.812] = 0.05$$

α r	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0005
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,578
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,600
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	0,679	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,290



Tabla II. Distribución F de Fisher

Puntos de Porcentaje de la distribución F



Ejemplo:

Para $n_1 = 9, n_2 = 12$ grados de libertad:

$$P[F > 2.80] = 0.05$$

$$P[F > 4.39] = 0.01$$

n ₂	5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F																				n ₂					
	n ₁ grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞		
1	161	199	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	246	248	249	250	251	252	253	253	254	254	254	254	1
2	4052	4999	5404	5624	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6083	6107	6143	6170	6209	6234	6260	6286	6302	6324	6334	6350	6360	6366	2	
3	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.40	19.41	19.42	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.48	19.49	19.49	19.49	19.50	19.50	3
4	98.50	99.00	99.16	99.25	99.30	99.33	99.36	99.38	99.39	99.40	99.41	99.42	99.43	99.44	99.45	99.46	99.47	99.48	99.48	99.48	99.49	99.49	99.50	99.50	99.50	4
5	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.71	8.69	8.66	8.64	8.62	8.59	8.58	8.56	8.55	8.54	8.53	8.53	8.53	5
6	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.34	27.23	27.13	27.05	26.92	26.83	26.69	26.60	26.50	26.41	26.35	26.28	26.24	26.18	26.15	26.13	26.13	6
7	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.87	5.84	5.80	5.77	5.75	5.72	5.70	5.68	5.66	5.65	5.64	5.63	5.63	7
8	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.45	14.37	14.25	14.15	14.02	13.93	13.84	13.75	13.69	13.61	13.58	13.52	13.49	13.46	13.46	8
9	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.64	4.60	4.56	4.53	4.50	4.46	4.44	4.42	4.41	4.39	4.37	4.37	4.37	9
10	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.96	9.89	9.77	9.68	9.55	9.47	9.38	9.29	9.24	9.17	9.13	9.08	9.04	9.02	9.02	10
11	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.96	3.92	3.87	3.84	3.81	3.77	3.75	3.73	3.71	3.69	3.68	3.67	3.67	11
12	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.60	7.52	7.40	7.31	7.23	7.14	7.09	7.02	6.99	6.93	6.90	6.88	6.88	12
13	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.53	3.49	3.44	3.41	3.38	3.34	3.32	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23	3.23	13
14	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.36	6.28	6.16	6.07	5.99	5.91	5.86	5.79	5.75	5.70	5.67	5.65	5.65	14
15	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.24	3.20	3.15	3.12	3.08	3.04	3.02	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93	2.93	15
16	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.56	5.48	5.36	5.28	5.20	5.12	5.07	5.00	4.96	4.91	4.88	4.86	4.86	16
17	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.03	2.99	2.94	2.90	2.86	2.83	2.80	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71	2.71	17
18	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.01	4.92	4.81	4.73	4.65	4.57	4.52	4.45	4.41	4.36	4.33	4.31	4.31	18
19	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.86	2.83	2.77	2.74	2.70	2.66	2.64	2.60	2.59	2.56	2.55	2.54	2.54	19
20	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.60	4.52	4.41	4.33	4.25	4.17	4.12	4.05	4.01	3.96	3.93	3.91	3.91	20





n ₂	5 % (normal) y 1 % (negritas) puntos para la distribución de F n ₁ grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																						n ₂		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200		500	∞
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.74	2.70	2.65	2.61	2.57	2.53	2.51	2.47	2.46	2.43	2.42	2.40	11
12	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.29	4.21	4.10	4.02	3.94	3.86	3.81	3.74	3.71	3.66	3.62	3.60	12
	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.64	2.60	2.54	2.51	2.47	2.43	2.40	2.37	2.35	2.32	2.31	2.30	12
13	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.05	3.97	3.86	3.78	3.70	3.62	3.57	3.50	3.47	3.41	3.38	3.36	13
	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.55	2.51	2.46	2.42	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.22	2.21	13
14	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.86	3.78	3.66	3.59	3.51	3.43	3.38	3.31	3.27	3.22	3.19	3.17	14
	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.48	2.44	2.39	2.35	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.16	2.14	2.13	14
15	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.70	3.62	3.51	3.43	3.35	3.27	3.22	3.15	3.11	3.06	3.03	3.00	15
	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.42	2.38	2.33	2.29	2.25	2.20	2.18	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07	15
16	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.56	3.49	3.37	3.29	3.21	3.13	3.08	3.01	2.98	2.92	2.89	2.87	16
	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.37	2.33	2.28	2.24	2.19	2.15	2.12	2.09	2.07	2.04	2.02	2.01	16
17	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.45	3.37	3.26	3.18	3.10	3.02	2.97	2.90	2.86	2.81	2.78	2.75	17
	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.33	2.29	2.23	2.19	2.15	2.10	2.08	2.04	2.02	1.99	1.97	1.96	17
18	8.40	6.11	5.19	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.35	3.27	3.16	3.08	3.00	2.92	2.87	2.80	2.76	2.71	2.68	2.65	18
	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.29	2.25	2.19	2.15	2.11	2.06	2.04	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	18
19	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.27	3.19	3.08	3.00	2.92	2.84	2.78	2.71	2.68	2.62	2.59	2.57	19
	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.26	2.21	2.16	2.11	2.07	2.03	2.00	1.96	1.94	1.91	1.89	1.88	19
20	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.19	3.12	3.00	2.92	2.84	2.76	2.71	2.64	2.60	2.55	2.51	2.49	20
	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.22	2.18	2.12	2.08	2.04	1.99	1.97	1.93	1.91	1.88	1.86	1.84	20
21	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.13	3.05	2.94	2.86	2.78	2.69	2.64	2.57	2.54	2.48	2.44	2.42	21
	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.20	2.16	2.10	2.05	2.01	1.96	1.94	1.90	1.88	1.84	1.83	1.81	21
22	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.07	2.99	2.88	2.80	2.72	2.64	2.58	2.51	2.48	2.42	2.38	2.36	22
	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.17	2.13	2.07	2.03	1.98	1.94	1.91	1.87	1.85	1.82	1.80	1.78	22
23	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.02	2.94	2.83	2.75	2.67	2.58	2.53	2.46	2.42	2.36	2.33	2.31	23
	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.24	2.20	2.15	2.11	2.05	2.01	1.96	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76	23
24	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	2.97	2.89	2.78	2.70	2.62	2.54	2.48	2.41	2.37	2.32	2.28	2.26	24
	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.22	2.18	2.13	2.09	2.03	1.98	1.94	1.89	1.86	1.82	1.80	1.77	1.75	1.73	24
25	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26	3.17	3.09	3.03	2.93	2.85	2.74	2.66	2.58	2.49	2.44	2.37	2.33	2.27	2.24	2.21	25
	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.11	2.07	2.01	1.96	1.92	1.87	1.84	1.80	1.78	1.75	1.73	1.71	25
26	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	3.06	2.99	2.89	2.81	2.70	2.62	2.54	2.45	2.40	2.33	2.29	2.23	2.19	2.17	26
	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.09	2.05	1.99	1.95	1.90	1.85	1.82	1.78	1.76	1.73	1.71	1.69	26
27	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18	3.09	3.02	2.96	2.86	2.78	2.66	2.58	2.50	2.42	2.36	2.29	2.25	2.19	2.16	2.13	27
	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.08	2.04	1.97	1.93	1.88	1.84	1.81	1.76	1.74	1.71	1.69	1.67	27
28	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15	3.06	2.99	2.93	2.82	2.75	2.63	2.55	2.47	2.38	2.33	2.26	2.22	2.16	2.12	2.10	28
	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.06	2.02	1.96	1.91	1.87	1.82	1.79	1.75	1.73	1.69	1.67	1.65	28
29	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12	3.03	2.96	2.90	2.79	2.72	2.60	2.52	2.44	2.35	2.30	2.23	2.19	2.13	2.09	2.06	29
	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.05	2.01	1.94	1.90	1.85	1.81	1.77	1.73	1.71	1.67	1.65	1.64	29
30	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09	3.00	2.93	2.87	2.77	2.69	2.57	2.49	2.41	2.33	2.27	2.20	2.16	2.10	2.06	2.03	30
	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.04	1.99	1.93	1.89	1.84	1.79	1.76	1.72	1.70	1.66	1.64	1.62	30
32	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.91	2.84	2.74	2.66	2.55	2.47	2.39	2.30	2.25	2.17	2.13	2.07	2.03	2.01	32
	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14	2.10	2.07	2.01	1.97	1.91	1.86	1.82	1.77	1.74	1.69	1.67	1.63	1.61	1.59	32
	7.50	5.34	4.46	3.97	3.65	3.43	3.26	3.13	3.02	2.93	2.86	2.80	2.70	2.62	2.50	2.42	2.34	2.25	2.20	2.12	2.08	2.02	1.98	1.96	





n_2	5 % (normal) y 1 % (negritas) puntos para la distribución de F																					n_2			
	n_1 grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	1.99	1.95	1.89	1.84	1.80	1.75	1.71	1.67	1.65	1.61	1.59	1.57	34
	7.44	5.29	4.42	3.93	3.61	3.39	3.22	3.09	2.98	2.89	2.82	2.76	2.66	2.58	2.46	2.38	2.30	2.21	2.16	2.08	2.04	1.98	1.94	1.91	
36	4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.87	1.82	1.78	1.73	1.69	1.65	1.62	1.59	1.56	1.55	36
	7.40	5.25	4.38	3.89	3.57	3.35	3.18	3.05	2.95	2.86	2.79	2.72	2.62	2.54	2.43	2.35	2.26	2.18	2.12	2.04	2.00	1.94	1.90	1.87	
38	4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09	2.05	2.02	1.96	1.92	1.85	1.81	1.76	1.71	1.68	1.63	1.61	1.57	1.54	1.53	38
	7.35	5.21	4.34	3.86	3.54	3.32	3.15	3.02	2.92	2.83	2.75	2.69	2.59	2.51	2.40	2.32	2.23	2.14	2.09	2.01	1.97	1.90	1.86	1.84	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.95	1.90	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.61	1.59	1.55	1.53	1.51	40
	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.56	2.48	2.37	2.29	2.20	2.11	2.06	1.98	1.94	1.87	1.83	1.81	
42	4.07	3.22	2.83	2.59	2.44	2.32	2.24	2.17	2.11	2.06	2.03	1.99	1.94	1.89	1.83	1.78	1.73	1.68	1.65	1.60	1.57	1.53	1.51	1.49	42
	7.28	5.15	4.29	3.80	3.49	3.27	3.10	2.97	2.86	2.78	2.70	2.64	2.54	2.46	2.34	2.26	2.18	2.09	2.03	1.95	1.91	1.85	1.80	1.78	
44	4.06	3.21	2.82	2.58	2.43	2.31	2.23	2.16	2.10	2.05	2.01	1.98	1.92	1.88	1.81	1.77	1.72	1.67	1.63	1.59	1.56	1.52	1.49	1.48	44
	7.25	5.12	4.26	3.78	3.47	3.24	3.08	2.95	2.84	2.75	2.68	2.62	2.52	2.44	2.32	2.24	2.15	2.07	2.01	1.93	1.89	1.82	1.78	1.75	
46	4.05	3.20	2.81	2.57	2.42	2.30	2.22	2.15	2.09	2.04	2.00	1.97	1.91	1.87	1.80	1.76	1.71	1.65	1.62	1.57	1.55	1.51	1.48	1.46	46
	7.22	5.10	4.24	3.76	3.44	3.22	3.06	2.93	2.82	2.73	2.66	2.60	2.50	2.42	2.30	2.22	2.13	2.04	1.99	1.91	1.86	1.80	1.76	1.73	
48	4.04	3.19	2.80	2.57	2.41	2.29	2.21	2.14	2.08	2.03	1.99	1.96	1.90	1.86	1.79	1.75	1.70	1.64	1.61	1.56	1.54	1.49	1.47	1.45	48
	7.19	5.08	4.22	3.74	3.43	3.20	3.04	2.91	2.80	2.71	2.64	2.58	2.48	2.40	2.28	2.20	2.12	2.02	1.97	1.89	1.84	1.78	1.73	1.70	
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.99	1.95	1.89	1.85	1.78	1.74	1.69	1.63	1.60	1.55	1.52	1.48	1.46	1.44	50
	7.17	5.06	4.20	3.72	3.41	3.19	3.02	2.89	2.78	2.70	2.63	2.56	2.46	2.38	2.27	2.18	2.10	2.01	1.95	1.87	1.82	1.76	1.71	1.68	
55	4.02	3.16	2.77	2.54	2.38	2.27	2.18	2.11	2.06	2.01	1.97	1.93	1.88	1.83	1.76	1.72	1.67	1.61	1.58	1.53	1.50	1.46	1.43	1.41	55
	7.12	5.01	4.16	3.68	3.37	3.15	2.98	2.85	2.75	2.66	2.59	2.53	2.42	2.34	2.23	2.15	2.06	1.97	1.91	1.83	1.78	1.71	1.67	1.64	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.86	1.82	1.75	1.70	1.65	1.59	1.56	1.51	1.48	1.44	1.41	1.39	60
	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	2.39	2.31	2.20	2.12	2.03	1.94	1.88	1.79	1.75	1.68	1.63	1.60	
65	3.99	3.14	2.75	2.51	2.36	2.24	2.15	2.08	2.03	1.98	1.94	1.90	1.85	1.80	1.73	1.69	1.63	1.58	1.54	1.49	1.46	1.42	1.39	1.37	65
	7.04	4.95	4.10	3.62	3.31	3.09	2.93	2.80	2.69	2.61	2.53	2.47	2.37	2.29	2.17	2.09	2.00	1.91	1.85	1.77	1.72	1.65	1.60	1.57	
70	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.02	1.97	1.93	1.89	1.84	1.79	1.72	1.67	1.62	1.57	1.53	1.48	1.45	1.40	1.37	1.35	70
	7.01	4.92	4.07	3.60	3.29	3.07	2.91	2.78	2.67	2.59	2.51	2.45	2.35	2.27	2.15	2.07	1.98	1.89	1.83	1.74	1.70	1.62	1.57	1.54	
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.91	1.88	1.82	1.77	1.70	1.65	1.60	1.54	1.51	1.45	1.43	1.38	1.35	1.33	80
	6.96	4.88	4.04	3.56	3.26	3.04	2.87	2.74	2.64	2.55	2.48	2.42	2.31	2.23	2.12	2.03	1.94	1.85	1.79	1.70	1.65	1.58	1.53	1.50	
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.89	1.85	1.79	1.75	1.68	1.63	1.57	1.52	1.48	1.42	1.39	1.34	1.31	1.28	100
	6.90	4.82	3.98	3.51	3.21	2.99	2.82	2.69	2.59	2.50	2.43	2.37	2.27	2.19	2.07	1.98	1.89	1.80	1.74	1.65	1.60	1.52	1.47	1.43	
125	3.92	3.07	2.68	2.44	2.29	2.17	2.08	2.01	1.96	1.91	1.87	1.83	1.77	1.73	1.66	1.60	1.55	1.49	1.45	1.40	1.36	1.31	1.27	1.25	125
	6.84	4.78	3.94	3.47	3.17	2.95	2.79	2.66	2.55	2.47	2.39	2.33	2.23	2.15	2.03	1.94	1.85	1.76	1.69	1.60	1.55	1.47	1.41	1.37	
150	3.90	3.06	2.66	2.43	2.27	2.16	2.07	2.00	1.94	1.89	1.85	1.82	1.76	1.71	1.64	1.59	1.54	1.48	1.44	1.38	1.34	1.29	1.25	1.22	150
	6.81	4.75	3.91	3.45	3.14	2.92	2.76	2.63	2.53	2.44	2.37	2.31	2.20	2.12	2.00	1.92	1.83	1.73	1.66	1.57	1.52	1.43	1.38	1.33	
200	3.89	3.04	2.65	2.42	2.26	2.14	2.06	1.98	1.93	1.88	1.84	1.80	1.74	1.69	1.62	1.57	1.52	1.46	1.41	1.35	1.32	1.26	1.22	1.19	200
	6.76	4.71	3.88	3.41	3.11	2.89	2.73	2.60	2.50	2.41	2.34	2.27	2.17	2.09	1.97	1.89	1.79	1.69	1.63	1.53	1.48	1.39	1.33	1.28	
400	3.86	3.02	2.63	2.39	2.24	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.81	1.78	1.72	1.67	1.60	1.54	1.49	1.42	1.38	1.32	1.28	1.22	1.17	1.13	400
	6.70	4.66	3.83	3.37	3.06	2.85	2.68	2.56	2.45	2.37	2.29	2.23	2.13	2.05	1.92	1.84	1.75	1.64	1.58	1.48	1.42	1.32	1.25	1.19	
1000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.11	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.70	1.65	1.58	1.53	1.47	1.41	1.36	1.30	1.26	1.19	1.13	1.08	1000
	6.66	4.63	3.80	3.34	3.04	2.82	2.66	2.53	2.43	2.34	2.27	2.20	2.10	2.02	1.90	1.81	1.72	1.61	1.54	1.44	1.38	1.28	1.19	1.12	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.69	1.64	1.57	1.52	1.46	1.39	1.35	1.28	1.24	1.17	1.11	1.00	∞
	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.25	2.18	2.08	2.00	1.88	1.79	1.70	1.59	1.52	1.42	1.36	1.25	1.15	1.00	

