



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLANTA HOJASÉN
(*FLOURENSIA CERNUA D.C.*) PARA SU DETERMINACIÓN POR
ELECTROFORESIS CAPILAR.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A:

GONZALO GRANADOS LÓPEZ

ASESORA: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2014.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
Exámenes Profesionales Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Optimización de métodos de extracción de compuestos fenólicos de la planta hojasén (Flourensia cernua D.C.) para su determinación por electroforesis capilar

Que presenta el pasante: Gonzalo Granados López
Con número de cuenta: 303191786 para obtener el Título de: Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
VOCAL	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
SECRETARIO	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Brigida del Carmen Camacho Enríquez	
2do. SUPLENTE	M.C. Claudia Briones Jurado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



A Dios por darme esta oportunidad de vida, y a su voluntad que permitió culminar este trabajo.

A mis padres Mario y Nohemí que durante toda mi vida tuve su apoyo incondicional y grandes enseñanzas de vida.

A mi tía Lorena y mis abuelitos Zenaida y Gonzalo, quienes me enseñaron valores y siempre estuvieron conmigo.

A mi hermano Saúl quien me apoyo en todo momento.

A mi esposa Jazmín por su apoyo incondicional y su gran amor "gracias por creer en mí".

A mi hija Mayte a quien le dedico este trabajo por ser mi gran motivación e inspiración.

A mis suegros María Auxilio e Isabel quienes me dieron su apoyo y creyeron en mí.

A mi asesora Gaby por su apoyo en todo momento y las lecciones de vida.



A la Dra. Andrea Trejo por su apoyo en la realización de este trabajo.

A las familias Granados, López, Suastegui, Sales y Torres quienes creyeron en mí y me brindaron su apoyo y consejos en todo momento, los quiero mucho familia.

A Rosario y Roberto Rocha quienes me apoyaron desde un inicio en esta meta.

A mis amigos de vida: Adriana Santos, Yemeri Camacho, Berny Almaraz, Nohemí Becerril y Gerardo Chino, y a todos mis amigos de la FESC que me brindaron su amistad, gracias por su apoyo incondicional.

A mis profesores queridos: M.C. Verónica Altamirano Lugo, M.C. Claudia Briones Jurado, Dra. María Guillermina Rivera Martínez, Dra. Yolanda Marina Vargas Rodríguez, Dra. María Guadalupe Pérez Caballero, Dra. Brigida del Carmen Camacho Enríquez, Dra. Gilda Flores Rosales, Dr. Zbigniew Oziwicz Kwass y Dr. René Miranda Ruvalcaba por su amistad y su apoyo.

A los demás profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán quienes me formaron y cuyas enseñanzas académicas y personales son parte de mí



*A la generación de Química 36 con quienes disfruté,
compartí y viví esta bonita etapa de mi vida*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México que
me brindó esta oportunidad de vida, y gracias a sus
instalaciones y proyectos fue posible la realización de
este trabajo.*



Este trabajo se ha desarrollado en el marco de las actividades establecidas por la empresa GBS GLOBAL, financiadas por CONACyT de la Convocatoria Fondo de Innovación Tecnológica, Secretaría de Economía, con clave ECO-2011-C01-164617 titulado:

"Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del semidesierto Mexicano y microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas"



Índice General





Índice general.

Índice general.....	vi
Abreviaturas.	xi
Resumen.....	xiv
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares.	3
3. Marco teórico.	5
3.1 Hojasén.....	5
3.1.1 Localización y nombres.....	5
3.1.2 Características.....	5
3.1.3 Composición.....	6
3.1.4 Información taxonómica.	7
3.1.5 Usos y aplicaciones.	7
3.1.6 Evaluación de algunos parámetros de extractos de hojasén.....	8
3.2 Compuestos fenólicos.	10
3.2.1 Generalidades.....	10
3.2.2 Importancia de la preparación de la muestra.....	11
3.2.3 Hidrólisis de compuestos fenólicos unidos a azúcares.	12
3.2.4 Características importantes de los analitos a tomar en cuenta para la extracción.	13
3.2.5 Extracción asistida por ultrasonido.....	14
3.2.6 Huellas digitales en el análisis de fitoequivalencia.	15
3.2.7 Técnicas analíticas utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos.	16
3.3 Electroforesis capilar.....	16
3.3.1 Proceso electroforético.....	17
3.3.2 Generalidades.....	17
3.3.3 Principios de la separación electroforética.....	18
3.4 Tecnología de alimentos.	20
3.4.1 Recubrimientos biorgánicos a base de extractos de hojasén.	21



4.	Desarrollo experimental.....	25
4.1	Material vegetal.	25
4.2	Reactivos.	25
4.3	Soluciones.	25
4.4	Equipos.	25
4.5	Identificación del material vegetal de hojasén.	26
4.6	Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos.	26
4.7	Procedimiento de hidrólisis alcalina del extracto.....	26
4.8	Condiciones de separación por electroforesis capilar.	28
4.9	Determinación de los compuestos fenólicos.....	28
4.9.1	Identificación de los compuestos fenólicos.	28
4.9.2	Precisión del sistema.	28
4.9.3	Cuantificación de los compuestos fenólicos.	29
4.10	Procesamiento de las señales de los electroferogramas obtenidos por electroforesis capilar.	30
4.11	Identificación de las huellas digitales de los materiales vegetales utilizados por electroforesis capilar.	31
5.	Discusión y análisis de resultados.....	33
5.1	Condiciones óptimas para la extracción de los compuestos fenólicos.....	33
5.1.1	Extractos acuosos (AS y AM).....	33
5.1.2	Extractos metanol-agua (MS y MM).....	34
5.1.3	Extractos etanol-agua (ES y EM).....	35
5.1.4	Determinación del tipo óptimo de disolvente.	35
5.2	Selección de las condiciones óptimas de hidrólisis.	36
5.2.1	Estudio de las condiciones de hidrólisis básica.....	36
5.2.2	Conclusiones sobre las condiciones de hidrólisis básica.....	41
5.3	Determinación de compuestos fenólicos.....	41
5.3.1	Identificación de compuestos fenólicos.	42
5.3.2	Selectividad del método.	45
5.3.3	Selección del estándar interno. (EI).	45
5.3.4	Precisión del sistema.....	46
5.3.5	Curvas de calibración.	48



5.3.6	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	49
5.4	Determinación de compuestos fenólicos en los recubrimientos biorgánicos a base del extracto de hojaseén.....	52
5.5	Caracterización de las huellas digitales de diferentes especies vegetales de hojaseén por electroforesis capilar.....	56
6.	Conclusiones.....	60
7.	Bibliografía.....	62
Anexos.	71
Anexo 1:	Detalle de la preparación de las soluciones patrón para la realización de la curva de calibración.....	71
Grupo A.....	71
Grupo B.....	71
Grupo C.....	72
Grupo D.....	72
Grupo E.....	73
Grupo F.....	73
Anexo 2:	Escalas de zonas de predominio de los compuestos fenólicos de interés.....	75
Anexo 3:	Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la planta hojaseén (<i>Flourensia cernua D.C.</i>) por CE.....	79
Naringina.....	79
Resveratrol.....	80
Rutina.....	82
(-)-Epicatequina.....	83
(+)-Catequina.....	84
Ácido clorogénico.....	85
Apigenina.....	87
Kaempferol.....	88
Quercetina.....	89
Ácido cafeico.....	90
Anexo 4:	Validación del modelo lineal de las curvas de calibración de los compuestos fenólicos.....	92
Naringina.....	93
Resveratrol.....	97



Rutina.	100
(-)-Epicatequina.	107
(+)-Catequina.	110
Ácido clorogénico.	113
Apigenina.	116
Kaempferol.	122
Quercetina.	126
Ácido cafeico.	130
Anexo 5: Documentos de la identificación taxonómica del material vegetal utilizado...	135

Edo. Mex.	PC1
PC2	NaOH
Na ₂ B ₄ O ₇	HPLC
N	HAs
EDTA	H ₂ O
EtOH	MetOH
N ₂	mM
M	pH
μV	g
mL	min
rpm	μm
psi	°C
cm	nm
CE	Ac.
hrs.	CE-DAD
EZP	E.I.

Abreviaturas





Abreviaturas.

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
°C	Grados Celcius	EZP	Escalas de zonas de predominio
μA	Microampere	FEO	Flujo electroosmótico
Ac.	Ácido	F _{Exp}	F calculada experimentalmente
A _i	Área	F _{tablas}	F de tablas de la distribución de Fisher
ANOVA	Analysis of variance	g	Gramos
b ₁	Pendiente	g.d.l.	Grados de libertad
b ₀	Ordenada al origen o intercepto	GC	Cromatografía de gases
CCEM	Cromatografía capilar electrocinética micelar	H _i	Altura
CE	Electroforesis capilar	H ₂ O	Agua
CE-DAD	Electroforesis capilar-arreglo de diodos	HAs	Ácido ascórbico
cm	Centímetro	HPLC	High performance liquid chromatography
EAU	Extracción asistida por ultrasonido	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona	hrs.	Horas
Edo. Mex.	Estado de México	IC(b ₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético	Kg	Kilogramo
EI	Estándar interno	KHz	Kilohertz
ESL	Extracción por maceración o sólido-líquido	L	Litros
EtOH	Etanol	LC	Límite de cuantificación



Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
LD	Límite de detección	P3	Planta 3
M	Molaridad	PC1	Planta Coahuila 1
MAE	Extracción asistida por microondas	PC2	Planta Coahuila 2
MetOH	Metanol	pH	Potencial de hidrógeno
MHz	Megahertz	PLE	Extracción líquida a presión
µm	Micrómetros	psi	Unidad de presión
min	Minutos	r²	Coefficiente de determinación
mL	Mililitros	RMN	Resonancia magnética nuclear
mM	Milimolar	rpm	Revoluciones por minuto
MΩ	Megaohms	%RSD	Desviación estándar relativa
MS	Espectrometría de masas	s	Segundos
MS_{EP}	Cuadrados medios del error puro	S_{b0}	Desviación estándar de la ordenada al origen
MS_{FDA}	Cuadrados medios de la falta de ajuste	S_{b1}	Desviación estándar de la pendiente
N	Normalidad	S_{y/x}	Desviación estándar de la regresión lineal
N₂	Nitrógeno	SFE	Extracción con fluidos supercríticos
Na₂B₄O₇	Tetraborato de sodio	SPE	Extracción en fase sólida
NaOH	Hidróxido de sodio	TLC	Cromatografía en capa fina
NC	No cuantificable	t_m	Tiempo de migración
ND	No detectado	UV	Ultravioleta
nm	Nanometros	\bar{x}	Promedio

RESUMEN.

Existen en México varias plantas a las que se les llama hojásén las cuales se distribuyen en distintas regiones del país. La especie *Flourensia cernua DC.* tiene varios usos medicinales para el tratamiento de diversas dolencias gastrointestinales, ésta especie es importante debido a la gran cantidad de *metabolitos secundarios* que posee, como son los *compuestos fenólicos*. Entre los usos que se le ha dado, se ha reportado que tiene la capacidad de **controlar hongos y bacterias** muy específicos, los cuales provocan enfermedades que causan grandes *pérdidas postcosecha* a nivel mundial en cultivos de un alto valor comercial como: la *zarzamora, fresa, tomate, papa, manzana, aguacate,*

Resumen





Resumen.

Existen en México varias especies vegetales a las que se les conoce como hojásén, las cuales se distribuyen en distintas regiones del país. La especie *Flourensia cernua* D.C., tiene varios usos medicinales para el tratamiento de diversas dolencias gastrointestinales; esta especie es importante debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que posee, como son los compuestos fenólicos. Entre los usos que se le ha dado, se ha reportado que tiene la capacidad de controlar hongos y bacterias muy específicos, los cuales provocan enfermedades que causan grandes pérdidas postcosecha a nivel mundial en cultivos de alto valor comercial como: la zarzamora, la fresa, el tomate, la papa, la manzana, el aguacate, la papaya, el plátano, etc. Recientemente, nuestro grupo de trabajo evaluó la efectividad de alargar la vida de anaquel de la zarzamora con resultados muy alentadores, adicionándole un recubrimiento biorgánico con extracto de hojásén, por lo que, el conocimiento de la composición del extracto de ésta especie vegetal se vuelve crucial para nuestros posteriores estudios. Por todo lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos de la planta hojásén, mediante el uso de disolventes polares y ultrasonido para su posterior determinación por electroforesis capilar incluyendo el estudio de algunos parámetros de validación del método y la evaluación de extractos de *Flourensia cernua* D.C. de diferente tiempo estacional. Adicionalmente, se obtuvieron las huellas digitales de diferentes especies vegetales de hojásén, con lo cual tenemos una herramienta para poder diferenciar entre las especies encontradas en el mercado.

Para encontrar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos, se realizaron pruebas para determinar la composición más adecuada de disolvente, así como la metodología utilizada para su extracción, siendo la mezcla etanol-agua (70:30) la más adecuada, mientras que la extracción asistida por ultrasonido es el método más eficiente, durante un periodo de 90 minutos. Para la optimización de la hidrólisis del extracto, se encontró que la hidrólisis alcalina era la más conveniente con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1.8 N, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) 10 mM y ácido ascórbico al 1% (HAs), a una temperatura de 60 °C, durante 30 minutos. La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por electroforesis capilar en los extractos de etanol-agua (70:30) y en los hidrolizados de los materiales vegetales de Coahuila 1 y 2, así como en el prototipo de un recubrimiento biorgánico utilizado en el estudio reportado para las zarzamoras.

El estudio realizado durante esta tesis, puede ayudar de forma importante a disminuir las pérdidas postcosecha al contribuir indirectamente al desarrollo de recubrimientos biorgánicos y al aprovechamiento de plantas del semidesierto mexicano que son baratas y altamente disponibles para su utilización.

Los compuestos fenólicos se pueden separar, *identificar, y cuantificar en una sola operación* POR **ACOPLAMIENTO DE HPLC CON DETECTORES DE** ultravioleta (UV), arreglo de diodos (DAD), espectrometría de **masas (MS)**, o resonancia magnética nuclear (RMN); recientemente, la técnica de **electroforesis capilar (CE)** ha **ganado terreno** en este tipo de análisis.....

Introducción





1. Introducción.

Existen en México varias especies vegetales a las que se les llama hojasén las cuales son *Flourensia cernua D.C.*, *Caesalpinia exostemma.*, *Caesalpinia pulcherrima (L.)*, *Cassia covesi Gray.*, *Cassia hispidula Vahl.* y *Cassia senna L.*, que se distribuyen en distintas regiones del país (Martínez M. , 1991). La especie *Flourensia cernua D.C.* es dominante en las franjas de vegetación del desierto de Chihuahua; además se distribuye desde Sonora hasta Nuevo León, Durango, Zacatecas y San Luis Potosí, y en los Estados Unidos en Arizona, Nuevo México y Texas (Estell, Fredrickson, & Havstad, 1991). Tiene varios usos medicinales, las infusiones de hojas se beben con frecuencia para el tratamiento de diversas dolencias gastrointestinales, además se usa como un remedio purgante (Estell, Fredrickson, & Havstad, 1991). Esta especie es importante debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que posee tales como los compuestos fenólicos, terpenos, entre otros; éstos se han utilizados para aplicaciones biológicas, médicas y ecológicas, y sus extractos para el control de hongos y bacterias muy específicos (Guerrero-Rodríguez, Solís-Gaona, Hernández-Castillo, Flores-Olivas, & Sandoval-López, 2007; Estell, Fredrickson, & Havstad, 1991). En este sentido, recientemente su papel en el control de plagas es muy valioso evitando enfermedades que causan grandes pérdidas en el campo a nivel mundial en la producción de cultivos y almacenaje de productos agrícolas de alto valor comercial como la zarzamora, el tomate, la papa, la manzana, el aguacate, la papaya, el plátano, etc. (Guerrero-Rodríguez, Solís-Gaona, Hernández-Castillo, Flores-Olivas, & Sandoval-López, 2007).

Los compuestos fenólicos influyen en la calidad, estabilidad y propiedades organolépticas de los alimentos ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor. Según la estructura química de éstos, se dividen en flavonoides y no flavonoides (Grotewold, 2006). Para su extracción se utilizan disolventes orgánicos polares como el etanol (Ruiz-Martínez, Ascacio, Rodríguez, Morales, & Aguila, 2011). La extracción asistida por ultrasonido, recientemente utilizada, aumenta la eficiencia de la extracción (Da Porto, Porretto, & Decorti, 2013; Yang & Zhang, 2008). Algunos compuestos fenólicos al extraerlos contienen azúcares asociados a sus grupos hidroxilo, por lo que para obtenerlos libres se realizan procesos de hidrólisis que no lleguen a degradar los compuestos fenólicos (Nardini, Cirillo, Natella, & Scaccini, 2002; Nardini, y otros, 2002).

Los compuestos fenólicos se pueden separar, identificar, y cuantificar en una sola operación por acoplamiento de HPLC con detectores de ultravioleta (UV), masas (MS), o resonancia magnética nuclear (RMN); al respecto, es importante resaltar que la técnica de electroforesis capilar (CE) ha ganado terreno en este tipo de análisis (Andersen & Markham, 2006; Schaper, y otros, 2012).

En consecuencia de todo lo anteriormente mencionado surge el objetivo primordial del presente trabajo: optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos de la planta hojasén (*Flourensia cernua D.C.*), mediante el uso de disolventes polares y ultrasonido y su posterior determinación por electroforesis capilar.



Objetivos





2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Optimizar las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos de la planta hojásén (*Flourensia cernua D.C.*), mediante el uso de diferentes disolventes, métodos de extracción e hidrólisis para su posterior determinación por electroforesis capilar, con la finalidad de correlacionar la composición de los extractos adicionados a recubrimientos biorgánicos con el aumento en la vida postcosecha reportado para la zarzamora.

2.2 Objetivos particulares.

- Determinar las condiciones óptimas de extracción de los compuestos fenólicos mediante el uso de diferentes disolventes y métodos de extracción.
- Determinar las condiciones óptimas de hidrólisis mediante el uso de soluciones de distinta composición para la liberación de los compuestos fenólicos unidos a azúcares.
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de hojásén, por los métodos de adición de estándar y comparación de los espectros de absorción.
- Obtener los modelos matemáticos de las curvas de calibración de los compuestos fenólicos identificados, para realizar la determinación cuantitativa por electroforesis capilar.
- Determinar cuantitativamente los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidrolizados y sin hidrolizar de hojásén (*Flourensia cernua D.C.*) por interpolación de las señales de los compuestos fenólicos obtenidas por electroforesis capilar.
- Obtener las huellas digitales de las distintas plantas de hojásén disponibles en el mercado por electroforesis capilar, con la finalidad de identificar los perfiles químicos característicos de cada especie.
- Correlacionar la composición de los extractos de hojásén adicionados a recubrimientos biorgánicos con el aumento en la vida postcosecha reportado para la zarzamora.



Marco Teórico





3. Marco teórico.

3.1 Hojasén.

Existen en México varias especies vegetales conocidas popularmente como hojasén, las cuales son *Flourensia cernua* DC., *Caesalpinia exostemma*, *Caesalpinia pulcherrima* (L.), *Cassia covesi* Gray., *Cassia hispidula* Vahl., *Cassia angustifolia* Vahl. y *Cassia senna* L., que se distribuyen en distintas regiones del país (Martínez M. , 1991). En este tratado nos centraremos en la especie *Flourensia cernua* D.C.

3.1.1 Localización y nombres.

La especie *Flourensia cernua* D.C. es dominante en los desiertos de Chihuahua y Sonora, así como en los estados de Coahuila, Chihuahua, Durango, Hidalgo, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas (Martínez M. , 1993). Y en los Estados Unidos de América, se encuentra al oeste de Texas y sur de Nuevo México y Arizona (Figura 4.1). Es comúnmente conocido en diferentes formas, los nombres que se dan en los Estados Unidos de América son: tarbush, tar-bush, hojase, american-tarbush, american tarwort, black-brush, varnish-brush, y hojasen (Correll & Johnston, 1970). En México, se le conoce como hojasén, hoja sen y hoja se.



Figura 3.1 Distribución geográfica de la especie *Flourensia cernua* D.C. en México y E.U.

3.1.2 Características.

Es un arbusto multitallo que parece a un cono invertido; su altura media es de 1.50 m y los intervalos de diámetro son de 1 m a 1.50 m, no tiene tronco y las ramas discurren oblicuamente desde la base. La hoja tiene un tamaño promedio de 20 mm X 6 mm, orientadas hacia arriba en posición oblicua a la posición sub-vertical (figura 3.2) (Ludwig, Reynolds, & Whitson, 1975) Esta especie florece en noviembre, produce frutos a partir de diciembre a febrero, se dispersa sus semillas durante febrero y marzo, y germina durante el verano (Valencia-Díaz & Montana, 2005).

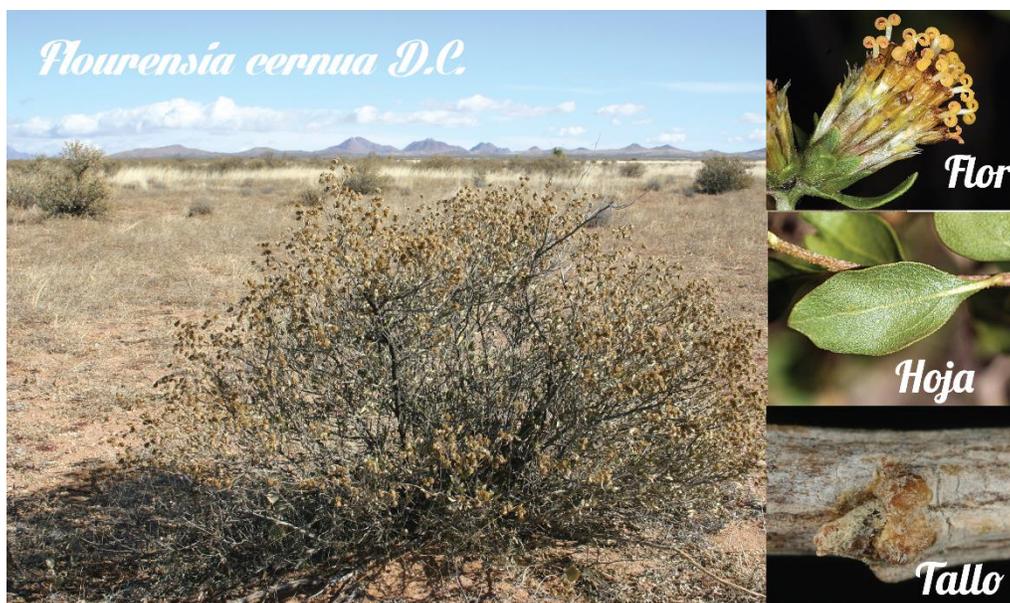


Figura 3.2 Características de la especie vegetal *Flourensia cernua* D.C.

Las características del arbusto hacen que sobreviva en un hábitat con escasas lluvias, al mantener los sitios de crecimiento con humedad (Kidron & Gutschick, 2013) y una captura efectiva del agua cuando llueve, lo cual se debe al escurrimiento del agua por el tronco, junto con la intercepción de la corona, de esta forma se puede canalizar casi la mitad de la precipitación total en la base del arbusto; además de que contiene raíces que rebasan el diámetro de su corona que permiten una absorción mayor del agua en épocas de lluvia (figura 3.2). En este sentido, hace que éste se adapte mejor que los pastizales, sustituyendo este tipo de flora provocando fenómenos de desertificación (Mauchamp & Janeauf, 1993), sin mencionar su adaptación al fenómeno de calentamiento global (Kidron & Gutschick, 2013) La desertificación también se asocia con la pérdida de productividad agrícola de las tierras, tanto de pastoreo y de cultivo que producen alimentos básicos. Se ha tratado de controlar la invasión de los arbustos mediante el consumo del ganado, pero éste no ha tenido gran éxito debido a que la planta en ciertas temporadas es tóxica, lo que hace que su consumo sea menor y por temporadas con dosis controladas (Fredrickson, Estell, Havstad, Shupe, & Murray, 2000); por lo que es factible la utilización de esta planta para el desarrollo de recubrimientos biorgánicos a base de extractos para alargar la vida de anaquel de frutas y hortalizas (Sánchez Soto, 2013).

3.1.3 Composición.

El estudio de la composición de esta especie vegetal es importante, ya que el contenido de metabolitos secundarios en tallos hojas y raíces, hace que tenga un uso potencial para el control de las enfermedades debidas a hongos y bacterias, además se estudia el grado de toxicidad para su uso. Se han aislado e identificado cinco 6,8-di-C-glicosilflavonas y dos flavonoles metoxilados (Dillon, Mabry, Besson, Bouillant, & Chopin, 1976); también se han aislado los compuestos fitotóxicos flourensadiol, orselinato de metilo, y ácido dihidroflourensico, junto con el flavonoide enamina y siete γ -lactonas en extractos de dicloro metano-metanol (1:1) (Mata, y otros, 2003), otras investigaciones reportan que han aislado dos flavonoides, cirsimaritina y hispidulina (Rao, Kingston, & Spittler, 1970); y se ha identificado la presecencia de los compuestos fenólicos de (+)-catequina, ácido 2-hidroxicinámico, ácido elágico y quercetina en extractos etanólicos (Ruiz-Martínez, Ascacio, Rodríguez, Morales, & Aguila, 2011); también se ha logrado aislar dos sesquiterpenos, el



ácido flourensico y flourensadiol, los cuales están relacionados con la toxicidad de la planta (Kingston, Rao, Spittler, Pettersen, & Cullen, 1975); también se ha identificado los terpenos borneol y globulol en la superficie de las hojas (Estell, Havstad, Fredrickson, & Gardea-Torresdey, 1994), además de otros (Estell, James, Fredrickson, & Anderson, 2013) que hacen que esta planta en épocas cuando florea sea tóxica, y se observa principalmente cuando la muestra no tienen un pretratamiento de secado (Fredrickson, Estell, Havstad, Shupe, & Murray, 2000). En el aceite esencial de hojas se han identificado 89 compuestos, cuyos compuestos principales son: β -eudesmol, α -eudesmol, limoneno, γ -eudesmol, mirceno, borneol, δ -3-careno, flourensiol, alcohol artimicia y viridiflorol (Tellez M. R., Estell, Fredrickson, & Havstad, 1977).

Las concentraciones y los perfiles de metabolitos secundarios de esta planta generalmente varían dentro y entre las plantas (Barnola, Cedeño, & Hasegawa, 1997; Byrd, McArthur, Wang, Graham, & Freeman, 1999). Factores bióticos, abióticos y de estrés (por ejemplo, la intensidad de la luz, longitud de onda, la humedad del suelo, nutrientes, herbivoría, daños mecánicos, etc.) pueden alterar los perfiles químicos y concentraciones de compuestos secundarios; la edad de la planta, etapa de crecimiento y la fenología de una especie dada son conductores también importantes de la química de las plantas. Dos factores importantes que pueden afectar los perfiles químicos en esta especie son la edad de la hoja y la ubicación dentro de la planta, de tal forma que, las hojas inmaduras contienen concentraciones más altas de compuestos de defensa tales como terpenos y fenoles totales (Estell, James, Fredrickson, & Anderson, 2013).

3.1.4 Información taxonómica.

De acuerdo con el instituto de biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la tabla 3.1 se obtiene la siguiente información taxonómica (Instituto de Biología.).

Tabla 3.1 Información taxonómica de la planta hojaseén (*Flourensia cernua* D.C.)

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Flourensia
Epiteto específico	cernua
Nombre Científico	Flourensia cernua
Autor del nombre	D.C.

3.1.5 Usos y aplicaciones.

En estas regiones la planta es utilizada como remedio medicinal. Una infusión de las hojas se bebe con frecuencia para el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales, el té se bebe para aliviar dolores estomacales, indigestión, diarrea y disentería, también es utilizada como remedio expectorante y purgante, las hojas son mezcladas con las de *Datura stramonium* en agua caliente para bañar a personas que sufren de reumatismo. Sin embargo, el uso moderno de esta planta es sumamente limitado debido a la falta de conocimiento de las propiedades químicas y los efectos toxicológicos, en investigaciones recientes se ha demostrado que un tratamiento de extracción a altas temperaturas ayuda que estos dejen de ser tóxicos, debido posiblemente a que los compuestos responsables de la toxicidad (en su mayoría terpenos) son muy lábiles (Zavala, Carrillo, Alvarado, & Sánchez, 2010).



Los extractos de productos naturales de la planta han demostrado tener gran aplicación para el control de hongos y bacterias, los extractos de las hojas tienen actividad antifúngica de *Rhizoctonia solani*, *Pythium sp.* y *Fusarium oxysporum*. Los extractos de hojas con hexano, éter dietílico y etanol son activos contra *Colletotrichum fragariae* Brooks, *C. gloeosporioides* Penz, Sacc. y *C. accutatum* Simmons. La extracción metanólica mediante Soxhlet es activa contra *Rhizoctonia solani*, *Phytopathogene* y *Phytophthora infestans*. Los extractos de hexano tienen una inhibición micelial contra *Alternaria alternata*, y los de etanol tienen una inhibición micelial para *Colletotrichum gloeosporoides*, y *Penicillium digitatum*, además de actividad antiesporulante para *Colletotrichum gloeosporoide*, por otra parte los extractos de metanol-cloroformo 1:1 tienen actividad antiesporulante para *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum*; finalmente los extractos anteriores presentan efecto fungistático (Guerrero-Rodríguez, Solís-Gaona, Hernández-Castillo, Flores-Olivas, & Sandoval-López, 2007).

Actualmente los extractos metanólicos se usan para el cuidado oral. La actividad antimicrobiana de este extracto fue evaluada frente a bacterias periodontopatogénicas tales como: *Prevotella intermedius*, *Streptococco intermedius* y *Tanerella forsythensis* (*bacteroides forsythus*) siendo las principales bacterias asociadas a enfermedades como la periodontitis (Moyeda Gaspar, 2013).

3.1.6 Evaluación de algunos parámetros de extractos de hojásén.

Dentro de este proyecto, nuestro equipo de trabajo evaluó algunos parámetros de los extractos de esta especie vegetal usando como disolventes de extracción etanol-agua (70:30) y agua, con tamaños de partículas malla 40 (partícula de 0.4 mm) y malla 10 (partículas de 1.6 mm), usando como métodos de extracción el asistido por ultrasonido y el de maceración (Vargas-Martínez & Trejo-Márquez, 2013)

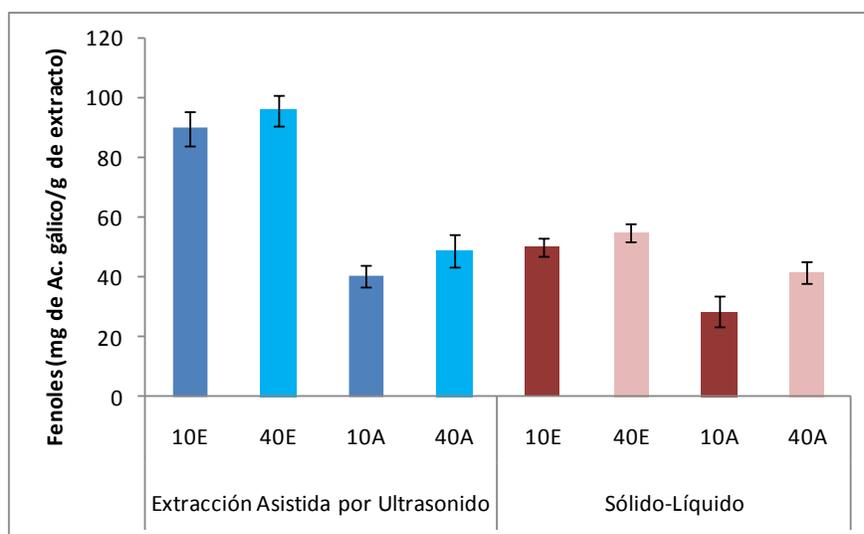


Figura 3.3 Rendimiento (%) de extracto vegetal de hojásén con dos tamaños de partícula 0.4mm (40) y 1.6mm (10), dos solventes etanol 70% (E) y agua (A) y dos métodos, extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción por maceración o sólido líquido (ESL). Las barras representan \pm desviación estándar.

En primer lugar se evaluó el rendimiento de extracción; el extracto vegetal que mayor rendimiento mostró fue el extraído con agua asistido por ultrasonido y 1.6 mm de tamaño de partícula, con un rendimiento del 57 %; mientras que el de menor rendimiento lo presentó



el extracto de solvente etanol-agua (70:30) por maceración (sólido-líquido) con un tamaño de partícula de 0.4 mm, cuyo rendimiento fue del 46 % (Figura 3.3).

El contenido de fenoles totales se obtuvo de acuerdo con lo descrito en (Sánchez Soto, 2013). Los extractos vegetales recuperados con diferente tamaño de partícula no presentaron diferencia significativa; por otro lado, los extractos recuperados con etanol-agua (70:30) mostraron valores promedio de 73 mg de Ac. gálico/g teniendo estos 45% mayor contenidos de fenoles con respecto a los extraídos con agua; con respecto al cambio de método de extracción el método asistido por ultrasonido tuvo 36% mayor contenido de fenoles que los provenientes con el método de maceración; concluyendo que el extracto vegetal con mayor contenido de fenoles fue el obtenido con el disolvente etanol-agua (70:30) asistido por ultrasonido y 0.4 mm de tamaño de partícula (malla 40), con un contenido de fenoles de 96 mg de Ac. Gálico/g extracto (figura 3.4).

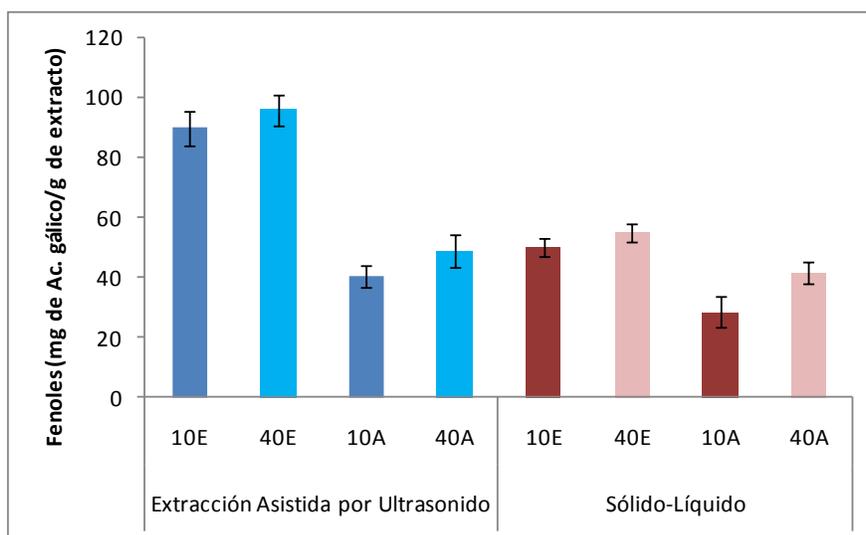


Figura 3.4 Contenido de fenoles totales de extracto vegetal de hojásén con dos tamaños de partícula 0.4mm (40) y 1.6mm (10), dos solventes etanol 70% (E) y agua (A) y dos métodos, extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción por maceración o sólido líquido (ESL). Las barras representan \pm desviación estándar.

La capacidad antioxidante se determinó de acuerdo a lo reportado por (Sánchez Soto, 2013). Los extractos de etanol-agua (70:30) tuvieron 9 % mayor capacidad antioxidante que los resultantes de la extracción con agua, arrojando éstos últimos valores promedio de 4814 mmol eq de Trolox/Kg de planta (Figura 3.5); con respecto al tamaño de partícula (0.4 ó 1.6 mm) y método de extracción (EAU ó ESL), la capacidad antioxidante no presentó diferencia significativa. El extracto vegetal que mayor capacidad antioxidante fue el recuperado con etanol-agua (70:30) asistido por ultrasonido y 1.6 mm de tamaño de partícula (malla 10) con una capacidad antioxidante de 5067 mmol eq de Trolox/Kg de planta (figura 3.5).

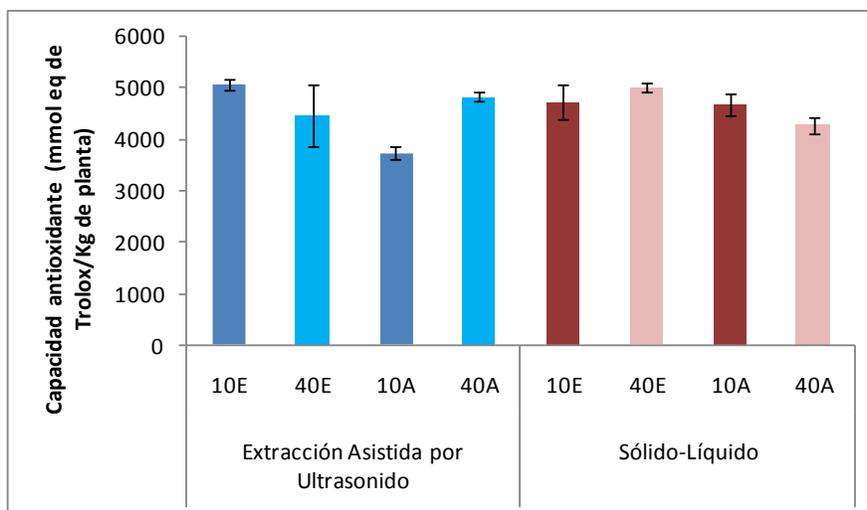


Figura 3.5 Capacidad antioxidante de extracto vegetal de hojásén con dos tamaños de partícula 0.4mm (40) y 1.6mm (10), dos solventes etanol 70% (E) y agua (A) y dos métodos, extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción por maceración o sólido líquido (ESL). Las barras representan \pm desviación estándar.

Finalmente se evaluó las propiedades antifúngicas de los distintos extractos de hojásén usando como hongo *Botrytis cinérea* (Sánchez Soto, 2013), el cual es el causante de la podredumbre gris en zarzamoras. Las pruebas *in vitro* realizadas nos dicen que al adicionar el extracto de etanol-agua (70:30) de hojásén a 3000 mg/L de concentración de fenoles totales, presentaron el máximo porcentaje de inhibición (100%) durante 15 días de incubación del hongo (figura 3.6). Este extracto fue el que presentó mayor inhibición del hongo en las pruebas realizadas.

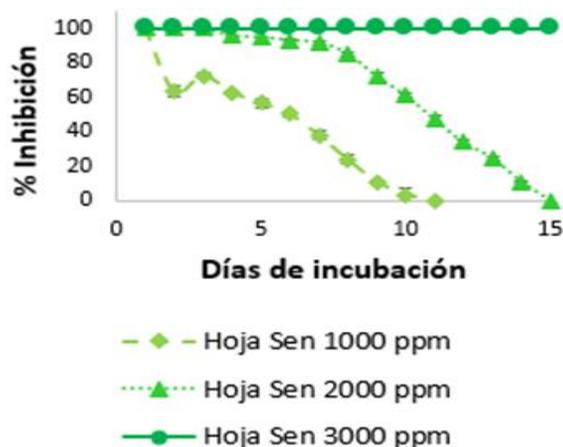


Figura 3.6 Porcentaje de inhibición de los extractos etanol-agua (70:30) de hojásén en pruebas *in vitro* a tres distintas concentraciones de fenoles totales (1000, 2000 y 3000 mg/L)

3.2 Compuestos fenólicos.

3.2.1 Generalidades.

Los compuestos fenólicos provienen principalmente de vegetales; éstos influyen en la calidad, estabilidad y propiedades organolépticas de los alimentos; su estructura consiste en uno o más anillos bencénicos con grupos hidroxilo. Éstos se dividen en dos grupos



principales: los flavonoides y los no flavonoides, en la figura 3.7 se muestra una clasificación muy general de éstos.

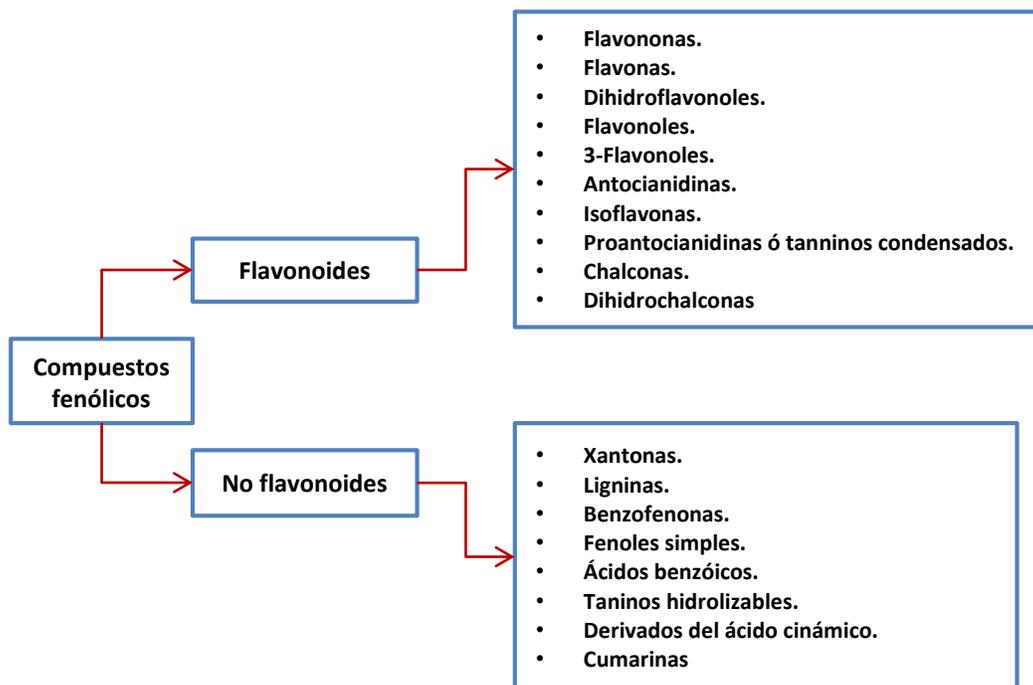


Figura 3.7 Clasificación de los compuestos fenólicos en base a su estructura.

Los ácidos fenólicos pueden ser clasificados como derivados de ácido benzoico y ácido cinámico, mientras que los flavonoides se dividen en subclases tales como flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, etc. Hasta ahora se conocen aproximadamente 5000 estructuras diferentes de flavonoides, lo cual habla de la diversidad y complejidad química de estos compuestos.

Los compuestos fenólicos presentes en distintos alimentos, constituyen la fracción compleja formada por un número grande de compuestos, algunos de los cuales no han sido identificados aún. La concentración de compuestos fenólicos es variable dependiendo de la especie, grado de maduración, lugar de procedencia y temporada de cosecha.

3.2.2 Importancia de la preparación de la muestra.

La preparación de muestras vegetales y de alimentos para la extracción de compuestos fenólicos se está convirtiendo en una ciencia en sí misma. El tratamiento inicial de la muestra es un paso crítico en análisis químicos y bioquímicos, usualmente es el paso más lento en el análisis. En el caso de muestras de alimentos y de plantas, el número y la diversidad de analitos es muy alta y el pretratamiento eficiente se requiere para obtener fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos (Mabry, Markham, & Thomas, 1970) (Hussein, Fattah, & Salem, 1990) (Harborne, 1988) (Harborne, 1989) (Santos-Buelga & Williamson, 2003) (Hostettmann, Marston, & Hostettmann, 1998) (Benthin, Danz, & Hamburger, 1999) (Dawidowicz, 2003).

Los métodos de preparación de muestras deberán cumplir con los siguientes requerimientos (Smith, 2003):



- Eliminar posibles interferentes (ya sea para la separación o etapas de detección) de la muestra, aumentando así la selectividad del método analítico.
- Aumento de la concentración del analito y por lo tanto la sensibilidad del ensayo.
- Convertir el analito en una forma más adecuada para la detección o separación (si es necesario).
- Proporcionar métodos robustos y reproducibles que son independientes de las variaciones en la matriz de la muestra.

El objetivo de la preparación de la muestra es que los componentes de interés deben ser extraídos de las matrices complejas con el menor tiempo y consumo de energía, pero con la mayor eficiencia y reproducibilidad. Las condiciones deben ser suficientemente suaves para evitar la oxidación, degradación térmica y química, además de cambios bioquímicos. Algunos procedimientos de análisis químico (electroforesis capilar por ejemplo) requieren un pretratamiento riguroso de la muestra, otros requieren un mínimo de preparación de muestra, tal es el caso de la cromatografía en capa fina (TLC).

Así como los métodos típicos de preparación de muestras tales como filtración y extracción líquido-líquido, se han desarrollado métodos que actualmente son ampliamente utilizados. La extracción fase sólida (SPE) es una técnica rápida, económica, y sensible que utiliza varios tipos diferentes de cartuchos y discos, con una variedad de materiales absorbentes. La preparación de la muestra y la concentración se puede lograr en un sólo paso, los azúcares que interfieren se eluyen con metanol acuoso en columnas de fase inversa antes de la elución de los compuestos fenólicos con metanol. Entre las numerosas aplicaciones de SPE están las separaciones de ácidos fenólicos y flavonoides de los vinos y zumos de frutas (Modey, Mulholland, & Raynor, 1996).

3.2.3 Hidrólisis de compuestos fenólicos unidos a azúcares.

Los compuestos fenólicos en los extractos de plantas muy rara vez los encontramos en forma libre, es común encontrarlos unidos a azúcares como glucósidos, o ligados a complejos; por esta razón, varios procedimientos de hidrólisis se han desarrollado para cuantificar los compuestos fenólicos; la mayoría de estos procedimientos se basan en hidrólisis alcalina con NaOH (de 2 N a 4 N aproximadamente) utilizando tiempos de reacción hasta 6 horas, y algunas utilizando atmósfera de nitrógeno (Fenton, Leung, & Clandinin, 1980; Kozłowska, Rotkiewicz, & Zadernowski, 1983; Krygier, Sosulski, & Hogge, 1982; Maillard & Berset, 1995). Sin embargo, se ha observado la degradación de compuestos fenólicos durante la hidrólisis alcalina (Krygier, Sosulski, & Hogge, 1982; Maillard & Berset, 1995). Algunos métodos reportan diversos valores de pérdida de los compuestos hidrolizados en las mismas condiciones de reacción con atmósfera de nitrógeno (Krygier, Sosulski, & Hogge, 1982), lo cual dificulta encontrar un método eficiente de hidrólisis. Sin embargo recientemente se realizó un estudio donde la adición de EDTA (quelante de metales) y ácido ascórbico (antioxidante fuerte) durante la hidrólisis alcalina previene completamente la degradación de los ácidos fenólicos particularmente susceptibles a la degradación oxidativa, tales como los *o*-dihidroxifenoles (Sosulski, 1979), lo que permite la estimación cuantitativa de estos compuestos. Posteriormente se realizó la hidrólisis de ácido clorogénico a estas condiciones; donde se observó una recuperación completa después de la hidrólisis, cuyo procedimiento fue aplicado para detectar cuantitativamente los ácidos fenólicos ligados en infusión de café y manzana (Nardini, y otros, 2002) y cuyo método fue optimizado y resultando en una hidrólisis alcalina con 1.8 N de NaOH, 10 mM de EDTA y ácido ascórbico 1 % a 30 °C durante 30 min (Nardini, Cirillo, Natella, & Scaccini, 2002).



3.2.4 Características importantes de los analitos a tomar en cuenta para la extracción.

Para la extracción eficaz de compuestos fenólicos el material vegetal es importante saber en qué condiciones se realiza. Los compuestos fenólicos (en particular los flavonoides glucosídicos) pueden ser degradados por la acción enzimática cuando el material recogido es planta fresca, por tanto, es aconsejable utilizar muestras secas, liofilizadas o congeladas. Cuando el material vegetal seco se utiliza, generalmente se muelen en un polvo. Para la extracción, el disolvente se elige en función del tipo de compuesto fenólico requerido. La polaridad es una consideración importante aquí, los compuestos fenólicos menos polares (por ejemplo, isoflavonas, flavanonas, flavonas y flavonoles, metilados) se extraen con disolventes poco polares como el cloroformo, diclorometano, éter dietílico, o acetato de etilo; mientras que los compuestos fenólicos (por ejemplo, flavonoides glicósidos y agliconas) más polares se extraen con alcoholes o mezclas de alcohol-agua. La mayor parte de las extracciones de material que contiene compuestos fenólicos todavía se realizan por simple extracción con disolvente directo.

También se puede hacer extracciones empleando un equipo Soxhlet, realizando primeramente una extracción con hexano, para eliminar los lípidos y luego con acetato de etilo o etanol para obtener los compuestos fenólicos, sin embargo, esta técnica no es adecuada para compuestos sensibles al calor y reduce la cantidad obtenida.

La extracción con disolvente secuencial es un procedimiento utilizado con frecuencia, primero se realiza una extracción con diclorometano para extraer agliconas de flavonoides y el material menos polar, después se realiza una extracción con alcohol para extraer los flavonoides glucosídicos y componentes polares. En este tipo de extracciones el disolvente puede variar dependiendo del tipo de compuesto a extraer, de esta forma hacemos que este método sea muy selectivo. Uno de los inconvenientes en la aplicación a tecnologías de principios activos de este método es la toxicidad de los solventes utilizados.

Determinadas flavononas y glucósidos de chalcona son difíciles de disolver en metanol, etanol, o mezclas de alcohol-agua, su solubilidad depende del pH de las soluciones que contienen agua por lo que su extracción depende de estudios adicionales para obtener condiciones óptimas de extracción.

Los flavan-3-oles (catequinas, proantocianidinas, y taninos condensados), a menudo se puede extraer directamente con solventes polares tales como el acetato de etilo, metanol, etanol o agua, la diferencia de la cantidad extraída no varía entre cada disolvente; sin embargo, la combinación de estos disolventes ayuda a una optimización de extracción.

Las antocianinas se extraen con metanol acidificado en frío. El ácido empleado es generalmente ácido acético (aproximadamente 7%) o ácido trifluoroacético (TFA) (aproximadamente 3%). El uso de ácidos minerales puede conducir a la pérdida de grupos acilo unidos.

La extracción se realiza normalmente con agitación magnética por tiempos prolongados lo que comúnmente se conoce como "maceración"; otros métodos han sido recientemente introducidos para aumentar la eficiencia y la velocidad del procedimiento de extracción.

La extracción de líquido a presión (PLE) es un método donde la extracción se acelera mediante el uso de alta temperatura y alta presión. Hay una mejora en la difusión del disolvente y, al mismo tiempo, existe la posibilidad de trabajar bajo una atmósfera inerte y



con protección de la luz. Los instrumentos comercialmente disponibles tienen recipientes de extracción con volúmenes de hasta aproximadamente 100 mL.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) como su nombre indica, se basa en las propiedades solubilizantes de estos. Las viscosidades bajas y altas velocidades de difusión de los fluidos supercríticos los hacen ideales para la extracción con difusión controlada en tejidos de planta. Las ventajas del método son un menor consumo de disolvente, selectividad controlable, y menos degradación térmica o química de métodos tales como extracción por Soxhlet. Numerosas aplicaciones en la extracción de productos naturales que han reportado; el fluido supercrítico de dióxido de carbono es ampliamente utilizado, sin embargo, para permitir la extracción de compuestos polares, tales como los flavonoides, los disolventes polares (como metanol) tiene que ser añadidos como modificadores. En consecuencia, existe una reducción sustancial en la selectividad. Esto explica por qué hay relativamente pocas aplicaciones en compuestos fenólicos en la literatura. Incluso con presiones de hasta 689 bar y 20% de modificador (normalmente metanol) en el fluido de extracción, los rendimientos de extracción con modificadores son bajos.

La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica sencilla que se puede completar en unos pocos minutos, la energía de microondas se aplica a la muestra en suspensión con disolvente, ya sea en un recipiente cerrado o en una celda abierta. Este último permite a las grandes cantidades de muestra a extraer, este procedimiento es muy versátil, ya que se ha descrito para la extracción de varios compuestos de diferentes matrices.

3.2.5 Extracción asistida por ultrasonido.

La extracción asistida por ultrasonido es una técnica rápida que también se utiliza para extracción de compuestos fenólicos, la ventaja de esta técnica es que se puede utilizar con mezclas de disolventes inmiscibles tales como el hexano con metanol-agua (9:1) para la extracción.

El ultrasonido comprende la región de frecuencias acústicas que va de 18 kHz a 100 MHz, fuera del intervalo normal del oído humano. Las ondas de sonido son transmitidas a través de cualquier sustancia, líquida, sólida o gaseosa, que posea propiedades elásticas induciendo movimientos vibratoriales en las moléculas que forman parte de ésta. La transmisión de ondas de ultrasonido de alta frecuencia produce ciclos de expansión y compresión; las moléculas del medio se juntan durante la compresión mientras que en la expansión son separadas. Cuando esto ocurre en un medio líquido y la intensidad del ultrasonido es suficientemente alta, los ciclos de expansión producen una presión negativa que excede el límite de elasticidad local del líquido produciendo burbujas de aire o cavidades.

El proceso en el que las burbujas se forman, crecen y posteriormente colapsan se conoce como cavitación acústica (Luque de Castro & Priego Capote, 2007) y los pasos principales del proceso se ilustran en la figura 3.8.

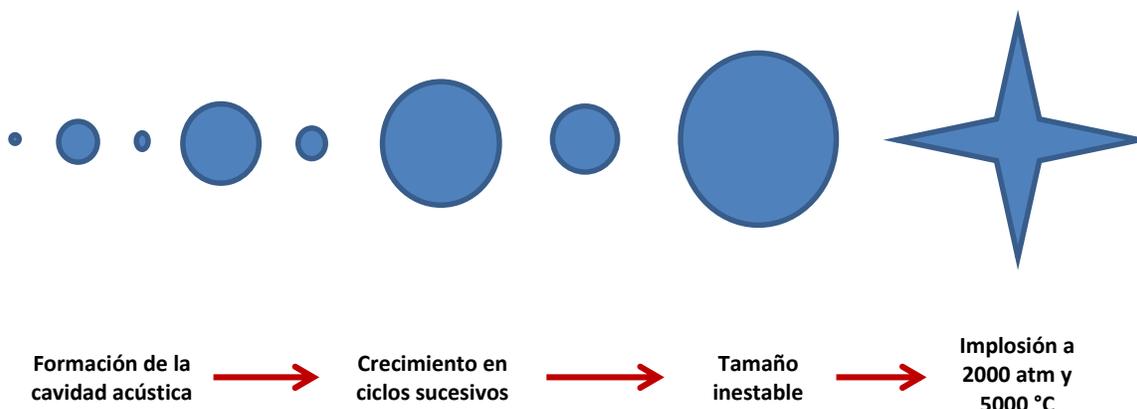


Figura 3.8 Fenómeno de cavitación acústica.

La importancia del proceso de cavitación no radica tanto en cómo se forman las burbujas, sino en lo que sucede cuando colapsan. En algún punto, la burbuja llega a un tamaño crítico en el que ya no puede absorber eficientemente la energía del ultrasonido por lo que implosionan violentamente generando temperaturas y presiones extremadamente altas en puntos definidos dentro del líquido; se ha estimado que la temperatura puede alcanzar los 5000 °C, y una presión de 2000 atm con una velocidad de enfriamiento posterior al colapso de aproximadamente 1010 K/s (Suslick, 2010).

El tamaño de las burbujas es muy pequeño en relación al volumen del líquido (del orden de micras) lo que provoca que el calor producido se disipe rápidamente sin producir cambios súbitos en el medio.

Cuando la cavitación ocurre en un líquido cercano a la superficie de un sólido, la dinámica de este proceso cambia de manera considerable. En un medio homogéneo (sólo líquido), la cavidad retiene su forma esférica durante el colapso; sin embargo, al estar cerca de un sólido, la cavidad colapsa de forma asimétrica haciendo que partículas del líquido salgan proyectadas hacia la superficie del sólido, esto provoca alteraciones sobre la superficie que tienen como consecuencia un incremento en el área de contacto del sólido con el líquido (Suslick, 1998)

La extracción de compuestos orgánicos contenidos en tejidos vegetales y/o semillas puede mejorarse significativamente mediante el uso de la energía del ultrasonido. Los efectos mecánicos del ultrasonido proveen una mayor penetración del disolvente en la matriz y mejoran la transferencia de masa haciendo que la extracción sea más efectiva y en un tiempo menor en comparación con los métodos tradicionales (Mason et al, 1996).

3.2.6 Huellas digitales en el análisis de fitoequivalencia.

Un producto a base de hierbas contiene una multitud de componentes que podrían ser responsables de sus efectos terapéuticos. Por tanto, es necesario definir como la mayoría muchos de los componentes como sea posible con el fin de entender y explicar la bioactividad. El concepto de "fitoequivalencia" ha sido introducido en Alemania para asegurar la consistencia de terapia con fitofármacos. De acuerdo con este concepto, un perfil químico de un producto a base de hierbas se construye y se compara con el perfil de un producto de referencia clínicamente probado. Dado que muchas de estas preparaciones contienen flavonoides, es esencial disponer de técnicas analíticas adecuadas para esta clase de productos naturales. La huella digital obtenida con la utilización de éstas técnicas



es de gran utilidad para poder identificar e incluso cuantificar y poder liberar el lote de un fitofármaco.

3.2.7 Técnicas analíticas utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos.

El conocimiento del contenido de compuestos fenólicos en productos y alimentos de origen vegetal es de suma importancia para la comprensión de su papel en la fisiología de las plantas y salud humana. Los métodos de análisis son también importantes para identificar la adulteración en productos comerciales como los vinos y licores, los flavonoides son ampliamente utilizados como marcadores indispensables para propósitos taxonómicos.

Existen varios métodos analíticos para los compuestos fenólicos. Éstos van desde TLC a CE. Con la introducción de técnicas de HPLC acopladas, el potencial de análisis químico se ha extendido. La cromatografía de gases (GC) es generalmente impracticable, debido a la baja volatilidad de los compuestos fenólicos y la necesidad de la preparación de derivados.

En épocas anteriores, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de poliamida, y electroforesis de papel fueron las principales técnicas de separación de compuestos fenólicos. De estos métodos, TLC sigue siendo el caballo de batalla de análisis de flavonoides. Se utiliza como un método rápido, simple y versátil para el seguimiento de los polifenoles en extractos de plantas y en el trabajo de fraccionamiento. Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados se refiere ahora a las aplicaciones cualitativas y cuantitativas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para el análisis. Los flavonoides se pueden separar, cuantificar, y se identifican en una sola operación por HPLC acoplados a los rayos ultravioleta (UV), masas, o la resonancia magnética nuclear (RMN) como detectores. Recientemente, la técnica de electroforesis capilar (CE) ha ido ganando atención.

Una característica que es de gran beneficio para el análisis de flavonoides es la presencia del anillo de fenilo. Este cromóforo es excelente, por supuesto, UV activa y proporciona la razón por la cual los flavonoides son tan fáciles de detectar. Sus espectros UV son particularmente característicos, proporcionando información estructural considerable que puede distinguir el tipo de fenol y el patrón de oxidación.

Las separaciones preparativas todavía presentan un desafío. No hay en general, la estrategia simple y sencilla para el aislamiento de productos naturales, aunque ciertos compuestos son fácilmente separados por las modernas técnicas cromatográficas. Cada problema de separación particular tiene que ser considerado en sí mismo y un procedimiento adecuado tiene que ser desarrollado.

3.3 Electroforesis capilar.

Durante muchos años, las técnicas electroforéticas se realizaron en geles hidrofílicos y otros medios de soporte, pero en los últimos años, se han llevado a cabo en capilares de sílice fundida de solo unas cuantas micras de diámetro interno. Se ha demostrado su gran utilidad en la separación de diversas sustancias, especialmente macromoléculas y su uso se ha extendido a muchas áreas de la ciencia (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).



3.3.1 Proceso electroforético.

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado las especies cargadas (iones) se mueven y se separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración como se muestra en la figura 3.9. Las partes básicas de dicho sistema son un par de electrodos, una fuente de poder y un medio conductor. La electroforesis clásica se ha utilizado tradicionalmente para analizar y purificar biopolímeros, sin embargo los métodos de separación para esta clase de compuestos son generalmente lentos y requieren de un intenso trabajo (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

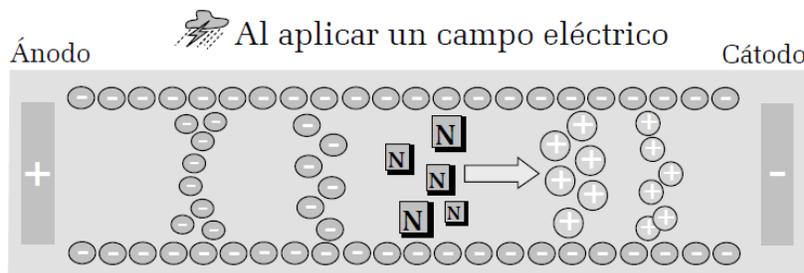


Figura 3.9 Proceso de separación electroforética.

3.3.2 Generalidades.

La electroforesis realizada en tubos capilares ha aumentado el interés en esta técnica desde el punto de vista analítico, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, ampliado increíblemente su campo de aplicación (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

Esta técnica electroforética es conocida como Electroforesis Capilar (CE), Electroforesis Capilar de Zona (ECZ). Es importante hacer notar que aunque este método se parece a la CLAR o HPLC, los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos, con excepción de la CCEM, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones carga/masa de los analitos más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria. En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

El mecanismo de separación en la EC es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación masa/carga y con la conformación de los analitos. La EC consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico.

Un sistema de EC consiste básicamente en las siguientes partes básicas, como se muestra en la figura 3.10:

- Dos electrodos de platino (ánodo y cátodo)
- Fuente de poder de alto voltaje autoreversible (0-30 kV)
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos respectivamente



- Capilar de sílice fundida sin o con recubrimiento en la pared (compartimiento donde se lleva a cabo la separación)
- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido recirculante)
- Un sistema que introduce la muestra
- Un detector

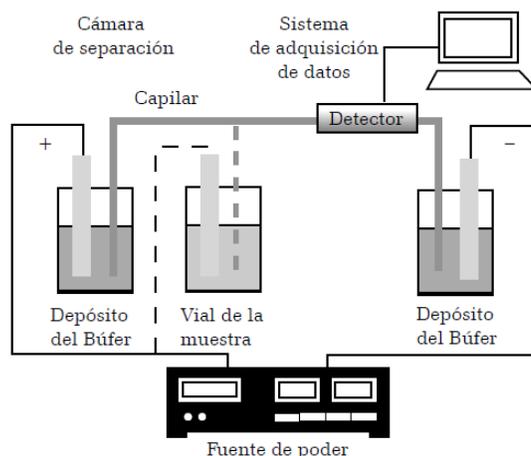


Figura 3.10 Sistema general del equipo de CE.

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente búfer) y se coloca entre dos depósitos que también lo contengan; los electrodos son conectados a una fuente de poder, que genera hasta 30 kV, y se sumergen en los depósitos por separado. La introducción de una muestra se realiza sustituyendo un depósito de búfer por el contenedor con la muestra (generalmente un vial) durante este proceso. Un volumen de muestra definido es introducido en el tubo capilar, ya sea por presión o por la aplicación de un pequeño voltaje por algunos segundos. Después se aplica una diferencia de potencial (o de corriente) para realizar la separación. Las especies iónicas en la muestra migran con dirección y velocidad determinadas por su carga y masa; eventualmente pasan por un detector y la señal obtenida entonces se conoce como electroferograma (Skoog, Holler, & Nieman, 2001; Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

3.3.3 Principios de la separación electroforética.

3.3.3.1 Movilidad electroforética.

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidad de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito, cuando ningún flujo electroosmótico está presente puede ser dada por la ecuación 1:

$$v = \mu E \dots\dots\dots (1)$$

Donde: v es la velocidad del analito, μ es la movilidad electroforética y E es el campo eléctrico, que es una simple función de la aplicación del voltaje y la longitud del capilar (voltios/cm). La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito. De la ecuación 2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.



$$\mu = \frac{q}{6\pi r \eta} \dots\dots\dots (2)$$

Donde: μ es la movilidad electroforética del analito, q es la carga del analito, η es la viscosidad de la solución y r el radio molecular (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

3.3.3.2 Flujo electroosmótico.

Un constituyente fundamental de la Electroforesis Capilar es el llamado Flujo Electroosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 5-6) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica.

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H⁺, Na⁺, K⁺) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico.

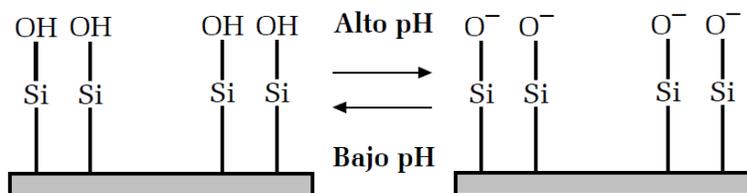


Figura 3.11 Representación del equilibrio de los grupos silanol en la pared del capilar de sílice fundida en función del pH.

Bajo condiciones alcalinas la superficie del sólido posee un exceso de cargas negativas (figura 3.11). Esto puede resultar de la ionización de la superficie (equilibrio ácido-base), de la adsorción de las especies iónicas a la superficie, o de ambas. Para la sílice fundida probablemente ocurren ambos procesos, aunque el FEO se controla más por el gran número de grupos silanol (SiOH) que pueden existir en forma ionizada (SiO⁻). Aunque el punto isoeléctrico exacto de la sílice fundida es difícil de determinar, se sabe que el FEO llega a ser significativo a pH mayor de 5. Los materiales no iónicos como el teflón exhiben también cierto FEO, y se presume que resulta de la adsorción de aniones por la superficie de la pared del capilar (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

3.3.4 Electroforesis capilar de zona.

La Electroforesis Capilar de Zona (ECZ) es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y su versatilidad. La ECZ es la forma más simple de EC principalmente porque el capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Los analitos neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del FEO (Castillo, Revilla, López, & Rivera, 2005).

La figura 3.12 representa lo que sucede en la Electroforesis Capilar de Zona:

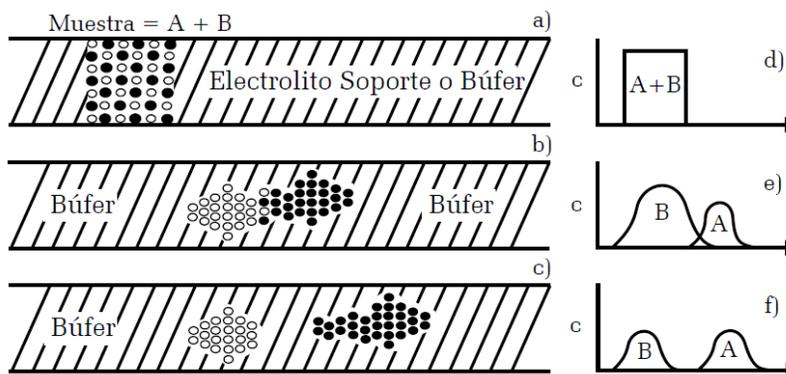


Figura 3.12 Ilustración de una separación zonal.

- El capilar se llena con el búfer y se introduce la muestra (analitos A y B).
- Los analitos A y B se separan con base en su distinta movilidad electroforética, al aplicarse una diferencia de potencial eléctrico.
- Los analitos A y B se han separado en zonas discretas.
- Es el comienzo.
- Representan el perfil de concentración a lo largo del capilar:
- Durante el proceso de separación.

Cuando se tiene flujo electroosmótico (pH entre 4–12) y polaridad positiva, las especies cargadas positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor que la del FEO, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción de sus cargas al electrodo negativo. Los analitos cargados negativamente se mueven en sentido contrario y más lentamente y en contra del flujo electroosmótico debido a que son atraídos por el electrodo positivo.

Los analitos neutros se mueven a través del capilar con el FEO, por lo general durante este movimiento no se produce separación entre las especies no cargadas. La velocidad de los analitos puede modificarse al controlar el pH, la viscosidad o concentración del búfer, o con cambio de voltaje como ya se mencionó anteriormente.

Estudios comparativos entre CE, HPLC y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) han conducido a reconocer que las principales ventajas de la aplicación de la técnica de CE, son la eficiencia en las separaciones, el bajo consumo de disolvente y su fácil automatización. En los últimos años la CE se presenta como una técnica alternativa a la electroforesis tradicional en gel y complementaria a HPLC para el análisis de una gran variedad de compuestos de muy diferentes matrices.

3.4 Tecnología de alimentos.

Actualmente, el control de hongos fitopatógenos requiere de aplicar técnicas alternativas, pues el manejo tradicional con agroquímicos sintéticos ha ocasionado diversos problemas como la toxicidad a los usuarios (Whalen, Wilson, Gleghorn, & Loganathan, 2003), la detención de exportaciones por residuos en producto de consumo y daños al medio ambiente (Ramírez-Legarreta & Jacobo-Cuéllar, 2002), así como afectación de organismos benéficos (Anderson, y otros, 2003). Otro aspecto importante es que los microorganismos fitopatógenos han generado resistencia al ingrediente activo de algunos fungicidas sintéticos, como respuesta a la presión de selección debido a las altas dosis y aplicaciones continuas, ocasionando grandes pérdidas económicas (Cooke, y otros, 2003). Una alternativa económica y eficiente para el control de enfermedades, es el uso de los



productos naturales derivados de las plantas, no afectan el medio ambiente ya que sus residuos son fáciles de degradar, son potenciales de utilizar en el control de patógenos de productos agrícolas en postcosecha, y permiten la obtención de productos agrícolas con calidad de exportación.

De los hongos que afectan en postcosecha, a continuación se mencionan algunos de gran importancia: *alternaria alternata* (Fr.:Fr.) keissl. este afecta a frutos de tomate (*lycopersicon esculentum* Mill.) en campo y en postcosecha, puede comportarse como oportunista o infectar por sí solo, y sus lesiones iniciales aumentan cubriendo el fruto con un moho negro; las especies *colletotrichum gloeosporioides penz. y sacc.* son el principal género causante de antracnosis en la mayoría de los cultivos en el mundo, es uno de los principales problemas de tomates destinados a la industria de conservación, y causa manchas hundidas recubiertas de pústulas de color rosa, anaranjado o negruzco; *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. causa en cítricos el moho verde, el cual constituye el problema más grave, responsable de más del 60% de pérdidas ocasionadas por hongos en frutos conservados en refrigeración (Guerrero-Rodríguez, Solís-Gaona, Hernández-Castillo, Flores-Olivas, & Sandoval-López, 2007); *botrytis cinerea* causa alteraciones internas y externas, pérdida de textura y brillo, liberación de líquido y lesiones en el pericarpio del fruto así como tizones en inflorescencias, pudrición en frutos, marchites del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas y canchales en los tallos, es el causante principal de podredumbre gris en la zarzamora (Sánchez Soto, 2013) . Los extractos vegetales se han empleado desde tiempos remotos, principalmente en el ámbito medicinal para el control de enfermedades, y recientemente en el entorno agrícola contra insectos e incluso en el control de algunos microorganismos fitopatógenos, sin definir en algunos casos cuál es su principio activo. En México existe un gran número de especies vegetales ampliamente distribuidas, que pueden ser evaluadas desde el punto de vista fitoquímico para determinar su actividad biológica sobre hongos fitopatógenos, como es el caso de *Flourensia cernua* D.C. (hojasén), la cual es abundante en las zonas áridas y semiáridas de México, y de la que se han reportado efectos de inhibición sobre *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary con extractos metanólicos (Gamboa-Alvarado, Hernández-Castillo, Guerrero-Rodríguez, & Sánchez-Arizpe, 2003), así como de *Colletotrichum spp.* con extractos hexánicos, y contra termitas con extractos hexánicos, de éter dietílico y etanólicos (Tellez M. , y otros, 2001).

3.4.1 Recubrimientos biorgánicos a base de extractos de hojasén.

En nuestro grupo de trabajo se elaboraron los recubrimientos biorgánicos a base de la matriz de carboximetilcelulosa (CMC) con los aditivos glicerol y Tween 80 junto con la cantidad necesaria del extracto de etanol-agua (70:30) de hojasén para generar 3000 mg/L de concentración de fenoles totales; cuya preparación se describe en (Sánchez Soto, 2013).

La aplicación de los recubrimientos biorgánicos se realizó para alargar la vida de anaquel de la zarzamora, cuyos resultados se presentan en el seguimiento fotográfico de los días en que se evalúo el índice de decaimiento (tabla 3.2) y cuyo procedimiento se describe en (Sánchez Soto, 2013).



Tabla 3.2 Seguimiento fotográfico de las zarzamoras recubiertas a base de carboximetilcelulosa 0.5% adicionadas con extracto etanólico de hojásén a 3000 mg/L para el parámetro de índice de decaimiento.

Tratamiento	Día 0	Día 4	Día 8	Día 12
ZI				
ZC				
ZI + RSE				
ZSI + RSE				
ZI + RH				
ZSI + RH				

Las abreviaciones representan: ZI= Zarzamora infectada, ZSI=Zarzamora sin infectar, ZC=Zarzamora de campo, RH= Recubrimiento +hojásén 3000 mg/L, RSE= Recubrimiento sin extracto.

Sin duda alguna la presencia del extracto etanol-agua (70:30) de hojásén como agente antimicrobiano fue un factor clave para disminuir el índice de deterioro principalmente en las zarzamoras infectadas.

Los prototipos de recubrimiento presentaron un comportamiento similar al exhibido por los propios extractos durante las pruebas in vitro, tanto en matriz de carboximetilcelulosa, dichos extractos presentaron los mayores porcentajes de inhibición contra el hongo *Botrytis cinerea*, siendo el envase activo de carboximetilcelulosa 0.5% adicionada con extracto etanólico de hojásén el de mayor poder antifúngico.



La aplicación del envase activo a base de carboximetilcelulosa 0.5% adicionado con extracto etanólico de hojasén a zarzamoras sin infectar mantuvo e incluso mejoró parámetros como: la pérdida de peso, índice de decaimiento, liberación de líquido, pérdida de capacidad antioxidante y pérdida de antocianos en comparación con las zarzamoras de campo, mientras que en zarzamoras infectadas la aplicación de esta tecnología controló dichos parámetros en comparación con el control infectado.

Y podemos observar en la tabla 3.2 que las zarzamoras con el recubrimiento biorgánico alargan su vida de anaquel en comparación con las que no lo tienen, inclusive hay una inhibición del crecimiento del hongo para las zarzamoras infectadas.



Desarrollo Experimental





4. Desarrollo experimental.

4.1 Material vegetal.

Durante la experimentación se utilizaron tres materiales vegetales secos de la planta hojásén, dos proporcionado por la empresa GBS, Global, S.A. de C.V. y el otro adquirido en la central de abastos de Atizapán, Edo. Méx. (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Materiales vegetales utilizados en la experimentación.

Etiqueta de material vegetal	Origen	Fecha de adquisición
Planta Coahuila 1 (PC1)	Proporcionado por GBS, Global, S.A. de C.V.	13 de julio del 2012
Planta Coahuila 2 (PC2)	Proporcionado por GBS, Global, S.A. de C.V.	2 de febrero del 2013
Planta 3 (P3)	Comprada en la central de abastos de Atizapán, Edo. Méx.	29 de febrero del 2012

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la planta Coahuila 1 y la planta Coahuila 2; la planta 3 sólo será referencia.

4.2 Reactivos.

Los reactivos utilizados para la medición en electroforesis capilar fueron: hidróxido de sodio (NaOH) y tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$), estos de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Méx., México). Para la extracción de compuestos fenólicos se utilizaron los siguientes disolventes: metanol y etanol grado HPLC de la marca Fermont, y nitrógeno comprimido industrial. Para la hidrólisis del extracto se utilizaron hidróxido de sodio (NaOH), ácido ascórbico (HAs) y ácido etilendiamintetraacético (EDTA) todos ellos de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. Méx., México). Para la determinación de compuestos fenólicos se contó con los siguientes estándares: (-)-epicatequina, (+)-catequina, 2-(4-hidroxifenil)etanol, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido elágico, ácido gálico, ácido nordihidroguayarético, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido siríngico, ácido tánico, ácido *trans*-4-hidroxi-3-metoxicinámico, ácido *trans*-cinámico, ácido vanílico, apigenina, kaempferol, luteolina, miricetina, naringina, quercetina, 3- β -D-glucósido de quercetina, resorcinol, resveratrol, rutina, vainillina y ácido benzoico, todos de Sigma-Aldrich.

4.3 Soluciones.

- Mezcla de extracción: etanol-agua 70:30.
- Solución para la hidrólisis la cual se nombró como solución hidrolizante y consistió en NaOH 1.8 N, EDTA 10 mM y HAs al 1%.
- Soluciones para la medición por electroforesis capilar: búfer de boratos a partir de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM de pH 9.4, NaOH 0.1 M y agua desionizada de 18 M Ω .

4.4 Equipos.

- Baño de ultrasonido Transsonic T570 Elma® (Alemania).
- Desionizador Direct-Q™ Millipore.



- Evaporador Turbo Vap® LV, Caliper.
- Equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter Capillary Electrophoresis system (Fullerton, CA, USA).
- Centrifuga Allegra™ 21 Centrifuge Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).
- Bomba de presión/vacío PALL.
- Balanza analítica BOECU (Alemania).
- pH-Metro sensION™+PH31 Hach.

4.5 Identificación del material vegetal de hojaseén.

La identificación fue realizada por el Herbario IZTA, FES-Iztacala-UNAM (anexo 5) cuyo resultado se muestra en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Resultados de los materiales vegetales utilizados en la experimentación.

Etiqueta del material vegetal	Resultados			
	Nombre popular	Nombre científico	Familia	No. de registro
Planta Coahuila 1 (PC1)	Hojaseén	<i>Flourensia cernua</i> D.C.	Asteraceae/Compositae	2141 IZTA
Planta Coahuila 2 (PC2)	Hojaseén	<i>Flourensia cernua</i> D.C.	Asteraceae/Compositae	2141 IZTA
Planta 3 (P3)	Hoja sen	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl.	Fabaceae	2117 IZTA

4.6 Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos.

La muestra vegetal seca fue molida y tamizada para obtener un tamaño de partícula malla 40 utilizando tamices de acero inoxidable certificados; de este material se pesó 1.0 g y se le adicionaron 10 mL de una mezcla de etanol-agua (70:30) en un vaso de precipitado, este se selló con parafilm y se sometió a sonicación por un periodo de 90 minutos recirculando el agua para mantener una temperatura constante. Después se trasvasó el extracto a tubos de centrifuga de polisulfona, se centrifugó a 8000 rpm durante un periodo de 15 minutos; el sobrenadante se filtró a vacío con papel filtro de poro chico; el extracto nuevamente se filtró a través de acrodiscos millipore de 0.45 µm de tamaño de poro; el filtrado fue sometido al proceso de separación por electroforesis capilar. Este procedimiento se puede apreciar en el diagrama de flujo de la figura 4.1.

4.7 Procedimiento de hidrólisis alcalina del extracto.

Se concentró el extracto por evaporación controlada del disolvente utilizando un evaporador con un flujo de nitrógeno a 20 psi de presión y 35 °C de temperatura durante 30 minutos para disminuir el volumen del extracto de 10 mL a 4 mL de volumen final, se adicionaron 5 mL de solución hidrolizante. La solución anterior fue puesta en baño de agua con agitación constante a una temperatura de 60 °C durante 30 minutos, el hidrolizado se trasvasó a tubos de centrifuga de polisulfona y se centrifugó a 8000 rpm durante un periodo de 15 minutos; el sobrenadante se filtró a través de acrodiscos millipore de 0.45 µm de tamaño de poro, el filtrado se llevó a un volumen de 10 mL y fue sometido al proceso de separación



por electroforesis capilar. Este procedimiento se puede apreciar en el diagrama de flujo de la figura 4.2.

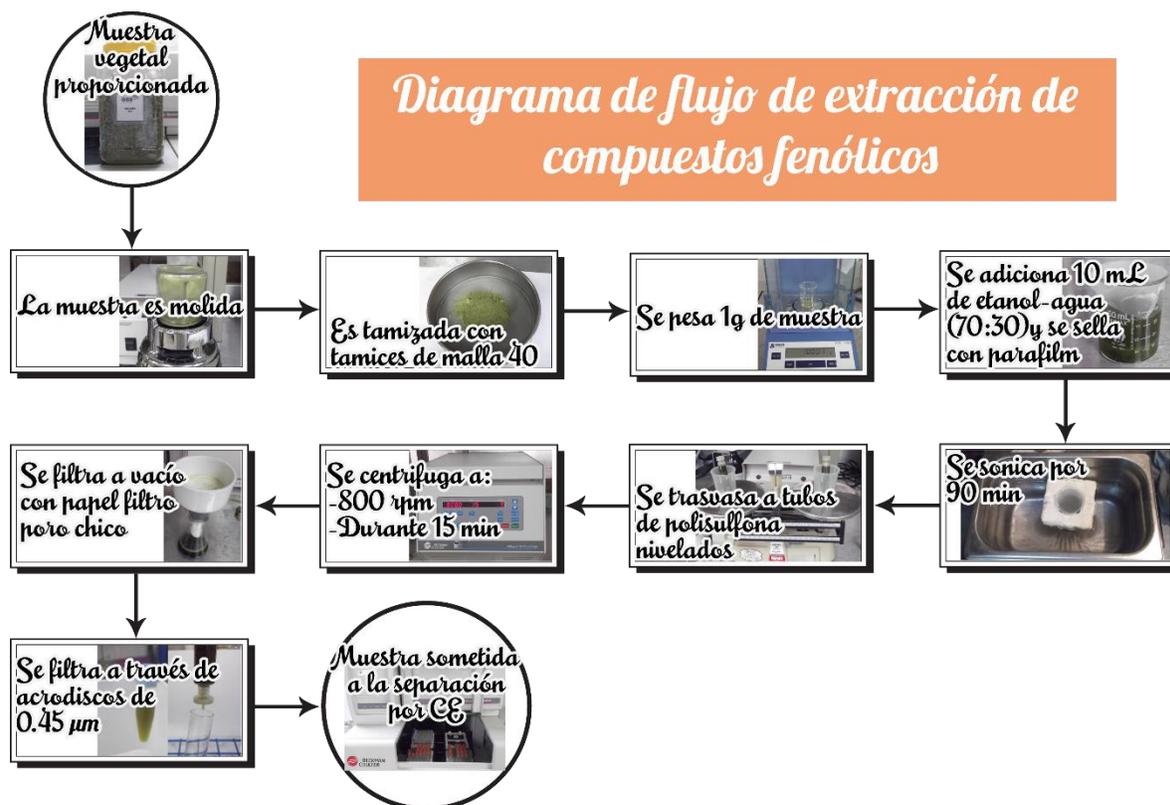


Figura 4.1 Diagrama de flujo para la extracción de compuestos fenólicos del espécimen de hojasén.

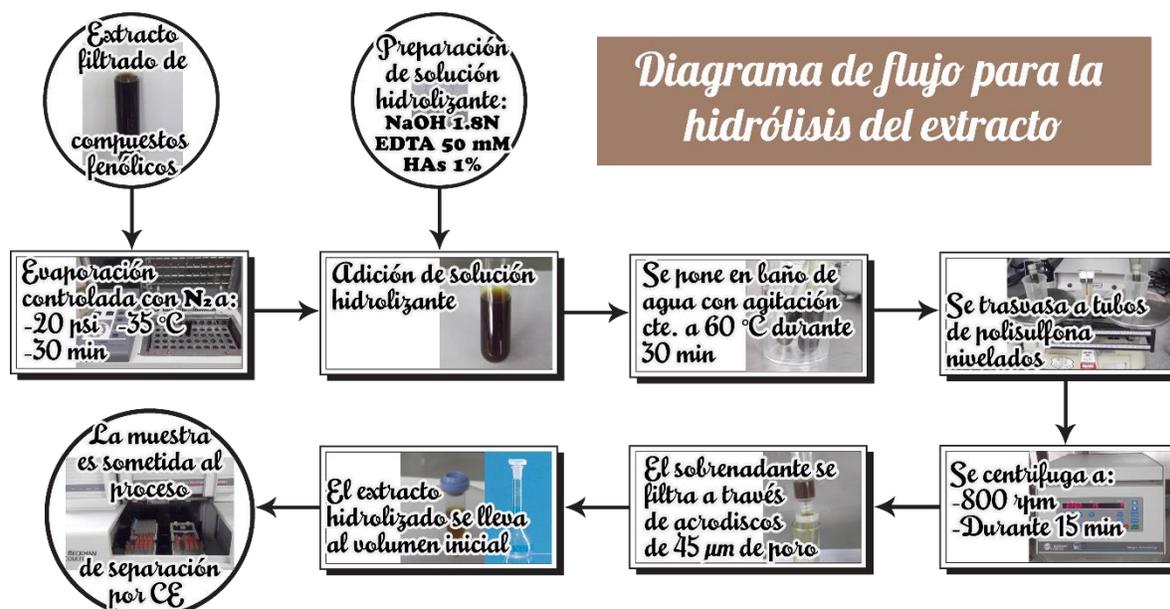


Figura 4.2 Diagrama de flujo para la hidrólisis del extracto de compuestos fenólicos del espécimen de hojasén.



4.8 Condiciones de separación por electroforesis capilar.

Las mediciones de los compuestos fenólicos se realizaron utilizando capilares de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, 54 cm de longitud total y 43.5 cm de longitud efectiva. La detección se realizó a 200 nm.

Al inicio del día se llevó a cabo un lavado del capilar cuyo procedimiento se describe en la tabla 4.3, posteriormente se realizó la separación de la muestra siguiendo el procedimiento de la tabla 4.4.

Tabla 4.3 Procedimiento de lavado al inicio del día del capilar.

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	20 psi	2 min.	Agua desionizada
2	Enjuague	Presión	20 psi	10 min.	NaOH (0.1 M)
3	Enjuague	Presión	20 psi	3 min.	Agua desionizada
4	Enjuague	Presión	20 psi	10 min.	Buffer (boratos 50 mM)

De esta forma se tiene entre cada corrida de muestra un lavado con buffer durante 15 minutos, un paso de espera después de la inyección de la muestra para lavar el capilar por fuera y en el momento de la separación en cada corrida se obtienen corrientes entre 90 a 100 μA .

Tabla 4.4 Procedimiento de separación de los compuestos fenólicos por electroforesis capilar.

Evento	Operación	Medida	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	Presión	40 psi	15 min.	Buffer (boratos 50 mM)
2	Inyección	Presión	0.5 psi	5 s	Muestra
3	Espera	-	-	0.2 s	Buffer (boratos 50 mM)
3	Separación	Voltaje	28 KV	30 min.	Buffer (boratos 50 mM)

4.9 Determinación de los compuestos fenólicos.

4.9.1 Identificación de los compuestos fenólicos.

La identificación de compuestos fenólicos se realizó en los extractos de los materiales vegetales de planta Coahuila 1 y planta Coahuila 2, así como en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2; llevándose a cabo por adición de estándar y la comparación de los espectros de absorción.

4.9.2 Precisión del sistema.

Para el estudio de precisión del sistema, se evaluó su repetibilidad, preparándose una solución patrón de mezcla de estándares pesando para cada estándar lo señalado en la tabla. 4.5 y se llevó a un aforo de 20 mL con una solución de etanol-agua (solución patrón), posteriormente de esta solución patrón se tomó 1 mL y se diluyó a 10 mL, ésta solución diluida fue utilizada para evaluar la repetibilidad, midiéndose diez repeticiones de la mezcla de estándares, utilizando como estándares internos el ácido benzoico y el ácido *trans*-cinámico. De los electroferogramas obtenidos anteriormente, se determinaron la desviación



estándar relativa para los tiempos de migración, relación de áreas y alturas de cada uno de los estándares.

Tabla 4.5 Datos de la preparación de la mezcla de estándares para evaluar la repetibilidad del sistema.

Estándar	Peso (mg)	Pureza (%)	[Fenol] _{Patrón} (mg/L)	[Fenol] _{Diluida} (mg/L)
Naringina	6.3	95	299.25	29.92
Resveratrol	2.3	99	113.85	11.38
Rutina	3.2	94	150.40	15.04
(-)-Epicatequina	15.1	90	679.50	67.95
(+)-Catequina	20.9	98	1024.10	102.41
Ac. <i>trans</i> -cinámico	40.6	99	2009.70	200.97
Ac. clorogénico	5.1	95	242.25	24.22
Ac. benzoico	68.0	99.95	3398.30	339.83
Apigenina	3.3	97	160.05	16.01
Kaempferol	3.1	97	150.35	15.04
Quercetina	3.1	98	151.90	15.19
Ac. cafeico	2.9	98	142.10	14.21

4.9.3 Cuantificación de los compuestos fenólicos.

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se utilizaron como estándares internos: ácido benzoico para los extractos de los materiales vegetales de planta Coahuila 1 y planta Coahuila 2, y ácido *trans*-cinámico para el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

La elaboración de las curvas de calibración se realizó a partir de grupos de soluciones patrón, los cuales fueron preparados a distintos volúmenes (tabla 4.7) y se adicionaron de forma distinta en cada sistema de la curva; los grupos se describen en la tabla 4.6 La preparación de cada uno de los grupos de soluciones patrón se puede ver en detalle en el Anexo 1.

Tabla 4.6 Grupos de soluciones patrón para realizar la curva de calibración.

Grupo de solución patrón	Estándares
A	Ácido <i>trans</i> -cinámico y ácido benzoico (estándares Internos, EI)
B	Naringina y resveratrol
C	Rutina y (-)-epicatequina
D	(+)-Catequina y apigenina
E	Ácido clorogénico
F	Kaempferol, quercetina y ácido cafeico

Cada punto de la curva de calibración fue medida por triplicado; además cada solución contiene todos los estándares de los grupos.

De esta forma los volúmenes añadidos (tabla 4.7) y las concentraciones finales de los puntos de la curva quedaron de la siguiente forma (tabla 4.8):



Tabla 4.7 Volúmenes de las soluciones patrones para preparar las curvas de calibración de los compuestos fenólicos.

Solución	V _{Aforo} (mL)	Volúmenes adicionados (mL) de cada uno de los grupos de estándares					
		V _A (E.I.)	V _B	V _C	V _D	V _E	V _F
1	50	10	0.5	0.5	4	0.5	1
2	50	10	1	1	5	1	2
3	50	10	2	2	6	2	3
4	50	10	3	3	7	3	4
5	50	10	4	4	8	4	5
6	50	10	5	5	9	5	6
7	50	10	6	6	10	6	7

Tabla 4.8 Concentraciones de los compuestos fenólicos y estándares internos en las curvas de calibración.

Compuesto fenólico	Concentraciones de cada uno de los compuestos fenólicos (mg/L)						
	Solución						
	1	2	3	4	5	6	7
Ac. benzoico	340.43	340.43	340.43	340.43	340.43	340.43	340.43
Ac. <i>trans</i> -cinámico	201.17	201.17	201.17	201.17	201.17	201.17	201.17
Naringina	5.51	11.02	22.04	33.06	44.08	55.10	66.12
Resveratrol	2.15	4.30	8.60	12.89	17.19	21.49	25.78
Rutina	9.16	18.31	36.62	54.93	73.24	91.56	109.87
(-)-Epicatequina	6.01	12.02	24.05	36.07	48.10	60.12	72.14
(+)-Catequina	96.35	120.44	144.53	168.62	192.71	216.80	240.88
Apigenina	24.68	30.85	37.02	43.18	49.35	55.52	61.69
Ac. Clorogénico	25.16	50.31	100.62	150.94	201.25	251.56	301.87
Kaemferol	1.64	3.28	4.92	6.56	8.20	9.84	11.48
Quercetina	1.85	3.70	5.56	7.41	9.26	11.11	12.97
Ac. Cafeico	3.08	6.15	9.23	12.31	15.39	18.46	21.54

4.10 Procesamiento de las señales de los electroferogramas obtenidos por electroforesis capilar.

Se aplicó un método de integración de picos para cada uno de los electroferogramas de cada medición, este método está descrito en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Método de integración para cada medición de las curvas de calibración.

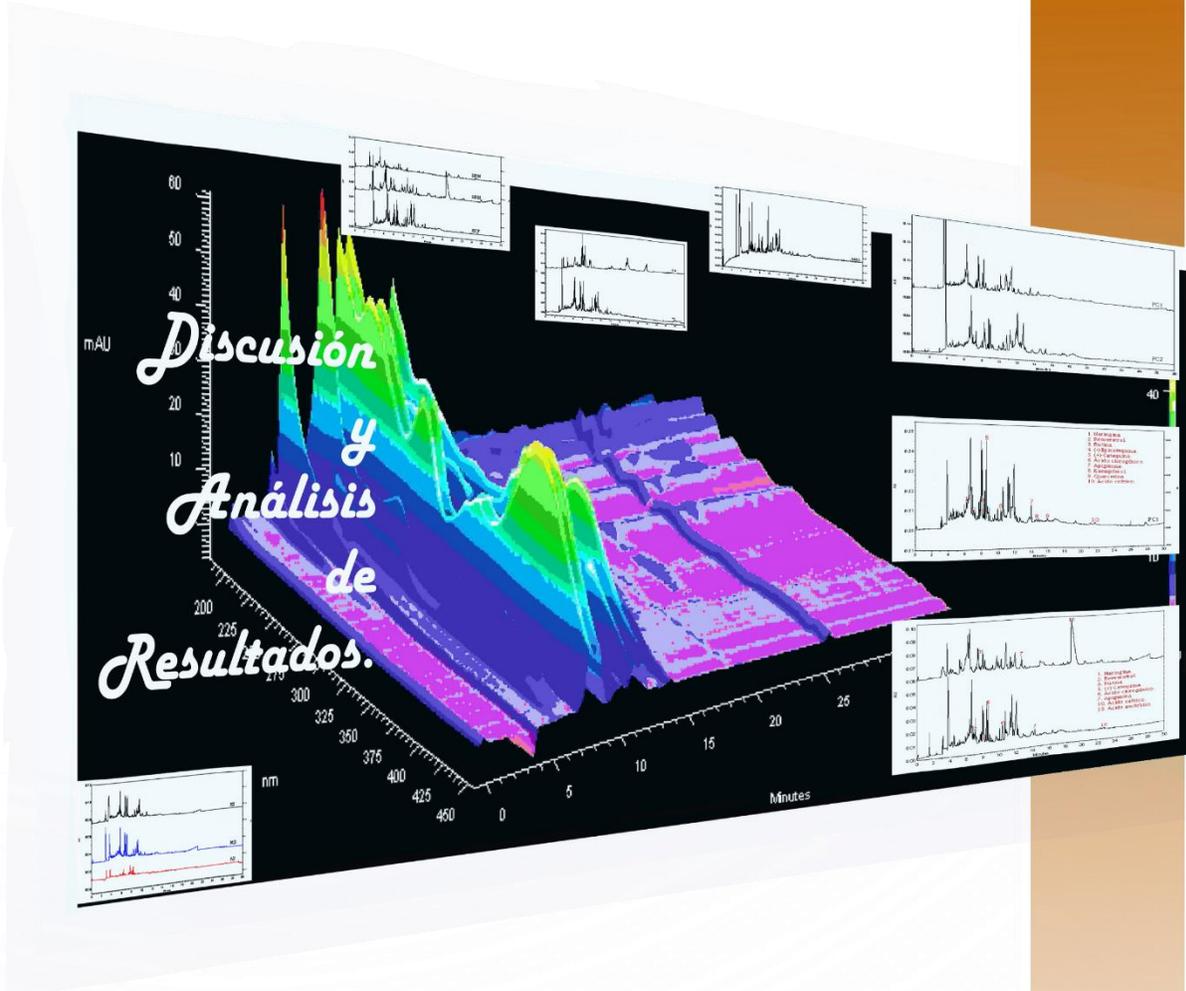
Parámetro de integración	Tiempo inicial (min.)	Tiempo final (min.)	Valor
Valle a valle	0	30	0
No integración	0	5	0
Área mínima	0	30	1000
Sensibilidad de hombro	0	0	10000
Umbral	0	9	300
Ancho	0	7.49	0.035
Ancho	7.49	8.4	0.11
Ancho	8.4	9	0.036
Umbral	9	14	200
Ancho	9	14	0.04
Umbral	14	30	150
Ancho	14	30	0.55



Se tabularon los tiempos de migración de cada compuesto fenólico en un archivo Excel, así como sus áreas y alturas correspondientes. En seguida se procesaron los datos para obtener las relaciones de áreas (área del compuesto fenólico/área del EI.) o alturas (altura del compuesto fenólico/altura del EI.), las cuales se procesaron en el software Statgraphics Centurion IV para realizar y validar el ajuste a un modelo lineal.

4.11 Identificación de las huellas digitales de los materiales vegetales utilizados por electroforesis capilar.

Se realizó la extracción de compuestos fenólicos asistida por ultrasonido de todos los materiales vegetales utilizados; los extractos se sometieron a la separación por electroforesis capilar y se compararon los perfiles electroforéticos de cada extracto.



Discusión y Análisis de Resultados





5. Discusión y análisis de resultados.

5.1 Condiciones óptimas para la extracción de los compuestos fenólicos.

Para la selección del tipo de disolvente óptimo, las extracciones se realizaron con mezclas de etanol-agua (70:30), metanol-agua (70:30) y agua, utilizando dos métodos distintos para cada extracción; la primera consistió en someter la muestra a una agitación constante durante 12 horas (maceración), y la segunda en sonicar la muestra durante 90 minutos (asistida por ultrasonido); éstas se pueden apreciar en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Condiciones de extracción de compuestos fenólicos utilizando distintos métodos y diferente composición de disolvente.

Código del procedimiento de extracción	Disolvente	Volumen de disolvente (mL)	Peso de Hojasén (g)	Método de extracción
AS	Agua	20	2.0	Sonicación 90 min.
AM	Agua	20	2.0	Maceración con agitación por 12 hrs.
ES	Etanol:Agua 70:30	20	2.0	Sonicación 90 min.
EM	Etanol:Agua 70:30	20	2.0	Maceración con agitación por 12 hrs.
MS	Metanol:Agua 70:30	20	2.0	Sonicación 90 min.
MM	Metanol:Agua 70:30	20	2.0	Maceración con agitación por 12 hrs.

Se realizó el análisis por electroforesis capilar, de los extractos obtenidos con cada uno de los disolventes utilizados, comparando las señales obtenidas con las diferentes metodologías de extracción, para determinar cuál es el mejor método para su realización. Estos resultados los discutiremos en los siguientes apartados.

5.1.1 Extractos acuosos (AS y AM).

Para determinar el mejor procedimiento de extracción para este disolvente se comparan los electroferogramas de los métodos empleados en la figura 5.1.

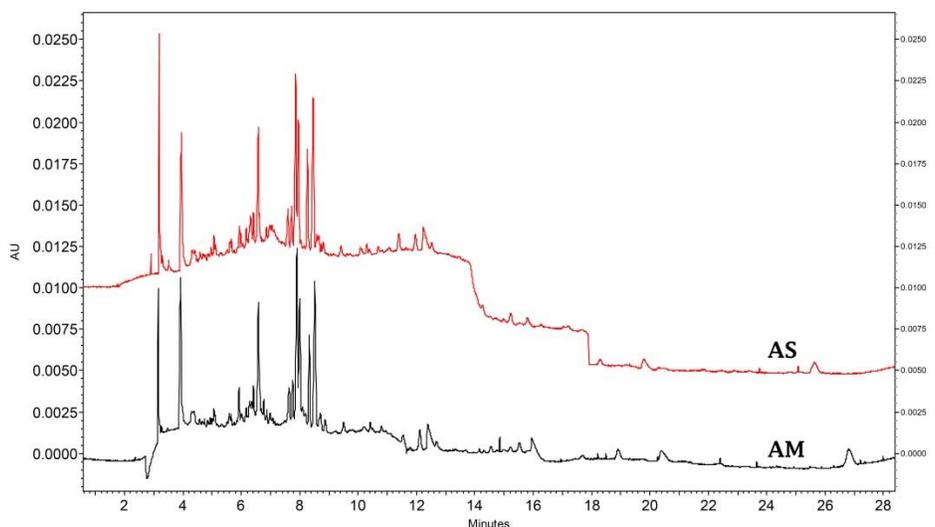


Figura 5.1 Electroferogramas de la separación de los compuestos fenólicos del espécimen hojásén utilizando: AS) extracción con agua como disolvente asistida por ultrasonido y AM) extracción con agua como disolvente por maceración.

En la figura 5.1 se observa que no hay diferencia significativa en los picos de los electroferogramas de los dos métodos de extracción, ya que se tiene una altura similar y su número es el mismo, con excepción de uno que sí se presenta en el método asistido por ultrasonido alrededor del minuto 6.5. Concluimos que por el menor tiempo de análisis el método de extracción asistida por ultrasonido es el más eficiente para este disolvente.

5.1.2 Extractos metanol-agua (MS y MM).

Para determinar el mejor procedimiento de extracción para este disolvente se comparan los electroferogramas de los métodos empleados en la figura 5.2.

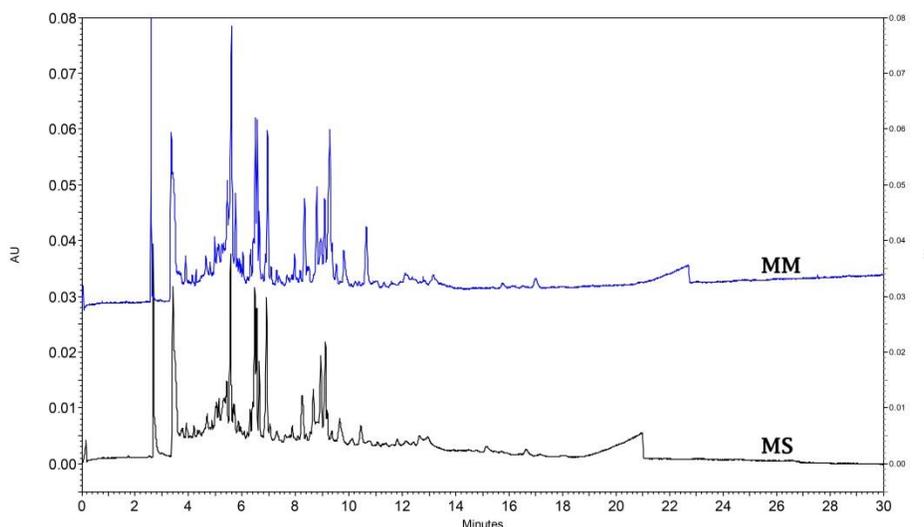


Figura 5.2 Electroferogramas de la separación de los compuestos fenólicos del espécimen hojásén utilizando: MS) extracción con metanol-agua (70:30) como disolvente asistida por ultrasonido y MM) extracción con metanol-agua (70:30) como disolvente por maceración.

En la figura 5.2 se presentan los dos electroferogramas correspondientes a los dos métodos de extracción utilizados. Se puede apreciar que no hay diferencia significativa en el número



de picos, sin embargo, desde el minuto 8 hasta el minuto 14 hay un aumento en la altura de los picos para la extracción por maceración (MM), mientras que si se desean estudiar los picos antes del minuto 8 y después del minuto 14 podemos decir que la forma eficiente de tratar la muestra es por el método asistido por ultrasonido (MS). De esta forma determinamos que el mejor método de extracción depende de los picos de interés del analista.

5.1.3 Extractos etanol-agua (ES y EM).

Para determinar el mejor método de extracción para este disolvente se comparan los electroferogramas de los dos métodos empleados en la figura 5.3:

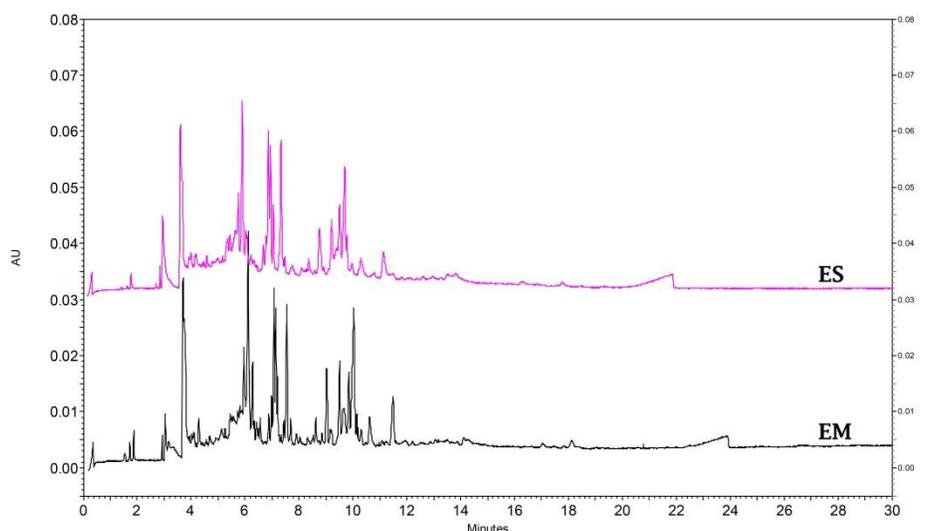


Figura 5.3 Electroferogramas de la separación de los compuestos fenólicos del espécimen hojásén utilizando: ES) extracción con etanol-agua (70:30) como disolvente asistida por ultrasonido y EM) extracción con etanol-agua (70:30) como disolvente por maceración.

En la figura 5.3 se presentan los dos electroferogramas correspondientes a los dos métodos de extracción utilizados, podemos observar que no hay diferencia significativa en el número de picos; sin embargo, en lo que respecta a su altura, la figura muestra que el método de maceración contiene picos un poco más altos, aunque este aumento en la altura no es significativo, la señal más notoria de este comportamiento se presenta al minuto 11.7. Concluimos que ambos procedimientos dan resultados semejantes, por lo que se optó por la extracción asistida por ultrasonido (ES) debido a su menor tiempo de análisis.

5.1.4 Determinación del tipo óptimo de disolvente.

A continuación se hace un análisis de resultados comparando la influencia del tipo de disolvente en las señales de los compuestos fenólicos obtenidos utilizando la extracción asistida por ultrasonido.

En la figura 5.4 se muestra los electroferogramas de las tres distintas mezclas de disolventes empleadas por el método de extracción asistida por ultrasonido. Podemos observar que el agua es el disolvente menos eficiente, ya que, la altura y el número de sus picos es menor comparado con los demás, en cuanto a las mezclas metanol-agua (70:30) y etanol-agua (70:30), no se observan diferencias significativas que nos indiquen que disolvente es mejor. Sin embargo se seleccionó etanol-agua (70:30) como disolvente óptimo, ya que esta mezcla es más amigable con el medio ambiente.

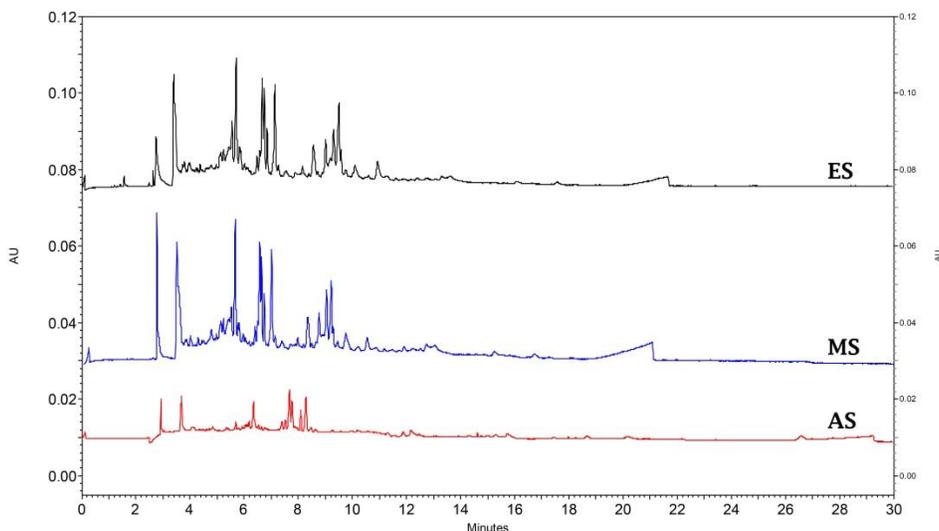


Figura 5.4 Electroferogramas de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos: ES) extracción con etanol-agua (70:30), MS) extracción con metanol-agua (70:30) y AS) extracción con agua.

5.2 Selección de las condiciones óptimas de hidrólisis.

Para determinar las condiciones óptimas de hidrólisis en primer lugar se estableció el medio más conveniente que nos permitiera obtener los compuestos fenólicos libres de sus azúcares asociados. Una vez establecido, se elaboró una variación de parámetros para encontrar las condiciones óptimas de hidrólisis.

Se observó que la hidrólisis en medio ácido afecta la medición de la muestra por CE, ya que, al inyectarla y medirla en medio alcalino (pH de 9.4), provoca la precipitación de la muestra dentro del capilar; entonces, se optó por hidrólisis alcalina.

5.2.1 Estudio de las condiciones de hidrólisis básica.

5.2.1.1 Hidrólisis con y sin adición de ácido ascórbico (Has) y EDTA (solución hidrolizante).

Se realizaron dos métodos de hidrólisis con NaOH, una en presencia de HAs y EDTA (HSH), y otra sin la presencia de éstos (HSN); la hidrólisis con HAs y EDTA, la cual llamaremos solución hidrolizante, tiene como objetivo la protección de los compuestos fenólicos a través de la adición de un antioxidante como lo es el ácido ascórbico.

En la figura 5.5 se puede apreciar el cambio de perfil electroforético de los extractos hidrolizados (HSH y HSN) con respecto al extracto de compuestos fenólicos sin hidrolizar (ECP), podemos observar que el número y la altura de los picos cambian, de esta forma podemos afirmar que la hidrólisis ocurre satisfactoriamente. En la figura 5.6 se puede observar el cambio de color del extracto de compuestos fenólicos sin hidrolizar (ECP) y el extracto hidrolizado HSH, es evidente el cambio en la constitución del extracto sin hidrolizar (ECP).

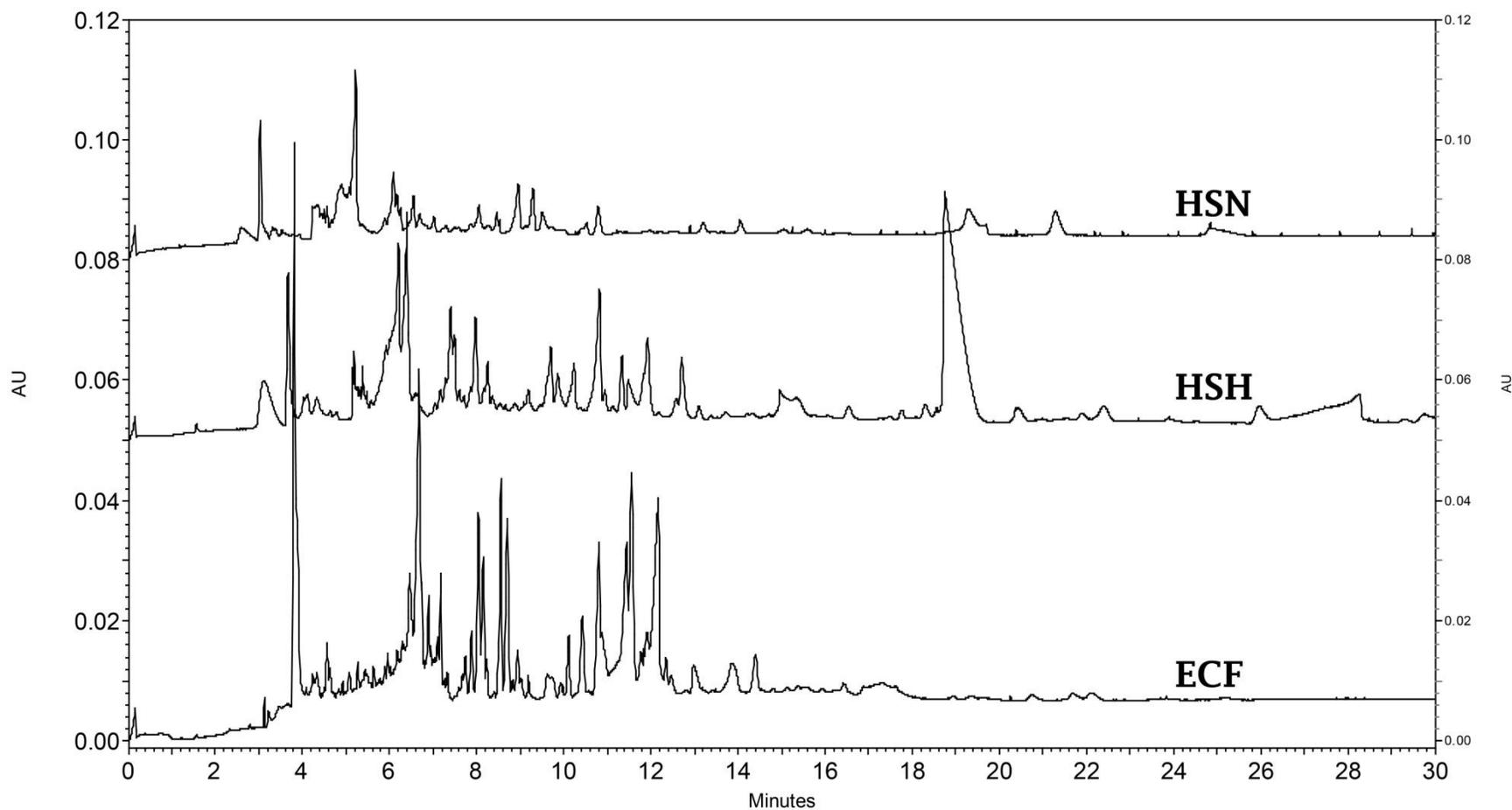


Figura 5.5 Electroferogramas de: ECF) extracto de compuestos fenólicos, HSH) hidrólisis con solución hidrolizante reciente, HSN) hidrólisis con solución de NaOH.

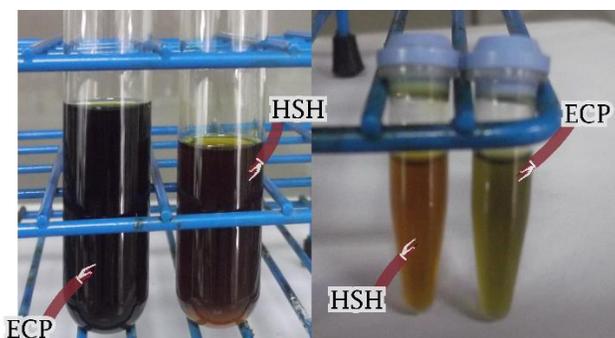


Figura 5.6 Fotos de la apariencia de los extractos de: ECP) extracto de compuestos fenólicos sin hidrolizar; HSH) hidrólisis del extracto con solución hidrolizante reciente

Al comparar los dos tipos de hidrólisis (figura 5.5) observamos que la realizada con NaOH 2 N (HSN) en los electroferogramas, la altura de los picos es baja y su número disminuye en comparación con la realizada con solución hidrolizante (HSH), esto posiblemente debido a que las condiciones de la misma, hace que los compuestos fenólicos libres de sus azúcares se degraden, por lo que es evidente el efecto protector del ácido ascórbico como antioxidante.

5.2.1.2 Evaluación de las condiciones de uso de la solución hidrolizante.

El ácido ascórbico se degrada con la luz y oxidantes fuertes. Es importante mencionar que se encuentra presente en la solución hidrolizante con NaOH, esto implica que se degrade con el tiempo de almacenamiento; en este sentido, su efecto antioxidante y protector de los compuestos fenólicos, disminuye al almacenarlo, de tal forma que se estudia la influencia del tiempo de preparación de esta solución, utilizando: a) una solución hidrolizante reciente y b) otra preparada con una semana de anticipación.

Podemos observar en la figura 5.7 que la hidrólisis realizada con la solución hidrolizante reciente (HR) es más efectiva que la realizada con una semana de anticipación (HE), es claro que el electroferograma del extracto hidrolizado con HR tiene mayor número y altura en los picos. En el minuto 20 se observa la señal del ácido ascórbico que todavía no se ha degradado y que protege a los compuestos fenólicos.

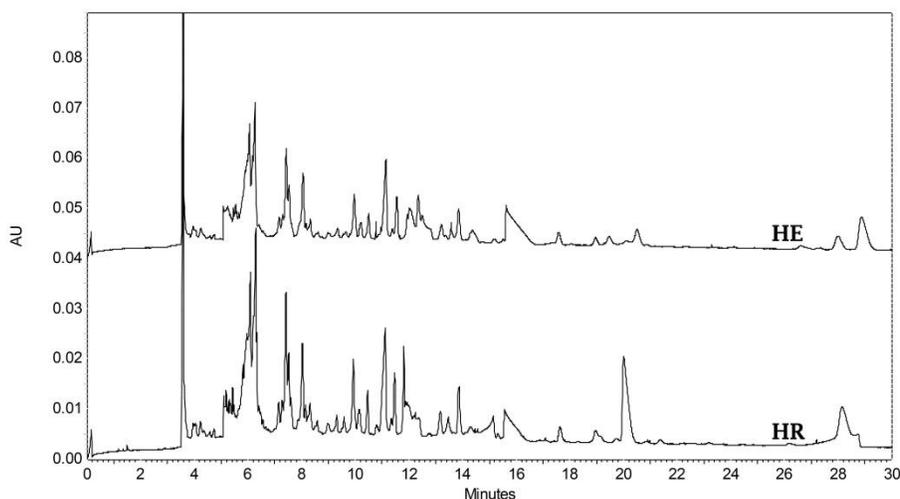


Figura 5.7 Electroferogramas de hidrólisis del extracto de compuestos fenólicos: HE) extracto hidrolizado con solución hidrolizante preparada con una semana de anticipación, HR) extracto hidrolizado con solución hidrolizante recién preparada.



Concluimos que la mejor forma de realizar la hidrólisis es preparar la solución hidrolizante en el momento en que se va a realizar la hidrólisis, para asegurar la protección de los compuestos fenólicos por parte del ácido ascórbico como antioxidante.

5.2.1.3 Efecto de la temperatura de hidrólisis.

Se realizó un estudio sobre el efecto de la temperatura en la hidrólisis de los compuestos fenólicos unidos a azúcares. Para ello se efectuó variación en la temperatura de hidrólisis desde 50 °C hasta 90 °C. En la figura 5.8 se observan los electroferogramas de la hidrólisis a las diferentes temperaturas estudiadas, encontrándose que hay una tendencia en el aumento del número de picos hasta la temperatura de 60 °C (H-60C), a mayor temperatura disminuyen los picos entre los minutos 8 y 12. Observando que el mayor número y altura de los picos de interés fue a 60 °C, concluimos que ésta es la temperatura óptima de hidrólisis.

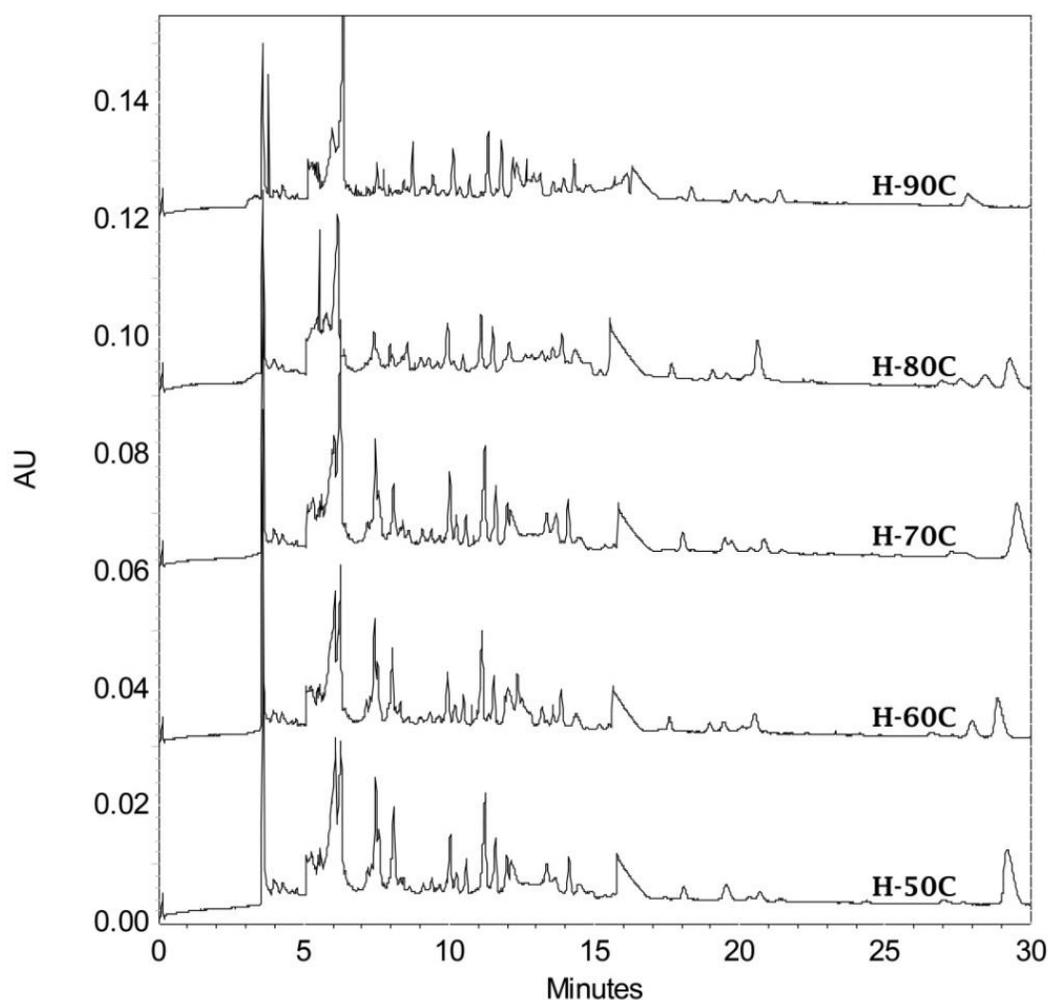


Figura 5.8 Electroferogramas de hidrólisis a diferentes temperaturas: H-50C) a 50 °C, H-60C) a 60°C, H-70C) a 70 °C, H-80C) a 80 °C y H-90) a 90 °C.

5.2.1.4 Efecto de la concentración de NaOH en la hidrólisis.

El análisis de este parámetro se realizó variando la concentración de NaOH desde 1.8 M hasta 8 M, cuyos electroferogramas se pueden observar en la figura 5.9, es visible que



mientras se incrementaba la concentración de hidróxido de sodio, el número de picos va desapareciendo y su altura decrece, con excepción de una serie de estos que incrementan alrededor del minuto 4 y forman un pico que no se resuelve al ir incrementando la concentración, por lo que se concluyó que la concentración óptima de NaOH es de 1.8 M.

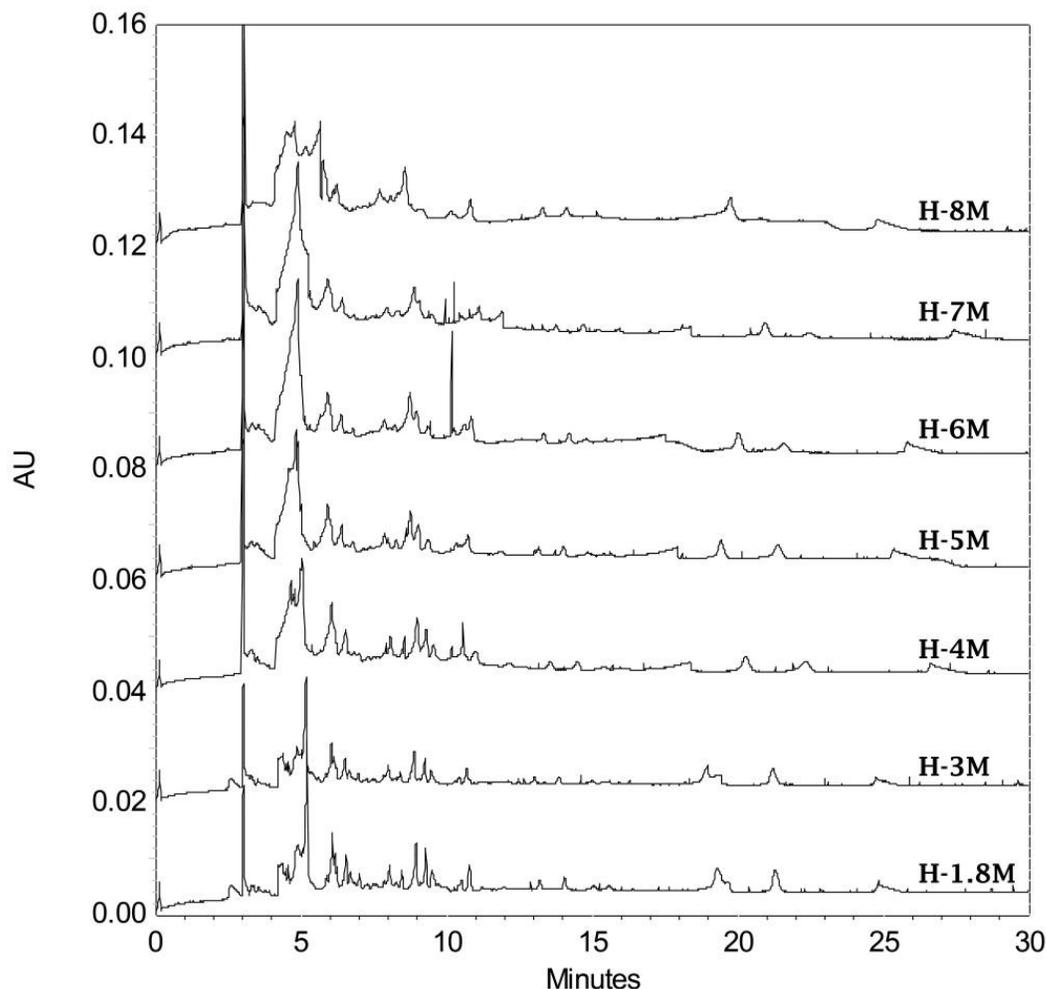


Figura 5.9 Electroferogramas de hidrólisis con diferentes concentraciones de NaOH: H-1.8M) con NaOH 1.8 M, H-3M) con NaOH 3 M, H-4M) con NaOH 4 M, H-5M) con NaOH 5 M, H-6M) con NaOH 6 M, H-7M) con NaOH 7 M y H-8M) con NaOH 8 M.

5.2.1.5 Efecto del tiempo de hidrólisis.

Para evaluar el efecto del tiempo de hidrólisis se realizó el estudio variando el tiempo desde los 15 minutos hasta los 120 minutos de reacción. En la figura 5.10 se observan los electroferogramas correspondientes a estos experimentos, encontrándose, que tanto el tiempo de hidrólisis de 15 min como el de 30 min tienen el mismo número y altura de los picos; sin embargo, la hidrólisis realizada a 30 min muestra una mejor resolución en los picos del minuto 6.2 y 10.8, que son de interés en estudios posteriores. A partir de los 30 minutos de hidrólisis el número y altura de los picos disminuye, con una menor resolución. Concluimos de esta forma que el tiempo de hidrólisis óptimo se da a los 30 minutos (H-30m) debido a una mejor resolución de los picos de interés.

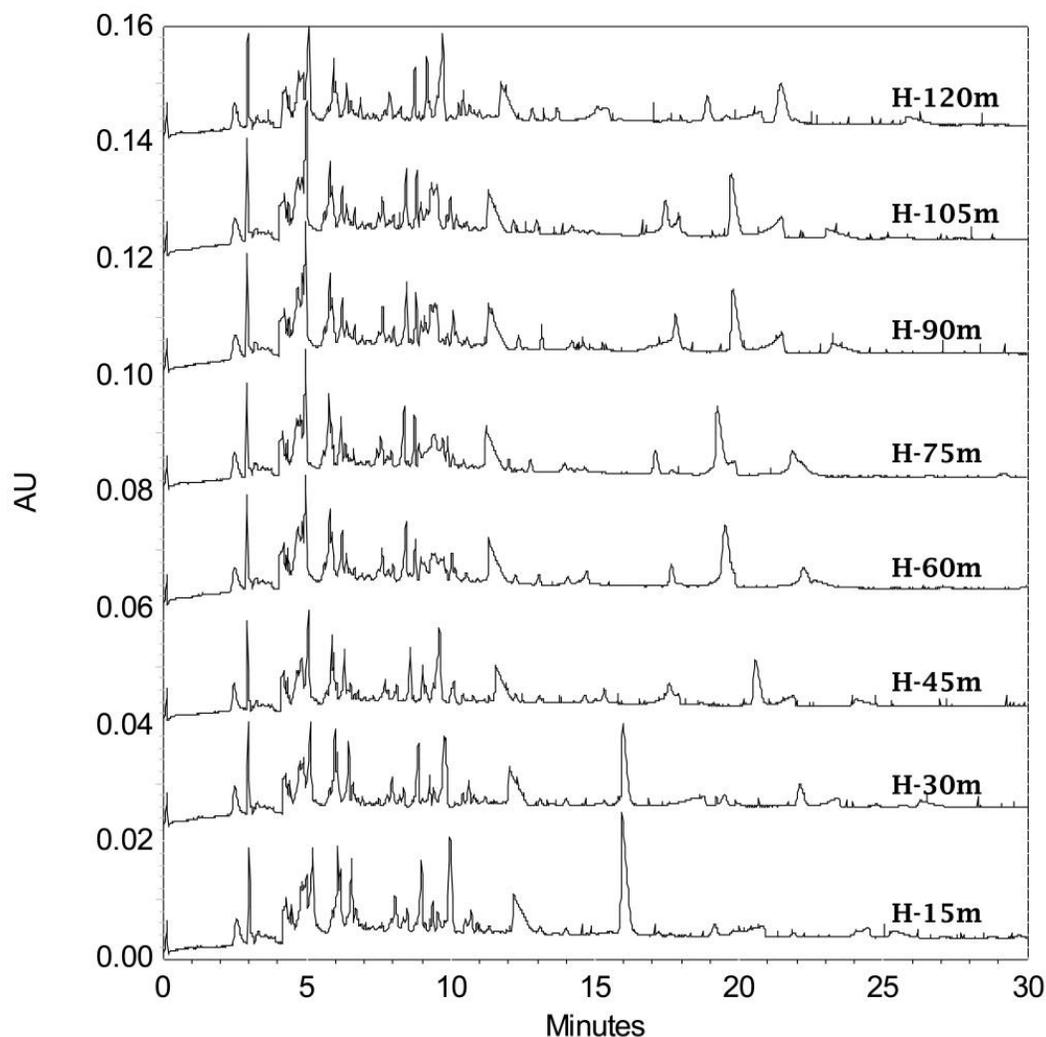


Figura 5.10 Electroferogramas de hidrólisis a diferentes tiempos de reacción: H-15m) a los 15 min., H-30m) a los 30 min, H-45m) a los 45 min, H-60m) a los 60 min, H-75m) a los 75 min, H-90m) a los 90 min, H-105m) a los 105 min y H-120m) a los 120 min.

5.2.2 Conclusiones sobre las condiciones de hidrólisis básica.

Concluimos que el método óptimo de hidrólisis se da a una concentración de hidróxido de sodio de 1.8 M con una temperatura de 60 °C durante 30 minutos con solución hidrolizante recién preparada.

Para obtener una concentración de los compuestos fenólicos en el extracto hidrolizado que sea comparable con el extracto de etanol-agua (70:30) se concentra el extracto hasta la mitad de su volumen y se adiciona la cantidad de volumen de solución hidrolizante igual a la cantidad evaporada, se realiza el procedimiento de hidrólisis y finalmente se lleva a un volumen igual al utilizado desde un principio del extracto.

5.3 Determinación de compuestos fenólicos.

Para la determinación de los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal es necesario tener las condiciones óptimas de separación. La técnica de electroforesis capilar nos permite separar estos compuestos fenólicos como aniones a un pH básico (con



ionización de los grupos $-OH$ ó $-COOH$) y al ser éstos sometidos a un campo eléctrico, migran al detector con diferente movilidad dependiendo de su relación carga/masa. Por lo tanto, el orden de elución de los compuestos fenólicos aniónicos por electroforesis capilar es: tiempos de migración menores para aniones más grandes con poca carga, mientras que se observarán tiempos de migración mayores para compuestos más ligeros y con mayor carga. Excepciones a esto, se deben a la formación de complejos de polioles con boratos y a la presencia de compuestos fenólicos unidos a azúcares. Un ejemplo de la separación de algunos estándares utilizados se puede observar en la figura 5.11, utilizando las condiciones reportadas en el apartado 4.8.

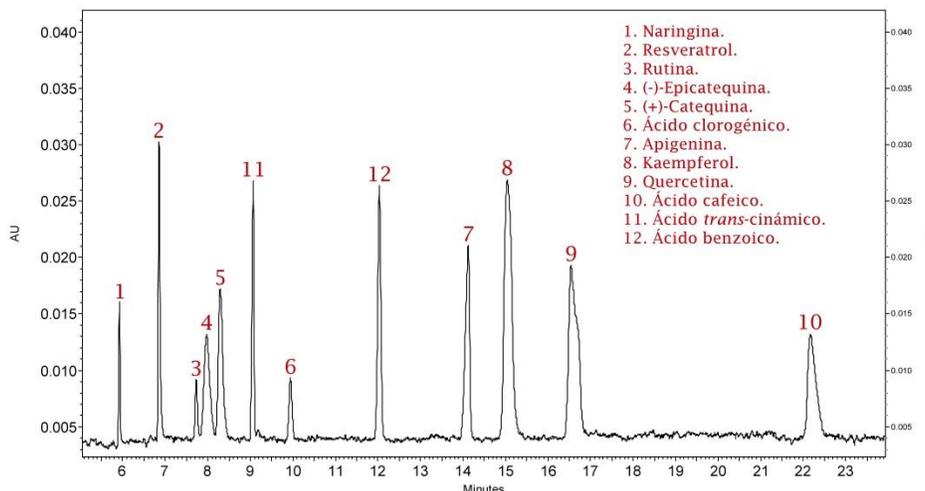


Figura 5.11 Electroferogramas de la separación de los estándares de compuestos fenólicos utilizados.

Las especies predominantes de los compuestos fenólicos a pH 9.4, se pueden observar en el anexo 2, con lo que puede confirmarse su carga negativa (especie anionica).

5.3.1 Identificación de compuestos fenólicos.

La identificación de compuestos fenólicos se realizó mediante adición de estándar en los extractos etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, mientras que en el caso de la planta Coahuila 2 la adición se realizó tanto en su extracto etanol-agua (70:30) como en su hidrolizado. Adicionalmente se confirmó comparando los espectros de absorción del pico identificado en las muestras, con el espectro de absorción del estándar.

5.3.1.1 Identificación de compuestos fenólicos en la planta Coahuila 1 (PC1).

En el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1 se identificaron 10 compuestos fenólicos, los cuales se presentan en la figura 5.12 y en el acercamiento de la figura 5.13.

Podemos observar que no hay mucha diferencia en los tiempos de migración de los compuestos fenólicos identificados con respecto a los tiempos de migración de los estándares. Los detalles de la identificación por adición estándar y la confirmación del compuesto por comparación de los espectros de absorción pueden verse en el Anexo 3 para cada compuesto.

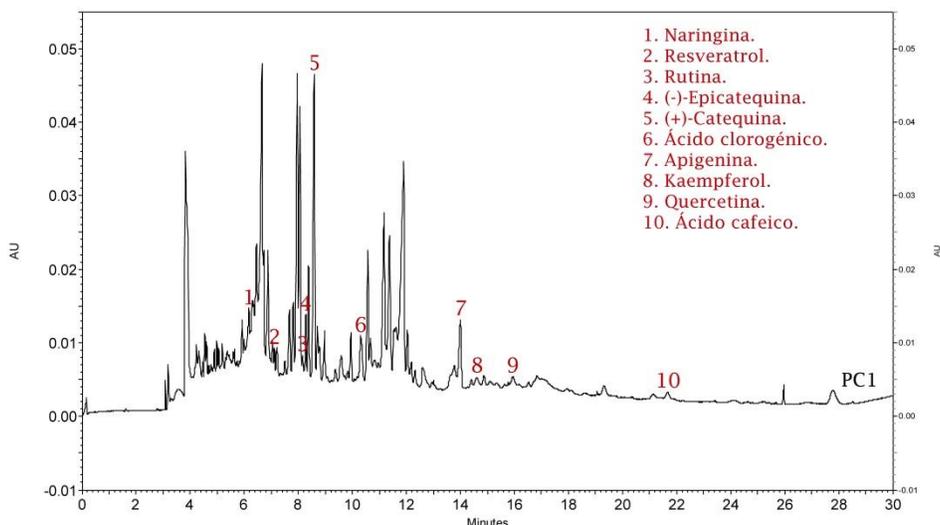


Figura 5.12 Electroferograma de compuestos identificados en la planta Coahuila 1.

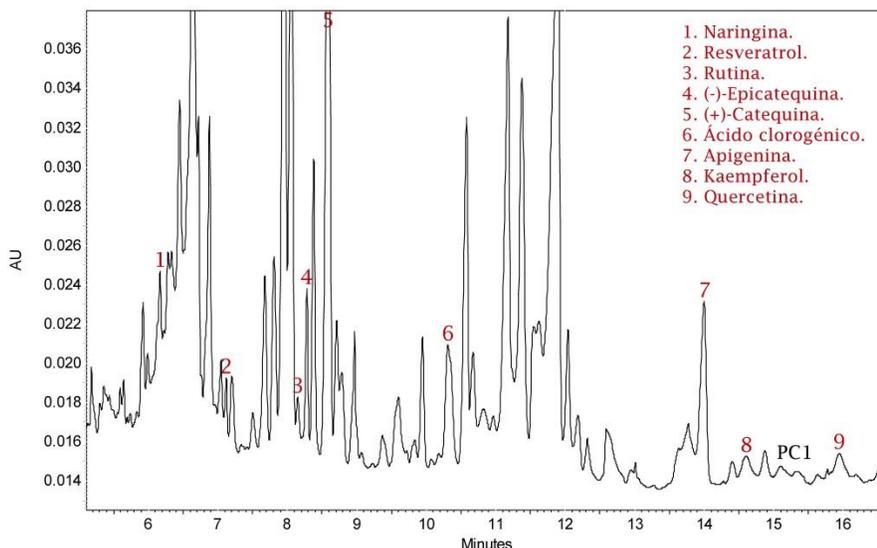


Figura 5.13 Amplificación del minuto 5 al minuto 17 del electroferograma de compuestos identificados en la planta Coahuila 1.

5.3.1.2 Identificación de compuestos fenólicos en la planta Coahuila 2 (PC2).

La muestra vegetal de esta planta es de la misma localidad que la de la planta de Coahuila 1; sin embargo, esta pertenece a un distinto tiempo estacional, por lo que se tiene diferencias de concentración de metabolitos secundarios.

En esta planta se desarrolló el método de hidrólisis, por lo que se identificaron compuestos fenólicos tanto en extractos etanol-agua (70:30) y en el extracto hidrolizado, la cual se realizó por adición de estándar, esperando el aumento de los picos por tal adición, además de comparar el espectro de absorción de los mismos con el espectro de absorción del estándar solo. En la figura 5.14 se muestran los electroferogramas del extracto etanol-agua (70:30) y el extracto hidrolizado y sus correspondientes compuestos fenólicos identificados, así como la amplificación en la figura 5.15.

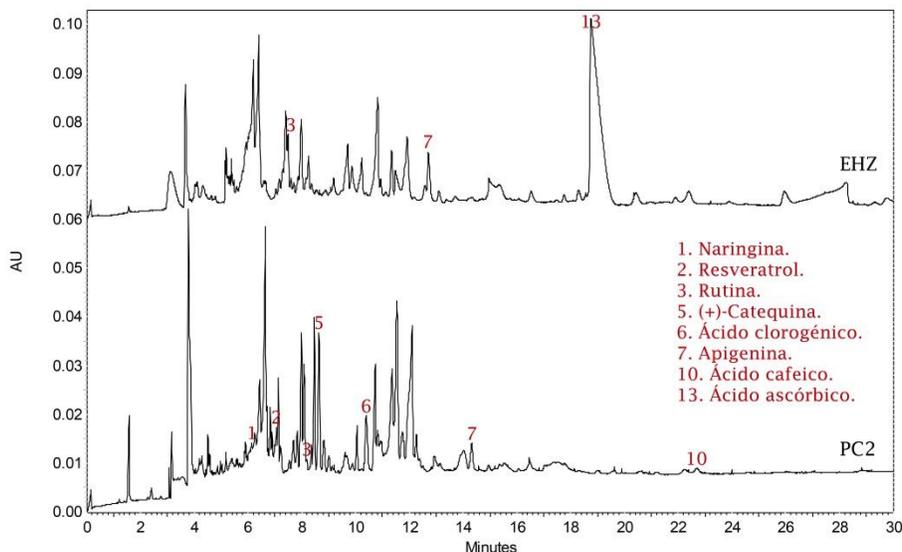


Figura 5.14 Electroferogramas de compuestos fenólicos identificados en la planta Coahuila 2, en PC2) el extracto etanol-agua (70:30) y en EHZ) el extracto hidrolizado.

Podemos observar que el número de compuestos fenólicos es menor, con un total de 7 compuestos identificados en el extracto etanol-agua (70:30), y 2 estándares identificados en el hidrolizado.

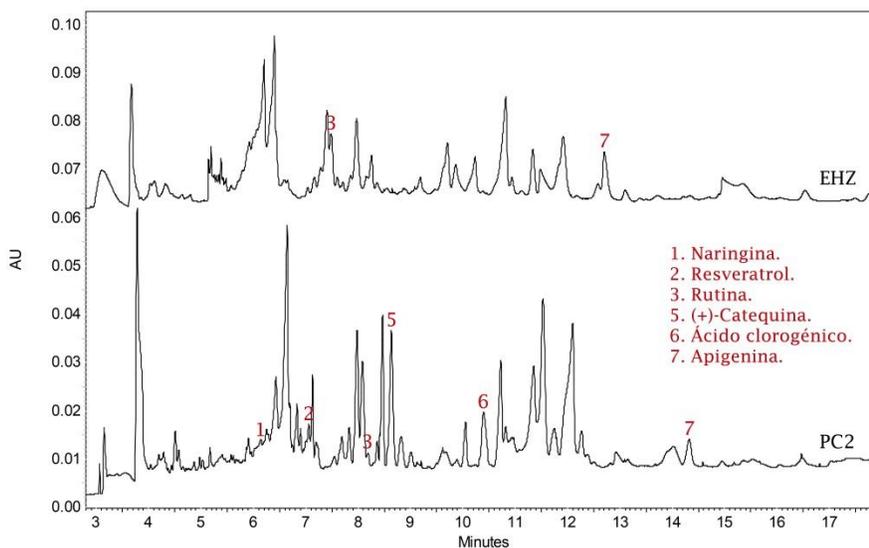


Figura 5.15 Ampliación del minuto 3 al minuto 18 de los electroferogramas de la figura 5.13, en PC2) el extracto etanol-agua (70:30) y en EHZ) el extracto hidrolizado.

Es evidente que apigenina (compuesto 7) tiene una señal mayor en el hidrolizado, debido al rompimiento del enlace con su azúcar dejándola libre, este pico se puede apreciar mejor en la figura 5.15.

En lo que respecta a la rutina, podemos ver que se identifica y además hay un pico mayor en el hidrolizado, esto quizá se deba a que el medio de hidrólisis favorece su disolución, ya que este compuesto no es muy soluble en soluciones alcohólicas pero si en soluciones básicas, su hidrólisis posiblemente se lleve a cabo en un tiempo mayor de hidrólisis ya que se puede observar la disminución de su pico en la figura 5.10.



Los detalles de la identificación por adición estándar y la confirmación de los compuestos por comparación de sus espectros de absorción con los de estándares, pueden verse en el Anexo 3.

5.3.2 Selectividad del método.

La electroforesis capilar es un método de separación muy selectivo, ya que, permite una buena separación de los componentes de los extractos a altas resoluciones, además la comprobación de ausencia de interferencias se lleva a cabo con el detector de arreglo de diodos (DAD), ya que éste nos permite evaluar la coelución en los picos, al comparar el espectro de absorción adquirido a lo largo del pico con el fin de determinar si consta de uno o más compuestos con espectros diferentes. Por lo tanto, la comprobación espectral de la pureza de pico es un indicativo de su homogeneidad no pudiendo descartar la coelución de otras sustancias con espectros similares presentes en la muestra.

Esta pureza espectral de pico, asegura que el método utilizado es capaz de dar una respuesta del analito de interés en los extractos, distinguible de los demás componentes de la mezcla potencialmente compleja como se observa en la sección 5.3.1 y en el Anexo 3.

Además este tipo de detector acoplado, nos asegura con más confiabilidad la identificación de un compuesto en la muestra, ya que, al realizarlo solo con tiempo de migración (t_m) habría mucho error, ya que los t_m dependen de la viscosidad de la muestra y que es variable en muestras reales. Al adicionar el estándar interno y corroborar la identidad del fenol con la comparación de su espectro con la del espectro de absorción del estándar, esto nos proporciona información objetiva y más certera en la identificación de un compuesto.

5.3.3 Selección del estándar interno. (EI).

La adición de un estándar interno tiene la finalidad de minimizar las diferencias en los tiempos de migración y las alturas de los picos obtenidos, debido a los cambios de viscosidad entre las muestras, errores en aforos o toma correcta de alícuotas durante la preparación y errores en el volumen de inyección que el equipo toma de cada vial, dando esta estrategia siempre resultados más precisos. Es importante mencionar que la elección del EI más adecuado, consiste en seleccionar un compuesto de estructura similar a los analitos en estudio, que sea de alta pureza, no esté presente de forma natural en la muestra; además, su señal no se vea traslapada con otra y sea lo más gaussiana posible (simétrica), para facilitar su buena integración. Como el EI se encuentra a una concentración constante en cada vial a medir, se espera por lo tanto obtener una respuesta de la misma magnitud (área constante) en todos los viales.

De esta forma el ácido benzoico fue elegido como estándar interno para los extractos de etanol-agua de las plantas de Coahuila 1 y Coahuila 2 y su señal se puede observar en la figura 5.16, observándose que no se traslapa con otra del extracto y posee un tiempo de migración de alrededor de 11.6 min.

Desafortunadamente la señal del ácido benzoico se traslapa con otra en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2, por lo que se elige otro estándar interno para el hidrolizado. Se eligió como estándar interno, el ácido *trans*-cinámico, cuya señal se puede observar en la figura 5.17, en donde es evidente que no hay un traslape con alguna otra señal del extracto hidrolizado y posee un tiempo de migración de alrededor de 8.8 min.

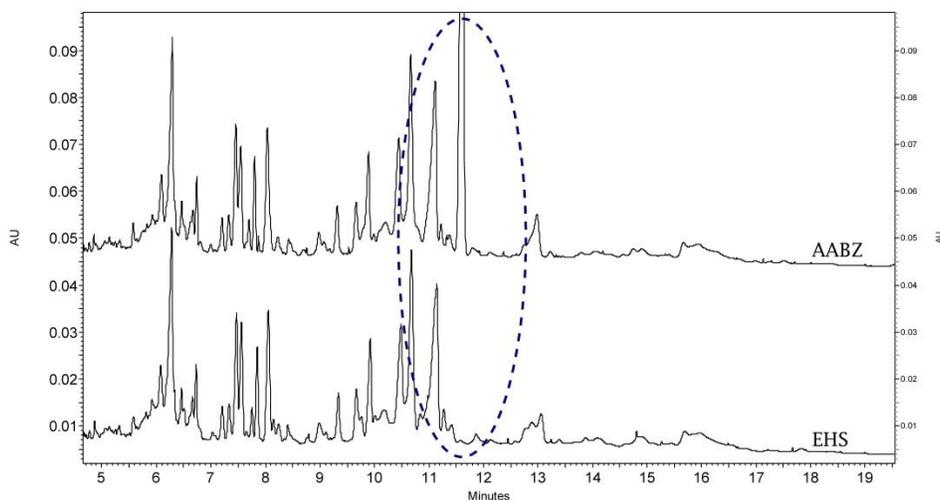


Figura 5.16 Electroferogramas del estudio del EI, en: EHS) extracto etanol-agua (70:30) de la planta de hojaseén y en AABZ) la adición del estándar de ácido benzoico al extracto.

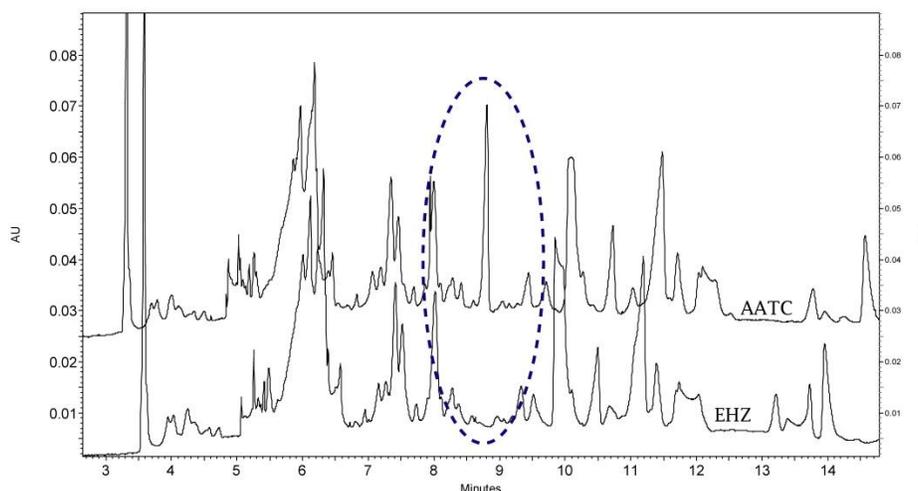


Figura 5.17 Electroferogramas del estudio del EI, en: EHZ) extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2 y en AACT) la adición del estándar de ácido *trans*-cinámico al extracto hidrolizado.

5.3.4 Precisión del sistema.

Se evaluó la repetibilidad del sistema, realizando diez mediciones consecutivas de la mezcla de estándares indicada en el apartado 4.9.2 y reportando el %RSD (C.V.) para tiempos de migración (t_m) relación de áreas ($A_{\text{Fenol}}/A_{\text{EI}}$) y relación de alturas ($H_{\text{Fenol}}/H_{\text{EI}}$) para cada estándar.

En lo que respecta a los tiempos de migración se obtienen %RSD < 2% (tabla 5.2) y de acuerdo a los criterios de aceptación este método es preciso en el caso de los tiempos de migración.



Tabla 5.2 Precisión (% RSD) para tiempos de migración de los diferentes compuestos fenólicos estudiados.

Estándar	t_m		
	Promedio (\bar{x})	Desv. Est (s).	%RSD
Naringina	5.822	0.025	0.436
Resveratrol	6.722	0.041	0.616
Rutina	7.521	0.039	0.522
(-)-Epicatequina	7.765	0.042	0.536
(+)-Catequina	8.066	0.046	0.575
Ac. Trans-cinámico	8.772	0.057	0.649
Ac. Clorogénico	9.595	0.066	0.693
Ac. Benzoico	11.501	0.101	0.877
Apigenina	13.423	0.139	1.033
Kaempferol	14.310	0.158	1.103
Quercetina	15.628	0.177	1.136
Ac. Cafeico	20.376	0.352	1.729

En lo que respecta a la relación de áreas y alturas cuando se utilizó como EI al ácido benzoico (tabla 5.3), observamos que se tienen %RSD <5% (con excepción de rutina y la relación de áreas para el ácido cafeico), de acuerdo a los criterios de aceptación, se considera que el método es preciso.

De esta forma se seleccionan los %RSD más bajos específicos para cada compuesto fenólico, siendo la relación de áreas para: naringina, (-)-epicatequina, apigenina y kaempferol; y la relación de alturas para: resveratrol, rutina, (+)-catequina, ácido clorogénico, quercetina y ácido cafeico; teniendo todos buena precisión, con excepción del caso de rutina.

Tabla 5.3 Precisión (% RSD) para la relación de áreas y alturas para los diferentes compuestos fenólicos utilizando como EI el ácido benzoico.

Estándar	$A_{STD}/A_{Ac. \text{ benzoico}}$			$H_{STD}/H_{Ac. \text{ benzoico}}$		
	Promedio (\bar{x})	Desv. Est. (s)	%RSD	Promedio (\bar{x})	Desv. Est. (s)	%RSD
Naringina	0.236	0.006	2.690	0.502	0.016	3.225
Resveratrol	0.674	0.033	4.875	1.071	0.042	3.899
Rutina	0.154	0.017	10.734	0.216	0.017	7.752
(-)-Epicatequina	0.697	0.029	4.132	0.370	0.017	4.479
(+)-Catequina	0.795	0.028	3.538	0.545	0.019	3.419
Ac. clorogénico	0.209	0.009	4.345	0.240	0.008	3.342
Apigenina	0.992	0.041	4.090	0.741	0.035	4.760
Kaempferol	2.234	0.100	4.461	0.957	0.047	4.899
Quercetina	1.676	0.077	4.584	0.640	0.027	4.281
Ac. cafeico	0.955	0.059	6.197	0.392	0.010	2.634

La precisión de la respuesta seleccionada para cada compuesto fenólico se observa en negritas

En lo que respecta a la relación de áreas y alturas cuando el EI utilizado fue el ácido *trans*-cinámico (tabla 5.4), se observó un %RSD <5% (con excepción de rutina), de acuerdo a los criterios de aceptación, se considera que el método es preciso y puede ser aplicado para el caso de los extractos hidrolizados.



De esta forma se seleccionan los %RSD más bajos para el estudio de los compuesto fenólicos en el extracto hidrolizado, centrándose para la relación de áreas en apigenina; y la relación de alturas en rutina.

Tabla 5.4 Precisión (% RSD) para la relación de áreas y alturas para los diferentes compuestos fenólicos utilizando como EI el ácido *trans*-cinámico.

Estándar	$A_{STD}/A_{Ac. trans-cinámico}$			$H_{STD}/H_{Ac. trans-cinámico}$		
	Promedio (\bar{x})	Desv. Est. (s)	%RSD	Promedio (\bar{x})	Desv. Est. (s)	%RSD
Rutina	0.233	0.022	9.459	0.217	0.014	6.271
Apigenina	1.506	0.039	2.610	0.745	0.022	2.905

La precisión de la respuesta seleccionada para cada fenol se observa en negritas

5.3.5 Curvas de calibración.

Se realizaron las curvas de calibración de acuerdo a lo establecido en el apartado 4.9.3 y Anexo 1, posteriormente se eligió de acuerdo a su precisión la respuesta analítica a seguir (apartado 5.3.4) para cada estándar, con excepción de (+)-catequina el cual se realizó en relación de áreas (EI de ácido benzoico), y apigenina el cual se realizó en relación de alturas (EI de ácido *trans*-cinámico), ya que estos describen mejor el modelo lineal.

Tabla 5.5 Ecuaciones de la curvas de calibración para cada estándar.

Estándar	Ecuación
Naringina	$\frac{A_{Naringina}}{A_{Ac. Benzoico}} = 0.0005 \pm 0.0006 + 0.2090 \pm 0.0049 \left(\frac{[Naringina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Resveratrol	$\frac{H_{Resveratrol}}{H_{Ac. Benzoico}} = -0.0014 \pm 0.0006 + 1.1780 \pm 0.0142 \left(\frac{[Resveratrol]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Rutina	$\frac{H_{Rutina}}{H_{Ac. Benzoico}} = -0.0003 \pm 0.0007 + 0.3692 \pm 0.0038 \left(\frac{[Rutina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Rutina	$\frac{H_{Rutina}}{H_{Ac. trans-cinamico}} = -0.0024 \pm 0.0023 + 0.4335 \pm 0.0070 \left(\frac{[Rutina]}{[Ac. trans - cinamico]} \right)$
(-)-Epicatequina	$\frac{A_{(-)-Epicatequina}}{A_{Ac. Benzoico}} = -0.0058 \pm 0.0017 + 1.0023 \pm 0.0130 \left(\frac{[(-)-Epicatequina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
(+)-Catequina	$\frac{A_{(+)-Catequina}}{A_{Ac. Benzoico}} = 0.0137 \pm 0.0086 + 0.9552 \pm 0.0167 \left(\frac{[(+)-Catequina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Ácido Clorogénico	$\frac{H_{Ac. clorogénico}}{H_{Ac. Benzoico}} = 0.0005 \pm 0.0012 + 0.2047 \pm 0.0023 \left(\frac{[Ac. clorogénico]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Apigenina	$\frac{A_{Apigenina}}{A_{Ac. Benzoico}} = -0.0090 \pm 0.0034 + 1.0246 \pm 0.0245 \left(\frac{[Apigenina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Apigenina	$\frac{H_{Apigenina}}{H_{Ac. trans-cinamico}} = -0.0048 \pm 0.0067 + 0.9836 \pm 0.0287 \left(\frac{[Apigenina]}{[Ac. trans - cinamico]} \right)$
Kaempferol	$\frac{A_{Kaempferol}}{A_{Ac. Benzoico}} = -0.0128 \pm 0.0047 + 1.6650 \pm 0.1917 \left(\frac{[Kaempferol]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Quercetina	$\frac{H_{Quercetina}}{H_{Ac. Benzoico}} = -0.0079 \pm 0.0015 + 1.0191 \pm 0.0566 \left(\frac{[Quercetina]}{[Ac. Benzoico]} \right)$
Ácido cafeico	$\frac{H_{Ac. cafeico}}{H_{Ac. Benzoico}} = 0.0014 \pm 0.0014 + 0.5195 \pm 0.0327 \left(\frac{[Ac. cafeico]}{[Ac. Benzoico]} \right)$



En la tabla 5.5 se muestran las ecuaciones de las distintas curvas de calibración de acuerdo a la validación del Anexo 4; en la tabla 5.6 se muestran algunos parámetros de validación de las curvas de calibración de acuerdo al Anexo 4.

Tabla 5.6 Algunos parámetros de validación de las curvas de calibración; coeficiente de determinación (r^2), límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Estándar	E.I. utilizado	r^2	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Naringina	Ac. benzoico	0.9895	7.4726	22.6442
Resveratrol	Ac. benzoico	0.9975	1.6959	5.1392
Rutina	Ac. benzoico	0.9982	4.8631	14.7367
(-)-Epicatequina	Ac. benzoico	0.9968	4.4819	13.5814
(+)-Catequina	Ac. benzoico	0.9942	12.7608	38.6690
Ac. clorogénico	Ac. benzoico	0.9976	16.1896	49.0593
Apigenina	Ac. benzoico	0.9915	4.0111	12.1548
Kaempferol	Ac. benzoico	0.8628	3.8795	11.7561
Quercetina	Ac. benzoico	0.9587	2.2987	6.9657
Ac. cafeico	Ac. benzoico	0.9440	4.6435	14.0713
Rutina	Ac. <i>trans</i> -cinámico	0.9950	8.5215	25.8228
Apigenina	Ac. <i>trans</i> -cinámico	0.9866	4.9635	15.0408

5.3.6 Cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo por la interpolación de las señales obtenidas por CE, de tal forma que a partir de la ecuación de la curva de calibración (EQ. 1) obtenemos la concentración del fenol (EQ 2).

$$\frac{(A \text{ o } H)_{\text{Fenol}}}{(A \text{ o } H)_{\text{EI}}} = b_0 + b_1 \left(\frac{[\text{Fenol}]}{[\text{EI}]} \right) \dots\dots\dots \text{EQ. 1}$$

Donde:

A = Area; H = Altura; b_0 = Intercepto; y b_1 = Pendiente

$$[\text{Fenol}] = \left[\frac{(A \text{ o } H)_{\text{Fenol}}}{(A \text{ o } H)_{\text{EI}}} - b_0 \right] ([\text{EI}]) b_1^{-1} \dots\dots\dots \text{EQ. 2}$$

De esta forma a continuación se muestran las cantidades obtenidas de cada fenol para cada planta en estudio.

5.3.6.1 Planta Coahuila 1 (PC1).

La cuantificación de los compuestos fenólicos en esta planta se realizó en el extracto etanol-agua (70:30), se utilizó como estándar interno el ácido benzoico de 340.43 mg/L de concentración, y cuyo pico se registró al minuto 11.45 con un área de 558810 y una altura de 110710.

En la tabla 5.7 podemos observar las concentraciones de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, además de los miligramos de compuesto fenólico obtenidos por cada 100 g de planta tratada.



Tabla 5.7 Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

Compuesto fenólico	t_m	A_{Fenol}	$A_{Fenol}/A_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L	mg Fenol/100 g planta
Naringina	5.75	10123	0.0181	28.64	28.64
(-)-Epicatequina	7.88	22616	0.0405	15.72	15.72
(+)-Catequina	8.04	166754	0.2984	101.46	101.46
Apigenina	13.20	69121	0.1237	44.10	44.10
Kaempferol	14.11	27652	0.0495	12.74	12.74
	t_m	H_{Fenol}	$H_{Fenol}/H_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L	mg Fenol/100 g planta
Resveratrol	6.65	3331	0.0301	9.10	9.10
Rutina	7.63	2245	0.0203	18.97	18.97
Ácido Clorogénico	9.61	7254	0.0655	108.12	108.12
Quercetina	15.90	1105	0.0100	5.98	5.98
Ácido cafeico	19.78	2090	0.0189	11.42	11.42

Donde t_m es el tiempo de migración; A_{Fenol} es el área obtenida del compuesto fenólico; $A_{Ac. benzoico}$ es el área del EI que corresponde a 558810; [Fenol] es la concentración obtenida del compuesto fenólico; H_{Fenol} es la altura obtenida del compuesto fenólico; $H_{Ac. benzoico}$ es la altura del EI que corresponde a 110710.

Como podemos ver que en la tabla 5.7, todos los compuestos fenólicos son cuantificables, ya que las concentraciones obtenidas son mayores que el LC (tabla 5.6); con excepción de quercetina y ácido cafeico, cuyas concentraciones son menores y cercanas al LC (tabla 5.6), podemos decir que los valores obtenidos son válidos pero con mayor error.

De acuerdo a esto tenemos como componentes mayoritarios a (+)-catequina, apigenina, y ácido clorogénico; y como componentes minoritarios a: naringina, resveratrol, rutina, (-)-epicatequina, kaempferol, quercetina y ácido cafeico.

5.3.6.2 Planta Coahuila 2 (PC2).

La cuantificación de los compuestos fenólicos en esta planta se realizó en el extracto etanol-agua (70:30), así como en su extracto hidrolizado.

Para el extracto etanol-agua (70:30) se utilizó como estándar interno el ácido benzoico de 340.43 mg/L de concentración, cuyo pico se registró al minuto 11.50 con un área de 489810 y una altura de 99027.

En la tabla 5.8 podemos observar las concentraciones de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, además de los miligramos de compuesto fenólico obtenidos por cada 100 g de planta tratada.

Como podemos ver que en la tabla 5.8, todos los compuestos fenólicos son cuantificables, ya que las concentraciones obtenidas son mayores que el LC (tabla 5.6); con excepción de naringina, cuya concentración es menor y cercana al LC (tabla 5.6), podemos decir que este valor obtenido es válido pero con mayor error.



Tabla 5.8 Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2

Compuesto fenólico	t_m	A_{Fenol}	$A_{Fenol}/A_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L	mg Fenol/100 g planta
Naringina	5.78	5291	0.0108	16.73	16.73
(+)-Catequina	8.03	142990	0.2919	99.15	99.15
Apigenina	13.20	58498	0.1194	42.68	42.68
	t_m	H_{Fenol}	$H_{Fenol}/H_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L	mg Fenol/100 g planta
Resveratrol	6.63	6384	0.0645	19.04	19.04
Rutina	7.66	2456	0.0248	23.15	23.15
Ácido Clorogénico	9.63	16830	0.1700	281.76	281.76
Ácido cafeico	19.80	3278	0.0331	20.75	20.75

Donde t_m es el tiempo de migración; A_{Fenol} es el área obtenida del compuesto fenólico; $A_{Ac. benzoico}$ es el área del EI que corresponde a 489810; [Fenol] es la concentración obtenida del compuesto fenólico; H_{Fenol} es la altura obtenida del compuesto fenólico; $H_{Ac. benzoico}$ es la altura del EI que corresponde a 99027.

De acuerdo a lo anterior tenemos como componentes mayoritarios en el extracto a: (+)-catequina, apigenina, y ácido clorogénico; y como componentes minoritarios a: naringina, resveratrol, rutina y ácido cafeico.

Podemos observar las diferencias en las concentraciones de compuestos fenólicos en los extractos de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2, esto debido al cambio estacional. En el extracto de la planta Coahuila 1 encontramos una mayor concentración de naringina, además de la presencia de kaempferol, quercetina y (-)-epicatequina; sin embargo en el extracto de la planta de Coahuila 2 encontramos una mayor concentración de ácido clorogénico, ácido cafeico y resveratrol, los cuales son importantes por ser buenos antioxidantes y poseer características anticancerígenas antibacterianas, y para el ácido clorogénico antimicóticas; para los demás componentes las concentraciones son muy similares sin una variación considerable, y en conjunto los compuestos fenólicos en el extracto representan un herbicida eficiente a base de productos naturales; en lo que respecta a los recubrimientos comestibles pueden fungir como anticancerígenos, reguladores de azúcar en sangre, y antiinflamatorios.

Para la cuantificación del extracto hidrolizado se utilizó como estándar interno el ácido *trans*-cinámico de 201.17 mg/L de concentración, cuyo pico se registró al minuto 9.04 con un área de 170166 y una altura de 41942.

En la tabla 5.9 podemos observar la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto hidrolizado, además de los miligramos de fenol obtenidos por cada 100 g de planta tratada e hidrolizada.

Tabla 5.9 Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

Estándar	t_m	H_{Fenol}	$H_{Fenol}/H_{Ac. trans-cinámico}$	[Fenol] mg/L	mg Fenol/100 g planta
Rutina	7.71	8978	0.2141	100.44	100.44
Apigenina	14.04	12634	0.3012	62.59	62.59

Donde t_m es el tiempo de migración; [Fenol] es la concentración obtenida del compuesto fenólico; H_{Fenol} es la altura obtenida del compuesto fenólico; $H_{Ac. trans-cinámico}$ es la altura del EI que corresponde a 41942.

Como podemos ver que en la tabla 5.9, todos los compuestos fenólicos son cuantificables, ya que las concentraciones obtenidas son mayores que el LC (tabla 5.6).



Se puede apreciar que la concentración de rutina aumenta considerablemente en el extracto hidrolizado, en comparación con el extracto de etanol-agua (70:30), esto significa que rutina a estas condiciones parece no sufrir hidrólisis alguna (contiene dos azúcares asociadas, ver Anexo 2), este aumento de concentración posiblemente se deba a que las condiciones de hidrólisis favorezcan la disolución dentro de la matriz, lo cual coincide con sus propiedades de disolución, las cuales nos dicen que es poco soluble en soluciones alcohólicas y soluble en soluciones alcalinas (O'Neil, y otros, 2001). Por otro lado, de acuerdo a los apartados 5.2.1.3, 5.2.1.4 y 5.2.1.5, se observa que la hidrólisis de rutina se está dando, cuyo pico va disminuyendo progresivamente al aumentar la temperatura de hidrólisis (figura 5.8), también se aprecia esta disminución al aumentar la concentración de NaOH (figura 5.9), además se observa una lenta disminución del pico al aumentar el tiempo de hidrólisis (figura 5.10); lo anterior nos indica que la hidrólisis específicamente de rutina se da en otras condiciones, pero no fue posible identificar los productos de reacción (quercetina e isoquercitrina), posiblemente a que se degraden a estas condiciones. Por lo que se sugiere en estudios posteriores realizar la hidrólisis por medio de enzimas (Cui & Wang, 2012; Chen & Gu, 2011), ya que los productos son de gran importancia.

En el caso de apigenina se puede apreciar el aumento de la concentración en el extracto hidrolizado, en comparación con el extracto de etanol-agua (70:30), esto nos indica que apigenina se encontraba unida a azúcares y la hidrólisis la liberó satisfactoriamente de estos, dándonos concentraciones más altas.

De esta forma podemos establecer que los compuestos mayoritarios en ambas plantas son (+)-catequina, ácido clorogénico, apigenina y rutina, estos compuestos son posiblemente responsables de la inhibición del crecimiento del hongo *Botrytis Cinerea* en pruebas *in vitro* de una muestra de extracto durante 15 días, y pruebas *in vivo* en zarzadoras con recubrimiento biorgánico durante 12 días (Sánchez Soto, 2013), también podemos ver que no sólo estos compuestos están en proporciones mayores, asimismo existen otras señales con mayor proporción que posiblemente provengan de algún compuesto fenólico que aporte a la inhibición de este hongo.

5.4 Determinación de compuestos fenólicos en los recubrimientos biorgánicos a base del extracto de hojasén.

La muestra del recubrimiento se midió directamente en el equipo, en la figura 5.18 se puede apreciar que no hay un cambio del perfil electroforético del recubrimiento en comparación con el extracto, se identificaron los compuestos resveratrol, (+)-catequina, ácido clorogénico y apigenina (figura 5.19).

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de los componentes identificados en el recubrimiento, se utilizó como estándar interno el ácido benzoico de 340.43 mg/L de concentración, cuyo pico se registró al minuto 12.05 con un área de 493215 y una altura de 90690.

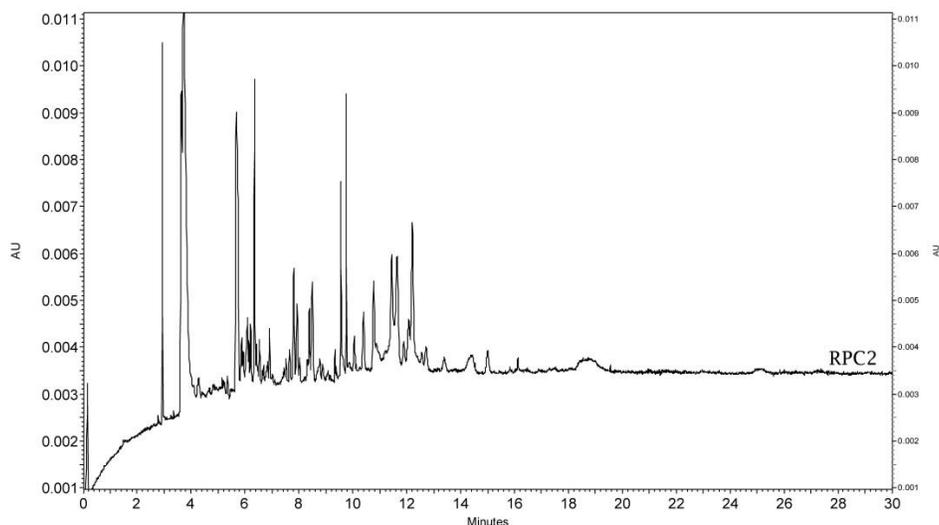


Figura 5.18 Electroferograma del recubrimiento elaborado con el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2.

En la tabla 5.10 podemos observar la concentración de compuestos fenólicos presentes en el recubrimiento, vemos que (+)-catequina y resveratrol no son cuantificables (NC) debido a que su interpolación da concentraciones por debajo del LD (tabla 5.6), pero si vemos la figura 5.19 el pico de (+)-catequina y resveratrol son mayores que tres veces el ruido, por lo que la determinación del LD en base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión no es válido, por lo que se sugiere en estudios posteriores la determinación en base al criterio señal/ruido.

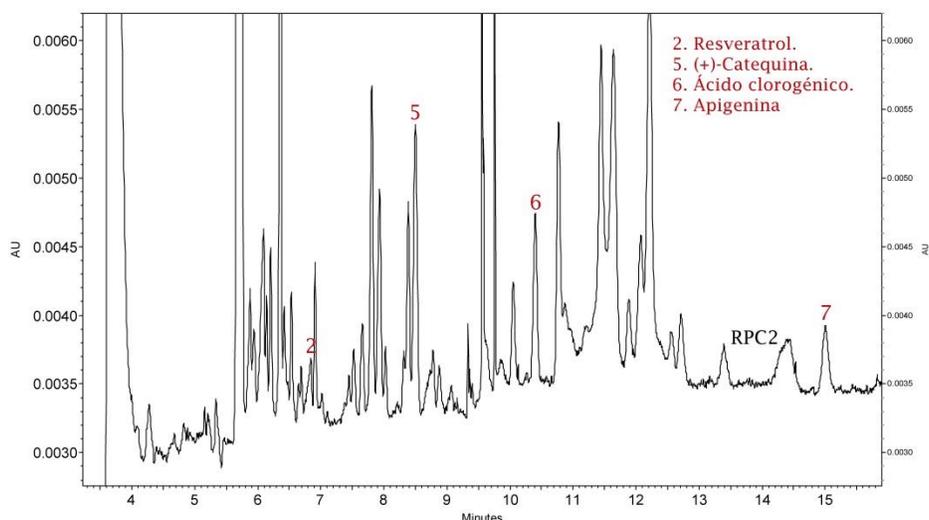


Figura 5.19 Ampliación del minuto 3 al 16 del electroferograma del recubrimiento biorgánico elaborado con el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2.

Los compuestos fenólicos (+)-catequina, apigenina, ácido clorogénico; y resveratrol presentes en los recubrimientos, coinciden con los compuestos mayoritarios de los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas, con excepción de resveratrol (componente minoritario). Es importante señalar que la dilución que se realiza del extracto para elaborar el recubrimiento es de aproximadamente 2.5:50, lo cual coincide con las concentraciones determinadas.



Tabla 5.10 Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos del recubrimiento del extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2.

Compuesto fenólico	t_m	A_{Fenol}	$A_{Fenol}/A_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L
(+)-Catequina	8.19	10706	0.0217	NC
Apigenina	14.01	2774	0.0056	4.8685
	t_m	H_{Fenol}	$H_{Fenol}/H_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L
Resveratrol	6.67	185	0.0020	NC
Ácido clorogénico	9.95	1088	0.0120	19.1202

Donde t_m es el tiempo de migración; A_{Fenol} es el área obtenida del compuesto fenólico; $A_{Ac. benzoico}$ es el área del EI que corresponde a 493215; [Fenol] es la concentración obtenida del compuesto fenólico; H_{Fenol} es la altura obtenida del compuesto fenólico; $H_{Ac. benzoico}$ es la altura del EI que corresponde a 90690; y NC no cuantificable.

Al no tener una concentración clara de los compuestos fenólicos presentes en los recubrimientos, se procedió a concentrar la muestra hasta llegar al volumen inicial del extracto antes de ser añadido al recubrimiento (50:2.5); en la figura 5.20 se puede observar la identificación de resveratrol, (+)-catequina, ácido clorogénico y ácido cafeico en el recubrimiento concentrado.

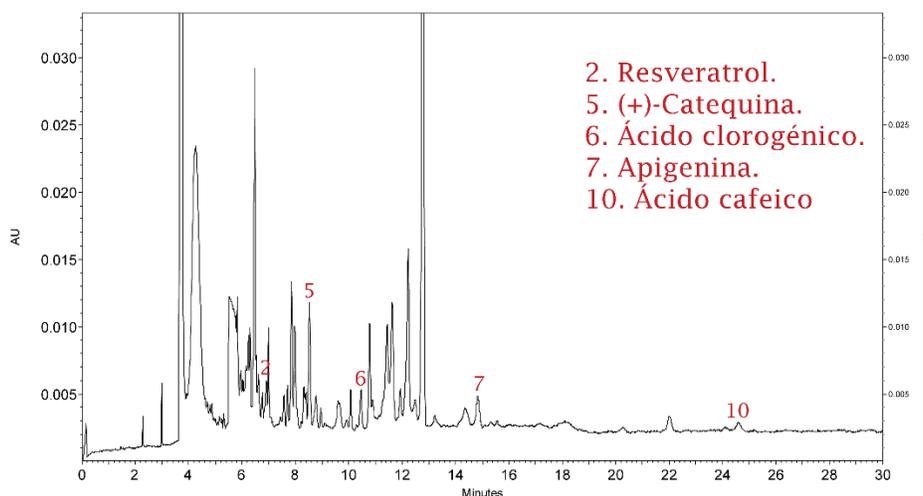


Figura 5.20 Electroferograma del recubrimiento biorgánico concentrado en una proporción 50:2.5 elaborado con el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2.

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de los componentes identificados en el recubrimiento concentrado, se utilizó como estándar interno el ácido benzoico de 340.43 mg/L de concentración, cuyo pico se registró al minuto 12.43 con un área de 317534 y una altura de 56193.

En la tabla 5.11 podemos observar la concentración de compuestos fenólicos presentes en el recubrimiento concentrado, vemos que (+)-catequina y ácido cafeico son cuantificables pero con mayor error, debido a que sus concentraciones están por debajo del LC (tabla 5.6), los demás compuestos son cuantificables.

Vemos que hay una pérdida en la concentración de los compuestos fenólicos en el recubrimiento concentrado con respecto al extracto etanol-agua (70:30), esto posiblemente



al tratamiento que se le dio al recubrimiento para concentrarlo, el cual estuvo mucho tiempo expuesto a temperaturas mayores de 40 °C para llegar al volumen deseado.

Tabla 5.11 Datos de la cuantificación de compuestos fenólicos del recubrimiento concentrado del extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2.

Compuesto fenólico	t_m	A_{Fenol}	$A_{Fenol}/A_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L
(+)-Catequina	8.54	38008	0.1197	37.7634
Apigenina	14.83	17196	0.0542	20.9936
	t_m	H_{Fenol}	$H_{Fenol}/H_{Ac. benzoico}$	[Fenol] mg/L
Resveratrol	6.92	1944	0.0346	10.4045
Ácido clorogénico	10.45	2664	0.0474	77.9986
Ácido cafeico	24.59	600	0.0107	6.0511

Donde t_m es el tiempo de migración; A_{Fenol} es el área obtenida del compuesto fenólico; $A_{Ac. benzoico}$ es el área del EI que corresponde a 317534; [Fenol] es la concentración obtenida del compuesto fenólico; H_{Fenol} es la altura obtenida del compuesto fenólico; $H_{Ac. benzoico}$ es la altura del EI que corresponde a 56193.

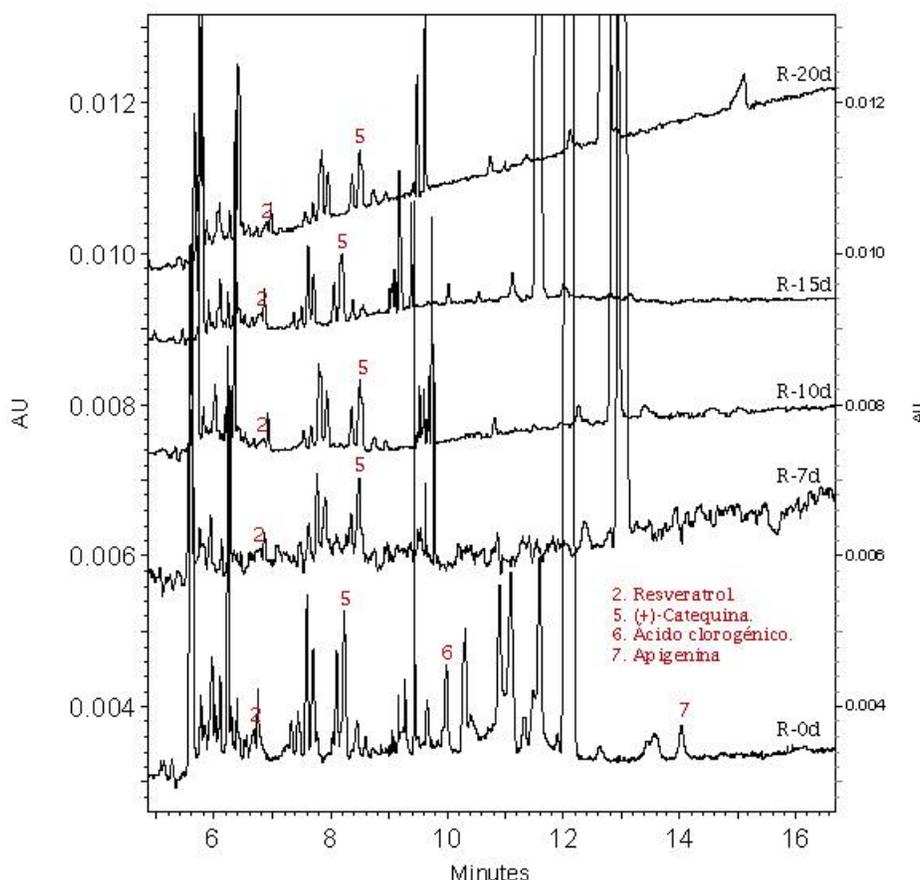


Figura 5.21 Electroferogramas del seguimiento de compuestos fenólicos en los recubrimientos biorgánicos; R-0d) medición después de la preparación; R-7d) medición después de los 7 días de preparación; R-10d) medición después de los 10 días de preparación; R-15d) medición después de los 15 días de preparación; y R-20d) medición después de los 20 días de preparación.



Posteriormente se realizó un seguimiento de los compuestos fenólicos presentes en el recubrimiento biorgánico a los 7, 10, 15 y 20 días después de su preparación; en la figura 5.21 podemos observar que en el momento de la preparación del recubrimiento contamos con los compuestos resveratrol, (+)-catequina, ácido clorogénico y apigenina; después del séptimo día de preparación observamos que los compuestos presentes son resveratrol y (+)-catequina, y se mantienen hasta los 20 días después de la preparación, por lo que concluimos que estos compuestos quizás son los principales en inhibir el crecimiento del hongo *Botrytis Cinerea* en las pruebas realizadas por (Sánchez Soto, 2013).

En general los compuestos estudiados son los principales causantes de la Inhibición del crecimiento micelial del hongo, empleando envases activos en un porcentaje de 64.5% durante 6 días en un tiempo de incubación de 12 días con un porcentaje de inhibición del 11.0%; y recubiertas las zarzamoras se pudo observar una inhibición de hongos hasta 12 días sin algún deterioro de la misma (Sánchez Soto, 2013).

Estos compuestos fenólicos se encuentran relacionados con la capacidad de actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos, estos pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y al DNA; también pueden quelar iones metálicos de transición, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , que ayudan a catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos positivos en pruebas in vitro sobre el control de bacterias y hongos; además en cuestión de salud se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Martínez-Flores, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2012).

5.5 Caracterización de las huellas digitales de diferentes especies vegetales de hojaseén por electroforesis capilar.

Este tipo de técnica nos ayuda a identificar las especies de hojaseén por medio del perfil electroforético (huella digital), de las diferentes especies en estudio. Se compararon los perfiles electroforéticos de las dos plantas utilizadas. En la figura 5.22 tenemos los perfiles de las dos especies de hojaseén (*Flourensia cernua* D.C. Y *Cassia angustifolia* Vahl.) en las cuales se realizó este estudio.

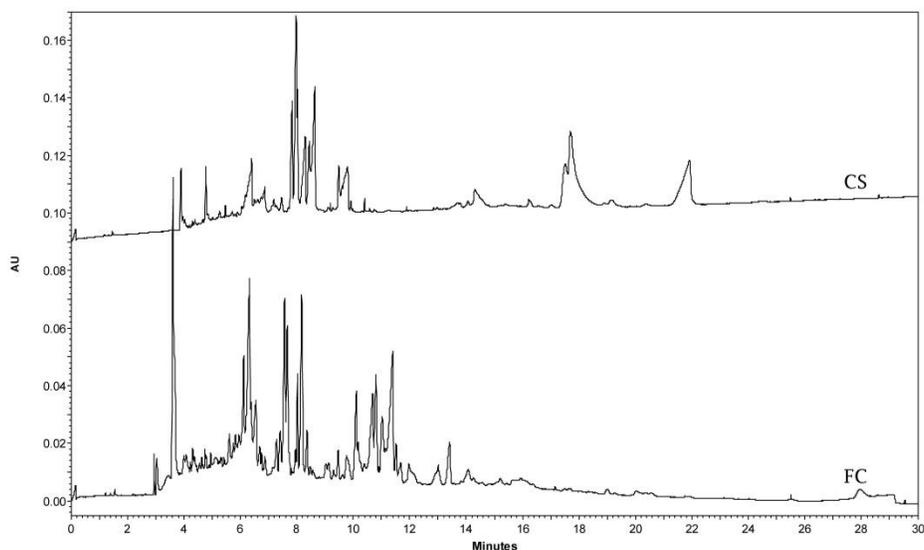


Figura 5.22 Electroferogramas de extracción con etanol-agua (70:30) asistida por ultrasonido de diferentes especies de Hojasén: FC) para la planta *Flourensia cernua* D.C. CS) para la panta *Cassia angustifolia* Vahl.

Podemos observar que el perfil de compuestos fenólicos, es totalmente distinto en cada especie, por lo que tenemos la huella digital característica de cada una. Estos diferentes perfiles de cada planta, pueden ser debidos al muy particular metabolismo de los compuestos fenólicos de cada especie, siendo útil en éste caso, para su caracterización.

En el caso de las plantas de la especie de *Flourensia cernua* D.C., se comparan los perfiles electroforéticos para ver las diferencias debidas a cambios estacionales, en los materiales vegetales de Coahuila 1 y 2. En la figura 5.23 observamos los perfiles de las dos plantas.

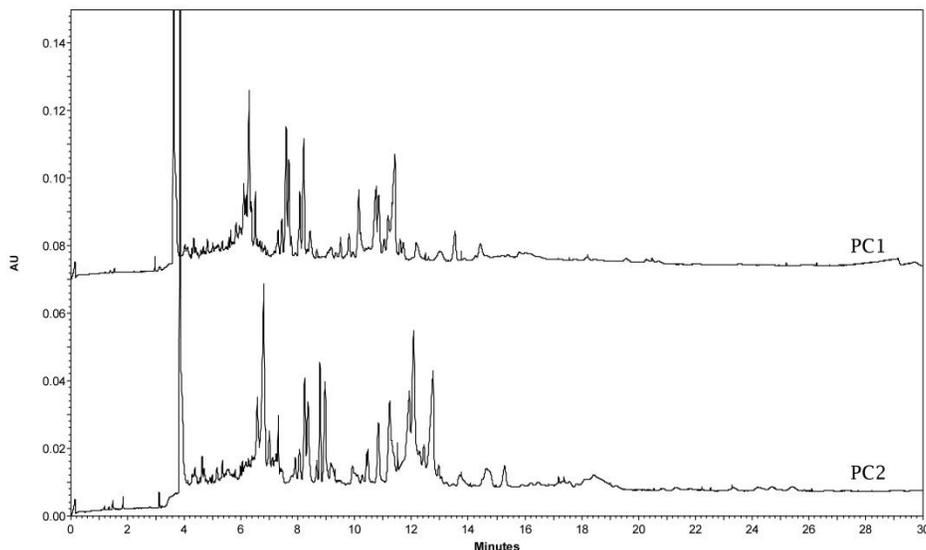


Figura 5. 23 Electroferogramas de extracción con etanol-agua (70:30) asistida por ultrasonido: PC1) para la planta Coahuila 1. PC2) para la panta Coahuila 2.

Podemos observar que no hay cambio de perfil (huella digital) de los compuestos fenólicos en función de la estación en la que se obtuvo el material vegetal; sin embargo, observamos diferencias en las alturas de los picos con el cambio en la estación. Otra posible causa de



esta diferencia en la altura de los picos, es que la planta Coahuila 2 fue proporcionada con flores, mientras que la Coahuila 1 (no floreaba) debido a la época del año, por lo que probablemente podría pensarse que las flores, contribuyen en mayor medida al aumento en el contenido de compuestos fenólicos, en particular los señalados en apartado 5.3.6.

Es importante mencionar que en los mercados de México, donde se venden hierbas medicinales, la venta de hojaseén no está regulada, por lo que se comercializan las distintas especies de hojaseén de forma indistinta. Ya se ha visto que la composición de cada una es muy diferente, por lo que este estudio es importante para la caracterización de cada especie mediante su huella digital y que de esta forma el consumidor pueda obtener los resultados que espera del material vegetal adquirido.

Conclusiones.

En este trabajo se realizó exitosamente la optimización del método de extracción de los compuestos fenólicos de la planta hojaseñ (Flourensia cernua DC) y su hidrolizado, para su posterior determinación por Electroforesis Capilar.

Se identificaron hasta 10 polifenoles presentes en los extractos de Flourensia cernua DC. codificados como Coahuila 1 y Coahuila 2 observando un aumento en la señal de cada polifenol al realizar la adición de su estándar correspondiente. Esta identificación se corroboró al comparar los espectros de absorción obtenidos



Conclusiones





6. Conclusiones.

- En este trabajo se realizó exitosamente la optimización del método de extracción de los compuestos fenólicos de la planta hojaseén (*Flourensia cernua DC*) y su hidrolizado, para su posterior determinación por Electroforesis Capilar.
- Se identificaron hasta 10 compuestos fenólicos presentes en los extractos de *Flourensia cernua DC*. codificados como Coahuila 1 y Coahuila 2 observando un aumento en la señal de cada polifenol al realizar la adición de su estándar correspondiente. Esta identificación se corroboró al comparar los espectros de absorción obtenidos del extracto con los de su estándar.
- Se realizó el diseño y los experimentos correspondientes para obtener las curvas de calibración de los compuestos fenólicos y obtener sus modelos correspondientes. Lo anterior con la finalidad de realizar la cuantificación de estos compuestos en los extractos de *Flourensia cernua DC*. y los extractos hidrolizados.
- Fue posible obtener las huellas digitales de las distintas especies vegetales conocidos como hojaseén realizando la medición de los compuestos fenólicos por electroforesis capilar. Este perfil electroforético contribuye a la identificación de cada especie y particularmente a la especie *Flourensia cernua DC*.
- La gran cantidad de compuestos fenólicos encontrados en los extractos analizados explica la actividad antimicótica y protectora de los recubrimientos biorgánicos aplicados a la zarzamora donde se reportó un aumento considerable en la vida postcocecha de éste fruto (Sánchez Soto, 2013; Vargas-Martínez & Trejo-Márquez, 2013).



7. Bibliografía.

- Moyeda Gaspar, J. Y. (28 de Marzo de 2013). *Uso del extracto metanólico de las hojas de Flourensia cernua (hojasén) como antimicrobiano en bacterias periodontopatogénicas: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN*. Obtenido de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN: <http://www.uanl.mx/content/uso-del-extracto-metanolico-de-las-hojas-de-flourensia-cernua-hojasen-como-antimicrobiano-en>
- Allais, D. P. (1995). 3-Desoxycallunin and 2"-acetylcallunin, two minor 2,3-dihydroflavonoid gluco-sides from *Calluna vulgaris*. *Phytochemistry*, 39, 427.
- Andersen, Ø. M., & Markham, K. R. (2006). *FLAVONOIDS: Chemistry, Biochemistry and Applications*. United States of America: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Anderson, B. S., Hunt, J. W., Phillips, B. M., Nicely, P. A., Vlaming, V., Connor, V., Tjeerdema, R. S. (2003). Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution*, 124, 523–532.
- Atindehou, K. K. (2001). Three new prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *Planta Med.*, 68, 181.
- Barnola, L. F., Cedeño, A., & Hasegawa, M. (1997). Intraindividual variations of volatile terpene contents in *Pinus caribaea* needles and its possible relationship to *Atta laevigata* herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 707-716.
- Benthin, B., Danz, H., & Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *J. Chromatogr. A*, 837, 211.
- Bevan, C. D., & Marshall, P. S. (1994). The use of supercritical fluids in the isolation of natural products. *Nat.Prod.Rep*, 11, 451.
- Bilia, A. R. (1996). Flavans and A-type proanthocyanidins from *Prunus prostrata*. *Phytochemistry*, 43, 887.
- Billeter, M., Meier, B., & Sticher, O. (1991). 8-Hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*, 30, 987.
- Byrd, D. W., McArthur, E. D., Wang, H., Graham, J. H., & Freeman, D. C. (1999). Narrow hybrid zone between two subspecies of big sagebrush, *Artemisia tridentata* (Asteraceae). VIII. Spatial and temporal pattern of terpenes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 11-25.
- Carlton, R. R. (1990). Kaempferol-3-(2,3-diacetoxy-4-p-coumaroyl)rhamnoside from leaves of *Myrica gale*. *Phytochemistry*, 29, 2369.



- Castillo, M. A., Revilla, A. L., López, R., & Rivera, P. (2005). *Fundamentos de electroforesis capilar*. México: UNAM.
- Chen, P., & Gu, J. (2011). A rapid measurement of rutin-degrading enzyme activity in extract of tartary buckwheat seeds. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 81–85.
- Conway, W. D. (1990). *Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Application*. New York: VCH PublisherS.
- Cooke, D. E., Young, V., Birch, P. R., Toth, R., Gourlay, F., Day, J. P., Duncan, J. M. (2003). Phenotypic and genotypic diversity of infestans populations in Scotland (1995–97). *Plant Pathology*, 52, 181–192.
- Correll, S. D., & Johnston, C. M. (1970). *Manual of the Vascular Plants of Texas*. Texas: Texas Research Foundation.
- Cui, X.-d., & Wang, Z.-h. (2012). Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds. *Food Chemistry*, 132, 60–66.
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076–1080.
- Dawidowicz, A. (2003). Optimization of ASE conditions for the HPLC determination of rutin and isoquercitrin in *Sambucus nigra* L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 26, 2381.
- Dillon, M. O., Mabry, T. J., Besson, E., Bouillant, M. L., & Chopin, J. (1976). New flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 15, 1085-1086.
- Ducrey, B. (1995). Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (*Onagraceae*) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry*, 38, 129.
- Estell, R. E., Fredrickson, E. L., & Havstad, K. M. (1991). Chemical composition of *Flourensia cernua* at four growth stages. *Grass and Forage Science*, 51, 434-441.
- Estell, R. E., Havstad, K. M., Fredrickson, E. L., & Gardea-Torresdey, J. L. (1994). Secondary Chemistry of the Leaf Surface of *Flourensia cernua*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22, 73-77.
- Estell, R. E., James, D. K., Fredrickson, E. L., & Anderson, D. M. (2013). Within-plant distribution of volatile compounds on the leaf surface of *Flourensia cernua*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 144-150.
- Fenton, T. W., Leung, J., & Clandinin, D. R. (1980). Phenolic components of rapeseed meal. *Journal of Food Science*, 45, 1702-1705.



- Ferrer, M. M., Eguiarte, L. E., & Montaña, C. (2004). Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert. *Annals of Botany*, 94, 419-126.
- Fiorini, M. (1995). Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *J. Chromatogr. A*, 692, 213.
- Flagg, M. L. (2000). Two novel flavanones from *Greigia sphacelata*. *J. Nat. Prod.*, 63, 1689.
- Fredrickson, E. L., Estell, R. E., Havstad, K. M., Shupe, W. L., & Murray, L. W. (2000). The effect of feeding ewe lambs a 15% tarbush (*Flourensia cernua* DC) pellet pre- and post-weaning on the subsequent diet selection of tarbush. *Journal of Arid Environments*, 44, 123-131.
- Gamboa-Alvarado, R., Hernández-Castillo, F. D., Guerrero-Rodríguez, E., & Sánchez-Arizpe, A. (2003). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con Extractos Vegetales Metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.) Schl. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 21, 13-18.
- Ganzler, K., Szinai, L., & Salgo, A. (1990). Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr.*, 520, 257.
- Gather, S. (1996). Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med.*, 62, 67.
- Gile, L. H., Gibbenst, R. P., & Lenz, J. M. (1998). Soil-induced variability in root systems of creosotebush (*Larrea tridentata*) and tarbush (*Flourensia cernua*). *Journal of Arid Environments*, 39, 57-78.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids*. USA: Springer.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., & Sandoval-López, V. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* D.C. en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc.* y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25, 48-53.
- Hamburger, M., Baumann, D., & Adler, S. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants — effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochem. Anal.*, 15, 46.
- Harborne, J. B. (1988). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. London: Chapman & Hall.
- Harborne, J. B. (1989). *General procedures and measurement of total phenolics*. London: Academic Press.



- Hostettmann, K., Marston, A., & Hostettmann, M. (1998). *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. Berlin: Springer-Verlag.
- Hussein, L., Fattah, M. A., & Salem, E. (1990). Characterization of pure proanthocyanidins isolated from the hulls of faba beans. *Agric. Food Chem.*, 38, 95.
- Hyder, P. W., Fredrickson, E. L., Estell, R. E., Lucero, M. E., & Remmenga, M. D. (2005). Loss of phenolic compounds from leaf litter of creosotebush [*Larrea tridentata* (Sess. & Moc. ex DC.) Cov.] and tarbush (*Flourensia cernua* DC.). *Journal of Arid Environments*, 61, 79–91.
- Instituto de Biología. (s.f.). "*Flourensia cernua* - IBUNAM:MEXU:ASTsn1578". Universidad Nacional Autónoma de México., UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-02-15. Recuperado el 3 de marzo de 2014, de <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:ASTsn1578>
- Jarvis, A. P., & Morgan, E. D. (1997). Isolation of plant products by supercritical fluid extraction. *Phytochem. Anal.*, 8, 217.
- Kapadia, G. J., Oguntimein, B., & Shukla, Y. N. (1994). High-speed countercurrent chromatographic separation of biflavonoids from *Garcinia kola* seeds. *J. Chromatogr. A*, 673, 142.
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, 105.
- Kidron, G. J., & Gutschick, V. P. (2013). Soil moisture correlates with shrub–grass association in the Chihuahuan Desert. *Catena*, 107, 71-79.
- Kingston, D. G., Rao, M. M., Spittler, T. D., Pettersen, R. C., & Cullen, D. L. (1975). Sesquiterpenes from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 14, 2033-2037.
- Kozłowska, H., Rotkiewicz, D. A., & Zadernowski, R. (1983). Phenolic acids in rapeseed and mustard. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 1119-1123.
- Krauze-Baranowska, M. (1999). Antifungal biflavones from *Cupressocyparis leylandii*. *Planta Med.*, 65, 572.
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 330-334.
- Lee, T.-H. (2000). Three new flavonol galloylglycosides from leaves of *Acacia confusa*. *J. Nat. Prod.*, 63, 710.
- Leutert, T., & Von Arx, E. (1984). Präparative Mitteldruck-flüssigkeitschromatographie (Preparative medium-pressure liquid chromatography). *J. Chromatogr.*, 292, 333.



- Liu, Y., Wagner, H., & Bauer, R. (1996). Nevadensin glycosides from *Lysionotus pauciflorus*. *Phytochemistry*, *42*, 1203.
- Ludwig, J. A., Reynolds, J. F., & Whitson, P. D. (1975). Size-biomass relationships of several Chihuahuan Desert shrubs. *American Midland Naturalist*, *94*, 451-461.
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag.
- Maillard, M. N., & Berset, C. (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 1789-1793.
- Marston, A., Slacanin, I., & Hostettmann, K. (1990). Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products. *Phytochem. Anal.*, *1*, 3.
- Martínez, M. (1991). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de cultura económica.
- Martínez, M. (1993). *Las plantas medicinales de México*. México, D. F.: Botas.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2012). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, *318*, 271-278.
- Mata, R., Bye, R., Linares, E., Macías, M., Rivero-Cruz, I., Pérez, O., & Timmermann, B. N. (2003). Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, *64*, 285-291.
- Mauchamp, A., & Janeauf, J. L. (1993). Water funnelling by the crown of *Flourensia cernua*, a Chihuahuan Desert shrub. *Journal of Arid Environments*, *25*, 299-306.
- McKee, T. C. (1997). Isolation and characterization of new anti-HIV and cytotoxic leads from plants, marine, and microbial organisms. *J. Nat. Prod.*, *60*, 431.
- Modey, W. K., Mulholland, D. A., & Raynor, M. W. (1996). Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochem. Anal.*, *1*, 1.
- Montaña, C., Cavagnarot, B., & Briones, O. (1995). Soil water use by co-existing shrubs and grasses in the Southern Chihuahuan Desert, Mexico. *Journal of Arid Environments*, *31*, 1-13.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*, 5735-5741.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., & Scaccini, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and



- ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79, 119-124.
- Nunome, S. (2004). In vitro antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*. *Planta Med.*, 70, 76.
- Nyiredy, S., Dallenbach-Tolke, K., & Sticher, O. (1988). The "PRISMA" optimization system in planar chromatography. *J. Planar Chromatogr.*, 1, 336.
- O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E., Obenchain, J. R., Gallipeau, J. R., & D'Arecca, M. A. (2001). *The merck index an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (Thirteenth edition). Whitehouse Station, NJ, E.U.: MERCK & CO., INC.
- Orjala, J. (1993). New monoterpene-substituted dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Helv. Chim. Acta*, 76, 1481.
- Pineiro, Z., Palma, Z., & Barroso, C. G. (2004). Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *J. Chromatogr. A*, 1026, 19.
- Queiroz, E. F. (2002). Prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *J. Nat. Prod.*, 65, 403.
- Ramírez-Legarreta, M. R., & Jacobo-Cuéllar, J. L. (2002). Impacto Ambiental del Uso de Plaguicidas en Huertos de Manzano del Noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20, 168-173.
- Rao, M. M., Kingston, D. G., & Spittler, T. D. (1970). Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, 9, 227-228.
- Ruiz-Martínez, J., Ascacio, J. A., Rodríguez, R., Morales, D., & Aguila, C. N. (2011). Phytochemical screening of extracts from some Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 2791-2797.
- Sánchez Soto, A. (2013). CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES Y SU APLICACIÓN COMO ENVASE ACTIVO EN ZARZAMORA (*Rubus fruticosus*) PARA EL CONTROL DE PODREDUMBRE GRIS. *Tesis para obtener el título de Ingeniera en Alimentos*.
- Santos-Buelga, C., & Williamson, G. (2003). *Methods in Polyphenol Analysis*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Sargenti, S. R., & Vichniewski, W. (2000). Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. *Phytochem. Anal.*, 11, 69.
- Schaper, C., Dillenburger, A., Poloni, A. C., Roberto, M., Bogusz, S., Augusto, C., & Teixeira, H. (2012). Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. *Food Research International*, 48, 763–768.

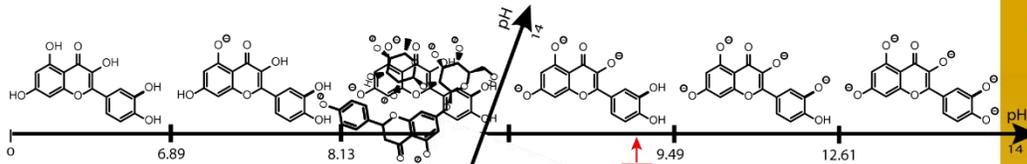


- Schaufelberger, D. E. (1991). Applications of analytical high-speed counter-current chromatography in natural products chemistry. *J. Chromatogr.*, 538, 45.
- Schaufelberger, D., & Hostettmann, K. (1985). Analytical and preparative reversed-phase liquid chromatography of secoiridoid glycosides. *J. Chromatogr.*, 346, 396.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental*. España: Mc Graw Hill.
- Slimestad, R., Marston, A., & Hostettmann, K. (1996). Preparative separation of phenolic compounds from *Picea abies* by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A*, 719, 438.
- Smith, R. M. (2003). Before the injection modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A*, 1000, 3.
- Sosulski, F. (1979). Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56, 711-715.
- Tellez, M. R., Estell, R. E., Fredrickson, E. L., & Havstad, K. M. (1977). Essential Oil of *Flourensia cernua* DC. *J. Essent. Oil Res.*, 9, 619-624.
- Tellez, M., Estell, R., Fredrickson, E., Powell, J., Wedge, D., Schrader, K., & Kobaisy, M. (2001). Extracts of *Flourensia cernua* (L): volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2263-2285.
- Valencia-Diaz, S., & Montana, C. (2005). Temporal variability in the maternal environment and its effect on seed size and seed quality in *Flourensia cernua* DC. (Asteraceae). *Journal of Arid Environments*, 63, 686-695.
- Vargas-Martínez, M. G., & Trejo-Márquez, M. A. (2013). *Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas*. Informe técnico de proyecto del Fondo de Innovación Tecnológico Secretaría de Economía - CONACyT.
- Vasange, M. (1997). The flavonoid constituents of two *Polypodium* species (Calaguala) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta Med*, 63, 511.
- Whalen, M. M., Wilson, S., Gleghorn, C., & Loganathan, B. G. (2003). Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environmental Research*, 92, 213-220.
- Yang, Y., & Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 308-313.

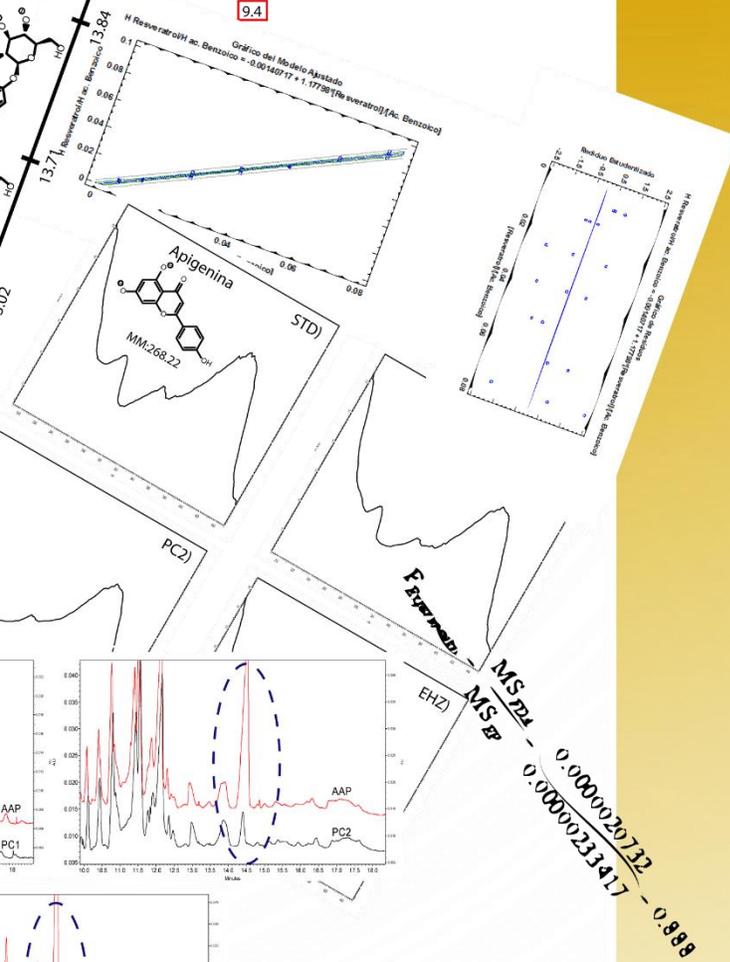
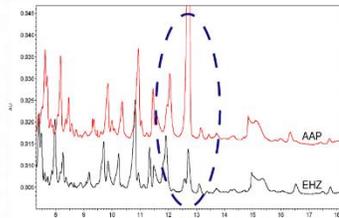
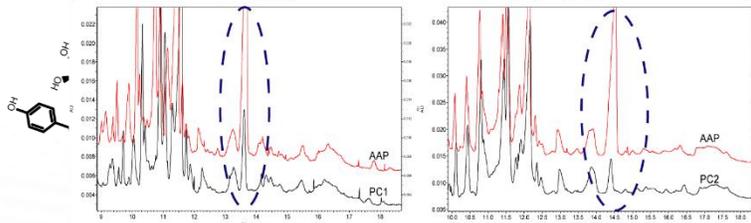


- Zavala, D., Carrillo, M. L., Alvarado, B., & Sánchez, A. O. (2010). Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de hojásén (*Flourensia cernua*). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 50-54.
- Zhang, T. Y. (1988). Separation of flavonoids in crude extract from sea buckthorn by countercurrent chromatography with two types of coil planet centrifuge. *J. Liq. Chromatogr.*, 11, 233.

Quercetina



Naringina



Anexos





Anexos.

Anexo 1: Detalle de la preparación de las soluciones patrón para la realización de la curva de calibración.

Grupo A.

Para el grupo A se preparó una solución patrón que consistió en los estándares de ácido *trans*-cinámico y ácido benzoico, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla A.1 para cada estándar y se llevó a un aforo de 100 mL.

Tabla A.1 Datos de la preparación de la solución patrón del grupo A

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V _{aforo} (mL)	[Fenol] (mg/L)
Ácido <i>trans</i> -cinámico	0.1016	99	100	1005.84
Ácido benzoico	0.1703	99.95	100	1702.15

De esta forma se tiene en la misma solución una concentración de ácido benzoico de 1702.15 mg/L y de ácido *trans*-cinámico de 1005.84 mg/L, ya que éstos son estándares internos, están presentes en la misma concentración para todos los puntos de la curva de calibración, por lo que se adicionan 10 mL de esta solución en cada una de las soluciones de la curva de calibración y son aforadas a 50 mL, se obtiene una concentración final de ácido benzoico de 340.43 mg/L y de ácido *trans*-cinámico de 201.17 mg/L, en la tabla A.2 se muestran las concentraciones para cada solución de la curva de calibración.

Tabla A.2 Datos de la preparación de la curva de calibración a partir de la solución patrón del grupo A

Solución	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[Ac. benzoico] (mg/L)	[Ac. <i>trans</i> -cinámico] (mg/L)
1	50	10	340.43	201.17
2	50	10	340.43	201.17
3	50	10	340.43	201.17
4	50	10	340.43	201.17
5	50	10	340.43	201.17
6	50	10	340.43	201.17
7	50	10	340.43	201.17

Grupo B.

Para el grupo B se preparó una solución patrón que consistió en los estándares de naringina y resveratrol, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla A.3 para cada estándar y se llevó a un aforo de 100 mL.

Tabla A.3 Datos de la preparación de la solución patrón del grupo B.

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V (mL)	[Fenol] (mg/L)
Naringina	0.0580	95	100	551.00
Resveratrol	0.0217	99	100	214.83

A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la curva de calibración; en la tabla A.4 se muestra la preparación en base a la cantidad de volumen adicionado de la solución patrón, volumen de aforo, así como la concentración final para cada estándar.



Tabla A.4 Datos de la preparación de la curva de calibración elaborada a partir de la solución patrón del grupo B.

Solución	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[Naringina] (mg/L)	[Resveratrol] (mg/L)
1	50	0.5	5.51	2.15
2	50	1	11.02	4.30
3	50	2	22.04	8.60
4	50	3	33.06	12.89
5	50	4	44.08	17.19
6	50	5	55.10	21.49
7	50	6	66.12	25.78

Grupo C.

Para el grupo C se preparó una solución patrón que consistió en los estándares de rutina y (-)-epicatequina, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla A.5 para cada estándar y se llevó a un aforo de 50 mL.

Tabla A.5 Datos de la preparación de la solución stock del grupo C.

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V (mL)	[Fenol] (mg/L)
Rutina	0.0487	94	50	915.56
(-)-Epicatequina	0.0334	90	50	601.20

A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la curva de calibración; en la tabla A.6 se muestra la preparación en base a la cantidad de volumen adicionado de la solución patrón, volumen de aforo, así como la concentración final para cada estándar.

Tabla A.6 Datos de la preparación de la curva de calibración elaborada a partir de la solución patrón del grupo C.

Solución	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[Rutina] (mg/L)	[(+)-Epicatequina] (mg/L)
1	50	0.5	9.16	6.01
2	50	1	18.31	12.02
3	50	2	36.62	24.05
4	50	3	54.93	36.07
5	50	4	73.24	48.10
6	50	5	91.56	60.12
7	50	6	109.87	72.14

Grupo D.

Para el grupo D se preparó una solución patrón que consistió en los estándares de (+)-catequina y apigenina, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla A.7 para cada estándar y se llevó a un aforo de 100 mL.

Tabla A.7 Datos de la preparación de la solución patrón del grupo D.

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V (mL)	[Fenol] (mg/L)
(+)-Catequina	0.1229	98	100	1204.42
Apigenina	0.0318	97	100	308.46

A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la curva de calibración, en la tabla A.8 se muestra la preparación en base a la cantidad de volumen adicionado de la solución patrón, volumen de aforo, así como la concentración final para cada estándar.



Tabla A.8 Datos de la preparación de la curva de calibración elaborada a partir de la solución patrón del grupo D.

Solución	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[(+)-Catequina] (mg/L)	[Apigenina] (mg/L)
1	50	4	96.35	24.68
2	50	5	120.44	30.85
3	50	6	144.53	37.02
4	50	7	168.62	43.18
5	50	8	192.71	49.35
6	50	9	216.80	55.52
7	50	10	240.88	61.69

Grupo E.

Para el grupo E se preparó una solución patrón de ácido clorogénico pesando 0.0662 g y llevándolo a un aforo de 25 mL, se obtuvo una concentración de 2515.6 ppm (tabla A.9).

Tabla A.9 Datos de la preparación de la solución patrón del grupo E.

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V (mL)	[Fenol] (mg/L)
Ac. clorogénico	0.0662	95	25	2515.60

A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la curva de calibración, en la tabla A.10 se muestra la preparación en base a la cantidad de volumen adicionado de la solución patrón, volumen de aforo, así como la concentración final para éste estándar.

Tabla A.10 Datos de la preparación de la curva de calibración elaborada a partir de la solución patrón del grupo E.

Solución	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[Ac. clorogénico] (mg/L)
1	50	0.5	25.16
2	50	1	50.31
3	50	2	100.62
4	50	3	150.94
5	50	4	201.25
6	50	5	251.56
7	50	6	301.87

Grupo F.

Para el grupo F se preparó una solución patrón que consistió en los estándares de kaempferol, quercetina y ácido cafeico, se pesó la cantidad de acuerdo a la tabla A.11 para cada estándar y se llevó a un aforo de 200 mL.

Tabla A.11 Datos de la preparación de la solución patrón del grupo F.

Estándar	Peso (g)	Pureza (%)	V (mL)	[Fenol] (mg/L)
Kaempferol	0.0169	97	200	81.97
Quercetina	0.0189	98	200	92.61
Ac. Cafeico	0.0314	98	200	153.86

A partir de esta solución se prepararon las soluciones de la curva de calibración, en la tabla A.12 se muestra la preparación en base a la cantidad de volumen adicionado de la solución patrón, volumen de aforo, así como la concentración final para cada estándar.

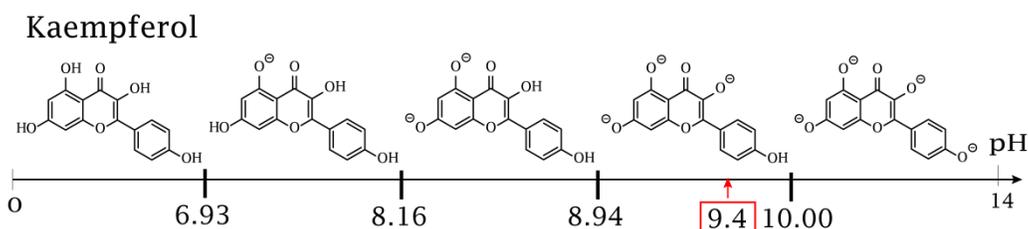
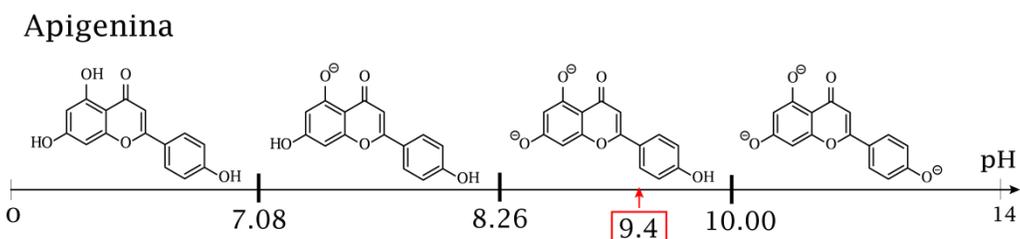
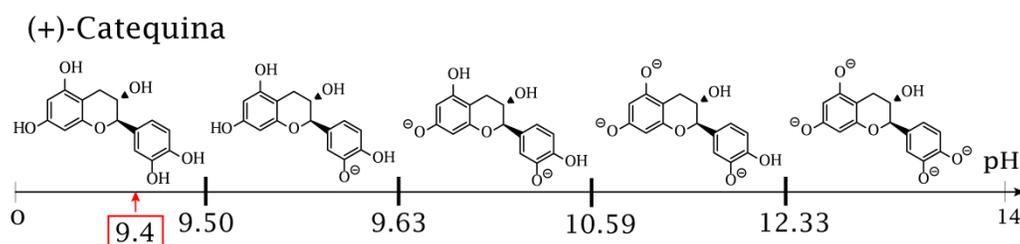
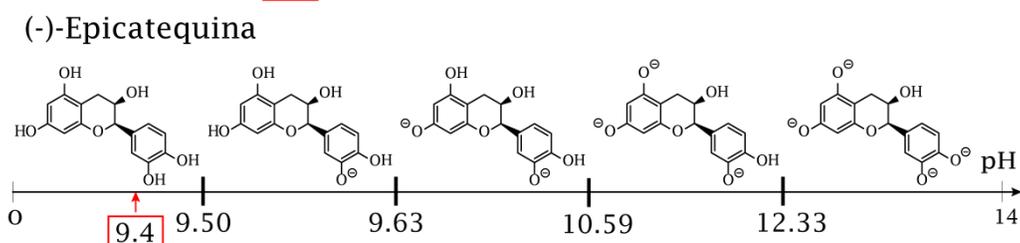
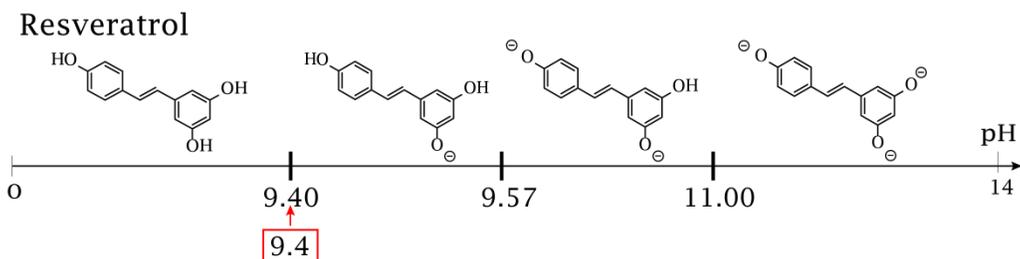
Tabla A.12 Datos de la preparación de la curva de calibración elaborada a partir de la solución patrón del grupo F.

Sistema	V _{aforo} (mL)	V _{adicionado} (mL)	[Kaempferol] (mg/L)	[Quercetina] (mg/L)	[Ac. cafeico] (mg/L)
1	50	1	1.64	1.85	3.08
2	50	2	3.28	3.70	6.15
3	50	3	4.92	5.56	9.23
4	50	4	6.56	7.41	12.31
5	50	5	8.20	9.26	15.39
6	50	6	9.84	11.11	18.46
7	50	7	11.48	12.97	21.54



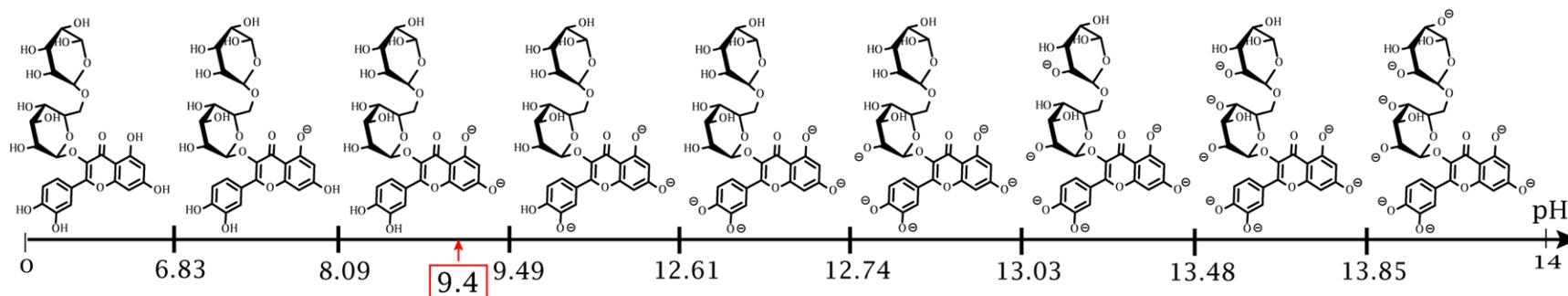
Anexo 2: Escalas de zonas de predominio de los compuestos fenólicos de interés.

Las siguientes EZP muestran las especies de compuestos fenólicos presentes en el rango de pH de 0 a 14, además señala la especie predominante a pH de 9.4.

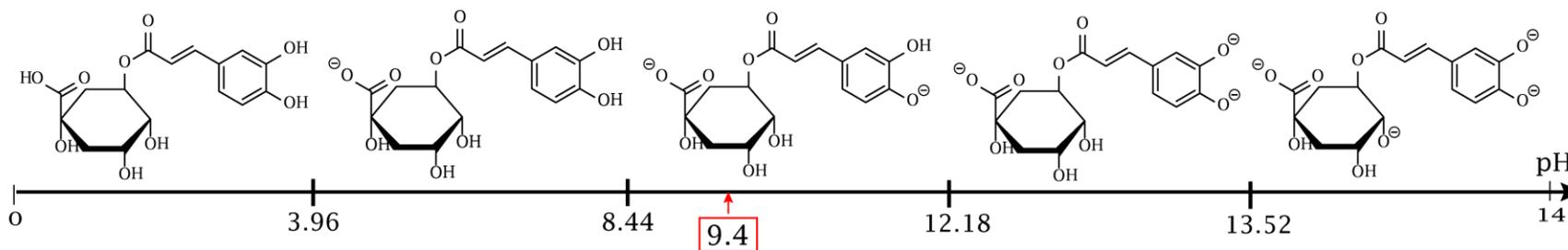




Rutina

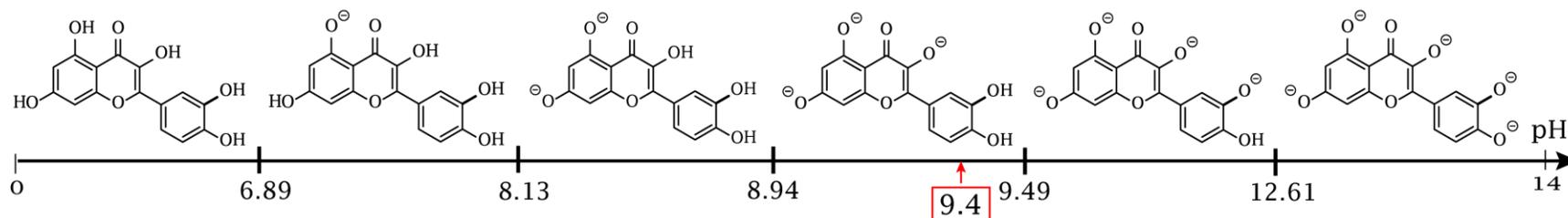


Ácido clorogénico

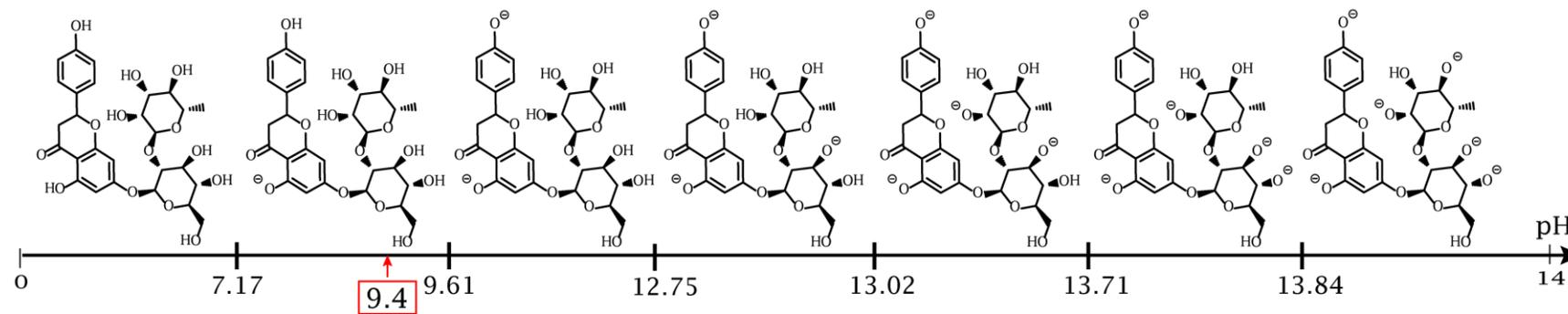




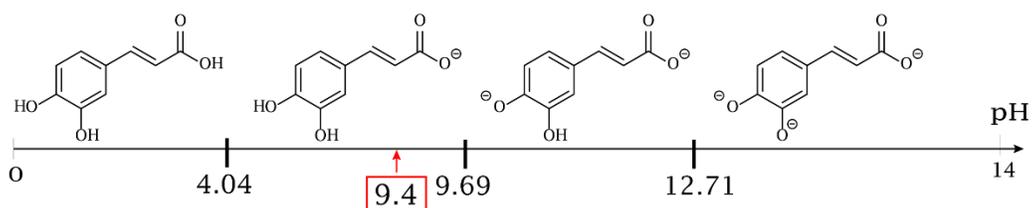
Quercetina



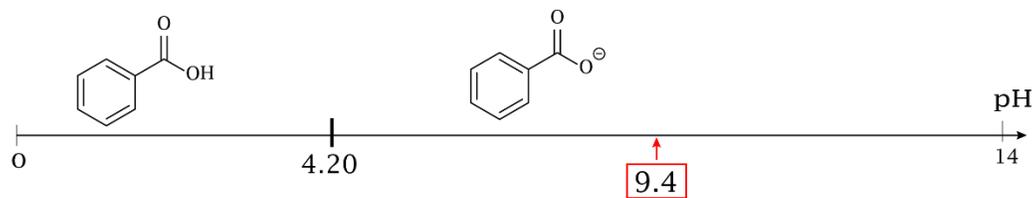
Naringina



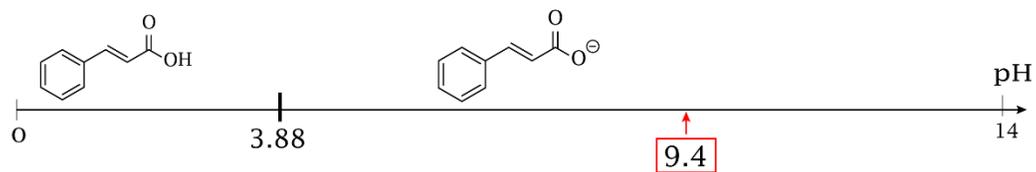
Ácido cafeico



Ácido benzoico



Ácido *trans*-cinámico



Anexo 3: Identificación de los compuestos fenólicos presentes en la planta hojásén (*Flourensia cernua* D.C.) por CE.

Naringina.

En la figura A.1 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza ANR pertenece a la adición del estándar de naringina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 6.4 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza ANR a la adición del estándar de naringina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 6.2 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de naringina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

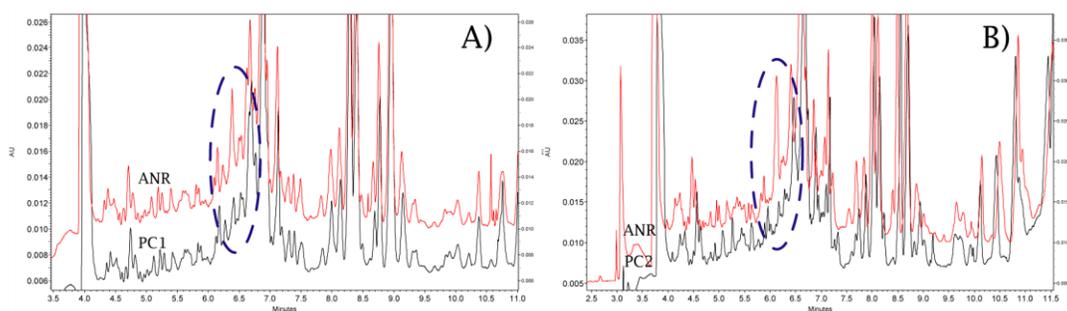


Figura A.1 Electroferogramas de la identificación de naringina por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos. En la figura A.2 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de naringina, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, y PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de STD en PC1 y en el caso de PC2 hay muy poca diferencia, los máximos que cuenta STD son aproximadamente en 190 y 260 nm, en el caso de PC1 coinciden estos máximos y para PC2 sólo el de 260 nm difiere por 10 nm. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de naringina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

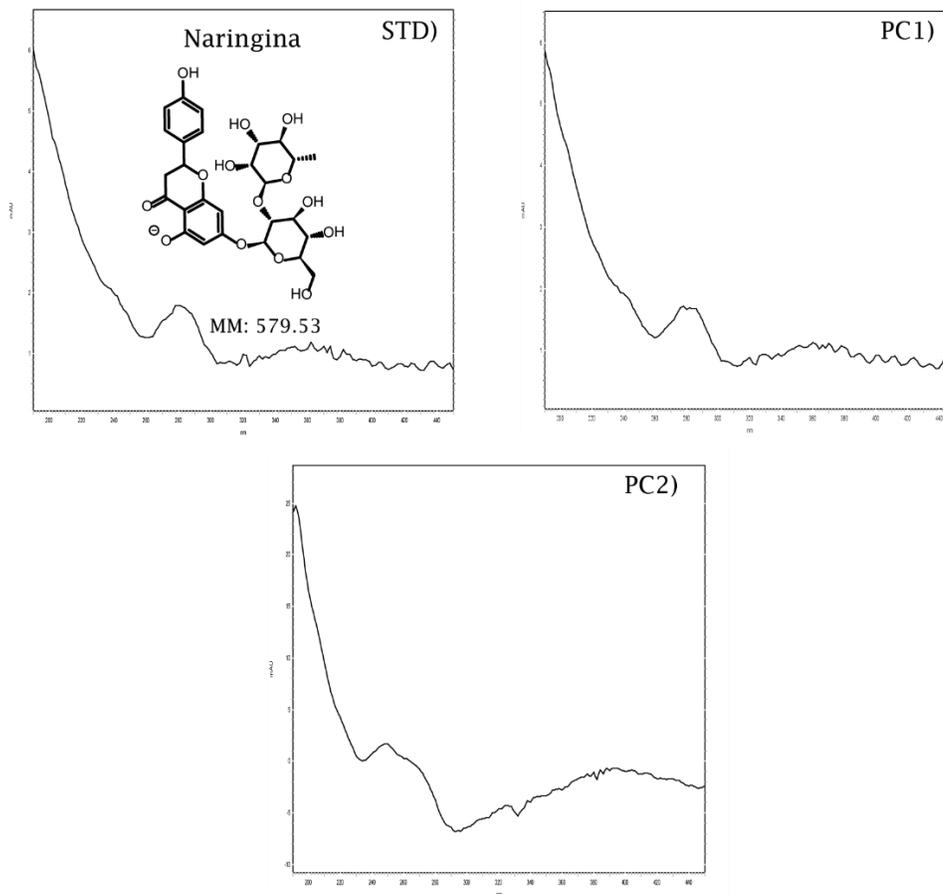


Figura A.2 Espectros de absorción de naringina.

Resveratrol.

En la figura A.3 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza ARS pertenece a la adición del estándar de resveratrol al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 7.0 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza ARS a la adición del estándar de resveratrol al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 7.1 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de resveratrol en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

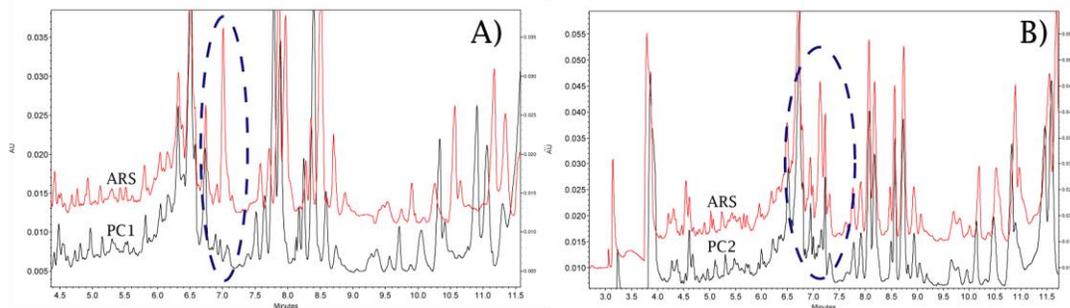


Figura A.3 Electroferogramas de la identificación de resveratrol por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos. En la figura A.4 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de resveratrol, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, y PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de STD en PC1 y PC2, el máximo que tiene STD está aproximadamente en 190 nm, lo cual coincide para PC1 y PC2. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de resveratrol en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

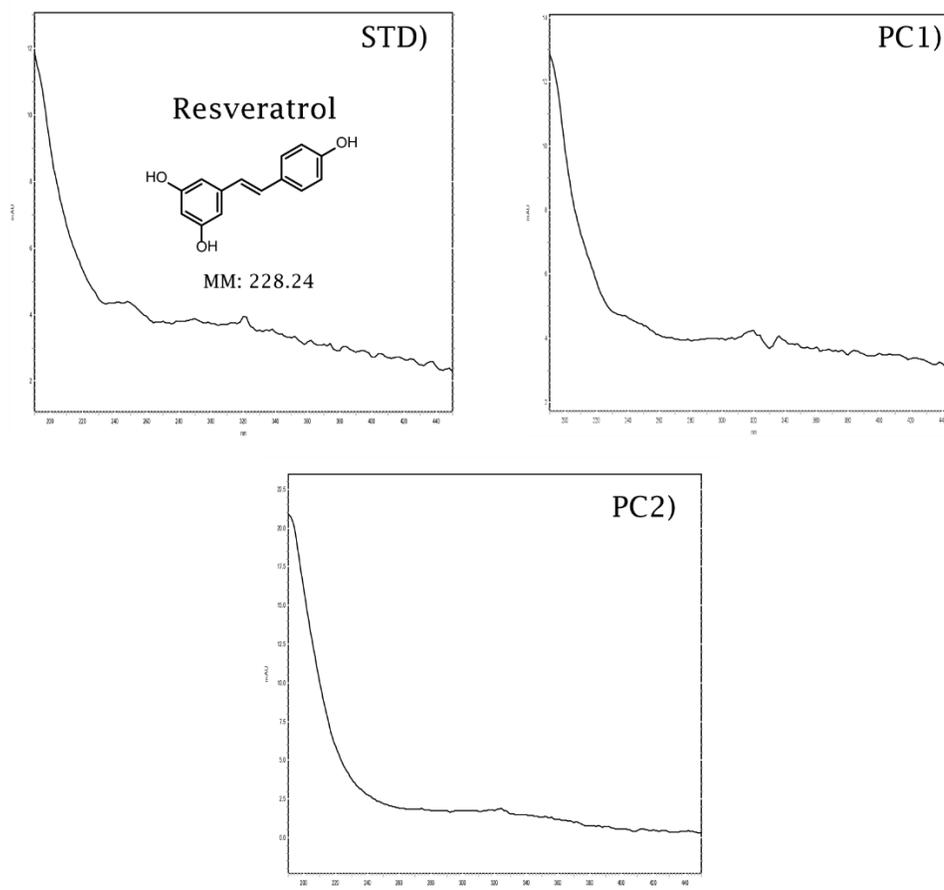


Figura A.4 Espectros de absorción de resveratrol.

Rutina.

En la figura A.5 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza ART pertenece a la adición del estándar de rutina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 7.8 min existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza ART a la adición del estándar de rutina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 8.2 min existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Finalmente para los electroferogramas de C se tiene que la traza EHZ pertenece al extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2, y la traza ART a la adición del estándar de rutina al extracto hidrolizado; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 8.2 min existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó su presencia en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2, y en extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

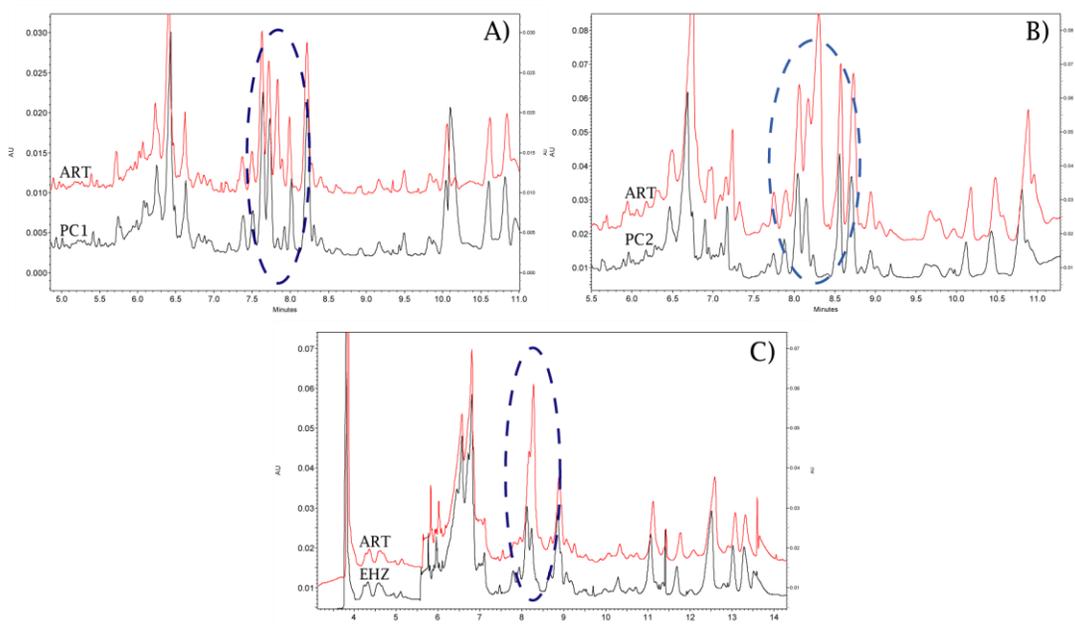


Figura A.5 Electroferogramas de la identificación de rutina por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos y en el extracto hidrolizado. En la figura A.6 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de rutina, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; y EHZ corresponde al pico identificado en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1, PC2 y EHZ, los máximos observados para STD están aproximadamente en 190, 265, y 380 nm, lo cual coincide para PC1 y PC2; en el caso de EHZ estos máximos están en 195, 290 y 405 nm por lo que están desfasados, además que el máximo de 405 nm presenta mayor absorbancia, pero exhibe el mismo comportamiento. Por lo tanto de ésta forma se confirma la presencia de rutina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2, y en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

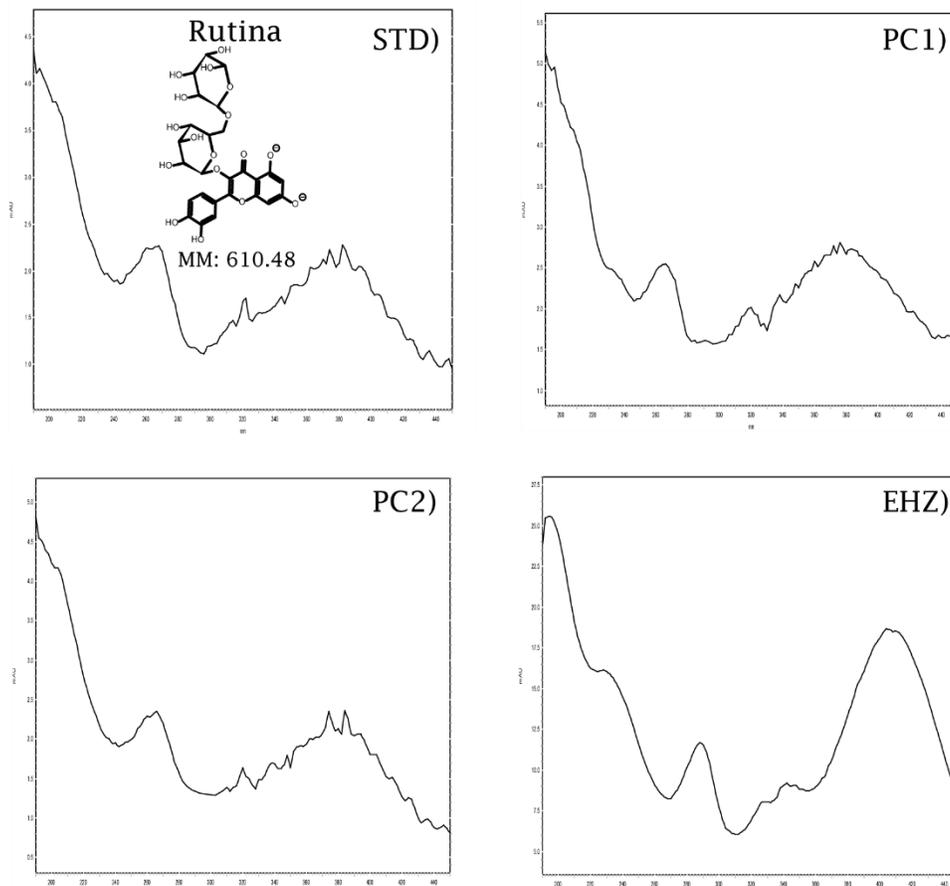


Figura A. 6 Espectros de absorción de rutina.

(-)-Epicatequina.

En la figura A.7 en los electroferogramas tenemos que, la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza de AEP pertenece a la adición del estándar de (-)-epicatequina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 8.2 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de (-)-epicatequina en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

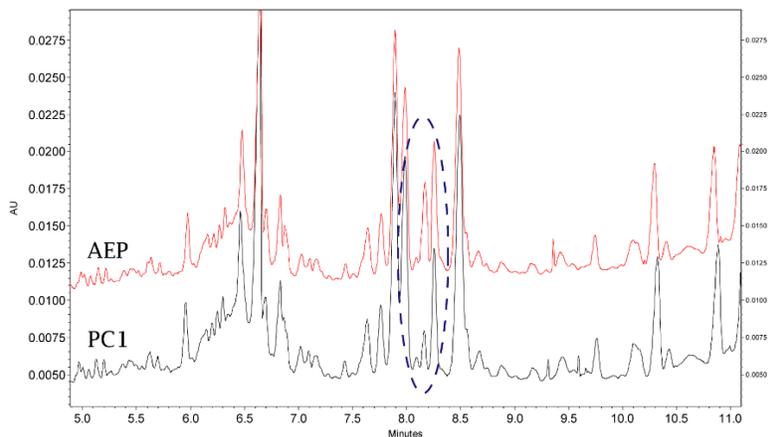


Figura A.7 Electroferogramas de la identificación de (-)-epicatequina por adición de estándar.



Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con la señal identificada en el extracto. En la figura A.8 se observa los espectros de absorción donde: STD correspondiente al estándar de (-)-epicatequina, y PC1 correspondiente al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1, los máximos que presenta STD están aproximadamente en 198 y 320 nm, los cuales coinciden para PC1. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de (-)-epicatequina en los extractos de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

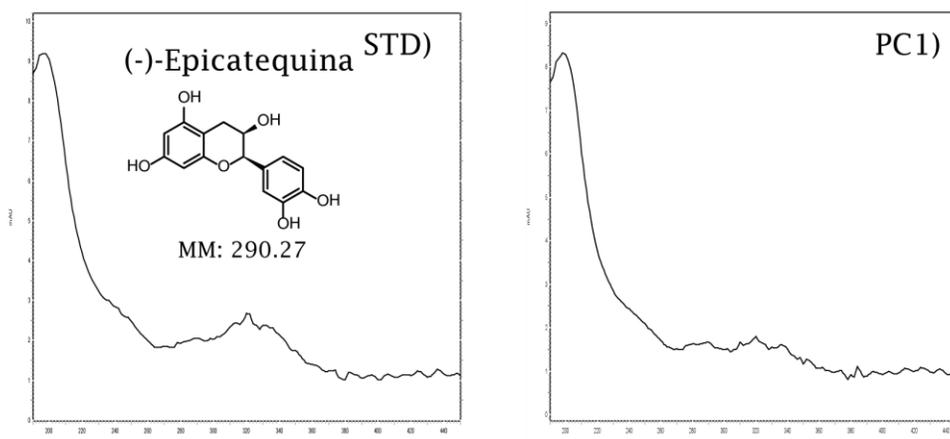


Figura A.8 Espectros de absorción de (-)-epicatequina.

(+)-Catequina.

En la figura A.9 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza ACT pertenece a la adición del estándar de (+)-catequina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 8.5 min existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que, la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza ACT a la adición del estándar de (+)-catequina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 8.6 min existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de (+)-catequina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

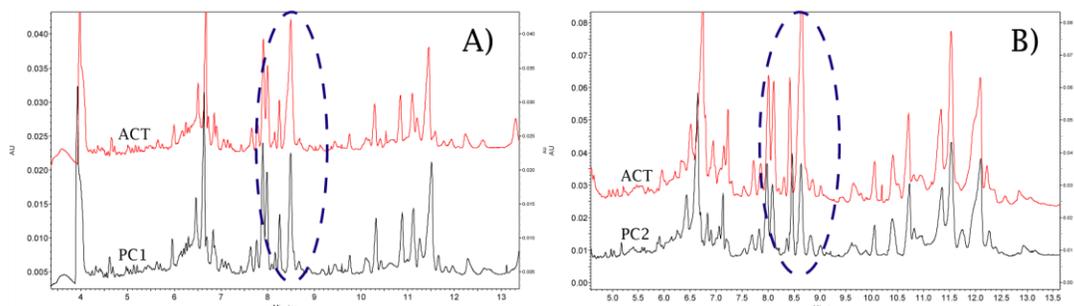


Figura A.9 Electroferogramas de la identificación de (+)-catequina por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos. En la figura A.10 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de (+)-catequina, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30)



de la planta Coahuila 1, y PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1 y PC2; el máximo que tiene STD está aproximadamente en 200 nm, lo cual coincide para PC1 y PC2. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de (+)-catequina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

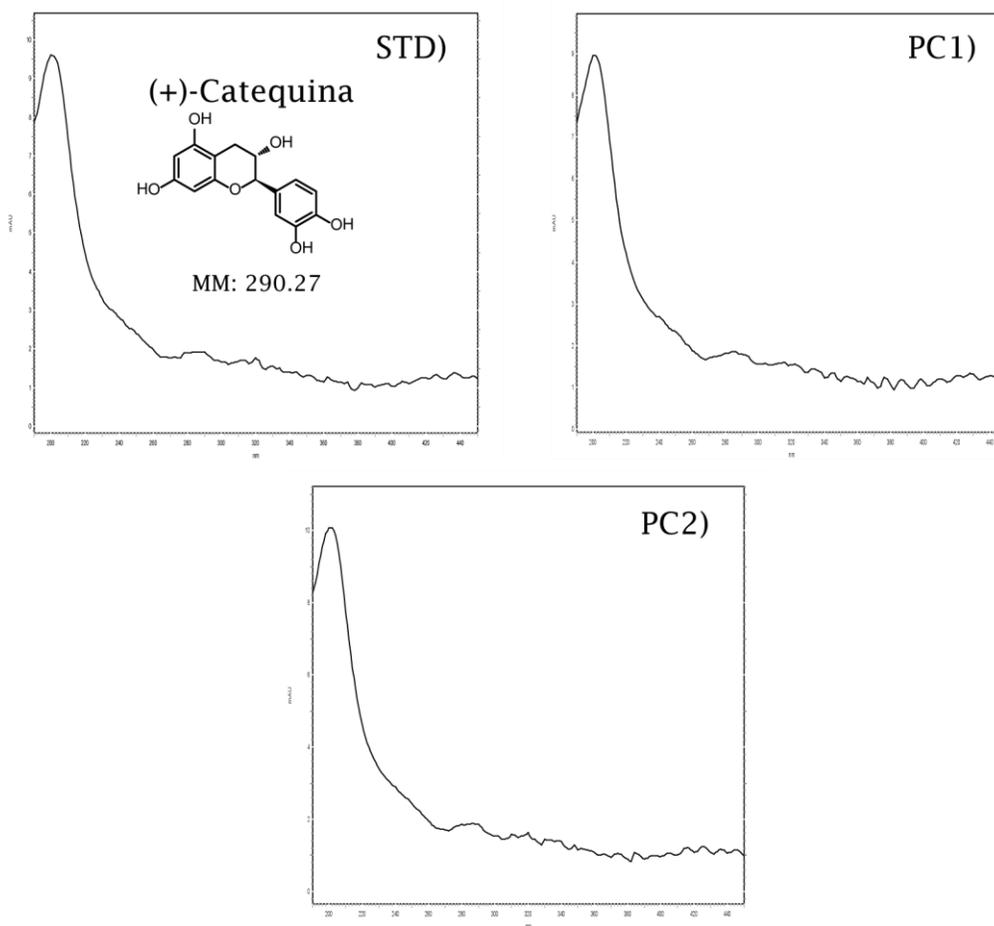


Figura A.10 Espectros de absorción de (+)-catequina.

Ácido clorogénico.

En la figura A.11 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza AACL pertenece a la adición del estándar de ácido clorogénico al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 10.4 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que, la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza AACL pertenece a la adición del estándar de ácido clorogénico al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 10.4 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de ácido clorogénico en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

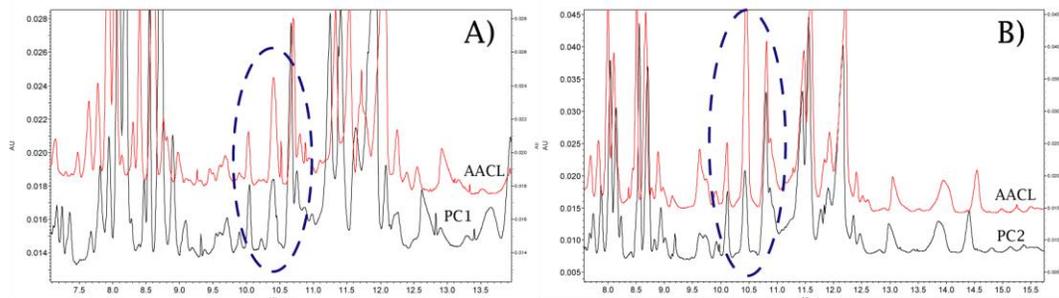


Figura A.11 Electroferogramas de la identificación de ácido clorogénico por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos. En la figura A.12 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de ácido clorogénico, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, y PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1 y PC2; los máximos que tiene STD están aproximadamente en 190, 250 y 344 nm, para PC1 y PC2 éstos se encuentran en 194, 262 y 354 nm, por lo que hay un desfase de las señales, sin embargo, el espectro es muy parecido. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de ácido clorogénico en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

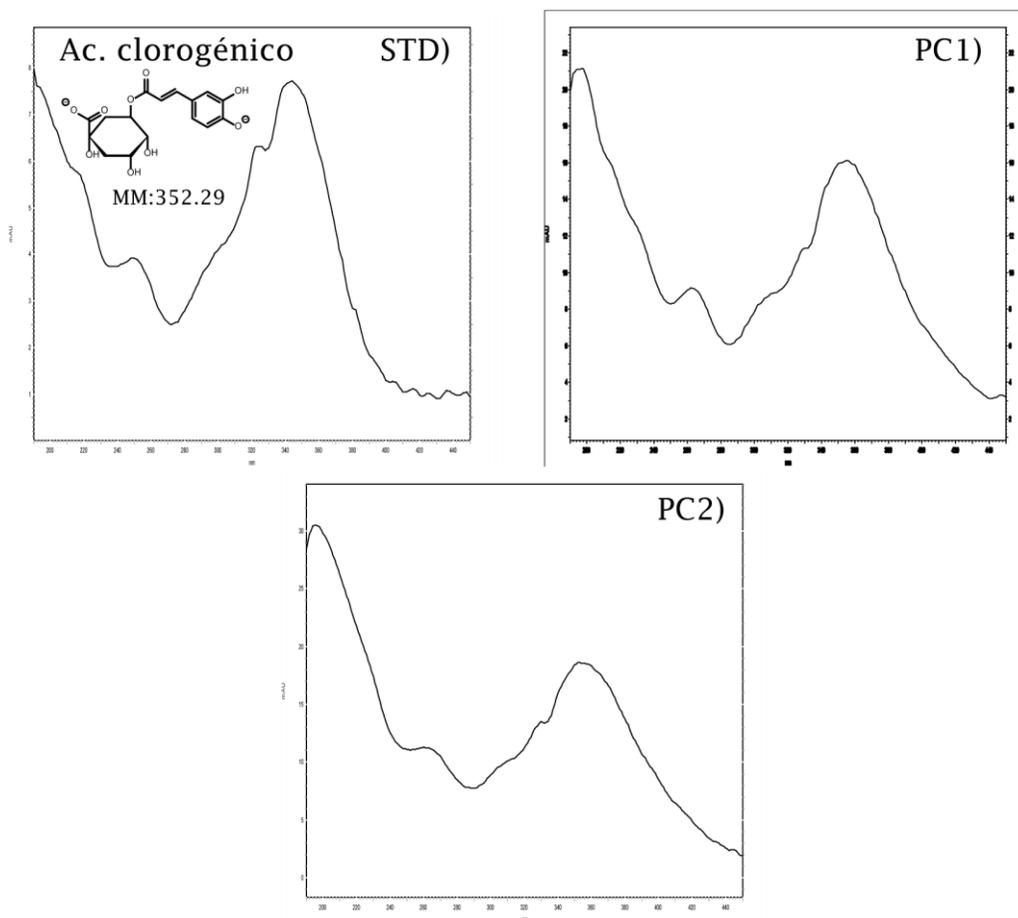


Figura A.12 Espectros de absorción de ácido clorogénico.

Apigenina.

En la figura A.13 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza AAP pertenece a la adición del estándar de apigenina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 13.6 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza AAP a la adición del estándar de apigenina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 14.4 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Finalmente para los electroferogramas de C se tiene que la traza EHZ pertenece al extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2, y la traza AAP la adición del estándar de apigenina al extracto hidrolizado; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 12.7 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de apigenina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2, y en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

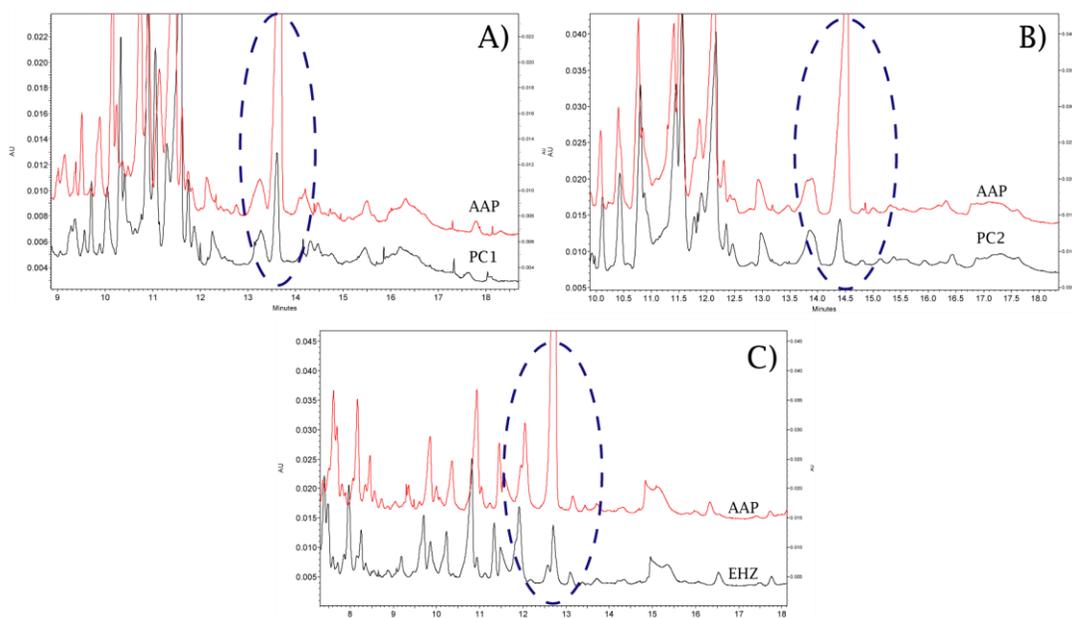


Figura A.13 Electroferogramas de la identificación de apigenina por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos y en el extracto hidrolizado. En la figura A.14 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de apigenina, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; y EHZ corresponde al pico identificado en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1, PC2 y EHZ, los máximos observados para STD están aproximadamente en 190, 270, 320 y 384 nm, lo cual coincide para PC1, PC2 y EHZ. Por lo tanto de ésta forma se confirma la presencia de apigenina en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2, y en el extracto hidrolizado de la planta Coahuila 2.

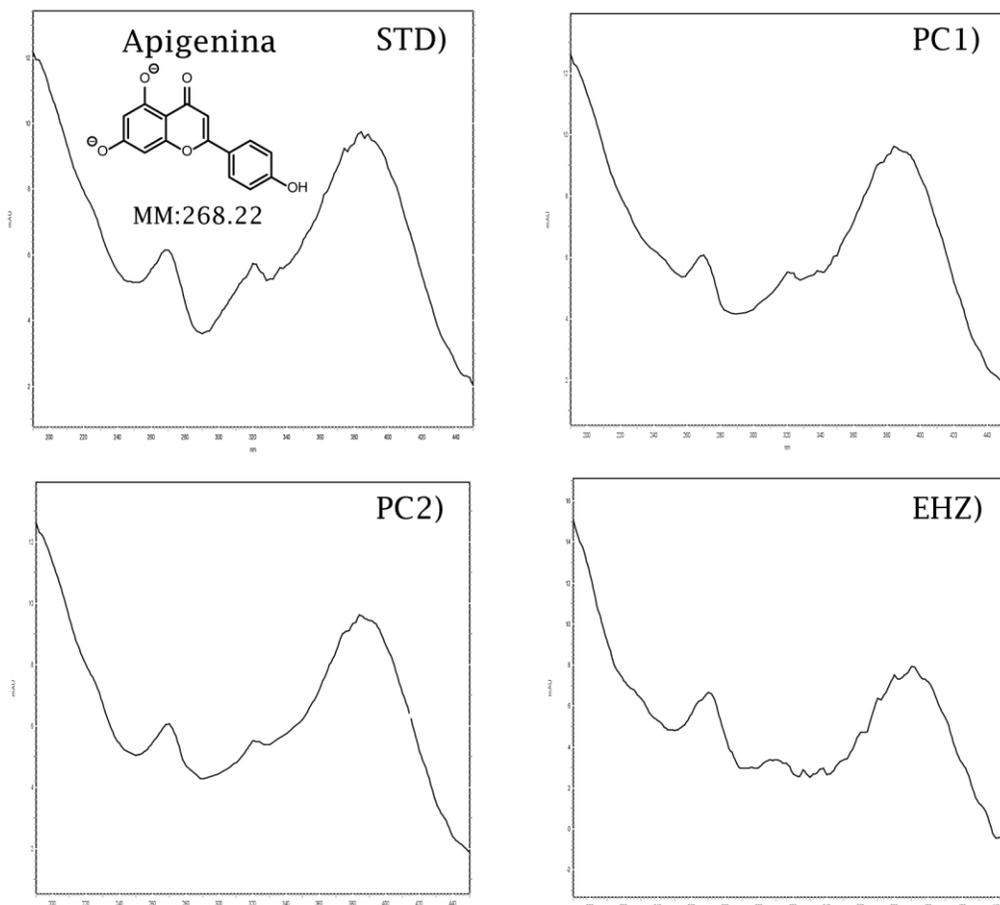


Figura A.14 Espectros de absorción de apigenina.

Kaempferol.

En la figura A.15 en los electroferogramas tenemos que, la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza de AKM pertenece a la adición del estándar de kaempferol al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 13.9 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de kaempferol en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

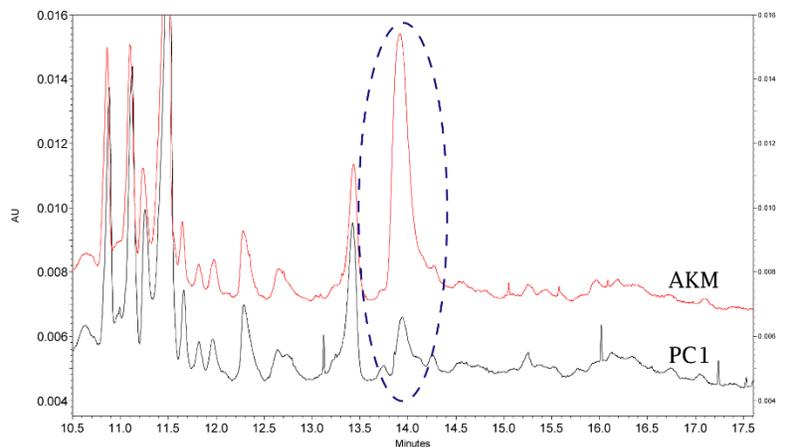


Figura A.15 Electroferogramas de la identificación de kaempferol por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con la señal identificada en el extracto. En la figura A.16 se observa los espectros de absorción donde: STD correspondiente al estándar de kaempferol, y PC1 correspondiente al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1; se puede observar el mismo patrón del espectro de STD en PC1, los máximos que presenta STD están aproximadamente en 190 y 320 nm, los cuales coinciden para PC1. Por lo tanto de ésta forma se confirma la presencia de kaempferol en los extractos de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

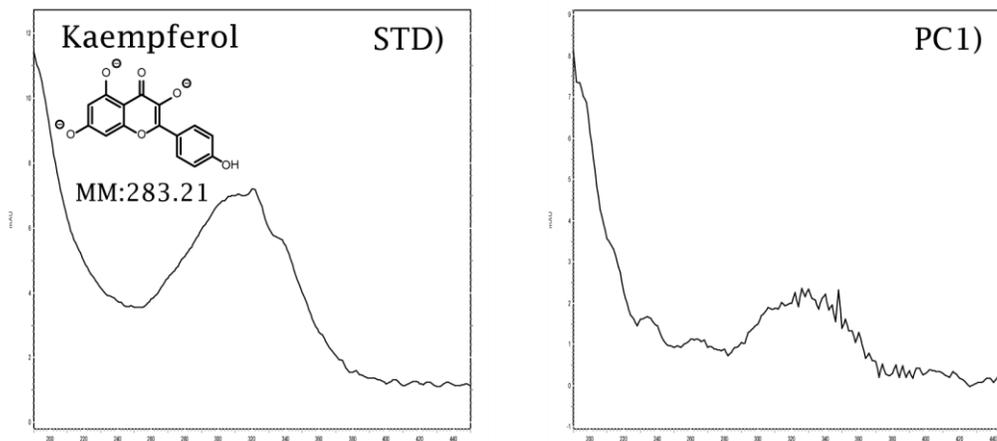


Figura A.16 Espectros de absorción de kaempferol.

Quercetina.

En la figura A.17 en los electroferogramas tenemos que, la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza de AQR pertenece a la adición del estándar de quercetina al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 14.2 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de quercetina en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

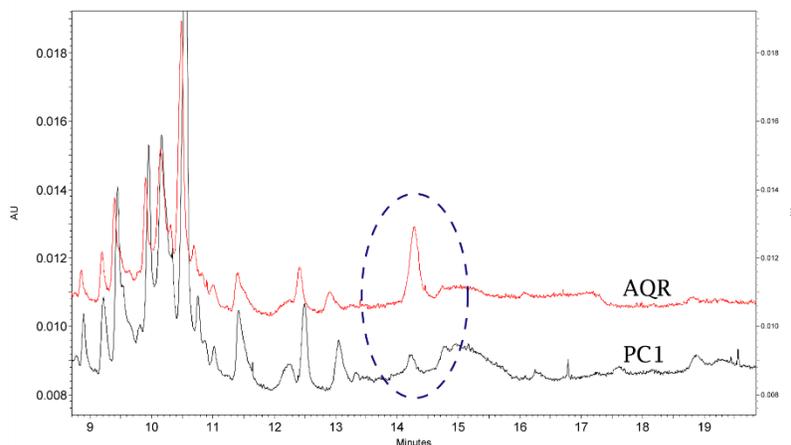


Figura A.17 Electroferogramas de la identificación de quercetina por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con la señal identificada en el extracto. En la figura A.18 se observa los espectros de absorción donde: STD correspondiente al estándar de quercetina, y PC1 correspondiente al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1, los máximos que presenta STD están aproximadamente en 190 y 320 nm, los cuales coinciden para PC1. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de quercetina en los extractos de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1.

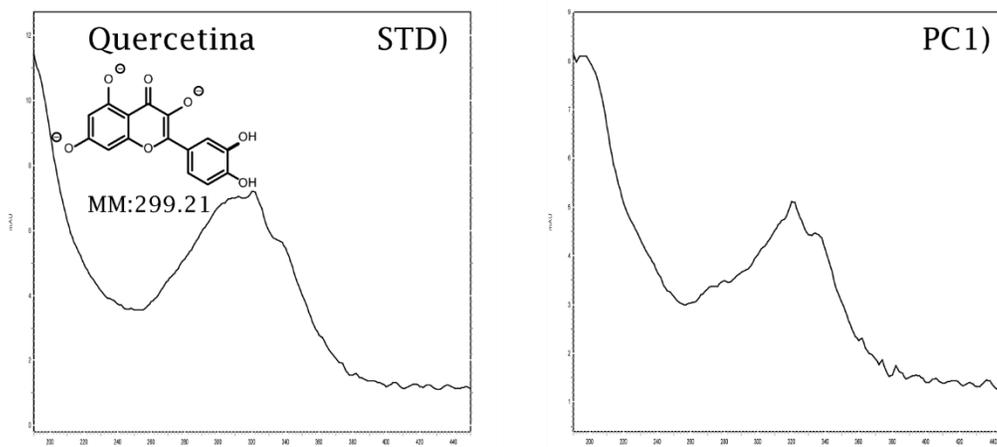


Figura A.18 Espectros de absorción de quercetina.

Ácido cafeico.

En la figura A.19 para los electroferogramas de A, tenemos que la traza PC1 pertenece al extracto de la planta Coahuila 1, y la traza AACF pertenece a la adición del estándar de ácido cafeico al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente 22.6 min, existe un aumento en la señal de pico debido a la adición del estándar. Por otra parte, para los electroferogramas de B se tiene que, la traza PC2 pertenece al extracto de la planta Coahuila 2, y la traza AACF pertenece a la adición del estándar de ácido cafeico al extracto; se puede apreciar que a un tiempo de migración de aproximadamente de 22.7 min, existe un aumento en la señal del pico debido a la adición del estándar. Por lo tanto de esta forma se identificó la presencia de ácido cafeico en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

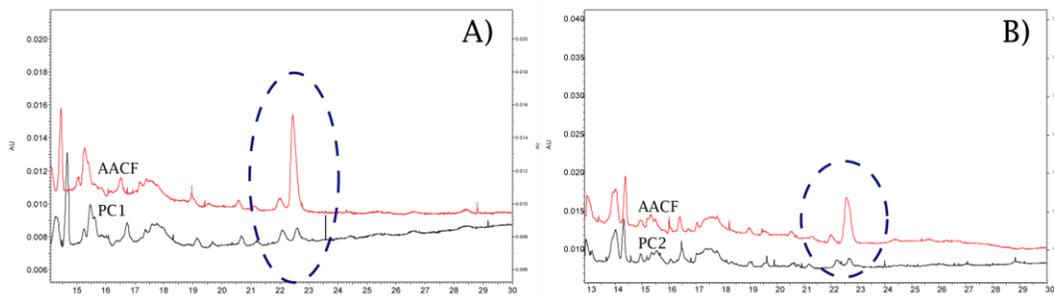


Figura A.19 Electroferogramas de la identificación de ácido cafeico por adición de estándar.

Una vez identificada la señal de pico se procedió a la confirmación de éste comparando los espectros de absorción del estándar con las señales identificadas en los extractos. En la figura A.20 se observa los espectros de absorción donde: STD corresponde al estándar de ácido cafeico, PC1 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 1, y PC2 corresponde al pico identificado en el extracto de etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2; se puede observar el mismo patrón del espectro de absorción de STD en PC1 y PC2, los máximos que tiene STD están aproximadamente en 190, 210 y 320 nm, para PC2 coinciden estos máximos y para PC1 el único que no se encuentra presente es el de 210 nm. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de ácido cafeico en los extractos de etanol-agua (70:30) de las plantas Coahuila 1 y Coahuila 2.

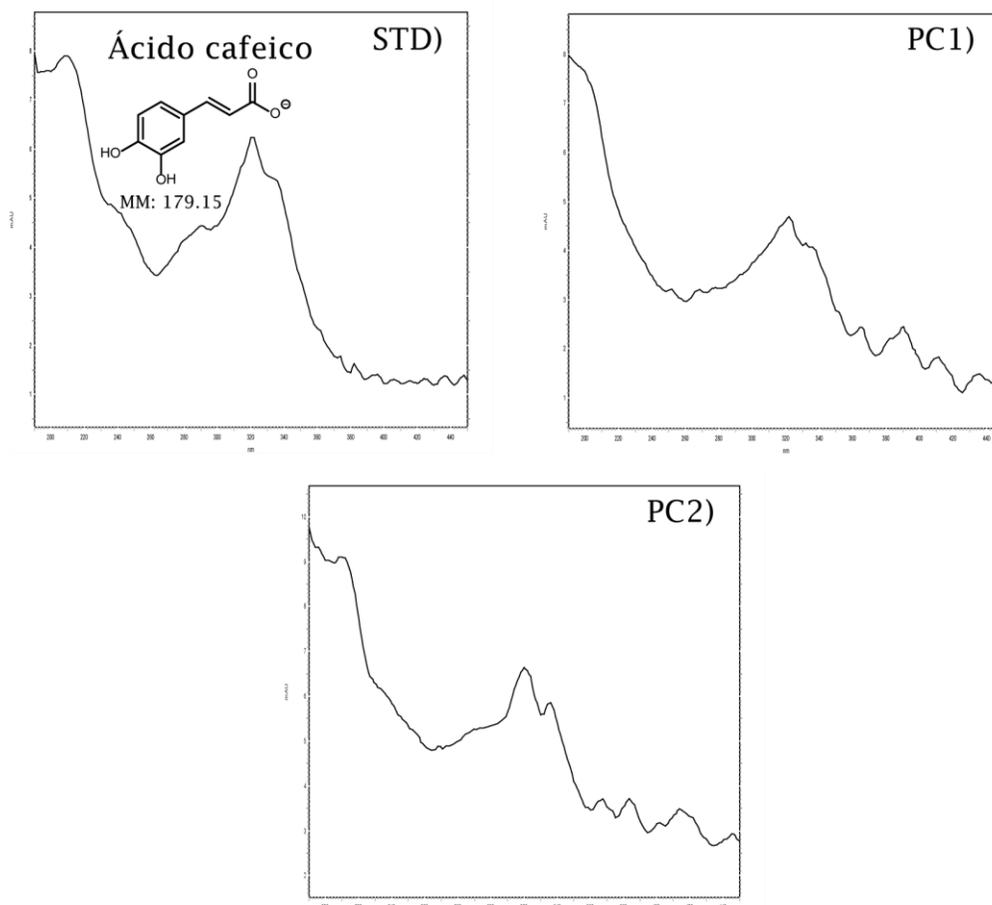


Figura A.20 Espectros de absorción de ácido cafeico.



Anexo 4: Validación del modelo lineal de las curvas de calibración de los compuestos fenólicos.

Se realizó la validación de los modelos lineales de las curvas de calibración por medio de un análisis de varianzas con falta de ajuste (ANOVA). Con ayuda del software statgraphics centurión XVI, se obtuvo el gráfico de regresión lineal para las tres repeticiones de cada curva de calibración utilizando los respectivos estándares internos; se determinó si hay una tendencia lineal en los datos y se obtuvieron los coeficientes y parámetros de la regresión lineal con su respectivo error, esto se realizó por el método de mínimos cuadrados, cuya ecuación de línea recta se establece en la ecuación 1 (Eq. 1).

$$y = b_0 + b_1x \dots \dots \dots \text{(Eq. 1)}$$

Donde y es la relación de áreas o alturas ($A_{\text{Fenol}}/A_{\text{EI}}$ ó $H_{\text{Fenol}}/H_{\text{EI}}$), b_0 es la ordenada al origen o intercepto, b_1 es la pendiente, y x es la relación de concentraciones ($[Fenol]/[EI]$).

En seguida se analizaron los datos con un gráfico de residuales, se descartaron los datos atípicos con un 95 % de confianza, y se confirmó el ajuste lineal observando si las varianzas de los datos son homogéneas, es decir, si son homocedásticos; de no serlos (datos heterocedásticos) se buscó otro modelo que se ajuste mejor a los datos, el cual se linealizó para facilitar el manejo de estos.

Posteriormente se realizó el test de falta de ajuste al comparar valores de F de la distribución de Fisher; para esto, se calculó la F experimental (F_{Exp}) de acuerdo a la ecuación 2 (Eq. 2).

$$F_{\text{Exp}} = \frac{MS_{\text{FDA}}}{MS_{\text{EP}}} \dots \dots \dots \text{(Eq. 2)}$$

Donde MS_{FDA} y MS_{EP} son los cuadrados medios para las varianzas de los residuales de la carencia de ajuste y el error puro respectivamente, estos se obtuvieron de los resultados del análisis ANOVA que reporta el software statgraphics centurión XVI. A continuación se obtuvo el valor de F de tablas (F_{Tablas}) para un 95 % de confianza ($\alpha=0.05$), se consideró que k es el número de puntos de la curva de calibración y n es el número total de corridas realizadas; de acuerdo a lo anterior, se obtuvieron los grados de libertad (g.d.l.) para MS_{FDA} y MS_{EP} cuyos valores son $k-2$ y $n-k$ respectivamente, de esta forma se estableció el valor de F_{Tablas} . Una vez determinados los valores de F_{Exp} y F_{Tablas} se comparan para establecer si hay o no un ajuste al modelo de acuerdo a las siguientes pruebas de hipótesis:

$H_0 = F_{\text{Exp}} < F_{\text{Tablas}} =$ Hay ajuste al modelo.

$H_1 = F_{\text{Exp}} > F_{\text{Tablas}} =$ Hay falta de ajuste.

Finalmente se verificó que el coeficiente de determinación (r^2) sea mayor que 0.98, este criterio indica que hay un ajuste al modelo lineal.

Ya validado el modelo lineal se calcularon algunos parámetros de validación, en primer lugar se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$), cuyo criterio de aceptación es que no debe incluir el cero. En las ecuaciones 3, 4 y 5 (Eq. 3, Eq. 4, Eq. 5) se establece el cálculo de este intervalo.

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} \dots \dots \dots (\text{Eq. 3})$$

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}} \dots \dots \dots (\text{Eq. 4})$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}} \dots \dots \dots (\text{Eq. 5})$$

Donde b_0 corresponde a la ordenada al origen, b_1 la pendiente de la curva de calibración, x la relación de concentraciones ($[Fenol]/[EI]$), y la relación de áreas o alturas (A_{Fenol}/A_{EI} ó H_{Fenol}/H_{EI}), y $t_{0.975, n-2}$ es el valor t de tablas de la distribución de Students para $n-2$ con un 95 % de confianza ($\alpha/2=0.025$), donde n es igual al número total de corridas consideradas.

En seguida se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, cuya fórmula se establece en la ecuación 6 (Eq. 6).

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) \dots \dots \dots (\text{Eq. 6})$$

Donde $[EI]$ es la concentración del estándar interno, $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión la cual se determina por la Eq. 5, y b_1 es la pendiente de la curva de calibración.

Posteriormente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, cuya fórmula se establece en la ecuación 7 (Eq. 7).

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) \dots \dots \dots (\text{Eq. 7})$$

Donde $[EI]$ es la concentración del estándar interno, $S_{y/x}$ es la desviación estándar de regresión la cual se determina por la Eq. 5, y b_1 es la pendiente de la curva de calibración.

A continuación se presenta la validación del modelo lineal de las curvas de calibración para cada uno de los compuestos fenólicos de interés con su respectivo estándar interno, así como el cálculo de los algunos parámetros de validación mencionados con anterioridad.

Naringina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico y siguiendo como respuesta el área de los picos; en la tabla A.13 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de áreas y concentraciones.



Tabla A.13 Datos de la curva de calibración para el estándar de naringina.

n	Solución	[Naringina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	A _{Naringina}	A _{Ac. benzoico}	[Naringina]/[Ac. benzoico]	A _{Naringina} /A _{Ac. benzoico}
1	1	5.51	340.43	2236	520753	0.0162	0.0043
2	1	5.51	340.43	2453	510771	0.0162	0.0048
3	1	5.51	340.43	1208	519551	0.0162	0.0023
4	2	11.02	340.43	2594	422745	0.0324	0.0061
5	2	11.02	340.43	2991	436960	0.0324	0.0068
6	2	11.02	340.43	3003	423747	0.0324	0.0071
7	3	22.04	340.43	5760	396015	0.0647	0.0145
8	3	22.04	340.43	5190	360517	0.0647	0.0144
9	3	22.04	340.43	5357	395371	0.0647	0.0135
10	4	33.06	340.43	7575	391616	0.0971	0.0193
11	4	33.06	340.43	8600	407806	0.0971	0.0211
12	4	33.06	340.43	8887	412118	0.0971	0.0216
13	5	44.08	340.43	12370	433552	0.1295	0.0285
14	5	44.08	340.43	14077	467810	0.1295	0.0301
15	5	44.08	340.43	12373	429417	0.1295	0.0288
16	6	55.10	340.43	13492	360983	0.1619	0.0374
17	6	55.10	340.43	12389	374035	0.1619	0.0331
18	6	55.10	340.43	13108	380675	0.1619	0.0344
19	7	66.12	340.43	16524	410269	0.1942	0.0403
20	7	66.12	340.43	15611	383850	0.1942	0.0407
21	7	66.12	340.43	16399	428381	0.1942	0.0383

En la figura A.21 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para naringina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal. En la tabla A.14 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.14 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de naringina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b ₀)	0.0005	0.0006	Correlación (r)	0.9947
Pendiente (b ₁)	0.2090	0.0049	Determinación (r ²)	0.9895

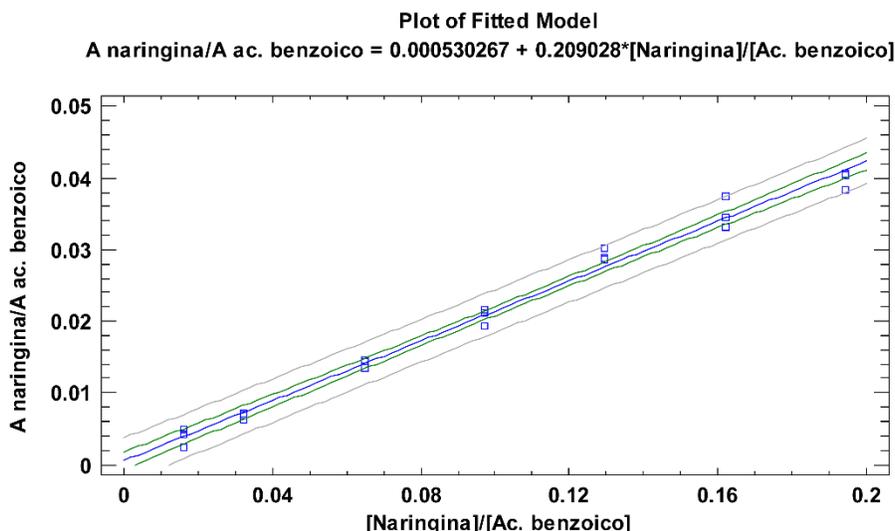


Figura A.21 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de naringina.

En la figura A.22 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

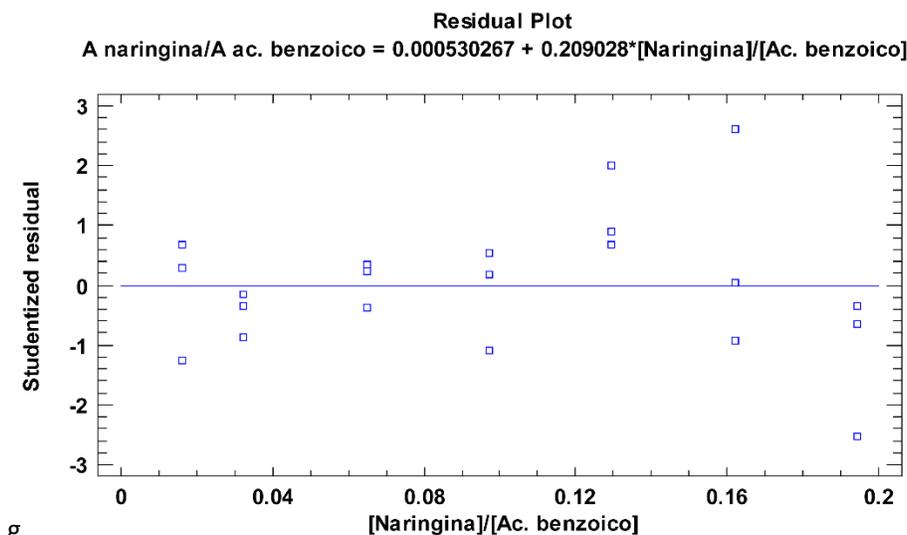


Figura A.22 Gráfica de residuales para la curva de calibración de naringina.

En la tabla A.15 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.15 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	3.4633×10^{-3}	1	3.4633×10^{-3}
Residuo	3.6730×10^{-5}	19	1.9332×10^{-6}
- Carencia de Ajuste	1.5357×10^{-5}	5	3.0714×10^{-6}
- Error Puro	2.1374×10^{-5}	14	1.5267×10^{-6}
Total (Corr.)	3.5000×10^{-3}	20	

A partir de los datos de la tabla A.15 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{\text{Exp}} = \frac{MS_{\text{FDA}}}{MS_{\text{EP}}} = \frac{3.0714 \times 10^{-6}}{1.5267 \times 10^{-6}} = 2.012$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=14$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{\text{Tablas}}=2.958$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{\text{Exp}} < F_{\text{Tablas}} = 2.012 < 2.958$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9895, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.16.

Tabla A.16 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0130	$S_{y/x}$	0.0014
Σxy	0.0611	Σx	2.0879
Σy	0.4476	Σx^2	0.2869
$n-2$	19	S_{b1}	0.0049
b_1	0.2090	$t_{0.975,19}$	2.0930
b_0	0.0005		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.16 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 0.2090 \pm (2.0930)(0.0049) = 0.2090 \pm 0.0103$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.1987 hasta 0.2193 y no incluye al cero, de esta forma se aceptó el intervalo como válido y de nuevo se ve un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.13 y A.16, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0014}{0.2090} \right) = 7.4726 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de naringina es de 7.4726 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.13 y A.16, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0014}{0.2090} \right) = 22.6442 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de naringina es de 22.6442 mg/L.

Resveratrol.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.17 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

Previamente se analizaron los datos con un gráfico de residuales y se encontraron que las mediciones 13 y 18 (tabla A.17) dan valores atípicos con un 95% de confianza, por lo que se descartaron del análisis ANOVA y de la curva de calibración.

Tabla A.17 Datos de la curva de calibración para el estándar de resveratrol.

n	Solución	[Resveratrol] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	H _{Resveratrol}	H _{Ac. benzoico}	[Resveratrol]/[Ac. benzoico]	H _{Resveratrol} /H _{Ac. benzoico}
1	1	2.15	340.43	726	97289	0.0063	0.0075
2	1	2.15	340.43	664	95891	0.0063	0.0069
3	1	2.15	340.43	660	97647	0.0063	0.0068
4	2	4.30	340.43	1162	88615	0.0126	0.0131
5	2	4.30	340.43	1169	91659	0.0126	0.0128
6	2	4.30	340.43	1216	89689	0.0126	0.0136
7	3	8.59	340.43	2502	83880	0.0252	0.0298
8	3	8.59	340.43	2124	77056	0.0252	0.0276
9	3	8.59	340.43	1987	76384	0.0252	0.0260
10	4	12.89	340.43	3151	76747	0.0379	0.0411
11	4	12.89	340.43	3522	79519	0.0379	0.0443
12	4	12.89	340.43	3529	82044	0.0379	0.0430
*13	5	17.19	340.43	4348	82098	0.0505	0.0530
14	5	17.19	340.43	5139	90008	0.0505	0.0571
15	5	17.19	340.43	4733	83977	0.0505	0.0564
16	6	21.48	340.43	5246	70482	0.0631	0.0744
17	6	21.48	340.43	5391	73732	0.0631	0.0731
*18	6	21.48	340.43	5926	75289	0.0631	0.0787
19	7	25.78	340.43	7172	79144	0.0757	0.0906
20	7	25.78	340.43	6673	75272	0.0757	0.0887
21	7	25.78	340.43	6375	74654	0.0757	0.0854

En la figura A.23 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para resveratrol, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

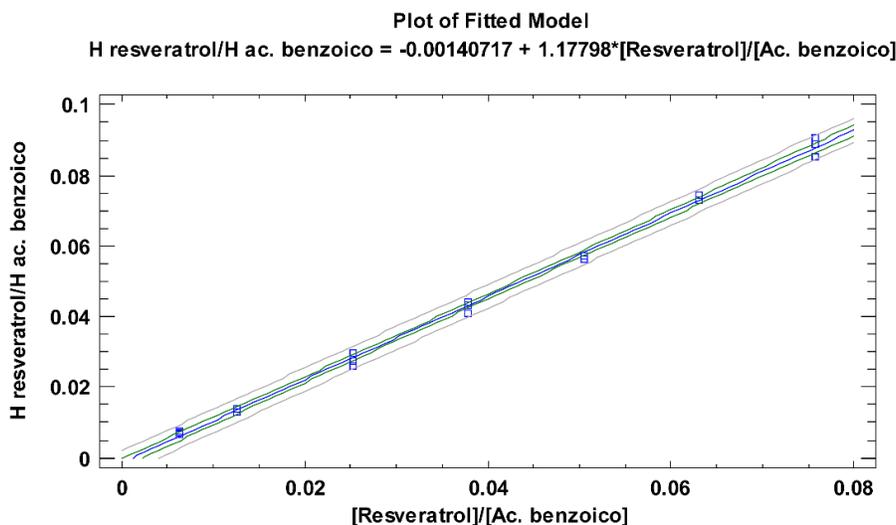


Figura A.23 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de resveratrol.

En la tabla A.18 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.18 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de resveratrol.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0014	0.0006	Correlación (r)	0.9988
Pendiente (b_1)	1.1780	0.0142	Determinación (r^2)	0.9975

En la figura A.24 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

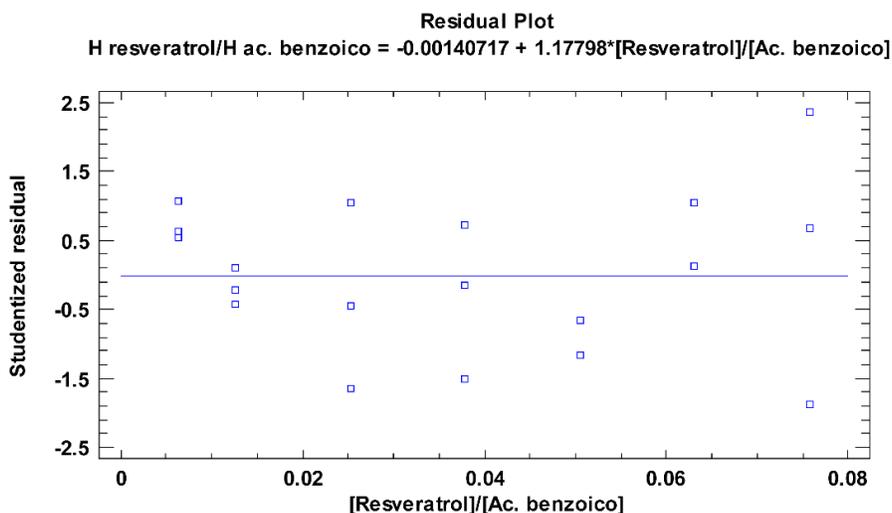


Figura A.24 Gráfica de residuales para la curva de calibración de resveratrol.

En la tabla A.19 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.19 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	1.5615×10^{-2}	1	1.5615×10^{-2}
Residuo	3.8376×10^{-5}	17	2.2574×10^{-6}
- Carencia de Ajuste	1.0366×10^{-5}	5	2.0732×10^{-6}
- Error Puro	2.8010×10^{-5}	12	2.3342×10^{-6}
Total (Corr.)	1.5654×10^{-2}	18	

A partir de los datos de la tabla A.19 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{2.0732 \times 10^{-6}}{2.3342 \times 10^{-6}} = 0.888$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=12$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=3.106$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 0.888 < 3.106$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9975, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.20.

Tabla A.20 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0492	$S_{y/x}$	0.0018
Σxy	0.0427	Σx	0.7005
Σy	0.7980	Σx^2	0.0371
n-2	17	S_{b_1}	0.0168
b_1	1.1780	$t_{0.975,17}$	2.1100
b_0	-0.0014		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.20 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 1.1780 \pm (2.1100)(0.0168) = 1.1780 \pm 0.0354$$

Por lo tanto el intervalo va desde 1.1426 hasta 1.2134 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo se observó el ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.17 y A.20, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0018}{1.1780} \right) = 1.6959 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de resveratrol es de 1.6959 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.17 y A.20, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0018}{1.1780} \right) = 5.1392 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de resveratrol es de 5.1392 mg/L.

Rutina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.21 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

Previamente se analizaron los datos con un gráfico de residuales y se encontraron que las mediciones 18 y 20 (tabla A.21) dan valores atípicos con un 95% de confianza, por lo que se descartaron del análisis ANOVA y de la curva de calibración.

Tabla A.21 Datos de la curva de calibración para el estándar de rutina.

n	Solución	[Rutina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	H _{Rutina}	H _{Ac. benzoico}	[Rutina]/[Ac. benzoico]	H _{Rutina} /H _{Ac. benzoico}
1	1	9.16	340.43	1091	97289	0.0269	0.0112
2	1	9.16	340.43	921	95891	0.0269	0.0096
3	1	9.16	340.43	781	97647	0.0269	0.0080
4	2	18.31	340.43	1871	88615	0.0538	0.0211
5	2	18.31	340.43	1794	91659	0.0538	0.0196
6	2	18.31	340.43	1695	89689	0.0538	0.0189
7	3	36.62	340.43	3195	83880	0.1076	0.0381
8	3	36.62	340.43	3006	77056	0.1076	0.0390
9	3	36.62	340.43	2998	76384	0.1076	0.0392
10	4	54.93	340.43	4529	76747	0.1614	0.0590
11	4	54.93	340.43	4490	79519	0.1614	0.0565
12	4	54.93	340.43	4984	82044	0.1614	0.0607
13	5	73.24	340.43	6566	82098	0.2152	0.0800
14	5	73.24	340.43	7463	90008	0.2152	0.0829
15	5	73.24	340.43	6598	83977	0.2152	0.0786
16	6	91.56	340.43	7048	70482	0.2689	0.1000
17	6	91.56	340.43	7232	73732	0.2689	0.0981
*18	6	91.56	340.43	8014	75289	0.2689	0.1064
19	7	109.87	340.43	9221	79144	0.3227	0.1165
*20	7	109.87	340.43	9625	75272	0.3227	0.1279
21	7	109.87	340.43	8933	74654	0.3227	0.1197

En la figura A.25 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para rutina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

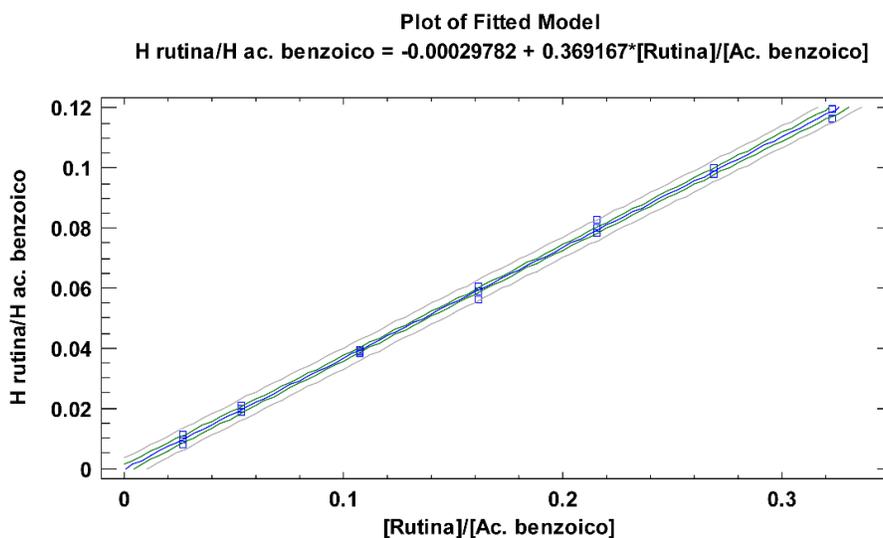


Figura A.25 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de rutina.

En la tabla A.22 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.



Tabla A.22 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de rutina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0003	0.0007	Correlación (r)	0.9991
Pendiente (b_1)	0.3692	0.0038	Determinación (r^2)	0.9982

En la figura A.26 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

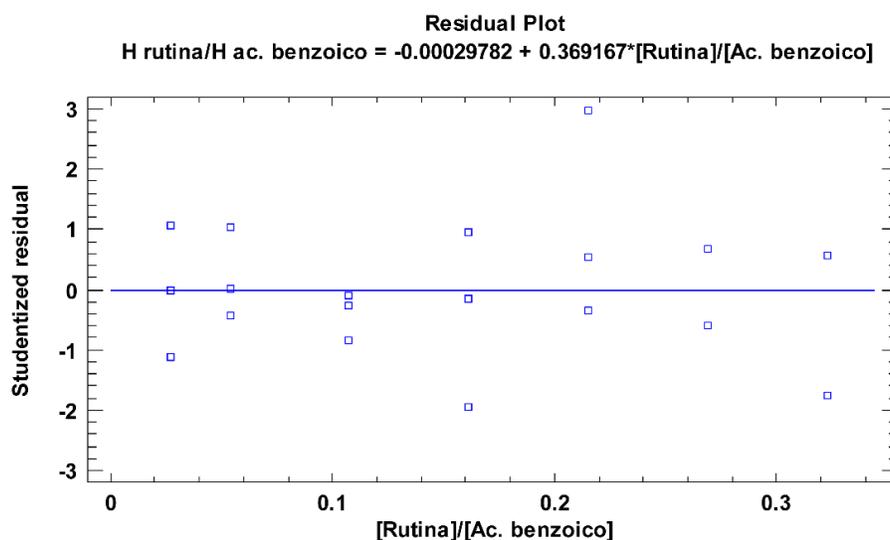


Figura A.26 Gráfica de residuales para la curva de calibración de rutina.

En la tabla A.23 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtienen los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.23 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	2.4488×10^{-2}	1	2.4488×10^{-2}
Residuo	4.3415×10^{-5}	17	2.5538×10^{-6}
- Carencia de Ajuste	9.0125×10^{-6}	5	1.8025×10^{-6}
- Error Puro	3.4403×10^{-5}	12	2.8669×10^{-6}
Total (Corr.)	2.4531×10^{-2}	18	

A partir de los datos de la tabla A.23 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{1.8025 \times 10^{-6}}{2.8669 \times 10^{-6}} = 0.629$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=12$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=3.106$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 0.629 < 3.106$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.



Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9982, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo, se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$), de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.24.

Tabla A.24 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0833	$S_{y/x}$	0.0016
Σxy	0.2264	Σx	2.8777
Σy	1.0567	Σx^2	0.6155
n-2	17	S_{b1}	0.0038
b_1	0.3692	$t_{0.975,17}$	2.1100
b_0	-0.0003		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.24 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 0.3692 \pm (2.1100)(0.0038) = 0.3692 \pm 0.0080$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.3612 hasta 0.3772 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo se observó un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.21 y A.24, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0016}{0.3692} \right) = 4.8631 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de rutina es de 4.8631 mg/L utilizando como estándar interno el ácido benzoico.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.21 y A.24, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0016}{0.3692} \right) = 14.7367 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de rutina es de 14.7367 mg/L utilizando como EI el ácido benzoico.

Este estándar se identificó tanto en el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2 como en el extracto hidrolizado, de acuerdo a lo anterior, también se validó el modelo lineal de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido *trans*-cinámico, el cual fue utilizado para la cuantificación en el extracto hidrolizado. Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración siguiendo como respuesta la altura de



los picos; en la tabla A.25 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

Tabla A.25 Datos de la curva de calibración para el estándar de rutina.

n	Solución	[Rutina] (mg/L)	[Ac. trans-cinámico] (mg/L)	H _{Rutina}	H _{Ac. trans-cinámico}	[Rutina]/[Ac. trans-cinámico]	H _{Rutina} /H _{Ac. trans-cinámico}
1	1	9.16	201.17	1091	49908	0.0455	0.0219
2	1	9.16	201.17	921	49271	0.0455	0.0187
3	1	9.16	201.17	781	49912	0.0455	0.0156
4	2	18.31	201.17	1871	45475	0.0910	0.0411
5	2	18.31	201.17	1794	47564	0.0910	0.0377
6	2	18.31	201.17	1695	46647	0.0910	0.0363
7	3	36.62	201.17	3195	43872	0.1820	0.0728
8	3	36.62	201.17	3006	40261	0.1820	0.0747
9	3	36.62	201.17	2998	40453	0.1820	0.0741
10	4	54.93	201.17	4529	40107	0.2731	0.1129
11	4	54.93	201.17	4490	41414	0.2731	0.1084
12	4	54.93	201.17	4984	42520	0.2731	0.1172
13	5	73.24	201.17	6566	42615	0.3641	0.1541
14	5	73.24	201.17	7463	45436	0.3641	0.1643
15	5	73.24	201.17	6598	42838	0.3641	0.1540
16	6	91.56	201.17	7048	36195	0.4551	0.1947
17	6	91.56	201.17	7232	37385	0.4551	0.1934
18	6	91.56	201.17	8014	39377	0.4551	0.2035
19	7	109.87	201.17	9221	40100	0.5461	0.2300
20	7	109.87	201.17	9625	39016	0.5461	0.2467
21	7	109.87	201.17	8933	40025	0.5461	0.2232

En la figura A.27 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para rutina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

En la tabla A.26 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.26 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de rutina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0024	0.0023	Correlación (r)	0.9975
Pendiente (b_1)	0.4335	0.0070	Determinación (r^2)	0.9950

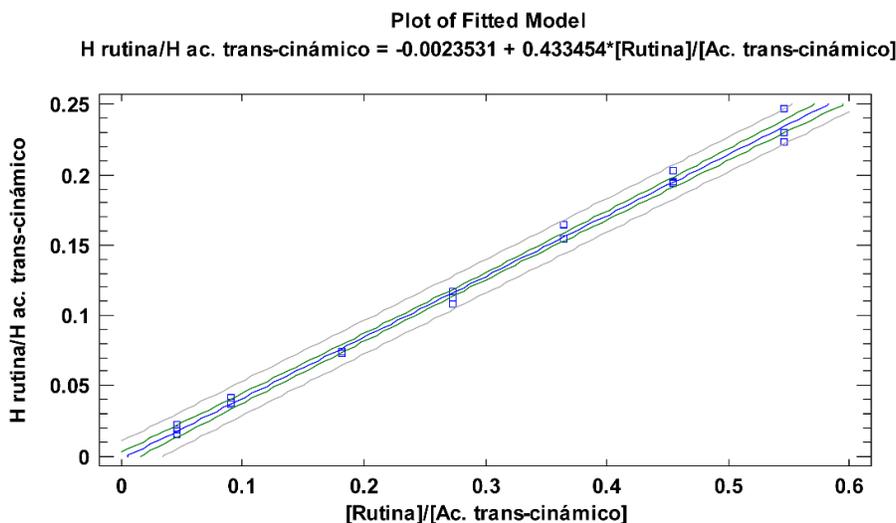


Figura A.27 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de rutina.

En la figura A.28 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

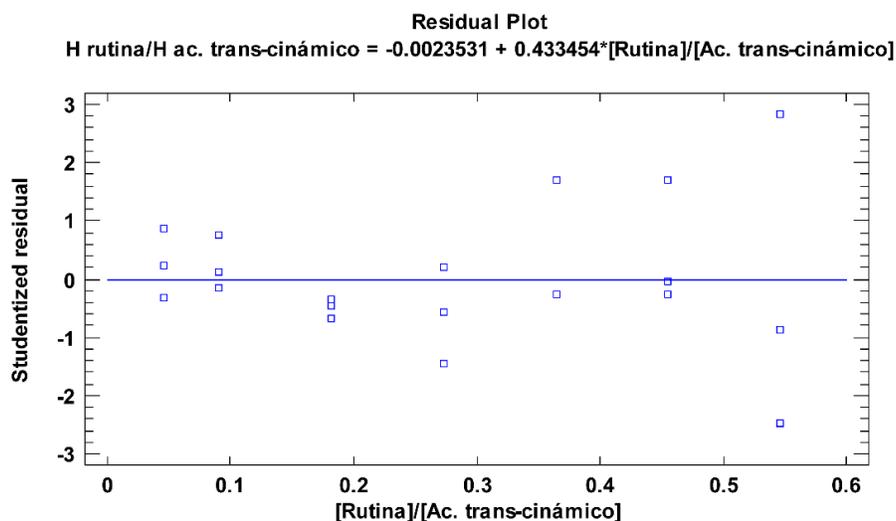


Figura A.28 Gráfica de residuales para la curva de calibración de rutina.

En la tabla A.27 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.27 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	1.1775×10^{-1}	1	1.1775×10^{-1}
Residuo	5.8820×10^{-4}	19	3.0958×10^{-5}
- Carencia de Ajuste	9.3684×10^{-5}	5	1.8737×10^{-5}
- Error Puro	4.9452×10^{-4}	14	3.5323×10^{-5}
Total (Corr.)	1.1834×10^{-1}	20	

A partir de los datos de la tabla A.27 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{\text{Exp}} = \frac{MS_{\text{FDA}}}{MS_{\text{EP}}} = \frac{1.8737 \times 10^{-5}}{3.5323 \times 10^{-5}} = 0.530$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=14$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{\text{Tablas}}=2.958$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{\text{Exp}} < F_{\text{Tablas}} = 0.530 < 2.958$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9950, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvo los valores reportados en la tabla A.28.

Tabla A.28 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.4149	$S_{y/x}$	0.0056
Σxy	0.9693	Σx	5.8711
Σy	2.4954	Σx^2	2.2681
$n-2$	19	S_{b1}	0.0070
b_1	0.4335	$t_{0.975,19}$	2.0930
b_0	-0.0024		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.28 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 0.4335 \pm (2.0930)(0.0070) = 0.4335 \pm 0.0147$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.4188 hasta 0.4482 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y observó de nuevo un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.25 y A.28, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (201.17 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0056}{0.4335} \right) = 8.5215 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de rutina es de 8.5215 mg/L utilizando como estándar interno el ácido *trans*-cinámico.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.25 y A.28, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (201.17 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0056}{0.4335} \right) = 25.8228 \text{ mg/L}$$



Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de rutina es de 25.8228 mg/L utilizando como EI el ácido *trans*-cinámico.

(-)-Epicatequina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta el área de los picos; en la tabla A.29 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de áreas y concentraciones.

Tabla A.29 Datos de la curva de calibración para el estándar de (-)-epicatequina.

n	Solución	[(-)-Epicatequina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	A _{(-)-Epicatequina}	A _{Ac. benzoico}	[(-)-Epicatequina]/[Ac. benzoico]	A _{(-)-Epicatequina} /A _{Ac. benzoico}
1	1	6.01	340.43	5374	520753	0.0177	0.0103
2	1	6.01	340.43	7145	510771	0.0177	0.0140
3	1	6.01	340.43	4092	519551	0.0177	0.0079
4	2	12.02	340.43	13209	422745	0.0353	0.0312
5	2	12.02	340.43	13810	436960	0.0353	0.0316
6	2	12.02	340.43	13720	423747	0.0353	0.0324
7	3	24.05	340.43	26025	396015	0.0706	0.0657
8	3	24.05	340.43	23716	360517	0.0706	0.0658
9	3	24.05	340.43	23478	395371	0.0706	0.0594
10	4	36.07	340.43	39757	391616	0.1060	0.1015
11	4	36.07	340.43	39410	407806	0.1060	0.0966
12	4	36.07	340.43	42978	412118	0.1060	0.1043
13	5	48.10	340.43	58981	433552	0.1413	0.1360
14	5	48.10	340.43	62766	467810	0.1413	0.1342
15	5	48.10	340.43	56983	429417	0.1413	0.1327
16	6	60.12	340.43	61446	360983	0.1766	0.1702
17	6	60.12	340.43	65457	374035	0.1766	0.1750
18	6	60.12	340.43	67077	380675	0.1766	0.1762
19	7	72.14	340.43	83185	410269	0.2119	0.2028
20	7	72.14	340.43	82495	383850	0.2119	0.2149
21	7	72.14	340.43	85012	428381	0.2119	0.1985

En la figura A.29 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración del estándar de (-)-epicatequina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

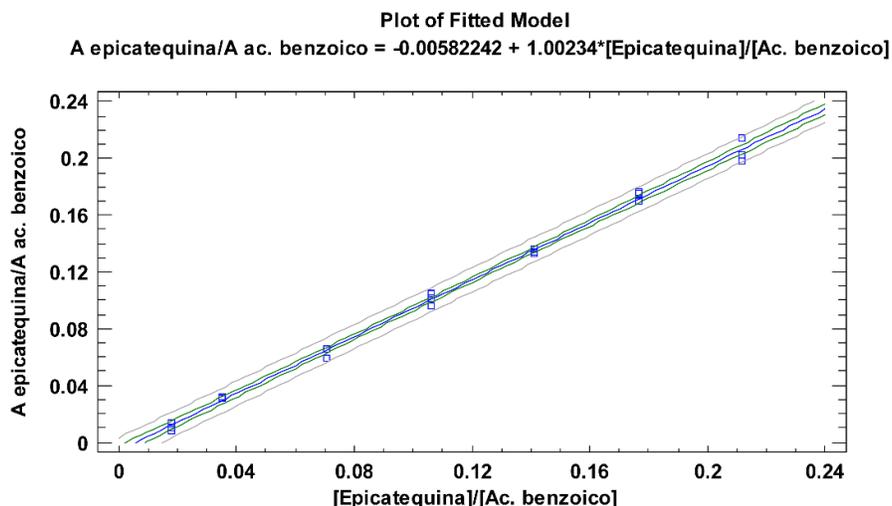


Figura A.29 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de (-)-epicatequina.

En la tabla A.30 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.30 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de (-)-epicatequina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0058	0.0017	Correlación (r)	0.9984
Pendiente (b_1)	1.0023	0.0130	Determinación (r^2)	0.9968

En la figura A.30 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

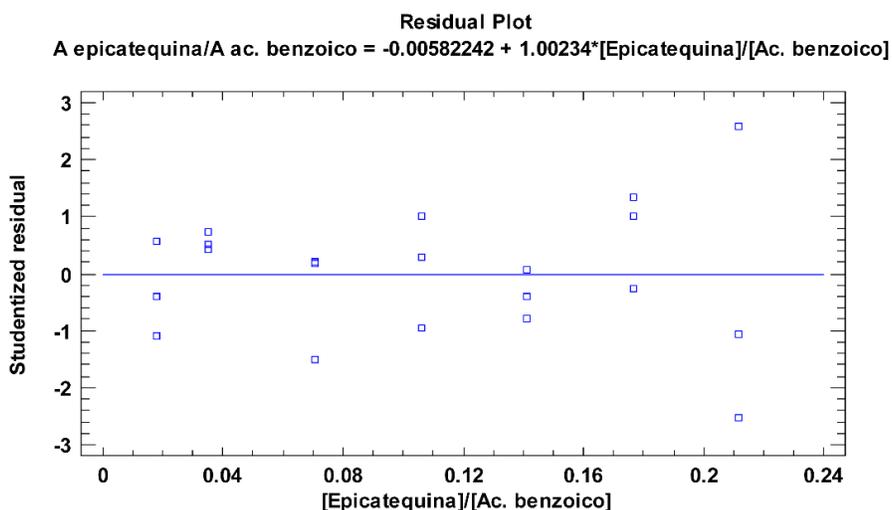


Figura A.30 Gráfica de residuales para la curva de calibración de (-)-epicatequina.

En la tabla A.31 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.31 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	9.4807×10 ⁻²	1	9.4807×10 ⁻²
Residuo	3.0382×10 ⁻⁴	19	1.5990×10 ⁻⁵
- Carencia de Ajuste	5.5706×10 ⁻⁵	5	1.1141×10 ⁻⁵
- Error Puro	2.4811×10 ⁻⁴	14	1.7722×10 ⁻⁵
Total (Corr.)	9.5110×10 ⁻²	20	

A partir de los datos de la tabla A.31 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{1.1141 \times 10^{-5}}{1.7722 \times 10^{-5}} = 0.629$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=14$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=2.958$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 0.629 < 2.958$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9968, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvo los valores reportados en la tabla A.32.

Tabla A.32 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.3175	$S_{y/x}$	0.0040
Σxy	0.3290	Σx	2.2781
Σy	2.1612	Σx^2	0.3415
$n-2$	19	S_{b1}	0.0130
b_1	1.0023	$t_{0.975,19}$	2.0930
b_0	-0.0058		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.32 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 1.0023 \pm (2.0930)(0.0130) = 1.0023 \pm 0.0272$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.9751 hasta 1.0295 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo los datos se ajustaron al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.29 y A.32, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0040}{1.0023} \right) = 4.4819 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de (-)-epicatequina es de 4.4819 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.29 y A.32, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0040}{1.0023} \right) = 13.5814 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de (-)-epicatequina es de 13.5814 mg/L.

(+)-Catequina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta el área de los picos; en la tabla A.33 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de áreas y concentraciones.

Tabla A.33 Datos de la curva de calibración para el estándar de (+)-catequina.

n	Solución	[(+)- Catequina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	A _{(+)-Catequina}	A _{Ac. benzoico}	[(+)- Catequina]/[A c. benzoico]	A _{(+)- Catequina} /A _{Ac. benzoico}
1	1	96.35	340.43	142630	520753	0.2830	0.2739
2	1	96.35	340.43	138081	510771	0.2830	0.2703
3	1	96.35	340.43	144060	519551	0.2830	0.2773
4	2	120.44	340.43	153010	422745	0.3538	0.3619
5	2	120.44	340.43	159936	436960	0.3538	0.3660
6	2	120.44	340.43	154811	423747	0.3538	0.3653
7	3	144.53	340.43	168830	396015	0.4246	0.4263
8	3	144.53	340.43	152102	360517	0.4246	0.4219
9	3	144.53	340.43	166162	395371	0.4246	0.4203
10	4	168.62	340.43	188313	391616	0.4953	0.4809
11	4	168.62	340.43	195796	407806	0.4953	0.4801
12	4	168.62	340.43	203595	412118	0.4953	0.4940
13	5	192.71	340.43	240323	433552	0.5661	0.5543
14	5	192.71	340.43	254439	467810	0.5661	0.5439
15	5	192.71	340.43	239438	429417	0.5661	0.5576
16	6	216.80	340.43	217305	360983	0.6368	0.6020
17	6	216.80	340.43	229905	374035	0.6368	0.6147
18	6	216.80	340.43	240389	380675	0.6368	0.6315
19	7	240.88	340.43	280308	410269	0.7076	0.6832
20	7	240.88	340.43	273227	383850	0.7076	0.7118
21	7	240.88	340.43	294122	428381	0.7076	0.6866

En la figura A.31 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración del estándar de (+)-catequina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

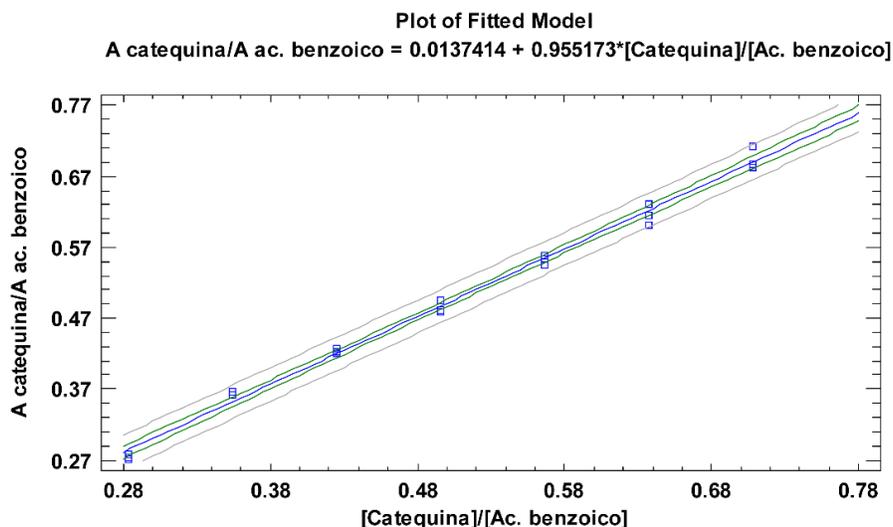


Figura A.31 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de (+)-catequina.

En la tabla A.34 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.34 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de (+)-catequina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto (b_0)	0.0137	0.0086	Correlación (r)	0.9971
Pendiente (b_1)	0.9552	0.0167	Determinación (r^2)	0.9942

En la figura A.32 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

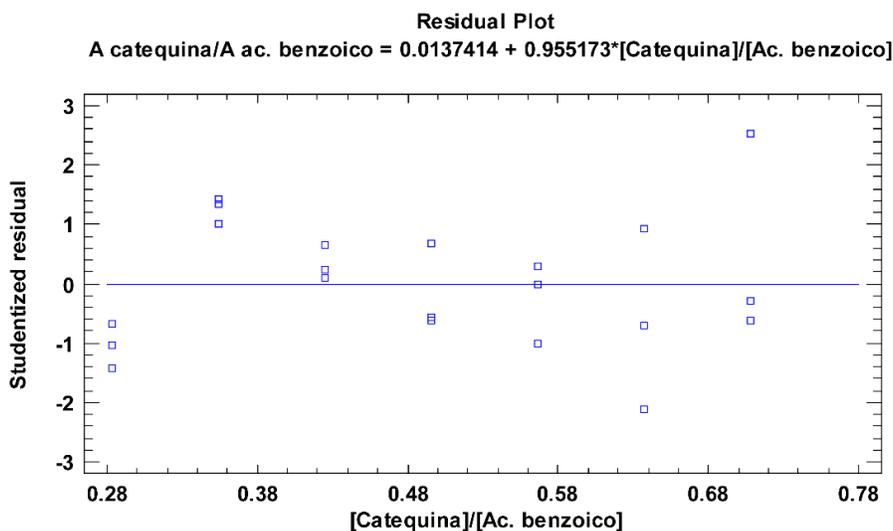


Figura A.32 Gráfica de residuales para la curva de calibración de (+)-catequina.

En la tabla A.35 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.35 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	3.8371×10 ⁻¹	1	3.8371×10 ⁻¹
Residuo	2.2366×10 ⁻³	19	1.1772×10 ⁻⁴
- Carencia de Ajuste	1.0329×10 ⁻³	5	2.0657×10 ⁻⁴
- Error Puro	1.2037×10 ⁻³	14	8.5981×10 ⁻⁵
Total (Corr.)	3.8595×10 ⁻¹	20	

A partir de los datos de la tabla A.35 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{2.0657 \times 10^{-4}}{8.5981 \times 10^{-5}} = 2.403$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=14$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=2.958$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 2.403 < 2.958$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9942, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.36.

Tabla A.36 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	5.3634	$S_{y/x}$	0.0108
Σxy	5.4657	Σx	10.4015
Σy	10.2238	Σx^2	5.5726
$n-2$	19	S_{b1}	0.0167
b_1	0.9552	$t_{0.975,19}$	2.0930
b_0	0.0137		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.36 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 0.9552 \pm (2.0930)(0.0167) = 0.9552 \pm 0.0350$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.9202 hasta 0.9902 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo los datos se ajustaron al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.33 y A.36, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0108}{0.9552} \right) = 12.7608 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de (+)-catequina es de 12.7608 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.33 y A.36, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0108}{0.9552} \right) = 38.6690 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de (+)-catequina es de 38.6690 mg/L.

Ácido clorogénico.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.37 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

Tabla A.37 Datos de la curva de calibración para el estándar de ácido clorogénico.

n	Solución	[Ac. clorogénico] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	H _{Ac. clorogénico}	H _{Ac. benzoico}	[Ac. clorogénico]/[Ac. benzoico]	H _{Ac. clorogénico} /H _{Ac. benzoico}
1	1	25.16	340.43	1488	97289	0.0739	0.0153
2	1	25.16	340.43	1659	95891	0.0739	0.0173
3	1	25.16	340.43	1827	97647	0.0739	0.0187
4	2	50.31	340.43	2732	88615	0.1478	0.0308
5	2	50.31	340.43	2770	91659	0.1478	0.0302
6	2	50.31	340.43	2850	89689	0.1478	0.0318
7	3	100.62	340.43	4815	83880	0.2956	0.0574
8	3	100.62	340.43	4611	77056	0.2956	0.0598
9	3	100.62	340.43	4334	76384	0.2956	0.0567
10	4	150.94	340.43	6809	76747	0.4434	0.0887
11	4	150.94	340.43	7251	79519	0.4434	0.0912
12	4	150.94	340.43	7486	82044	0.4434	0.0912
13	5	201.25	340.43	10095	82098	0.5912	0.1230
14	5	201.25	340.43	11335	90008	0.5912	0.1259
15	5	201.25	340.43	10545	83977	0.5912	0.1256
16	6	251.56	340.43	10638	70482	0.7390	0.1509
17	6	251.56	340.43	10690	73732	0.7390	0.1450
18	6	251.56	340.43	11812	75289	0.7390	0.1569
19	7	301.87	340.43	14474	79144	0.8867	0.1829
20	7	301.87	340.43	13662	75272	0.8867	0.1815
21	7	301.87	340.43	13530	74654	0.8867	0.1812

En la figura A.33 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración del estándar de ácido clorogénico, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

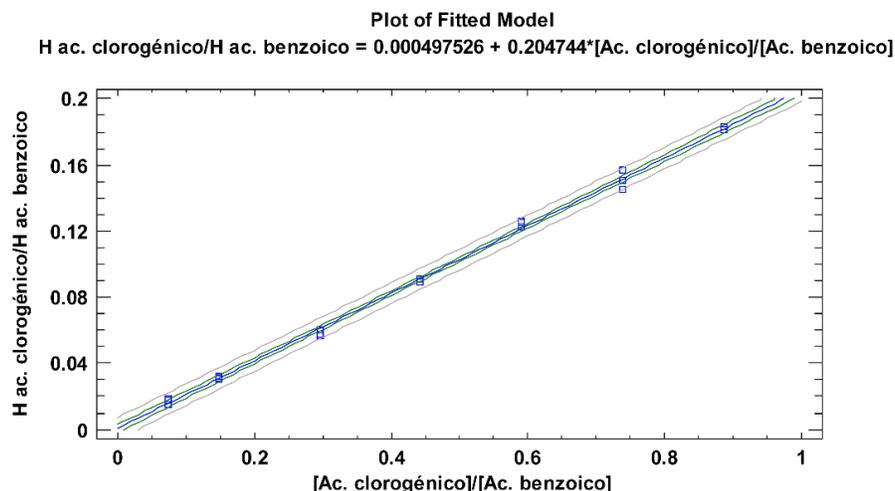


Figura A.33 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de ácido clorogénico.

En la tabla A.38 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.38 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de (-)-epicatequina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coficiente	Valor
Intercepto (b_0)	0.0005	0.0012	Correlación (r)	0.9988
Pendiente (b_1)	0.2047	0.0023	Determinación (r^2)	0.9976

En la figura A.34 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

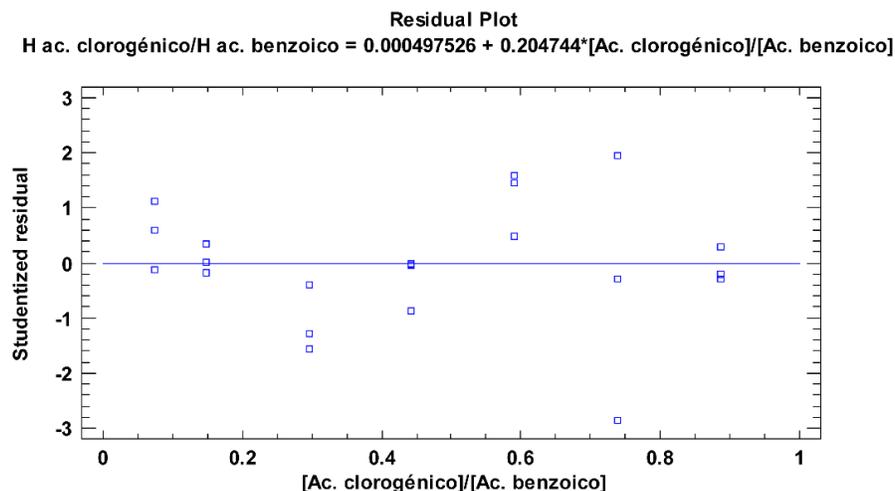


Figura A.34 Gráfica de residuales para la curva de calibración de ácido clorogénico.

En la tabla A.39 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).



Tabla A.39 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	6.9259×10^{-2}	1	6.9259×10^{-2}
Residuo	1.6541×10^{-4}	19	8.7058×10^{-6}
- Carencia de Ajuste	7.1142×10^{-5}	5	1.4228×10^{-5}
- Error Puro	9.4269×10^{-5}	14	6.7335×10^{-6}
Total (Corr.)	6.9425×10^{-2}	20	

A partir de los datos de la tabla A.39 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{1.4228 \times 10^{-5}}{6.7335 \times 10^{-6}} = 2.113$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=5$ y $n-k=14$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=2.958$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 2.113 < 2.958$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9976, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.40.

Tabla A.40 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.2528	$S_{y/x}$	0.0030
Σxy	1.2289	Σx	9.5324
Σy	1.9622	Σx^2	5.9792
$n-2$	19	S_{b_1}	0.0023
b_1	0.2047	$t_{0.975,19}$	2.0930
b_0	0.0005		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.40 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 0.2047 \pm (2.0930)(0.0023) = 0.2047 \pm 0.0048$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.1999 hasta 0.2095 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo los datos se ajustaron al modelo lineal.



Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.37 y A.40, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0030}{0.2047} \right) = 16.1896 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de ácido clorogénico es de 16.1896 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.37 y A.40, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0030}{0.2047} \right) = 49.0593 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de ácido clorogénico es de 49.0593 mg/L.

Apigenina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta el área de los picos; en la tabla A.41 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de áreas y concentraciones.

Previamente se analizaron los datos con un gráfico de residuales y se encontraron que las mediciones 4, 5, 6 y 8 (tabla A.41) dan valores atípicos con un 95% de confianza, por lo que se descartaron del análisis ANOVA y de la curva de calibración.

Tabla A.41 Datos de la curva de calibración para el estándar de apigenina.

n	Solución	[Apigenina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	A _{Apigenina}	A _{Ac. benzoico}	[Apigenina]/[Ac. benzoico]	A _{Apigenina} /A _{Ac. benzoico}
1	1	24.68	340.43	35545	520753	0.0725	0.0683
2	1	24.68	340.43	32958	510771	0.0725	0.0645
3	1	24.68	340.43	33492	519551	0.0725	0.0645
*4	2	30.85	340.43	20690	422745	0.0906	0.0489
*5	2	30.85	340.43	24837	436960	0.0906	0.0568
*6	2	30.85	340.43	23367	423747	0.0906	0.0551
7	3	37.02	340.43	40532	396015	0.1087	0.1024
*8	3	37.02	340.43	32071	360517	0.1087	0.0890
9	3	37.02	340.43	39907	395371	0.1087	0.1009
10	4	43.18	340.43	46910	391616	0.1269	0.1198
11	4	43.18	340.43	50457	407806	0.1269	0.1237
12	4	43.18	340.43	51945	412118	0.1269	0.1260
13	5	49.35	340.43	59273	433552	0.1450	0.1367
14	5	49.35	340.43	61927	467810	0.1450	0.1324
15	5	49.35	340.43	59327	429417	0.1450	0.1382
16	6	55.52	340.43	57578	360983	0.1631	0.1595
17	6	55.52	340.43	57794	374035	0.1631	0.1545
18	6	55.52	340.43	60628	380675	0.1631	0.1593
19	7	61.69	340.43	72892	410269	0.1812	0.1777
20	7	61.69	340.43	71181	405706	0.1812	0.1774
21	7	63.73	340.43	73753	406299	0.1872	0.1838

En la figura A.35 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración del estándar de apigenina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

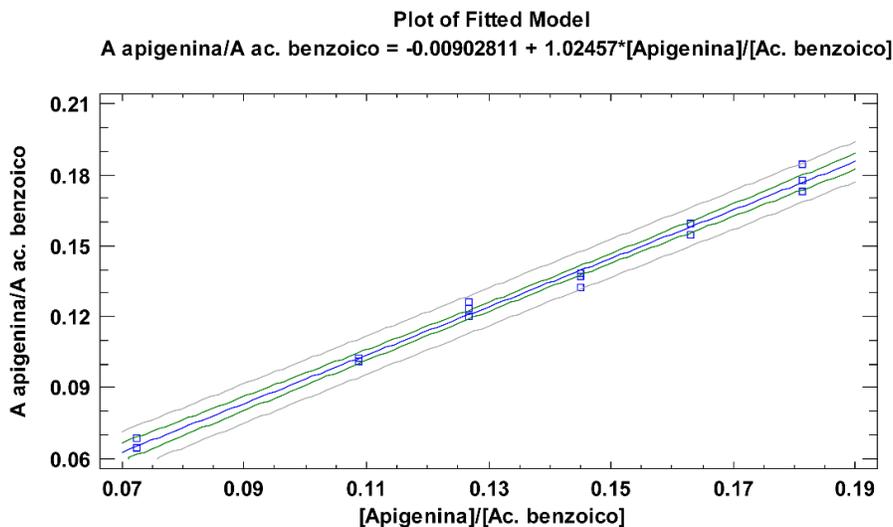


Figura A.35 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de apigenina.

En la tabla A.42 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.42 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de apigenina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0090	0.0034	Correlación (r)	0.9958
Pendiente (b_1)	1.0246	0.0245	Determinación (r^2)	0.9915

En la figura A.36 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

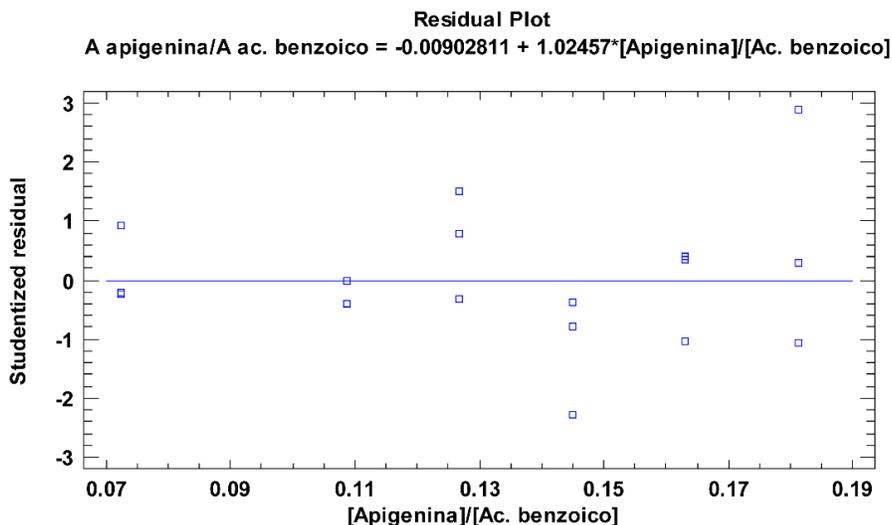


Figura A.36 Gráfica de residuales para la curva de calibración de apigenina.

En la tabla A.43 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.43 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	2.3483×10^{-2}	1	2.3483×10^{-2}
Residuo	2.0073×10^{-4}	15	1.3382×10^{-5}
- Carencia de Ajuste	6.9464×10^{-5}	4	1.7366×10^{-5}
- Error Puro	1.3127×10^{-4}	11	1.1933×10^{-5}
Total (Corr.)	2.3683×10^{-2}	16	

A partir de los datos de la tabla A.43 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{1.7366 \times 10^{-5}}{1.1933 \times 10^{-5}} = 1.455$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=4$ y $n-k=11$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=3.357$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 1.455 < 3.357$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9915, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.44.

Tabla A.44 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.3048	$S_{y/x}$	0.0037
Σxy	0.3165	Σx	2.2833
Σy	2.1860	Σx^2	0.3291
$n-2$	15	S_{b_1}	0.0245
b_1	1.0246	$t_{0.975,15}$	2.1310
b_0	-0.0090		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.44 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 1.0246 \pm (2.1310)(0.0245) = 1.0246 \pm 0.0521$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.9725 hasta 1.0767 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo los datos se ajustaron al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.41 y A.44, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0037}{1.0246} \right) = 4.0111 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de apigenina es de 4.0111 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.41 y A.44, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0037}{1.0246} \right) = 12.1548 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de apigenina es de 12.1548 mg/L.

Este estándar se identificó tanto en el extracto etanol-agua (70:30) de la planta Coahuila 2 como en el extracto hidrolizado, de acuerdo a lo anterior, también se validó el modelo lineal de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido *trans*-cinámico, el cual se utilizó para la cuantificación en el extracto hidrolizado. Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.45 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

Previamente se analizaron los datos con un gráfico de residuales y se encontraron que las mediciones 4, 5, y 6 (tabla A.45) dan valores atípicos con un 95% de confianza, por lo que se descartaron del análisis ANOVA y de la curva de calibración.

Tabla A.45 Datos de la curva de calibración para el estándar de apigenina.

n	Solución	[Apigenina] (mg/L)	[Ac. trans-cinámico] (mg/L)	H _{Apigenina}	H _{Ac. trans-cinámico}	[Apigenina]/[Ac. trans-cinámico]	H _{Apigenina} /H _{Ac. trans-cinámico}
1	1	24.68	201.17	6031	49908	0.1227	0.1208
2	1	24.68	201.17	5900	49271	0.1227	0.1197
3	1	24.68	201.17	5945	49912	0.1227	0.1191
*4	2	30.85	201.17	4041	45475	0.1533	0.0889
*5	2	30.85	201.17	4727	47564	0.1533	0.0994
*6	2	30.85	201.17	4635	46647	0.1533	0.0994
7	3	37.02	201.17	7678	43872	0.1840	0.1750
8	3	37.02	201.17	6693	40261	0.1840	0.1662
9	3	37.02	201.17	6557	40453	0.1840	0.1621
10	4	43.18	201.17	8130	40107	0.2147	0.2027
11	4	43.18	201.17	8578	41414	0.2147	0.2071
12	4	43.18	201.17	9085	42520	0.2147	0.2137
13	5	49.35	201.17	9915	42615	0.2453	0.2327
14	5	49.35	201.17	10799	45436	0.2453	0.2377
15	5	49.35	201.17	10333	42838	0.2453	0.2412
16	6	55.52	201.17	9767	36195	0.2760	0.2698
17	6	55.52	201.17	9884	37385	0.2760	0.2644
18	6	55.52	201.17	10840	39377	0.2760	0.2753
19	7	61.69	201.17	12159	40100	0.3067	0.3032
20	7	61.69	201.17	11814	39016	0.3067	0.3028
21	7	61.69	201.17	11255	40025	0.3067	0.2812

En la figura A.37 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración del estándar de apigenina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

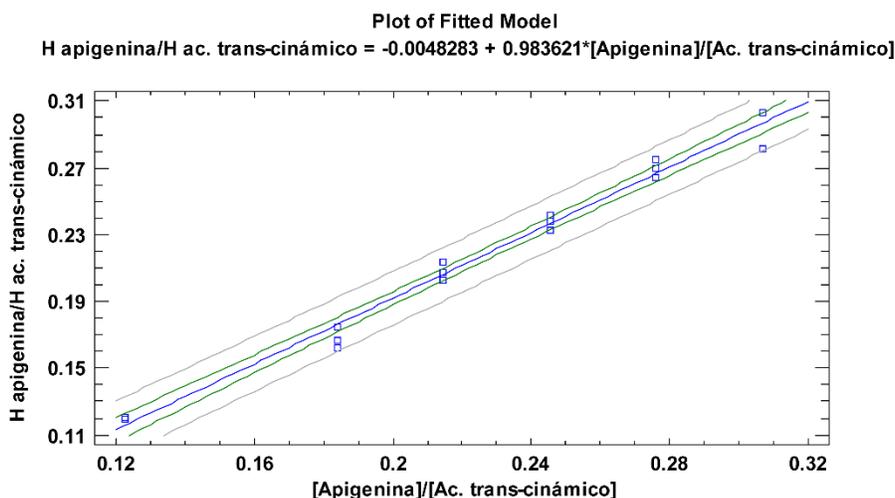


Figura A.37 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de apigenina.

En la tabla A.46 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.46 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de apigenina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0048	0.0067	Correlación (r)	0.9933
Pendiente (b_1)	0.9836	0.0287	Determinación (r^2)	0.9866

En la figura A.38 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

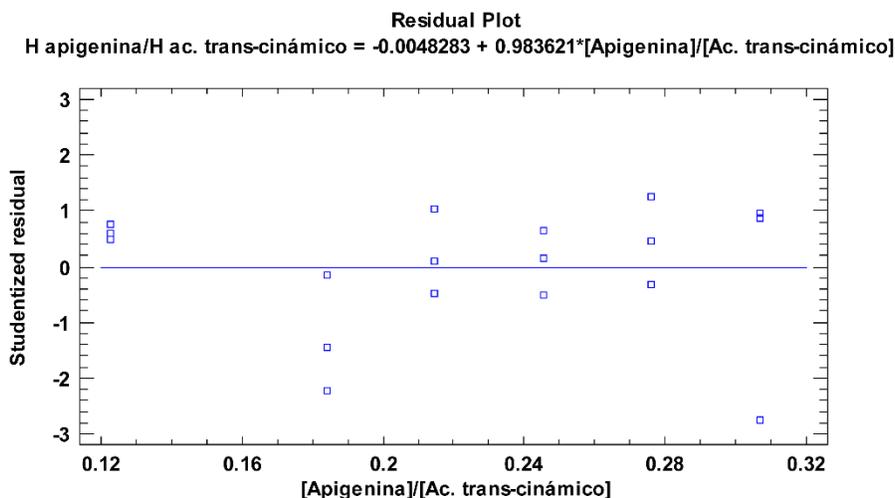


Figura A.38 Gráfica de residuales para la curva de calibración de apigenina.

En la tabla A.47 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.47 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	6.3693×10^{-2}	1	6.3693×10^{-2}
Residuo	8.6537×10^{-4}	16	5.4085×10^{-5}
- Carencia de Ajuste	3.0255×10^{-4}	4	7.5639×10^{-5}
- Error Puro	5.6281×10^{-4}	12	4.6901×10^{-5}
Total (Corr.)	6.4559×10^{-2}	17	

A partir de los datos de la tabla A.47 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{7.5639 \times 10^{-5}}{4.6901 \times 10^{-5}} = 1.613$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=4$ y $n-k=12$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{Tablas}=3.259$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{Exp} < F_{Tablas} = 1.613 < 3.259$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9866, el cual es mayor que 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.48.

Tabla A.48 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.9073	$S_{y/x}$	0.0074
Σxy	0.9407	Σx	4.0480
Σy	3.8948	Σx^2	0.9762
$n-2$	16	S_{b_1}	0.0287
b_1	0.9836	$t_{0.975,16}$	2.1200
b_0	-0.0048		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.48 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 0.9836 \pm (2.1200)(0.0287) = 0.9836 \pm 0.0608$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.9228 hasta 1.0444 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y de nuevo los datos se ajustaron al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.45 y A.48, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (201.17 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0074}{0.9836} \right) = 4.9635 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de apigenina es de 4.9635 mg/L a estas condiciones.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.45 y A.48, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (201.17 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0074}{0.9836} \right) = 15.0408 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de apigenina es de 15.0408 mg/L.

Kaempferol.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta el área de los picos; en la tabla A.49 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de áreas y concentraciones.

En la experimentación se obtuvieron mediciones no detectadas (ND), es decir, no se observó la señal del estándar, estas mediciones fueron la 1, 2, 3, 5, 6, 13 y 14 (tabla A.49). De esta forma se realizó la validación del modelo lineal con los datos disponibles.

Tabla A.49 Datos de la curva de calibración para el estándar de kaempferol.

n	Solución	[Kaempferol] (mg/L)	[Ac. Benzoico] (mg/L)	$A_{\text{Kaempferol}}$	$A_{\text{Ac. benzoico}}$	$[\text{Kaempferol}]/[\text{Ac. benzoico}]$	$A_{\text{Kaempferol}}/A_{\text{Ac. benzoico}}$
*1	1	1.64	340.43	ND	520753	0.0048	ND
*2	1	1.64	340.43	ND	510771	0.0048	ND
*3	1	1.64	340.43	ND	519551	0.0048	ND
4	2	3.28	340.43	2161	422745	0.0096	0.0051
*5	2	3.28	340.43	ND	436960	0.0096	ND
*6	2	3.28	340.43	ND	423747	0.0096	ND
7	3	4.92	340.43	7277	396015	0.0144	0.0184
8	3	4.92	340.43	3111	360517	0.0144	0.0086
9	3	4.92	340.43	2108	395371	0.0144	0.0053
10	4	6.56	340.43	10571	391616	0.0193	0.0270
11	4	6.56	340.43	3881	407806	0.0193	0.0095
12	4	6.56	340.43	9413	412118	0.0193	0.0228
*13	5	8.20	340.43	ND	433552	0.0241	ND
*14	5	8.20	340.43	ND	467810	0.0241	ND
15	5	8.20	340.43	10050	429417	0.0241	0.0234
16	6	9.84	340.43	12615	360983	0.0289	0.0349
17	6	9.84	340.43	13059	374035	0.0289	0.0349
18	6	9.84	340.43	13194	380675	0.0289	0.0347
19	7	11.48	340.43	19095	410269	0.0337	0.0465
20	7	11.48	340.43	19344	383850	0.0337	0.0504
21	7	11.48	340.43	15463	428381	0.0337	0.0361

En la figura A.39 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para kaempferol, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

En la tabla A.50 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.50 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de kaempferol.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coeficiente	Valor
Intercepto (b_0)	-0.0128	0.0047	Correlación (r)	0.9289
Pendiente (b_1)	1.6650	0.1917	Determinación (r^2)	0.8628

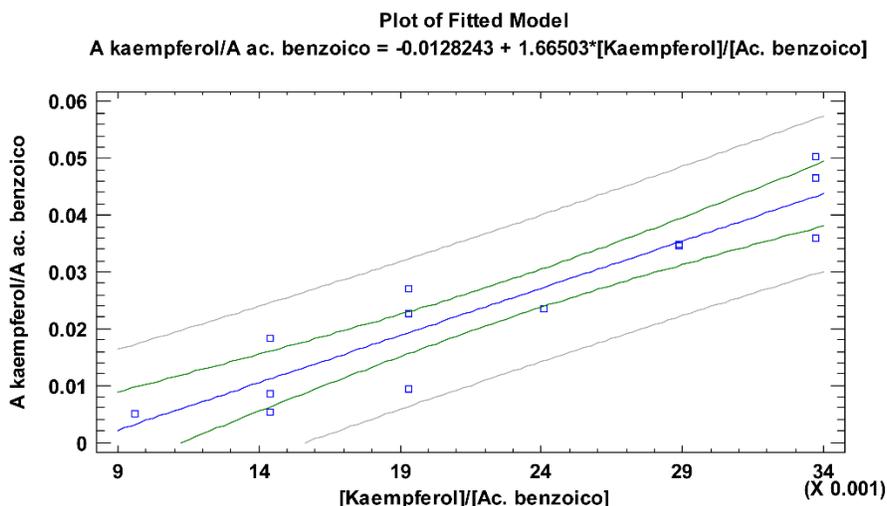


Figura A.39 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de kaempferol.

En la figura A.40 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

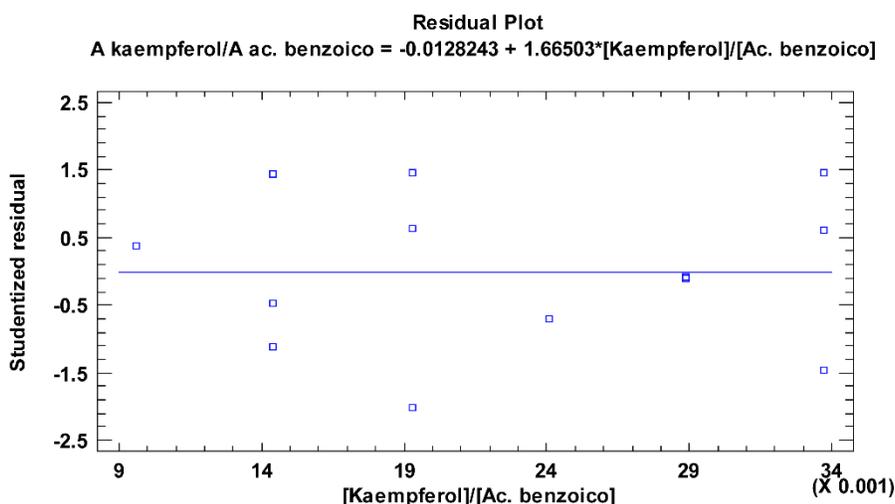


Figura A.40 Gráfica de residuales para la curva de calibración de kaempferol.

En la tabla A.51 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA} , MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.51 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	2.4718×10^{-3}	1	2.4718×10^{-3}
Residuo	3.9308×10^{-4}	12	3.2756×10^{-5}
- Carencia de Ajuste	2.3988×10^{-5}	4	5.9971×10^{-6}
- Error Puro	3.6909×10^{-4}	8	4.6136×10^{-5}
Total (Corr.)	2.8649×10^{-3}	13	

A partir de los datos de la tabla A.51 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp} , de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{\text{Exp}} = \frac{MS_{\text{FDA}}}{MS_{\text{EP}}} = \frac{5.9971 \times 10^{-6}}{4.6136 \times 10^{-5}} = 0.130$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad $k-2=4$ y $n-k=8$, de esta forma se obtuvo un valor de $F_{\text{Tablas}}=3.838$; por lo que se cumple:

$H_0 = F_{\text{Exp}} < F_{\text{Tablas}} = 0.130 < 3.838$, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.8628, el cual es menor que 0.98, por medio de este criterio no es válido el modelo lineal, sin embargo el test con falta de ajuste (ANOVA) nos dice que el modelo si es válido, además, al comparar otros modelos que pueden describir mejor la tendencia de los datos (tabla A.52), observamos que el modelo lineal es el que mejor se ajusta. El valor bajo de r^2 es debido posiblemente a las concentraciones bajas (cerca del límite de detección) usadas para realizar la curva de calibración, lo que aumenta la incertidumbre entre las respuestas, dándonos una variabilidad mayor de los datos y un bajo valor de r^2 .

Tabla A. 52 Comparación de modelos alternos para el ajuste de los datos de la curva de calibración de kaempferol

Modelo	r	r ²
Lineal	0.9289	0.8628
Cuadrado de X	0.9282	0.8615
Raíz Cuadrada de X	0.9214	0.8490
Cuadrado Doble	0.9211	0.8485
Raíz Cuadrada Doble	0.9178	0.8424
Raíz Cuadrada de Y	0.9166	0.8402

De esta forma se validó el modelo lineal para los datos de la curva de calibración de kaempferol.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.53.

Tabla A.53 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0120	$S_{y/x}$	0.0058
Σxy	0.0097	Σx	0.3226
Σy	0.3578	Σx^2	0.0083
n-2	12	S_{b1}	0.1930
b_1	1.6650	$t_{0.975,12}$	2.1790
b_0	-0.0128		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.53 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 1.6650 \pm (2.1790)(0.1930) = 1.6650 \pm 0.4206$$

Por lo tanto el intervalo va desde 1.2444 hasta 2.0856 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y se observó de esta forma un ajuste de los datos al modelo lineal.



Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.49 y A.53, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0058}{1.6650} \right) = 3.8795 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de kaempferol es de 3.8795 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.49 y A.53, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0058}{1.6650} \right) = 11.7561 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de kaempferol es de 11.7561 mg/L.

Quercetina.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.54 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

En la experimentación se obtuvieron mediciones no detectadas (ND), es decir, no se observó la señal del estándar, estas mediciones fueron la 1, 2, 3, 6 y 13 (tabla A.54). De esta forma se realizó la validación del modelo lineal con los datos disponibles.

Tabla A.54 Datos de la curva de calibración para el estándar de quercetina.

n	Solución	[Quercetina] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	H _{Quercetina}	H _{Ac. benzoico}	[Quercetina]/[Ac. benzoico]	H _{Quercetina} /H _{Ac. benzoico}
*1	1	1.85	340.43	ND	97289	0.0054	ND
*2	1	1.85	340.43	ND	95891	0.0054	ND
*3	1	1.85	340.43	ND	97647	0.0054	ND
4	2	3.70	340.43	362	88615	0.0109	0.0041
5	2	3.70	340.43	321	91659	0.0109	0.0035
*6	2	3.70	340.43	ND	89689	0.0109	ND
7	3	5.56	340.43	782	83880	0.0163	0.0093
8	3	5.56	340.43	674	77056	0.0163	0.0087
9	3	5.56	340.43	573	76384	0.0163	0.0075
10	4	7.41	340.43	838	76747	0.0218	0.0109
11	4	7.41	340.43	1132	79519	0.0218	0.0142
12	4	7.41	340.43	1303	82044	0.0218	0.0159
*13	5	9.26	340.43	ND	82098	0.0272	ND
14	5	9.26	340.43	1636	90008	0.0272	0.0182
15	5	9.26	340.43	1951	83977	0.0272	0.0232
16	6	11.11	340.43	1662	70482	0.0326	0.0236
17	6	11.11	340.43	1793	73732	0.0326	0.0243
18	6	11.11	340.43	2020	75289	0.0326	0.0268
19	7	12.97	340.43	2587	79144	0.0381	0.0327
20	7	12.97	340.43	2528	75272	0.0381	0.0336
21	7	12.97	340.43	2038	74654	0.0381	0.0273

En la figura A.41 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para quercetina, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

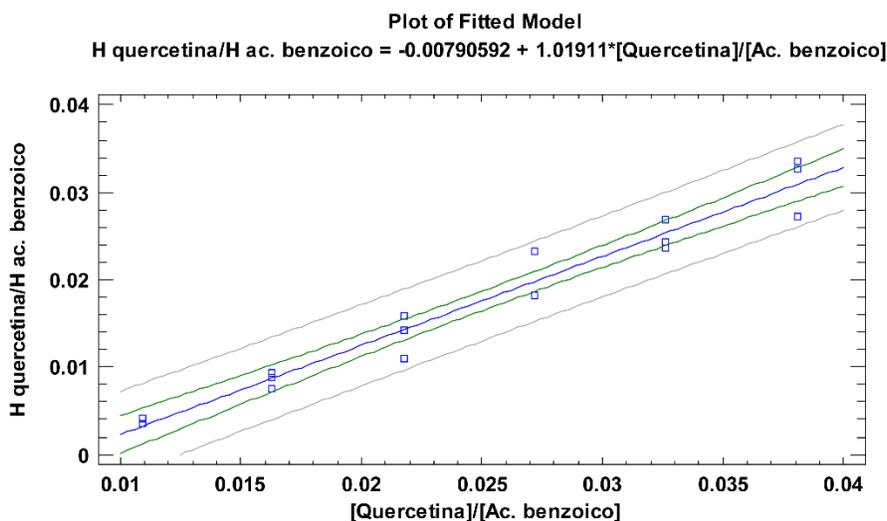


Figura A.41 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de quercetina.

En la tabla A.55 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.55 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de quercetina.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b ₀)	-0.0079	0.0015	Correlación (r)	0.9791
Pendiente (b ₁)	1.0191	0.0566	Determinación (r ²)	0.9587

En la figura A.42 se muestra el gráfico de residuales, donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

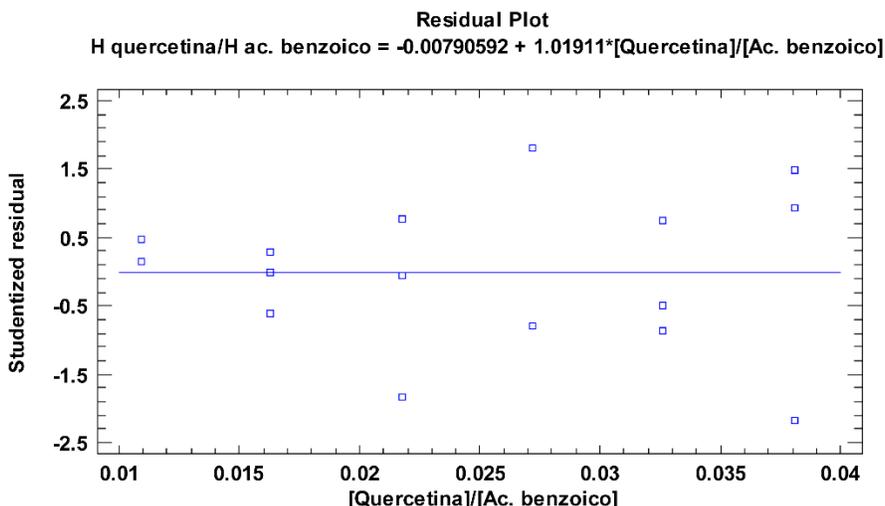


Figura A.42 Gráfica de residuales para la curva de calibración de quercetina.

En la tabla A.56 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA}, MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.56 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	1.4050×10 ⁻³	1	1.4050×10 ⁻³
Residuo	6.0576×10 ⁻⁵	14	4.3269×10 ⁻⁶
- Carencia de Ajuste	4.4092×10 ⁻⁶	4	1.1023×10 ⁻⁶
- Error Puro	5.6167×10 ⁻⁵	10	5.6167×10 ⁻⁶
Total (Corr.)	1.4656×10 ⁻³	15	

A partir de los datos de la tabla A.56 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp}, de esta forma se obtuvo el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{1.1023 \times 10^{-6}}{5.6167 \times 10^{-6}} = 0.196$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad k-2=4 y n-k=10, de esta forma se obtuvo un valor de F_{Tablas}=3.478; por lo que se cumple:

H₀ = F_{Exp} < F_{Tablas} = 0.196 < 3.478, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r^2) cuyo valor es de 0.9587, el cual es menor que 0.98, por medio de este criterio no es válido el modelo lineal, se buscó un modelo alternativo que nos describiera mejor la tendencia de los datos (tabla A.57), sin embargo, no se observó mejora en el coeficiente de determinación (r^2), por lo que se optó por el modelo lineal por la sencillez que tiene; el test con falta de ajuste (ANOVA) nos dice que el modelo lineal si es válido al realizar la prueba F, el valor bajo de r^2 es debido posiblemente a las concentraciones bajas (cerca del límite de detección) usadas para realizar la curva de calibración, lo que aumenta la incertidumbre entre las respuestas, dándonos una variabilidad mayor de los datos y un bajo valor de r^2 .

Tabla A. 57 Comparación de modelos alternos para el ajuste de los datos de la curva de calibración de quercetina.

Modelo	r	r^2
Multiplicativa	0.9847	96.96%
Raíz Cuadrada Doble	0.9841	96.84%
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0.9816	96.35%
Curva S	-0.9816	96.35%
Lineal	0.9791	95.87%
Raíz Cuadrada de Y	0.9786	95.77%

De esta forma se validó el modelo lineal para los datos de la curva de calibración de quercetina.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.58.

Tabla A.58 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente ($IC(b_1)$).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0065	$S_{y/x}$	0.0021
Σxy	0.0085	Σx	0.4026
Σy	0.2839	Σx^2	0.0115
n-2	14	S_{b1}	0.0566
b_1	1.0191	$t_{0.975,14}$	2.1450
b_0	-0.0079		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.58 se obtuvo el $IC(b_1)$ de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1} = 1.0191 \pm (2.1450)(0.0566) = 1.0191 \pm 0.1214$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.8977 hasta 1.1405 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y se observa de esta forma un ajuste de los datos al modelo lineal.



Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.54 y A.58, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0021}{1.0191} \right) = 2.2987 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de quercetina es de 2.2987 mg/L.

Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.54 y A.58, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0021}{1.0191} \right) = 6.9657 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de quercetina es de 6.9657 mg/L.

Ácido cafeico.

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración utilizando como estándar interno el ácido benzoico, y siguiendo como respuesta la altura de los picos; en la tabla A.59 se muestran los valores obtenidos en las curvas de calibración, así como la relación de alturas y concentraciones.

En la experimentación se obtuvieron mediciones no detectadas (ND), es decir, no se observó la señal del estándar, estas mediciones fueron la 1, 2 y 3 (tabla A.54). De esta forma se realizó la validación del modelo lineal con los datos disponibles.

Previamente se analizaron los datos con un gráfico de residuales y se encontró que la medición 14 (tabla A.59) da un valor atípico con un 95% de confianza, por lo que se descartó del análisis ANOVA y de la curva de calibración.

Tabla A.59 Datos de la curva de calibración para el estándar de ácido cafeico.

n	Solución	[Ac. cafeico] (mg/L)	[Ac. benzoico] (mg/L)	H _{Ac. cafeico}	H _{Ac. benzoico}	[Ac. cafeico]/[Ac. benzoico]	H _{Ac. cafeico} /H _{Ac. benzoico}
*1	1	3.08	340.43	ND	97289	0.0090	ND
*2	1	3.08	340.43	ND	95891	0.0090	ND
*3	1	3.08	340.43	ND	97647	0.0090	ND
4	2	6.15	340.43	867	88615	0.0181	0.0098
5	2	6.15	340.43	1055	91659	0.0181	0.0115
6	2	6.15	340.43	1056	89689	0.0181	0.0118
7	3	9.23	340.43	1340	83880	0.0271	0.016
8	3	9.23	340.43	930	77056	0.0271	0.0121
9	3	9.23	340.43	1127	76384	0.0271	0.0148
10	4	12.31	340.43	1490	76747	0.0362	0.0194
11	4	12.31	340.43	1608	79519	0.0362	0.0202
12	4	12.31	340.43	1745	82044	0.0362	0.0213
13	5	15.39	340.43	2249	82098	0.0452	0.0274
*14	5	15.39	340.43	267	90008	0.0452	0.0030
15	5	15.39	340.43	2184	83977	0.0452	0.026
16		18.46	340.43	2039	70482	0.0542	0.0289
17	6	18.46	340.43	2330	73732	0.0542	0.0316
18	6	18.46	340.43	2458	75289	0.0542	0.0326
19	7	21.54	340.43	2434	79144	0.0633	0.0308
20	7	21.54	340.43	2754	75272	0.0633	0.0366
21	7	21.54	340.43	2294	74654	0.0633	0.0307

En la figura A.43 se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para ácido cafeico, es visible que los datos tienen una tendencia lineal.

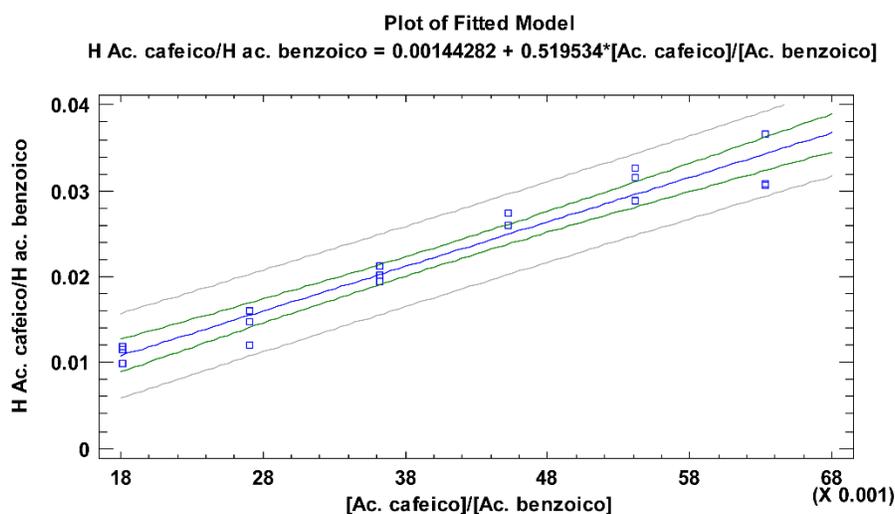


Figura A.43 Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración del estándar de ácido cafeico.

En la tabla A.60 se muestran los parámetros con su respectivo error y los coeficientes de la regresión lineal.

Tabla A.60 Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de ácido cafeico.

Parámetro	Valor estimado	Error	Coefficiente	Valor
Intercepto (b ₀)	0.0014	0.0014	Correlación (r)	0.9716
Pendiente (b ₁)	0.5195	0.0327	Determinación (r ²)	0.9440

En la figura A.44 se muestra el gráfico de residuales, donde se puede observar que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, esto indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

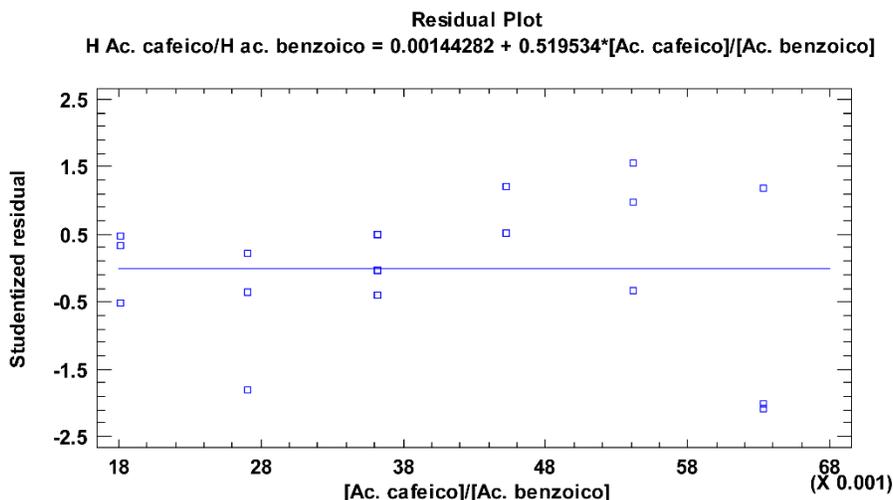


Figura A.44 Gráfica de residuales para la curva de calibración de ácido cafeico.

En la tabla A.61 se muestran los resultados del análisis ANOVA, de donde se obtiene los valores de MS_{FDA}, MS_{EP} y los respectivos grados de libertad (g.l.d.).

Tabla A.61 Resultados del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA).

Fuente	Suma de Cuadrados (SS)	g.d.l.	Cuadrado Medio (MS)
Modelo	1.1515×10 ⁻³	1	1.1515×10 ⁻³
Residuo	6.8257×10 ⁻⁵	15	4.5505×10 ⁻⁶
- Carencia de Ajuste	2.5004×10 ⁻⁵	4	6.2509×10 ⁻⁶
- Error Puro	4.3253×10 ⁻⁵	11	3.9321×10 ⁻⁶
Total (Corr.)	1.2197×10 ⁻³	16	

A partir de los datos de la tabla A.61 y de acuerdo a la ecuación 2 se calculó F_{Exp}, de esta forma se obtiene el siguiente valor:

$$F_{Exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{6.2509 \times 10^{-6}}{3.9321 \times 10^{-6}} = 1.590$$

Posteriormente se comparó con el reportado en tablas (F_{Tablas}), siendo los grados de libertad k-2=4 y n-k=11, de esta forma se obtuvo un valor de F_{Tablas}=3.357; por lo que se cumple:

H₀ = F_{Exp} < F_{Tablas} = 1.590 < 3.357, por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r²) cuyo valor es de 0.9440, el cual es menor que 0.98, por medio de este criterio no es válido el modelo lineal; se buscó un modelo alternativo que nos describiera mejor la tendencia de los datos (tabla A.62), sin embargo, no se observó mejora en el coeficiente de determinación, por lo que se optó por

el modelo lineal por la sencillez que tiene; el test con falta de ajuste (ANOVA) nos dice que el modelo lineal si es válido al realizar la prueba F, el valor bajo de r^2 es debido posiblemente a las concentraciones bajas (cerca del límite de detección) usadas para realizar la curva de calibración, lo que aumenta la incertidumbre entre las respuestas, dándonos una variabilidad mayor de los datos y un bajo valor de r^2 .

Tabla A. 62 Comparación de modelos alternos para el ajuste de los datos de la curva de calibración de ácido cafeico.

Modelo	r	r ²
Multiplicativa	0.9754	0.9513
Raíz Cuadrada Doble	0.9753	0.9512
Raíz Cuadrada-Y Log-X	0.9725	0.9458
Logarítmico-Y Raíz Cuadrada-X	0.9723	0.9453
Raíz Cuadrada de X	0.9722	0.9451
Lineal	0.9716	0.9440

De esta forma se validó el modelo lineal para los datos de la curva de calibración de ácido cafeico.

Una vez validado el modelo se determinó el intervalo de confianza para la pendiente (IC(b_1)) y de acuerdo a las ecuaciones 4 y 5 se obtuvieron los valores reportados en la tabla A.63.

Tabla A.63 Valores de los términos utilizados para el cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC(b_1)).

Término	Valor	Término	Valor
Σy^2	0.0098	$S_{y/x}$	0.0021
Σxy	0.0176	Σx	0.6870
Σy	0.3814	Σx^2	0.0320
n-2	15	S_{b_1}	0.0329
b_1	0.5195	$t_{0.975,15}$	2.1310
b_0	0.0014		

De acuerdo a la Eq. 3 y los valores de los términos de la tabla A.63 se obtuvo el IC(b_1) de la siguiente manera:

$$IC(b_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1} = 0.5195 \pm (2.1310)(0.0329) = 0.5195 \pm 0.0701$$

Por lo tanto el intervalo va desde 0.4494 hasta 0.5896 y no incluye al cero, de esta forma es aceptable el intervalo, y se observó de esta forma un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LD) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.59 y A.63, y Eq. 6 se obtuvo el LD de la siguiente forma:

$$LD = ([EI]) \left(\frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{3.3 \times 0.0021}{0.5195} \right) = 4.6435 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de ácido cafeico es de 4.6435 mg/L.



Finalmente se calculó el límite de cuantificación (LC) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de las tablas A.59 y A.63, y Eq. 7 se obtuvo el LC de la siguiente forma:

$$LC = ([EI]) \left(\frac{10 \times S_{y/x}}{b_1} \right) = (340.43 \text{ mg/L}) \left(\frac{10 \times 0.0021}{0.5195} \right) = 14.0713 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de ácido cafeico es de 14.0713 mg/L.



Anexo 5: Documentos de la identificación taxonómica del material vegetal utilizado.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
CARRERA DE BIOLOGÍA



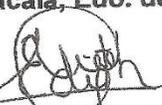
FESI/IZTA/048/2012

**DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ,
LABORATORIO DE DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS,
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN-UNAM,
P R E S E N T E .**

Por este conducto me permito agradecer a usted la donación de material botánico (muestras de mercado), respaldo del Proyecto CONACYT: *“Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y Microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas”*, realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la cual es usted responsable. Así mismo, le informo que los ejemplares han sido integrados en la **Colección Etnobotánica** del Herbario Iztacala con los siguientes Números de Registro (se anexa listado).

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Los Reyes Iztacala, Edo. de México., 5 de octubre de 2012


M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
RESPONSABLE DEL HERBARIO



Edificio de gobierno, primer piso
Tel: 5623-1147 • 5623-1149
Fax: 5623-1149
Av. de los Barrios N.º 1, Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, CP 54090,
Estado de México, México.

Herbario IZTA
Edificio L4, Planta baja
Av. de los Barrios No. 1
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla
Estado de México, CP 54090 MÉXICO
Tel/Fax: 5623-1378
herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
CARRERA DE BIOLOGÍA



FESI/IZTA/048/2012

NÚMEROS DE REGISTRO DEL PROYECTO CONACYT "Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y Microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas"

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. REGISTRO
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	VERBENACEAE	Orégano(1)	2115 IZTA
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	VERBENACEAE	Orégano(2)	2116 IZTA
<i>Cassia angustifolia</i> Vahl.	FABACEAE	Hoja Sen	2117 IZTA
<i>Larrea tridentata</i> (Moc. & Sessé ex DC.) Cov.	ZYGOPHYLLACEAE	Gobernadora	2118 IZTA
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult	TURNERACEAE	Damiana (Baja California)	2119 IZTA
<i>Turnera</i> sp	TURNERACEAE	Damiana (San Luis)	2120 IZTA
<i>Turnera</i> sp	TURNERACEAE	Damiana (Guerrero)	2121 IZTA
<i>Jatropha</i> sp	EUPHORBIACEAE	Sangre de Drago	2122 IZTA



Edificio de gobierno, primer piso
Tel: 5623-1147 • 5623-1149
Fax: 5623-1149
Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala,
Pulquepec, CP 54090,
Estado de México, México

Herbario IZTA
Edificio E4, Planta baja
Av. de los Barrios No. 1
Los Reyes Iztacala, Pulquepec
Estado de México, CP 54090 MÉXICO
Tel/Fax: 5623-1178
herbario_izta@campus.iztaco.unam.mx





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
CARRERA DE BIOLOGÍA



FESI/HI/08/2013

DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ,
Responsable del Laboratorio de Desarrollo de
Métodos Analíticos,
FES-Cuautitlán, UNAM,
Presente.

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo (planta de mercado) del Proyecto CONACYT: “*Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y Microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas*”, realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la FES-Cuautitlán, UNAM del cual es usted responsable.

Así mismo, les informo que la planta ha sido integrada en la **Colección Etnobotánica** del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. DE REGISTRO
<i>Flourensia cernua</i> D.C.	ASTERACEAE/ COMPOSITAE	“Hoja sen”	2141 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Los Reyes Iztacala, Edo. de México., 6 de febrero de 2013


M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTACALA



Edificio de gobierno, primer piso
Tel: 5623-1147 + 5623-1149
Fax: 5623-1149
Av. de los Barrios N.º 1, Los Reyes Iztacala,
Tlalnepantla, CP 54090,
Estado de México, México.

Herbario IZTA
Edificio L4, Planta baja
Av. de los Barrios No.1
Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla
Estado de México, CP 54090 MÉXICO
Tel/Fax: 5623-1378
herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx

