



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES PRESENTES EN EXTRACTO
ETANÓLICO DE GOBERNADORA (*Larrea tridentata*) POR
ELECTROFORESIS CAPILAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ JUAN MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESORA:

DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2015



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 CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES 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

Determinación de polifenoles presentes en extracto etanólico de Gobernadora (*Larrea tridentata*) por Electroforesis Capilar.

Que presenta el pasante: José Juan Martínez Hernández
Con número de cuenta: 304013885 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

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 06 de Marzo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Brigida del Carmen Camacho Enriquez	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dr. Julio César Botello Pozos	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Martha Angélica Villegas González	
2do. SUPLENTE	M. en C. Enrique Ramos López	

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

IHM/mmgm*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia quienes son mi motivación en la vida, y que incondicionalmente me han brindado la confianza y apoyo total así como en las buenas y malas han estado siempre ahí; alentándome a seguir y levantarme cada vez que he caído. A todos ellos les digo que esto logro no es mío..... "es nuestro".

A mis padres: Sara y José Juan, quienes han dado todo de sí para que este logro pudiera cumplirse, a ustedes les digo que nuestros esfuerzos y desvelos no han sido en vano y aunque el camino fue largo, al final he recibido lo mejor que me han podido dar en la vida. Gracias por guiarme y hacerme la persona que soy ahora. Esto es solo el principio y se que mejoras cosas están en camino.

A mis hermanos Liliana y Edgar, gracias por estar aquí, por confiar en mi y porque aunque muchas veces hemos reído, peleado, llorado y muchas cosas por las que hemos pasado, siempre seguimos juntos. Saben que los quiero y cuentan con migo.

A mi sobrina Danna, mi cuñado Nacho y el bebe que viene en camino, gracias por formar parte de esta familia, por el apoyo y por estar aquí en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros de generación. Gracias a cada uno de ellos, por tantos momentos inolvidables así como tantas buenas experiencias que compartimos a lo largo de la carrera. También gracias a cada uno con los que conviví en el Lab-401 de FESC-1.

A Dulce, Jessy, Luis, David, Giovanni, Gonzalo y Tito Soto, por escucharme, aconsejarme y apoyarme en diversas situaciones y por los buenos momentos en los que nos divertimos.

Gabriela Vargas, gracias por el apoyo brindado durante la realización de éste proyecto, por el valioso tiempo que nos has dedicado y la confianza que siempre depositaste en nosotros. Gracias por tus consejos, enseñanza como profesora y amistad.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT: “Desarrollo de envases activos para la conservación de productos frescos y mínimamente procesados” (IT201513), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas.....	ix
1 RESUMEN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 El género <i>Larrea</i> de la familia de las <i>Zygophyllaceae</i>	3
2.2 <i>Larrea tridentata</i> localización y nombres comunes.....	3
2.2.1 Información taxonómica.....	4
2.2.2 Características.....	4
2.2.3 Composición.....	6
2.2.4 Usos y aplicaciones.....	8
2.2.5 Etnobotánica.....	8
2.2.6 Antecedentes.....	10
2.2.7 Toxicidad.....	11
2.3 Antioxidantes.....	13
2.4 Polifenoles.....	14
2.4.1 Importancia.....	14
2.4.2 Biosíntesis.....	15
2.4.3 Extracción de polifenoles.....	16
2.5 Extracción asistida por ultrasonido.....	17
2.6 Técnicas de análisis utilizadas en polifenoles.....	18
2.7 Electroforesis.....	19
2.8 Electroforesis capilar (CE).....	19
2.8.1 Fundamento.....	19
2.8.2 Modalidades de separación.....	20
2.8.3 Instrumentación.....	21

2.8.4	Partes básicas de un equipo de CE.....	21
2.8.5	Introducción de la muestra	22
2.8.6	Detectores.	23
2.8.7	Ventajas de CE.....	23
2.8.8	Calor de joule.....	24
2.8.9	Movilidad electroforética.	24
2.8.10	Flujo electroosmótico (EOF).	25
2.9	Recubrimientos biorgánicos.	27
2.9.1	Importancia de los recubrimientos.	27
2.9.2	Perdidas postcosecha de mango en México	28
2.9.3	Recubrimiento adicionado con extracto de gobernadora.....	29
3	OBJETIVOS.	31
3.1	Objetivo General:	31
3.2	Objetivos particulares:.....	31
4	MATERIALES Y MÉTODOS.	33
4.1	Material vegetal.....	33
4.2	Equipos	33
4.3	Estándares y reactivos.	33
4.4	Procedimiento para la obtención del extracto etanólico.	34
4.5	Procedimiento de hidrólisis alcalina del extracto.	35
4.6	Elaboración del recubrimiento.....	36
4.7	Condiciones para la separación de los polifenoles por CE.	36
4.8	Determinación de los compuestos.	37
4.8.1	Identificación de polifenoles en el extracto de Gobernadora.	37
4.8.2	Determinación cuantitativa de los compuestos identificados.....	38

5	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	39
5.1	Estudio del método de extracción.	39
5.2	Estudio del disolvente.	40
5.2.1	Efecto de la proporción del disolvente.	41
5.3	Resolución del ácido nordihidroguayarático (NDGA).	42
5.3.1	Condiciones finales para resolver NDGA.	43
5.4	Condiciones de hidrólisis del extracto.	44
5.4.1	Efecto de la temperatura.	45
5.4.2	Efecto del tiempo de hidrólisis.	45
5.4.3	Condiciones finales de hidrólisis.....	46
5.5	Determinación de los polifenoles.	47
5.5.1	Identificación de polifenoles presentes en extracto de Gobernadora.	47
5.5.2	Elección de Estándar Interno (E.I).....	48
5.5.3	Resumen de las condiciones finales de los 2 métodos desarrollados.....	50
5.5.4	Precisión.....	50
5.5.5	Curvas de calibración.	52
5.5.6	Cuantificación de los compuestos en el extracto de gobernadora.....	55
5.5.7	Determinación de los compuestos en el recubrimiento.	58
6	CONCLUSIONES.....	62
7	BIBLIOGRAFIA.	63
8	ANEXOS.	69
	ANEXO 1 Identificación del material vegetal utilizado, realizado por el herbario de IZTA de FES-Iztacala y su certificación como <i>Larrea tridentata</i>	69
	ANEXO 2 Identificación de polifenoles en extracto de Gobernadora.	70
	Identificación en extracto etanólico.	70

Ácido nordihidroguayarético.....	70
Derivado de NDGA.....	71
2-(4-Hidroxifenil) etanol.....	72
Rutina.....	73
Catequina.....	74
Ácido clorogénico.....	75
Ácido 2,5-dihidroxi benzoico.....	76
Apigenina.....	77
Ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico (Ferúlico).....	78
Kaempferol.....	79
Ácido p-hidroxibenzoico.....	80
Ácido 3,4-dihidroxi benzoico.....	81
Identificación en extracto hidrolizado.....	82
Ácido p-cumárico.....	82
Ácido vanílico.....	84
Ácido p-hidroxibenzoico.....	85
ANEXO 3 Resolución de NDGA.....	86
ANEXO 4 Curvas de calibración.....	91
Concentración experimental en cada sistema de calibración.....	92
ANEXO 5 Gráficos de ajuste al modelo lineal y gráficos de residuales para cada sistema de calibración.....	95
ANEXO 6 Tratamiento al recubrimiento.....	100
Recubrimiento fresco de Gobernadora.....	100
Extracción del polímero.....	102

Abreviaturas.

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
% RSD	Desviación estándar relativa	DAD	Detector de Arreglo de diodos
°C	Grados Celsius	DL	Dosis letal
μA	Microampere	DL₅₀	Dosis letal capaz de matar al 50 % de la población
μm	Micrómetro	E	Campo eléctrico
2,4 Hfe	2-(4-Hidroxifenil) etanol	E.I	Estándar interno
2,5 Dhb	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	ECC	Electrocromatografía Capilar
3,4 Dhb	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	ECEI	Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico
A	Área	ECZ	Electroforesis Capilar de Zona
ANOVA	Análisis de varianza	EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Api	Apigenina	E.U.	Estados Unidos
b₀	Ordenada al origen	EOF	Flujo electroosmótico
b₁	Pendiente	FDA	Food and Drug Administration
Cat	(+)-Catequina	Fer	Ácido ferúlico
CCEM	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar	F_{exp}	F experimental
CE	Electroforesis capilar	F_{tablas}	F obtenida de tablas
Clo	Ácido clorogénico	g	Gramo
cm	Centímetro	GC	Cromatografía de gases
Cum	Ácido p-cumárico	H	Altura
c.p.	Citado por	H0	Hipótesis nula

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
H1	Hipótesis alternativa	MS	Espectrometría de masas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución	MS_{EP}	Cuadrados medios del error puro
h	Horas	MS_{FDA}	Cuadrados medios de la falta de ajuste
IC	Intervalo de confianza	N₂	Nitrógeno
Kae	Kaempferol	Na₂B₄O₇*10H₂O	Tetraborato de sodio
k	Kilogramo	NaOH	Hidróxido de sodio
kHz	Kilohertz	NDGA	Ácido Nordihidroguayarético
kV	Kilovolts	nm	Nanómetros
L	Litro	pH	Potencial de hidrogeno
LOQ	Límite de cuantificación	Phb	Ácido p-hidroxibenzoico
LOD	Límite de detección	ppm	Partes por millón
M	Molar	\bar{X}	Promedio
mg	Miligramo	psi	Unidad de presión del inglés "pounds force per square inch"
MIC	Concentración mínima inhibitoria	r²	Coefficiente de determinación
min	Minuto	rpm	Revolución por minuto
mL	Mililitro	Rut	Rutina
mM	Milimolar	S	Desviación estándar

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
s	Segundo	Tci	Ácido trans-cinámico
S_{b0}	Desviación estándar de la ordenada al origen	tm	Tiempo de migración
S_{b1}	Desviación estándar de la pendiente	UV	Ultravioleta
Std	Estándar (refiriéndose a estándar primario)	Van	Ácido vanílico

1 RESUMEN.

La gobernadora (*Larrea tridentata*) se distribuye abundantemente en zonas desérticas al norte del país y ha sido utilizada ampliamente en la medicina tradicional mexicana. Sus metabolitos secundarios son útiles frente a gran variedad de hongos y bacterias debido a sus propiedades antioxidantes, bactericidas y fungicidas. Por lo que el uso de tecnologías a base de gobernadora puede prolongar el tiempo de vida de frutos mexicanos frente a hongos fitopatógenos causantes de grandes pérdidas postcosecha, mejorar la apariencia y sanidad de los productos de mayor consumo y valor comercial.

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado la efectividad de la aplicación de un recubrimiento adicionado con extracto de gobernadora para alargar el tiempo de vida postcosecha de mangos de la variedad *Keitt*, obteniendo resultados favorables, siendo el conocimiento de la composición del extracto de suma importancia. Por lo que el objetivo del presente estudio fue extraer los compuestos polifenólicos presentes en extracto etanólico de gobernadora (incluyendo el ácido nordihidroguayarático, NDGA) y su posterior determinación por electroforesis capilar (CE), obteniendo la mayor cantidad de polifenoles realizando la extracción asistida por sonicación durante 90 min con una solución etanol-agua (70:30), además se identificaron 13 compuestos en el extracto por el aumento en la señal del pico obtenido en el extracto al adicionar un poco del estándar del polifenol, además de confirmarlo por comparación del espectro de absorción del pico en el extracto, con los espectros de la base de datos de los estándares.

La determinación cuantitativa de cada polifenol identificado se realizó por interpolación en las curvas de calibración construidas y medidas por triplicado previamente. Determinándose que la cantidad requerida de extracto para la elaboración del recubrimiento es de 13 mL para preparar 500 mL de recubrimiento, lo cual no representa riesgos de toxicidad y dando ventajas competitivas para una presentación y aceptación comercial.

El estudio realizado durante este trabajo de tesis puede ayudar a la utilización y aprovechamiento de la gobernadora como alternativa natural en el control de hongos fitopatógenos que afectan a frutos mexicanos y contribuir indirectamente en la elaboración de recubrimientos biorgánicos utilizando el extracto de esta especie vegetal.

2 MARCO TEÓRICO.

2.1 El género *Larrea* de la familia de las *Zygophyllaceae*.

Se sabe que el género *Larrea* de la familia de las *Zygophyllaceae* se compone de cinco especies distribuidas en las zonas áridas y semiáridas del Norte y América del Sur diferenciadas en su número cromosómico. Tres especies, *L. cuneifolia* Cav. (n=26), *L. nitida* Cav. (n=13) y *L. umeghinoi* Speg. (n=13) se limitan a Argentina. *L. divaricata* (DC.) Coville (n=13) principalmente en Argentina con algunas poblaciones pequeñas y aisladas en Perú, Chile y Bolivia. Y *L. tridentata* Cov. (especie utilizada en este trabajo) se produce en América del Norte con tres niveles de ploidía¹ y es muy similar en su morfología a *L. divaricata*; el diploide (n=13) en el desierto de Chihuahua, el tetraploide (n=26) en el desierto de Sonora, y el hexaploide (n=39) en el desierto Mojave. (Sakakibara, Difeo, Nakatani, Timmermann, & Mabry, 1976).

2.2 *Larrea tridentata* localización y nombres comunes.

Larrea tridentata se distribuye abundantemente en zonas desérticas desde el oeste de Texas hasta el sur de California y en la república mexicana se encuentra en parte del desierto Sonorense incluyendo los estados de Baja California Norte, Baja California Sur y Sonora, en el desierto Chihuahuense incluyendo los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas. (Lira Saldivar, 2003).

Comúnmente en México se le conoce como gobernadora por su dominancia en las grandes extensiones de las zonas áridas del norte de México (Lira Saldivar, 2003), pero también se le conoce como Chaparral (Alonso, 2004), Guamis, Hediøndilla y Huamis, (Martínez, 1991), (Rzedowsky & Equihua, 1987).

¹ Numero de juegos completos de cromosomas, siendo n = al número de cromosomas.

2.2.1 Información taxonómica.

De acuerdo con el instituto de biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la tabla 2.1 se muestra la información taxonómica de gobernadora.

Tabla 2.1 Taxonomía de la gobernadora (Instituto de Biología, 2010).

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Zygophyllaceae
Género	<i>Larrea</i>
Epíteto específico	<i>tridentata</i>
Nombre Científico	<i>Larrea tridentata</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Coville
Autor del nombre	(Sessé & Mo. ex DC.) Coville

2.2.2 Características.

Es una planta con forma de arbusto ramificado, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura, hojas formadas por 2 folíolos² unidos entre sí en la base, folíolos oblicuamente ovados a lanceolados³, divaricados⁴, de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos⁵, resinosos, de olor penetrante, verde o verde amarillentos. (Vázquez Yanes & otros, 2009). Sus hojas contienen una resina que se comporta como antitranspirante debido a que forma una barrera que disminuye la transpiración. Los metabolitos secundarios (destacando lignanos y flavonoides) son defensas para repeler la agresión de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos (Lira Saldivar, 2003).

La copa tiene un volumen promedio de 0.124 m³ x arbusto, tronco erecto ramificado desde la base, flores solitarias de 2.5 cm de diámetro, sépalos elípticos de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, pubescentes, caedizos; pétalos de color amarillo fuerte, de 1 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho, caedizos, la raíz es un

² Cada una de las partes en que a veces se encuentra dividida una hoja compuesta.

³ Larga, mas ancha en la mitad, con forma de lanza, es decir con forma elíptica y alargada.

⁴ Se aplica a las ramas que forman con el eje principal ángulos muy abiertos.

⁵ De consistencia similar al cuero.

sistema radical superficial, poco profundo y muy extenso, llegando a ocupar casi el total del espacio que hay entre un arbusto y otro.

En la figura 2.1, se muestran imágenes de la gobernadora donde se observan algunas partes de la planta como hojas, flores y frutos.



Figura 2.1 Características de gobernadora (Hojas, flores y frutos)

Fuente: (Tenorio Lezama, 2006)

La gobernadora es bien conocida por su fuerte olor característico, de ahí el nombre común en México de “Hediondilla” (Jardine, Abrell, Kurc, Huxman, Ortega, & Guenther, 2010). Crece en los sitios más secos de México, en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos y en planicies aluviales. Se desarrolla en lugares con temperaturas de 14 a 28 °C y presencia de 8 meses de sequía, en climas áridos y en precipitaciones de 150 a 500 mm anuales. Los suelos en los que se desarrolla son de profundidad variable, textura franco arenosa, estructura granular, drenaje interno medio de consistencia friable, de color café grisáceo, compacto-arcilloso, calcáreo, blanco-arenoso, aluvial con pH de 6.8 a 7.6. (Vázquez Yanes & otros, 2009).

Se ha demostrado una alta aclimatación fotosintética de la temperatura, con tasas máximas esencialmente constantes durante todo el año a pesar de las grandes diferencias en la temperatura del aire (Naumburg, Loik, & Smith, 2004). Y pueden aparecer poblaciones puras de hasta 6.000 plantas por hectárea, lo que sugiere que pueden poseer propiedades alelopáticas⁶ (Elakovich & Stevens, 1985).

2.2.3 Composición.

En estudios previos, el perfil fitoquímico de gobernadora reveló la presencia de importantes compuestos bioactivos que pueden ser asociados a la funcionalidad de los extractos etanólicos, las pruebas cualitativas evidenciaron la presencia de terpenos, taninos, flavonoides y saponinas, por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se identificó ácido cinámico, metil galato, catequina, ac 2-hidroxicinámico, ácido elágico, ácido clorogénico. (Ruiz Martínez, Ascacio, Rodríguez, Morales, & Aguilar, 2011), NDGA, Kaempferol y Quercetina (Martins S. , Aguilar, Teixeira, & Mussatto, 2011).

En las hojas se han identificado los flavonoides; 6-8-diglucósido de crisoeriol, 3-3'-7-8-eter-tetrametílico de gosipetina, 3-7-dimetil-herbacetina, 3-7-8-éter-trimetílico de herbacetina y vecenína; y los lignanos ácidos dihidro-norguaiarético, 3'-demetoxi-6-demetil-isoguaiacina, 4-epilearreatricina y su derivado 3'-hidroxilado. Del tallo se han aislado los lignanos isoguaiacina, sus derivados 3'-demetoxi-6-demetilado y 6-demetilado, larreatricina, sus derivados 3', 3"-dimetoxilado, 3-4-dehidrogenado y el 4-epi-compuesto y larreatridenticina; los triterpenos 3-beta (3-dihidroxi-cinamoil)-eritrodioil; y el esteroil betasitosterol, mientras que la raíz contiene el compuesto quinoideo larreantina (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

De las hojas se ha aislado una resina que se exuda de tricomas glandulares (células epidérmicas especializadas) que contienen aceites volátiles y otras secreciones producidos por plantas (Jardine, Abrell, Kurc, Huxman, Ortega, &

⁶ Producción de sustancias que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos.

Guenther, 2010), dicha resina contiene la mayor cantidad hasta ahora encontrada del ácido nordihidroguayarático (NDGA), presentándose además en todas las especies e híbridos de *Larrea*, con una pequeña diferencia que depende del origen a través del desierto Chihuahuense (2.62%), Sonorense (3.84%) y hacia el Mojave (4.86%). (Lira Saldivar, 2003). La resina representa de un 10 a un 15% del peso seco de la planta y ésta a su vez está compuesta cerca del 50 % por NDGA (Sakakibara, Difeo, Nakatani, Timmermann, & Mabry, 1976).

Es evidente que los compuestos de gobernadora reportados en la literatura son numerosos, sin embargo, destacan por su contenido en base al peso seco del follaje los lignanos fenólicos, seguido de las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales como se puede ver en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Principales constituyentes fitoquímicos de *Larrea tridentata*.

% del peso seco de la planta	Tipo	Compuesto
16-21	Lignanos fenólicos	Ácido dihidroguayarático Hemi-norisoguaiacin Ácido nordihidroguayarático Nordihidroguaiacina
5-7.5	Flavonoides	Apigenina, kaempferol
10-15	Saponinas	
	Triterpenos	Larreagenin A, ácido larreico
0.1-0.2	Monoterpenos volátiles	
	Hidrocarbonos 35	Alpha penene, delta-3-carene, limoneno
	Aromáticos	Benzaldehído, benzilacetato, benzilbutano, Metil naftaleno
	Esteroides	Beta-sitosterol, colesterol, campesterol
	Taninos	
70.1(de tallos)	Carbohidratos	Glucosa, sucrosa
16.6	Lípidos	alkil ésteres (C46-C56)
	Aminoácidos	Fenilalanina, isoleucina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina.
15.6 mg/lb	Vitaminas	Caroteno
19.8 mg/100 g		Vitamina C
13.7	Minerales	Sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, azufre y fosforo.

Fuente: Lira Saldivar (2003) c.p. Brinker (1993).

2.2.4 Usos y aplicaciones.

Se usa como materia prima para la obtención de resinas y antioxidantes, para teñir cuero, como pegamento, en alimentación de ganado y en la medicina tradicional aunque no se le explota en mayor escala. (Rzedowsky & Equihua, 1987).

Las hojas como forraje son importantes por su contenido de proteínas lo que permite utilizarlas para consumo animal, aunque se requiere de la eliminación previa de las resinas para incrementar su digestibilidad y palatabilidad. La resina sirve de base para fabricar pinturas, para teñir cuero, plásticos, es extraída de las hojas y contiene a NDGA que se utiliza en la elaboración de grasas para calzado, pegamentos, aceites, lubricantes, barnices y hule.

Se sabe que NDGA muestra actividad antifúngica contra una gran variedad de especies hongos y bacterias además de actividad insecticida contra: gorgojo pardo del frijol (*Acanthoscelides obtectus*, *Coleoptera: Bruchidae*); barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*, *Coleoptera: Bostrichidae*) (Vázquez Yanes & otros, 2009), actividad antioxidante, actividad hipoglucemiante etc. (Alonso, 2004), razón por la cual en la medicina tradicional se ha utilizado ampliamente para tratar diversos padecimientos. Estudios recientes muestran que además tiene propiedades anticancerígenas, tanto *in vitro* como *in vivo* en las células del cáncer de mama, se le atribuye dicho efecto al NDGA, por su capacidad para inhibir directamente la función de dos receptores tirosina quinasa; el receptor de la insulina como factor de crecimiento (IGF-1R) y el receptor de c-erbB2/HER2/neu (Youngren, y otros, 2005).

2.2.5 Etnobotánica.

La medicina tradicional está fuertemente arraigada en la sociedad mexicana siendo preferida por un importante número de personas sobre cualquier otro tipo de tratamiento médico. Este hecho, desempeña un papel importante en comunidades aisladas y de bajos recursos. (Cervantes Romero, 2012).

El uso de la gobernadora tiene una larga historia entre los pueblos nativos del norte de México y el suroeste de E.U, fue utilizada tradicionalmente por los indios norteamericanos como medicina para varias enfermedades (Martins S. , Aguilar, Teixeira, & Mussatto, 2011) y son diversos los padecimientos en los que se aplican sus propiedades medicinales, siendo el uso más común en aquellos que son de origen renal urinario como cálculos renales o de vejiga, para deshacerlos se recomienda tomar como agua de uso la cocción de ramas o de toda la planta; malestares renales (dolor de riñón, mal de orín, mal de piedra), cistitis (inflamación de la vejiga), para aliviarlos se pueden ocupar ramas (jóvenes), raíces, hojas o corteza, en cocimiento administrado en ayunas.

Con frecuencia se le emplea en problemas ginecológicos, como esterilidad femenina, mediante lavados vaginales con el cocimiento de las hojas o se toma un té 9 días antes y 9 después de la regla, durante 3 meses seguidos. Para quitar los “entuetos” (dolores y malestares que suelen sufrir las mujeres después del parto), se bebe una taza de té, preparado con las hojas de gobernadora, cada vez que se presenta el dolor o bien se administra durante 10 días después de la regla con la finalidad de regularizar el sangrado o quitar los dolores menstruales. Como conceptivo cuando las mujeres no conciben porque están "descompuestas de la matriz por enfriamiento" se administra un té preparado con gobernadora, manzanilla y canela, además de dar un masaje para calentar a la mujer. Aunque también suelen usarse las raíces, ramas o corteza en cocimiento como abortivo.

Para aliviar el dolor de reumas se utiliza el cocimiento de la planta ó las ramas puestas en alcohol, dejando reposar por un día, ambas preparaciones se usan en frotación o sólo se aplica la planta soasada en la zona dolorida.

Asimismo se reporta para tratar anemias, catarro, diabetes, dolor de cabeza, tos, úlcera, uretritis, presión sanguínea e infecciones en los pies; se sugiere beber el cocimiento de las raíces, ramas o corteza en lugar de agua hasta recuperarse; con este mismo cocimiento se frota el área dolorida o es usado en baños cuando se tienen hemorroides.

Cuando hay mala digestión o dolor de estómago se ingiere la infusión de las ramas, o bien, estas se aplican calientes sobre el vientre para aliviar hinchazones o inflamaciones del cuerpo se ponen fomentos calientes con la infusión de las hojas, la que además sirve para lavar heridas y granos; en caso de mareos, se machacan las hojas y se dan a oler; si se tiene calentura, se hierve toda la planta y con esto se baña todo el cuerpo y para lograr una buena cicatrización, se deja hervir la planta hasta que adquiera consistencia de miel, para aplicarla sobre golpes y heridas. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.2.6 Antecedentes

Los productos naturales son aprovechados para la obtención de fármacos, cosméticos, fragancias y aditivos alimenticios sin embargo, en la actualidad se ha incrementado el interés por agentes antifúngicos como son los aceites esenciales y extractos vegetales para el control de fitopatógenos. Siendo las plantas empleadas en la medicina tradicional, un recurso potencial para encontrar nuevos compuestos antimicrobianos (Garduño Pizaña, 2009).

Se ha demostrado que los extractos acuoso y de éter de petróleo de gobernadora presentan actividad antihelmíntica en pollos infestados con *Eimeria tenella* y actividad antibiótica contra bacterias y hongos patógenos. Extractos acuosos y metanólicos de la raíz ejercieron una acción citotóxica al ser probados en el cultivo de células humanas obtenidas de carcinoma -9KB y células leucémicas tipo P-388. El extracto etanólico obtenido de las ramas, ejerció una actividad antibiótica sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Se ha evidenciado la inhibición de bacterias como *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* así como *Staphylococcus aureus*, ya que la presencia de taninos puede formar complejos con enzimas y otras proteínas inhibiendo sus funciones, ó inhibir el transporte de electrones a través de membranas y adicionalmente alterar los iones como Hierro y Cobre inhibiendo así

la actividad de algunas enzimas que pueden ser esenciales para la vida microbiana (Mendez, y otros, 2011).

También se ha evaluado su actividad antifúngica frente a: *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium oxysporum*, mostrando actividad antifúngica frente a estos microorganismos (Lira, Hernández, & Hernández, 2006), además de ser eficiente para el control de *Fusarium verticillioides* en cualquiera de sus fases de crecimiento, en la germinación de esporas, así como en el crecimiento micelial (Suárez Jiménez, Cortez Rocha, Rosas Burgos, Burgos Hernández, Plascencia Jatomea, & Cinco Moroyoqui, 2007). Otros investigadores evaluaron la actividad antifúngica de los extractos etanólicos frente a los hongos *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* mostrando que la concentración mínima inhibitoria (MIC) va de 3-7 mg/mL (Moreno, Gonzáles, Salcedo, Cárdenas, & Perales, 2011).

2.2.7 Toxicidad.

La forma tradicional de tomar gobernadora es en una infusión de sabor fuerte y a menudo considerado desagradable, lo que limita en gran medida la cantidad que puede ser ingerida. La toxicidad causada por la ingestión de gobernadora es multifactorial en la naturaleza, como el consumo de cantidades excesivamente grandes, relacionados al uso de productos encapsulados porque permiten a las personas tomar una cantidad mayor con facilidad, donde el gusto no es un factor limitante (Heron & Yarnell, 2001), aunque también pudiera haber ocurrido una adulteración.

En la medicina tradicional mexicana se ha utilizado gobernadora para diversos padecimientos sin embargo, su uso se ha asociado con la nefropatía y la hepatotoxicidad, por lo que se debe tener cuidado cuando se utiliza esta planta en la medicina alternativa o complementaria (Arteaga, Carmona, Luis, Andrade Cetto, & Cárdenas, 2005). Además en animales se reporta que esta planta provoca el envenenamiento de borregos cuando se come durante años, observándose mayor

mortandad entre los animales preñados cuando la gobernadora está disponible como alimento (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Debido a los reportes con el uso de la infusión de gobernadora, se removió a NDGA del listado GRAS (Generally Regarded As Safe). La utilidad de estos compuestos se ve obstaculizada por la falta de comprensión de los mecanismos de acción para cada actividad, y a pesar de que numerosos trabajos han sido reportados mostrando los efectos benéficos, ha habido pocos estudios sobre el mecanismo con NDGA, además de que los datos toxicológicos y farmacocinéticos sobre NDGA son escasos. (Lambert, Dorr, & Timmermann, Nordihydroguaiaretic Acid: A Review of Its Numerous and Varied, 2004).

El uso de la gobernadora sigue siendo motivo de controversia, ya que mientras algunos estudios sugieren su seguridad para ingesta humana, algunos otros insisten en una eventual toxicidad. Los primeros trabajos realizados en la década de los 70's en humanos, tampoco lograron demostrar una clara relación hepatotóxica (Alonso, 2004), al realizar un estudio con 59 pacientes con cáncer terminal a los cuales se les administró 16 a 24 onzas de té de gobernadora ó 250 a 3000 mg NDGA diaria (4.17-50 mg NDGA/kg), encontrándose que ninguno de los pacientes desarrollaron signos de daño hepático. La inyección intramuscular de NDGA en humanos a una dosis superior a 400 mg/kg de peso durante 5-6 meses demostró escasa a nula toxicidad. En ratones la DL 50 vía oral fue calculada en 4 g/kg, en conejillos de indias fue de 830 mg/kg (Heron & Yarnell, 2001), mientras que en una administración intraperitoneal en ratones mostró una DL₅₀ de 75mg/kg observándose incremento en los niveles séricos de alanino-aminotransferasa indicado señales de toxicidad hepática (Alonso, 2004). En un caso que contradice la teoría de que el uso de gobernadora no es tóxico se reporta a una mujer que bebió 3 a 4 tazas de té de *Larrea tridentata* durante un período de 3 meses junto con 5 a 6 tazas de *Tabebuia spp.* en un período de 6 meses y desarrolló carcinoma de riñón (Smith et. al, 1994) c.p. (Heron & Yarnell, 2001), en éste caso la causalidad no se probó y parece poco probable que el tumor se podría haber desarrollado en un corto período de tiempo. Sin embargo,

otros estudios en humanos tampoco pudieron corroborar firmemente una clara relación hepatotóxica con ninguno de los principios activos de esta planta. Ya desde la década de los 80's la OMS tampoco había hallado hepatotoxicidad, a lo que debe sumarse la incertidumbre sobre adulteraciones o presencia de sustancias contaminantes en productos de venta libre de dudosa calidad y control sanitario (Smet P. et al., 1993; Mc Caleb R. et al., 2000) c.p. (Alonso, 2004). Así mismo, el Dr. Clark Watt, perteneciente a un grupo de científicos encargados de evaluar la toxicidad del chaparral ó gobernadora, señaló que no encontró relación directa entre su consumo y daño hepático, concluyendo que la mayoría de los casos señalados como hepatotóxicos eran debidos a reacción alérgica o de hipersensibilidad (Hobbs, 1997) c.p. (Alonso, 2004). Todo ello provocó que en 1996 se revisase toda la literatura médica y se levantara la prohibición de su venta (Dharmananda S. 1996) c.p. (Alonso, 2004).

Cabe mencionar que a pesar de haberse considerado durante muchos años a gobernadora como una planta medicinal peligrosa para consumo humano y prohibido su comercialización, aunque la FDA levantó la prohibición sobre su venta, aún no figura en el listado de drogas seguras para uso humano, pero se puede decir que el mayor peligro del consumo de esta especie radica en la toma muy prolongada a concentraciones muy altas e hipersensibilidad con otros fármacos de actividad hepática (Alonso, 2004).

2.3 Antioxidantes.

Los antioxidantes son componentes protectores que consisten en un arreglo enzimático y nutrientes esenciales cuya función principal es prevenir la formación de radicales libres generados mediante la respiración e interceptar los que ya se han generado (Shi, 2001) c.p. (González Jiménez, 2010), retrasan el proceso de oxidación por diferentes mecanismos como la donación de electrones (como agentes reductores), la quelación de iones metálicos (eliminando así posibles radicales libres) o por genes de regulación de la expresión y pueden ser usados

para reducir los daños oxidativos relacionados con la edad y con ciertas enfermedades (Vaya & Aviram , 2001).

Los sistemas antioxidantes se engloban en dos grandes grupos: sistemas enzimáticos y metabolitos de bajo peso molecular (Halliwell y Gutteridge, 1989) c.p. (Pérez Tortosa, 2008) existen antioxidantes naturales contenidos en los alimentos y también sintéticos elaborados por la industria. Los principales sistemas antioxidantes enzimáticos en plantas están constituidos por las enzimas: superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa. Además, la célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa como los antioxidantes de naturaleza hidrosoluble: como el ácido ascórbico, glutatión y diversos compuestos fenólicos; los liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides (Mittler et al., 2004), (Arrigoni y de Tullio, 2000) c.p. (Pérez Tortosa, 2008).

2.4 Polifenoles

Los polifenoles o compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas (Antolovich M., P. Prenzler P., Robards K., Ryan D.) c.p. (Piñeiro Méndez, 2005).

Químicamente los fenoles son compuestos que poseen en su estructura al menos un anillo aromático sustituido con uno o más grupos hidroxilo, que en la naturaleza derivan de las rutas biosintéticas del ácido shikímico (fenilpropanos y derivados) y la del acetato-malonato (fenoles simples y quinonas) y la combinación de ambas rutas da lugar a formación de flavonoides (Pérez Tortosa, 2008).

2.4.1 Importancia.

En las plantas los polifenoles son útiles para repeler agresiones por otros microorganismos y existen evidencias que sugieren que estos compuestos son

muy importantes para los ciclos vitales de las plantas, además de servir como pantallas contra la radiación UV (Piñeiro Méndez, 2005).

Tanto los frutos como otras partes de las plantas son una importante fuente de sustancias fenólicas tanto para la dieta como para considerarlas a nivel comercial (Piñeiro Méndez, 2005) y han sido objeto de un interés creciente debido a sus propiedades anti-inflamatorias, antihistamínicas, antitumorales y prevención frente a radicales libres y enfermedades cardiovasculares (Peng, Liu, Peng, & Ye, 2004).

Existen especies vegetales distribuidas en la zona semidesértica de México con antecedentes que indican el potencial antimicrobiano y este hecho es atribuido a los compuestos polifenólicos, entre éstas destaca la gobernadora por su alto contenido de fenoles y principalmente a su componente mayoritario NDGA.

2.4.2 Biosíntesis.

En la figura 2.2 se muestran las principales rutas de síntesis. Los ácidos hidroxicinámicos (HCAs) y los flavonoides derivan de los ácidos cinámicos, que se forman a partir de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Los ácidos cinámicos son transformados en HCA por la enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y por la *o*-metiltransferasa. La enzima 4-cumarato:CoA ligasa (4CL) cataliza la formación de hidroxicinamoil CoA (HCA-CoA) y este intermediario activado se emplea en la biosíntesis de flavonoides y ligninas.

La síntesis de flavonoides comienza con la condensación de HCA-CoA con 3 moléculas de malonil CoA catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS). La chalcona formada puede ser convertida en diversos productos finales como flavona, flavonol y antocianina por diversas enzimas como chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (F3OH), isoflavona sintasa (ISF), flavona sintasa (FS), flavonol sintasa (FLS), dihidroxiflavonol reductasa (DHFR) y antocianina sintasa (AS).

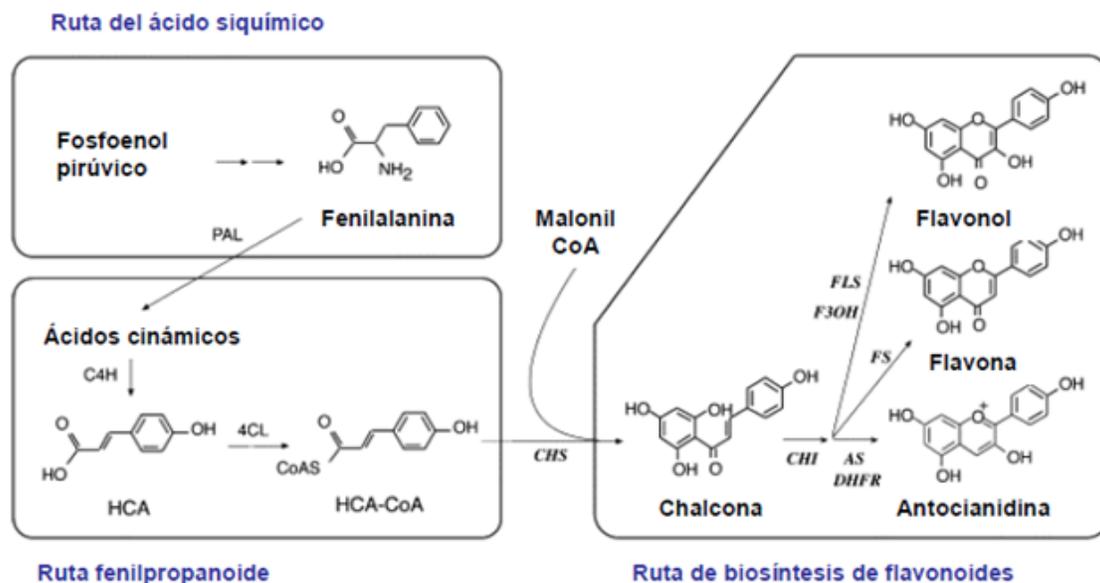


Figura 2.2 Ruta biosintética de compuestos fenólicos.
 Fuente: (Sakihama et al. 2002) c.p. (Pérez Tortosa, 2008)

2.4.3 Extracción de polifenoles.

La preparación de la muestra es una etapa crítica en el análisis, especialmente en muestras de origen vegetal donde la complejidad de la matriz es considerable, los métodos de extracción de fenoles dependerán entonces de distintos factores y los procedimientos usuales de cuantificación implican el uso de técnicas de separación, requiriendo para determinar compuestos fenólicos en muestras vegetales sólidas el empleo de técnicas de extracción eficientes (Piñeiro Méndez, 2005). El procedimiento de extracción viene determinado por el tipo de compuestos que queremos obtener (Pérez Tortosa, 2008).

Las condiciones impuestas para la extracción pueden dañar los compuestos antioxidantes que se pretenden aislar, por tal motivo, han surgido una serie de técnicas de extracción que cumplen una doble misión: minimizar el deterioro de los compuestos de interés y tratar con tecnologías mínimamente contaminantes. Entre estas tecnologías se encuentra la destilación molecular, la extracción con fluidos supercríticos y el uso de ultrasonidos (Nakatani et al., 1984); (Muklopadhyay, 2000); (Albu et al., 2004) c. p. (Pérez Tortosa, 2008).

Al contar con un material vegetal sólido las técnicas más comunes empleadas incluyen la extracción con Soxhlet, extracción asistida por ultrasonidos (sonicación), extracción asistida con microondas, extracción con fluidos supercríticos y extracción con fluidos presurizados (Piñeiro Méndez, 2005).

2.5 Extracción asistida por ultrasonido.

Las técnicas clásicas de extracción a partir de material vegetal se basan en la extracción de compuestos con base en sus solubilidades por dos líquidos inmiscibles pero se ha comprobado mediante distintos estudios que la extracción asistida por ultrasonido es más eficiente que la extracción por métodos tradicionales ya que 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. También puede utilizarse junto con otros métodos de extracción no convencionales, aunque la extracción asistida por ultrasonido no requiere de un equipo tan sofisticado y costoso (Azuola & Vargas, 2007).

El concepto de ultrasonido contempla a cualquier sonido con una frecuencia tan alta que el oído humano no puede detectar y se considera que éste se encuentra arriba de los 20 kHz, pero menor que las microondas (Chemat, Zill-e & Khan, 2011) c.p. (Núñez Luna, 2013).

La eficiencia de este método es atribuida a la propagación de ondas ultrasónicas a través del disolvente, presentándose el fenómeno de cavitación, en la cual una onda sonora genera una presión variable sinusoidal en algunos espacios existentes en la solución, siendo transmitida ésta onda en ciclos de compresión y rarefacción (expansión) (Núñez Luna, 2013). El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas cuyo tamaño aumenta miles de veces en la alternancia de los ciclos de presión, alcanzando un tamaño crítico e implosionan violentamente para volver al tamaño original. La implosión supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos

y focales, que se disipan ya que el tamaño de las burbujas es muy pequeño en relación al volumen del líquido disipándose rápidamente el calor.

2.6 Técnicas de análisis utilizadas en polifenoles.

El aislamiento y la cuantificación de los polifenoles en productos naturales es difícil debido a la complejidad de las muestras y se han utilizado diferentes métodos para analizarlos desde utilizar gel de sílice como soporte para el fraccionamiento de los extractos en la Cromatografía en capa fina (Ruiz Martínez, Ascacio, Rodríguez, Morales, & Aguilar, 2011), HPLC, Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-EM) y Electroforesis Capilar (EC). (Peng, Liu, Peng, & Ye, 2004). Cabe señalar que no hay necesidad de derivatizar las muestras de compuestos fenólicos debido a que son aromáticas y por tanto, presentan absorción intensa en la región UV (González Jiménez, 2010).

El análisis por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD) permite una excelente separación y en la detección de algunos compuestos fitoquímicos importantes en muestras de extractos, se observó que todos tenían un alto contenido de compuestos fenólicos (Ruiz Martínez, Ascacio, Rodríguez, Morales, & Aguilar, 2011). La técnica de HPLC es la más ampliamente utilizada y combinada con la Espectrometría de Masas (EM) se puede obtener la información estructural de los analitos logrando la confirmación de la identidad, sin embargo tiene algunos inconvenientes como el largo tiempo de análisis y la corta vida útil de la columna debido a numerosas interferencias y contaminaciones, mientras que la CE se está convirtiendo cada vez más en una técnica de separación analítica importante por su velocidad, eficiencia, reproducibilidad, pequeño volumen de muestra, y un consumo mínimo de disolvente (Peng, Liu, Peng, & Ye, 2004) además de permitir la utilización de diferentes detectores al igual que por HPLC. Muchos autores mantienen que la CE y HPLC son técnicas analíticas indispensables, además porque en muchos casos se complementan, especialmente cuando se quiere tener información general fiable sobre la presencia de compuestos polifenólicos en ciertos alimentos (Piñeiro Méndez, 2005).

2.7 Electroforesis.

El término electroforesis es empleado para describir la migración de compuestos cargados bajo la influencia de un campo eléctrico y representa una de las técnicas clásicas de separación más utilizada en el área de la química, la cual se realiza generalmente en geles hidrofílicos como medio de soporte y continúa siendo de gran utilidad, sin embargo este tipo de separación es lenta, laboriosa, difícil de automatizar y en ciertos casos no proporciona resultados cuantitativos precisos. Lo anterior fue revolucionado con el uso de capilares de sílice fundida de sólo unas cuantas micras de diámetro interno. (Castillo Rodriguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

2.8 Electroforesis capilar (CE).

La CE llamada así por el empleo de capilares de diámetro interno pequeño, es una técnica de separación en la que las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad (Rodríguez Dorado, 2010), es una de las técnicas de separación más usadas en la actualidad, que se utiliza además para la identificación y cuantificación de compuestos (Cervantes Romero, 2012), siendo su mayor área de impacto el análisis de biomoléculas, apoyando y ampliando su campo de aplicación como son: la industria farmacéutica, medicina, criminalística, industria alimentaria, así como en investigaciones bioquímicas (Castillo Rodriguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

La versatilidad de esta técnica reside en los elementos del equipo que se pueden controlar; como la polaridad de los electrodos, diámetro interno y longitud del capilar, el tipo de introducción de la muestra y uso de diferentes detectores. (Cervantes Romero, 2012).

2.8.1 Fundamento.

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 un electrolito soporte o buffer, donde una mezcla de especies (cargadas o neutras) se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico.

Es importante hacer notar que aunque superficialmente este método se parece a HPLC, los diferentes tipos de CE no se basan en fundamentos cromatográficos, 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 (Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

2.8.2 Modalidades de separación.

Los distintos modos de separación con los que cuenta la CE pueden utilizarse según las necesidades del analista y usando el mismo instrumento se muestran continuación.

- Electroforesis Capilar de Zona (ECZ)
- Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM)
- Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico (ECEI)
- Isotacoforesis Capilar
- Electrocromatografía Capilar (ECC).

El tipo de electroforesis que se utiliza en el presente trabajo es el de electroforesis capilar de zona, por lo que se hará énfasis a este modo de separación.

2.8.2.1 ECZ.

La ECZ es uno de los modos de la CE más ampliamente usados debido a la simplicidad de operación y a su gran versatilidad (Rodríguez Dorado, 2010), el capilar “generalmente de sílice fundida y recubiertos con una capa de poliimida por su: Flexibilidad, alta conductividad, transparencia espectral en el UV-Vis.” (Castagnino, 2000), (Cervantes Romero, 2012), 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 (EOF). Donde los analitos

neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del EOF (Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

2.8.3 Instrumentación.

El capilar de separación se llena con electrolito soporte (usualmente un buffer) 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 buffer 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 (Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

2.8.4 Partes básicas de un equipo de CE.

En la figura 2.3 pueden verse las partes básicas de un sistema de CE las cuales son:

- ④ Dos electrodos de platino (ánodo y cátodo).
- ④ Fuente de poder de alto voltaje (autoreversible de 0 a 30,000 Volts).
- ④ Depósitos (viales) donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte respectivamente.
- ④ Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación)
- ④ Sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido).
- ④ Sistema que introduce la muestra.
- ④ Detector.

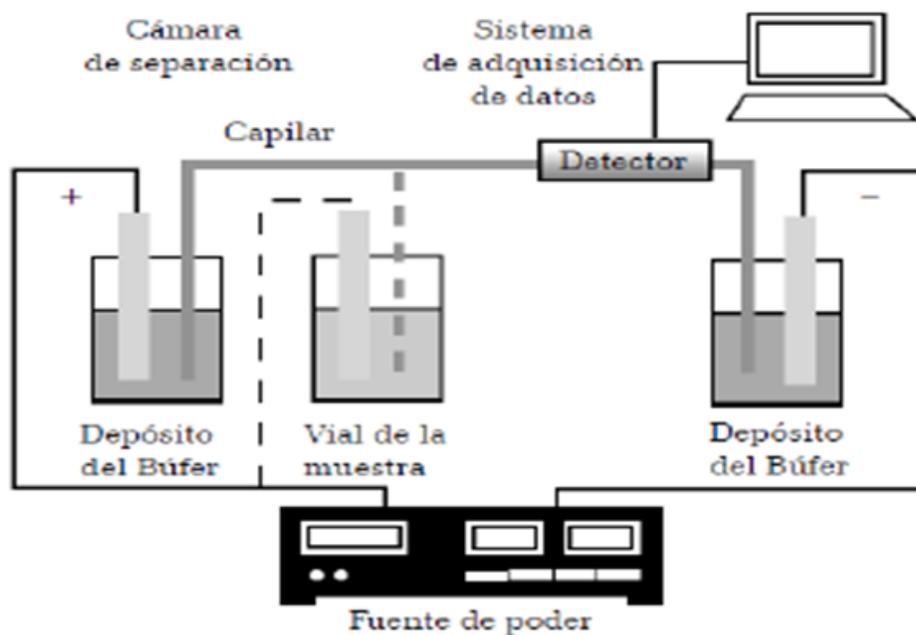


Figura 2.3 Partes básicas de un CE.

Fuente: (Castillo Rodríguez y otros 2005)

2.8.5 Introducción de la muestra

La introducción de la muestra puede ser hidrodinámica usando una diferencia de presión entre los dos extremos del capilar ó electrocinética usando un campo eléctrico que fuerce a la muestra (Harris, 2007). La introducción de tipo hidrodinámica se lleva a cabo mediante diferencia de presión, por bombeo, o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar, de esta forma el volumen de la muestra introducida estará en función de las dimensiones de los capilares, la viscosidad del electrolito soporte en el capilar, la presión aplicada y el tiempo, por lo que con un control de la presión y el tiempo de introducción se pueden obtener resultados altamente reproducibles (Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

Para un análisis cuantitativo por CE es importante cuando se requiera, usar un estándar interno (E.I), para mejorar la reproducibilidad de la cantidad de muestra inyectada en el capilar (Harris, 2007). Esto es frecuente en muestras que poseen matrices complicadas, ya que puede haber cambios de viscosidad entre ellas.

2.8.6 Detectores.

La CE permite la utilización de diferentes detectores de acuerdo a la necesidad del analista y de acuerdo al tipo de compuestos a analizar. Los detectores son similares a los de HPLC, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas (Castagnino, 2000), entre ellos: Absorción UV-Vis, Fluorescencia, Fluorescencia inducida por LASER, Amperometría, Conductividad, Espectrometría de masas.

La detección espectrofotométrica con arreglo de diodos (DAD) en inglés, “Diode Array Detection” es una alternativa a la detección individual o múltiple. La cual consiste en un sistema con un lente acromático, un foco de luz en el capilar, donde el rayo de luz es dispersado por una rejilla de difracción; un DAD tiene numerosos diodos, cada uno dedicado a medir los picos estrechos del espectro y puede monitorear una muestra a muchas longitudes de onda.

2.8.7 Ventajas de CE.

Entre las grandes ventajas que ofrece CE, se encuentra la alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra a utilizar y la separación de un sin número de compuestos, una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva (Castillo Rodriguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005) además de un bajo consumo de reactivos y costos (Rodríguez Dorado, 2010).

Otra importante ventaja de CE como una técnica alternativa para el análisis de alimentos es que el capilar es fácil de lavar para adquirir alta reproducibilidad (Peng, Liu, Peng, & Ye, 2004). Cabe señalar que al llevar a cabo la separación electroforética en capilares se reduce el efecto de calentamiento por la rápida disipación de calor, lo cual tradicionalmente limitaba a las técnicas electroforéticas, por lo que es posible aumentar el voltaje aplicado y entonces disminuir considerablemente el tiempo de análisis y obtener una mejor resolución de picos.

2.8.8 Calor de joule.

Este fenómeno se da porque una corriente pasa a lo largo del capilar, ya que parte de la energía eléctrica es convertida en calor dando como consecuencia el aumento de la temperatura dentro del capilar, creándose un gradiente de temperatura desde el centro hacia la pared del capilar (Rodríguez Dorado, 2010). De aquí la importancia del empleo de capilares de diámetro tan pequeño, debido a que la superficie externa es mayor que la interna y la disipación del calor es mayor. Además se puede eliminar el calor de la superficie del capilar a través de un sistema de refrigeración que puede ser por una corriente forzada de aire o mediante el uso de un líquido refrigerante. Este control de temperatura es necesario no sólo para eliminar el calor sino para mantener el capilar a una temperatura constante durante la separación, incluso en ausencia de efecto Joule, para asegurarnos la reproducibilidad de las medidas (Rodríguez Dorado, 2010).

2.8.9 Movilidad electroforética.

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 (Castillo Rodriguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005).

$$v = \mu E$$

Donde: v =velocidad del analito
 μ =movilidad electroforética
 E =campo eléctrico

El campo eléctrico es una función simple de la aplicación del voltaje y 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 siguiente ecuación, es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras que especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

$$\mu = \frac{q}{6\pi r\eta}$$

Donde: μ =movilidad electroforética del analito
 q =carga del analito
 η =viscosidad de la solución
 r =radio molecular

2.8.10 Flujo electroosmótico (EOF).

El EOF es el desplazamiento por el capilar de las moléculas del soluto y la solución buffer bajo la influencia de la corriente eléctrica, de modo que va del polo positivo al negativo (Osatinsky, 2007), para lograrse se requiere tener cargada la pared del capilar, generar un campo eléctrico y contar con un electrolito.

Un beneficio del EOF es provocar movimiento a todas las especies prescindiendo de la carga y en la misma dirección. Bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar está cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo. Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo, pero si el EOF es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo.

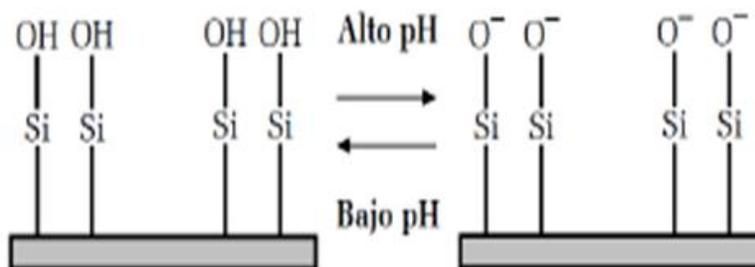


Figura 2.4 Grupos silanol en la pared del capilar.

Fuente: (Castillo Rodríguez y otros 2005)

El perfil de flujo del EOF es casi plano, este perfil es contrario al perfil laminar observado en sistemas controlados por presión y no sufre de resistencia grande en las paredes del capilar, además de ser benéfico porque no contribuye directamente a la dispersión de zonas de los analitos y provoca el movimiento de todas las especies sin importar su carga, en la misma dirección (Muñoz Ramírez, 2007).

Cuando se tiene EOF, 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 EOF, 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. Mientras que los analitos neutros se mueven a través del capilar con el EOF (Castillo Rodríguez, Revilla Vázquez, López Arellano, & Rivera Garcia, 2005). Ver figura 2.5.

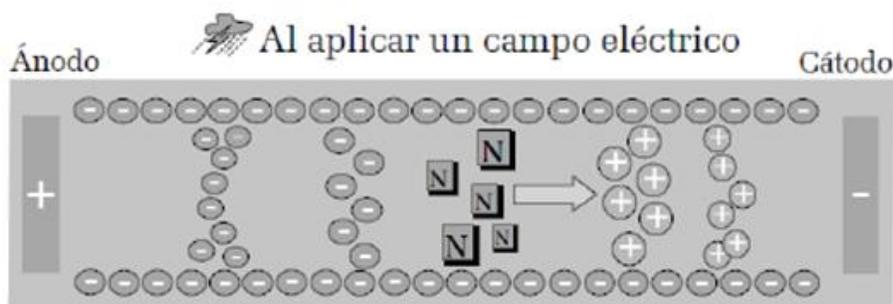


Figura 2.5 Representación del proceso de separación.

Fuente: (Castillo Rodríguez y otros 2005)

Así como el EOF normalmente es beneficioso para la separación, necesita ser controlado puesto que valores elevados pueden provocar la elución de los compuestos antes de que se produzca la separación o bien valores muy bajos pueden conducir a tiempos de análisis elevados o incluso que no eluyan determinados compuestos. Así, los parámetros que nos van a permitir el control del EOF son: campo eléctrico, pH de separación, fuerza iónica del buffer de separación, adición de disolventes orgánicos, temperatura, adición de polímeros neutros hidrofílicos y recubrimiento interno del capilar (Rodríguez Dorado, 2010).

2.9 Recubrimientos biorgánicos.

Los recubrimientos comestibles pueden ser definidos como una capa delgada de material que cubre la superficie del alimento generalmente son aplicados en forma líquida usualmente por inmersión. Constituyen una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua que retrasa el deterioro del alimento, mejoran las propiedades mecánicas, ayudan a mantener la integridad estructural del producto que envuelven, a retener compuestos volátiles y también pueden actuar como vehículo de aditivos alimentarios (antimicrobianos, microorganismo de control biológico, antioxidantes, aromatizantes, colorantes etc.) (González Melchor, 2012).

Se elaboran a partir de una gran variedad de proteínas, polisacáridos y lípidos ya sea como componentes únicos o combinados, con la finalidad de mejorar las propiedades organolépticas, mecánicas o nutricionales de los alimentos (Pérez Martínez, 2013). Las formulaciones pueden incluir plastificantes, emulsificantes, agentes de superficie activa (surfactantes), agentes de liberación específica de compuestos y lubricantes.

Además pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos incluyendo compuestos antimicrobianos presentes en aceites esenciales y extractos obtenidos de diferentes plantas con la finalidad del control de microorganismos (González Melchor, 2012).

2.9.1 Importancia de los recubrimientos.

Las pérdidas económicas debidas a enfermedades de postcosecha en granos, frutas y hortalizas son provocadas principalmente por hongos y bacterias que causan la degradación de los tejidos y su consiguiente pudrición. Por lo que el uso de sustancias bioactivas naturales para el control de infecciones por hongos postcosecha ha ganado atención (Suárez Jiménez, Cortez Rocha, Rosas Burgos, Burgos Hernández, Plascencia Jatomea, & Cinco Moroyoqui, 2007), entre ellas se encuentran los aceites esenciales y extractos obtenidos de plantas con actividad fungicidas, herbicidas, bactericidas e insecticidas (Moreno Limón, Salcedo Martínez, Cárdenas Ávila, Hernández Piñero, & Núñez González, 2012), los

cuales pueden tener un papel ecológico importante para el control de enfermedades o formar parte en la agricultura convencional. (López Benites, López Betancourt, Vázquez Badillo, Rodríguez Herrera, Mensoza Elos, & Padrón, 2005).

2.9.2 Pérdidas postcosecha de mango en México

El mango es un fruto poco resistente y en su mayor parte muy perecedero, por lo que si no se pone cuidado en su cosecha, manipulación y transporte se deteriora rápidamente y deja de servir para el consumo humano. Las principales causas de pérdidas postcosecha son: enfermedades, plagas, desórdenes fisiológicos y daños mecánicos. Considerando las enfermedades como una de las principales causas de pérdidas en varios cultivos, el mango puede quedar infectado antes o después de la cosecha por enfermedades difundidas por el aire el suelo y el agua. Entre las enfermedades en mango destacan la antracnosis, cenicilla polvorienta, fumagina y sama, reconociéndose al hongo del género *Colletotrichum* como el agente causal de la enfermedad comúnmente llamada antracnosis, la cual se encuentra distribuida en todos los estados productores de mango y las pérdidas son del 3 % llegando a alcanzar el 60 %.

La infección del fruto por antracnosis se produce mayoritariamente cuando éste llega a la madurez pero ya desde cuajado existen niveles bajos de infección en forma de pequeñas manchas que se mantienen sin desarrollar hasta la maduración. Las lesiones empiezan como pequeñas manchas ligeramente hundidas que pueden ser de color marrón claro a oscuro y que en frutos maduros puede presentar un halo rojo (González Melchor, 2012).



Figura 2.6 Antracnosis en mango causada por *Colletotrichum gloeosporioides*

2.9.3 Recubrimiento adicionado con extracto de gobernadora.

En nuestro grupo de trabajo, González Melchor (2012) elaboró una serie de formulaciones de un recubrimiento comestible a base de Alginato de sodio con los excipientes: glicerol, Tween 80 y la cantidad de extracto de gobernadora para generar 3000 mg/L de fenoles totales. Seleccionando la formulación C del recubrimiento que se aplicó en mangos de la variedad *Keitt* para alargar su tiempo de vida postcosecha en el control de antracnosis ver figura 2.7. La aplicación de tal recubrimiento permitió reducir la pérdida de peso, la velocidad de respiración, la firmeza sin afectar el pH, acidez, vitamina C, sólidos solubles, de igual forma no afectó el color, es decir que no tuvo un efecto en la luminosidad, cromaticidad y tono de los frutos, lo cual lo hace ser una alternativa tecnológica que contribuye alargando la vida útil mejorando la calidad y generando un valor agregado en mango.

DÍA	A	B	C	D	E
1					
5					
10					
15					
20					

A) Control; B) Alginato 0.75%, Glicerol 3%, 0.5% tween, 2 minutos de inmersión; C) Alginato 0.75%, Glicerol 3%, 0.5% tween, 4 minutos de inmersión; D) Alginato 0.75%, Glicerol 2%, tween, 2 minutos de inmersión; E) Alginato 0.75%, Glicerol 2%, 0.5% tween, 4 minutos de inmersión

Figura 2.7 Efecto de la aplicación de un recubrimiento a base de alginato de sodio en mangos de la variedad Keitt.

FUENTE: (González Melchor, 2012)

3 OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General:

Identificar y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes en extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* Moc. & Sessé ex DC. Cov.) utilizando la técnica de Electroforesis Capilar (CE), con la finalidad de caracterizar los polifenoles presentes en dichos extractos, que son base de la elaboración de recubrimientos para el aumento de la vida postcosecha de mangos de la variedad *Keitt*.

3.2 Objetivos particulares:

- ☉ Realizar el estudio de selección del método de extracción de los polifenoles de *Larrea tridentata*, y la comparación de los electroferogramas obtenidos por CE usando la técnica de extracción por maceración y extracción asistida por ultrasonido.

- ☉ Realizar un estudio utilizando diferentes proporciones de disolvente, comprando los perfiles obtenidos por CE para seleccionar la composición de disolvente que permita la extracción de la mayor cantidad de compuestos.

- ☉ Identificar las señales de los polifenoles presentes en el extracto de gobernadora mediante la adición del estándar y comparación del espectro de absorción para su posterior cuantificación.

- ☉ Medir las curvas de calibración correspondientes a cada polifenol identificado usando la técnica de CE, con la finalidad de obtener los modelos que permitan la cuantificación certera de cada uno de los fenoles presentes en los extractos de Gobernadora.

- ☉ Cuantificar por CE los polifenoles presentes en el recubrimiento elaborado a base de extracto de Gobernadora y aplicado en la piel de mangos de la variedad *Keitt* y relacionar este hecho con su aumento de vida postcosecha.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Material vegetal.

Para realizar este trabajo se utilizaron tallos y hojas de la planta Gobernadora (*Larrea tridentata* Moc. & Sessé ex DC. Cov.) adquirida en las Bodegas de Atizapán de Zaragoza. La identificación fue realizada por una experta de la UNAM, la M. en C. Ma. Edith López Villafranco del Herbario IZTA, Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM. Tlalnepantla Estado de México. El documento oficial se puede ver en el anexo 1.

4.2 Equipos

- ☉ Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA. USA).
- ☉ Balanza analítica BOECU (Alemania).
- ☉ Baño de ultrasonido Transsonic T570 Elma® (Alemania).
- ☉ Centrifuga Allegra™ 21, Beckman Coulter (Fullerton, CA. USA).
- ☉ Potenciómetro, Hanna Instruments (Padua, Italia).
- ☉ Desionizador MilliQ (Millipore, MA USA).
- ☉ Bomba de vacío PALL.

4.3 Estándares y reactivos.

- ☉ Estándares marca Sigma Aldrich: (+)-Catequina ≥ 98 %, ácido 2,5-dihidroxibenzoico 98 %, ácido 3,4-dihidroxibenzoico ≥ 97 %, ácido clorogénico ≥ 95 %, NDGA ≥ 90 %, ácido p-cumárico ≥ 98 %, ácido ferúlico 99 %, ácido trans-cinámico 99 %, Apigenina ≥ 97 %, Kaempferol ≥ 97 %, Quercetina 98 %, Rutina ≥ 94 %.
- ☉ Estándares marca Fluka: 2-(4-hidroxifenil) etanol 100 %, ácido vanílico ≥ 97 %, 3-aminofenol ≥ 98 %.
- ☉ Estándares marca J.T. Baker: ácido p-hidroxibenzoico 100 %.
- ☉ Reactivos: Etanol y metanol grado HPLC marca Fermont, hidróxido de sodio (NaOH), Tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) marca J.T. Baker.

4.4 Procedimiento para la obtención del extracto etanólico.

La mezcla óptima de disolventes para realizar la extracción de la mayor cantidad de polifenoles es una solución de etanol-agua (70:30). La optimización de la proporción del disolvente y del método de extracción se discute en el apartado de análisis de resultados.

- I. La muestra vegetal seca de Gobernadora es molida en una licuadora y la estandarización del tamaño de partícula se realizó utilizando tamices de acero inoxidable. Ver Figura 4.1.



Figura 4.1 Molienda y tamizado de la planta.

- II. Se pesa 1.0 g de planta seca, molida y de tamiz malla No. 40 en un vaso de precipitados de 50 mL y se le adicionan 10 mL de una mezcla de etanol-agua (70:30).
- III. Tras agregar el disolvente se sella el vaso utilizando papel parafilm y se realiza la extracción asistida con ultrasonido durante 90 min recirculando el agua del sonicador. Ver figura 4.2.



Figura 4.2 Proceso de extracción asistida por sonicación.

- IV. Concluida la sonicación se trasvasa el extracto a tubos de centrifuga de polisulfona y se centrifuga a 8,000 rpm durante 15 minutos.

- V. El sobrenadante se filtra a vacío utilizando papel filtro de poro chico, se lava con 3 mL de etanol 70% y se lleva al volumen inicial de 10 mL con etanol-agua (70:30). Ver figura 4.3.



Figura 4.3 Proceso de separación de los sólidos del extracto.

- VI. Se realiza una dilución del extracto tomando 1 mL con una pipeta volumétrica, se deposita en un matraz aforado de 10 mL y se lleva al aforo con etanol-agua (70:30). Ver figura 4.4.



Figura 4.4 Proceso de dilución de la muestra.

4.5 Procedimiento de hidrólisis alcalina del extracto.

Para realizar la hidrólisis en medio básico se utiliza una solución hidrolizante que contiene NaOH 1.8 N, EDTA 10 mM y Ácido Ascórbico 1 %.

- I. Se toman 2 mL de extracto etanólico sin diluir y se concentra por evaporación controlada usando un evaporador con un flujo de nitrógeno a 20 psi de presión y 35°C de temperatura.
- II. Se reconstituye con 2 mL de solución hidrolizante y es puesto en baño maría a 60 °C durante 30 minutos.

4.6 Elaboración del recubrimiento.

Se utilizó la formulación que contiene: Alginato de sodio 0.75%, Glicerol 3%, Tween 80 al 0.5% y la cantidad de extracto etanólico necesario para 3000 mg/L de fenoles totales determinada por Follin-Ciocalteu de acuerdo a (González Melchor, 2012) requiriendo solo de 13 mL de dicho extracto para preparar 500 mL de recubrimiento.

Se pesan los ingredientes y se mezclan en un vaso de precipitados con ayuda de un agitador mecánico hasta incorporación total. Se depositan aproximadamente 30 mL del recubrimiento en moldes de plástico para obtener las películas. Para la posterior medición por CE, se despega dicho recubrimiento, se pesa y se disuelve en agua agitando con una barra magnética hasta su completa disolución y se mide por CE a las condiciones establecidas. Ver figura 4.5



Figura 4.5 Elaboración del recubrimiento a base de alginato de sodio.

4.7 Condiciones para la separación de los polifenoles por CE.

Se utiliza un equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter Capillary Electrophoresis system (Fullerton, CA, USA), utilizando un capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, 54.6 cm de longitud total y 44.1 cm de longitud efectiva. La detección se realizó empleando un detector con arreglo de diodos (DAD) monitoreado a una longitud de onda de 200 nm y un voltaje aplicado de 28 kV con el cual se alcanzan corrientes entre 90 y 100 μA .

La separación se lleva a cabo empleando un buffer de boratos a partir de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) de concentración 50 mM a un pH de 9.4 y

usando como disolvente agua desionizada y bajo las condiciones especificadas en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Condiciones de separación de los compuestos fenólicos por CE.

Evento	Operación	Valor	Tiempo	Solución
1	Enjuague	20 psi	5 min	buffer boratos 50 mM
2	Inyección	0.5 psi	5 s	Muestra
3	Separación	28 kV	40 min	buffer boratos 50 mM

Cabe mencionar que para acondicionar el capilar y al inicio de cada día de trabajo se realiza un lavado a 25 psi con agua desionizada durante 2 min, NaOH 0.1 M durante 10 min, agua desionizada durante 3 min y posteriormente 10 min con buffer (boratos 50 mM). Así mismo al final del día se realiza un lavado con agua a 25 psi durante 10 minutos para evitar la acumulación de sales en el capilar.

4.8 Determinación de los compuestos.

4.8.1 Identificación de polifenoles en el extracto de Gobernadora.

- I. Una vez preparado el extracto etanólico de Gobernadora se realiza la medición obteniendo su electroferograma (perfil) y se adiciona una pequeña porción del estándar por confirmar (extracto fortificado).
- II. Considerando el tiempo de migración del estándar, se compara el electroferograma del extracto de Gobernadora sin adicionar con el extracto enriquecido con el estándar a evaluar.
- III. Se confirma la presencia del compuesto con un incremento en la altura del pico del que se sospecha o bien se descarta con la aparición de uno nuevo que no corresponda a ninguno de los picos del perfil electroforético de la planta.
- IV. Adicionalmente se compara el espectro de absorción del pico del extracto con el espectro de absorción del estándar correspondiente.

4.8.2 Determinación cuantitativa de los compuestos identificados.

Para realizar la determinación cuantitativa de los compuestos se realizó las curvas de calibración correspondientes y se evaluaron los parámetros de: precisión, linealidad, coeficiente de determinación (r^2), intervalos de confianza para la pendiente, así como los límites de detección y cuantificación. La planeación de las curvas de calibración puede revisarse a detalle en el ANEXO 4.

5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.

5.1 Estudio del método de extracción.

Para determinar los polifenoles presentes en el material vegetal fue necesario desarrollar un procedimiento para extraer los compuestos así como encontrar las condiciones adecuadas para realizar la extracción, por lo que se llevó a cabo un estudio para determinar el tipo de extracción adecuado, el disolvente a utilizar y la proporción.

Para seleccionar el método de extracción de los polifenoles presentes en gobernadora se utilizaron 2 métodos; uno usando el método más común de extracción (maceración) y otro usando extracción asistida por ultrasonido.

- I. Extracción por maceración de 1g de la planta seca y tamizada a malla No. 40 con 10 mL del etanol-agua (70:30) durante 14 horas en la obscuridad.
- II. Sonicación de 1g de la planta seca y tamizada a malla No. 40 con 10 mL de etanol-agua (70:30) durante 90 minutos con recirculación de agua fría.

En la figura 5.1 se comparan los electroferogramas del extracto etanólico obtenido por las dos formas de extracción (I y II) observándose perfiles similares en cuanto a cantidad de picos, tiempos de migración y alturas.

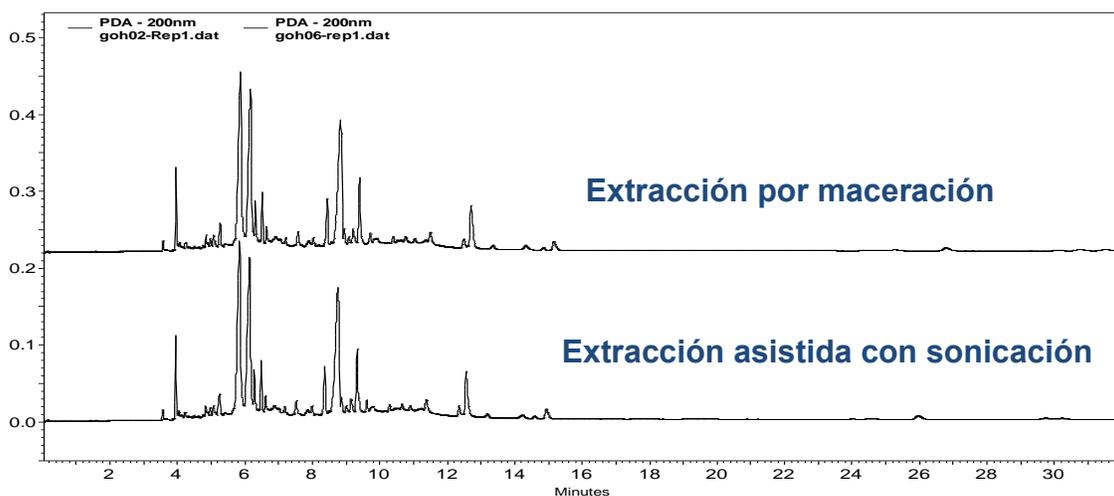


Figura 5.1 Electroferograma de extracción por maceración (14 hrs) y asistida con sonicación (90 min).

Se determinó que las señales de los polifenoles obtenidas por los métodos de extracción I y II, no presentan diferencias para afirmar que un método sea mejor que el otro, sin embargo, debido a que el tiempo requerido para realizar la extracción por maceración es significativamente mayor (14 hrs) alargando el tiempo de análisis y con ello su costo, se decidió utilizar el método de extracción asistida por sonicación en las mediciones posteriores, requiriendo sólo de 90 minutos para llevarse a cabo.

5.2 Estudio del disolvente.

Para determinar en qué medio se obtenían las mejores señales que permitieran analizar los compuestos presentes en el extracto de Gobernadora se realizó la extracción asistida por sonicación utilizando como disolventes etanol-agua (70:30) y metanol-agua (70:30). Al comparar los electroferogramas obtenidos para cada extracto y su réplica se observa que son muy similares entre sí mostrando la misma cantidad de señales y tiempos de migración (t_m), aunque en el extracto etanólico las señales antes del minuto 8 parecen mejor resueltas que en el extracto metanólico. Considerando que en extracto etanólico se obtienen señales mejor resueltas en comparación al extracto con metanol, además de que etanol resulta un disolvente mas amigable con el medio ambiente, se decidió trabajar con el extracto etanólico el cual no es tóxico como el metanol o algunos otros disolventes. Ver figura 5.2.

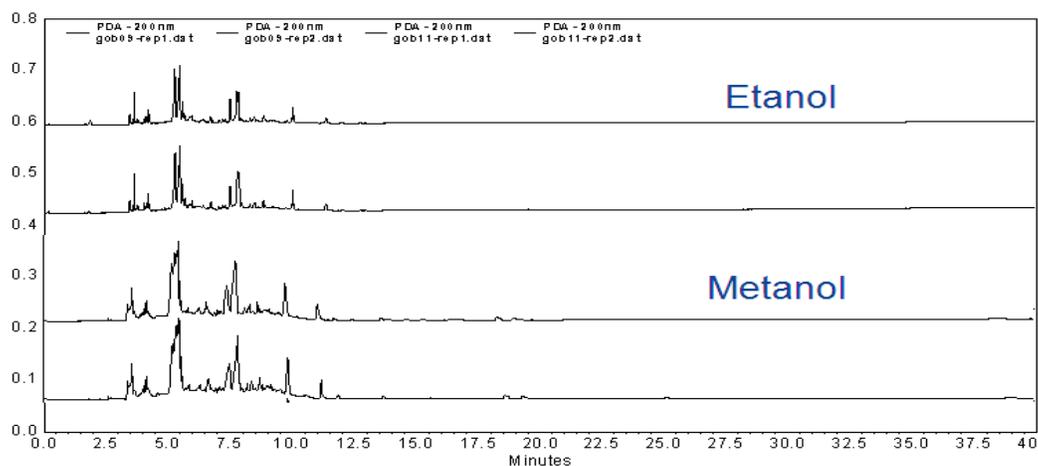


Figura 5.2 Electroferograma de extracto utilizando etanol y metanol.

5.2.1 Efecto de la proporción del disolvente.

Para determinar la proporción adecuada de disolvente y realizar la extracción de la mayor cantidad de los polifenoles presentes en gobernadora, se prepararon 5 extractos variando las proporciones etanol-agua como se observa en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 Proporciones de disolvente para realizar la extracción.

Extracto	Proporción disolvente (%)	
	Etanol	Agua
E 100%	100	0
E 70%	70	30
E 50%	50	50
E 25%	25	75
E (acuoso)	0	100

Al comparar los electroferogramas de los extractos obtenidos con dichas mezclas se observa que al variar las proporciones de etanol-agua no hay diferencia en la cantidad de señales pero sí en la intensidad, ya que las señales antes del min 9.5 se ven aumentadas en altura a mayor proporción de etanol, de igual forma cuando hay mayor proporción de agua algunas señales después del min 9.5 se ven aumentadas en altura, esto debido a la solubilidad de los componentes en los disolventes. Ver figura 5.3.

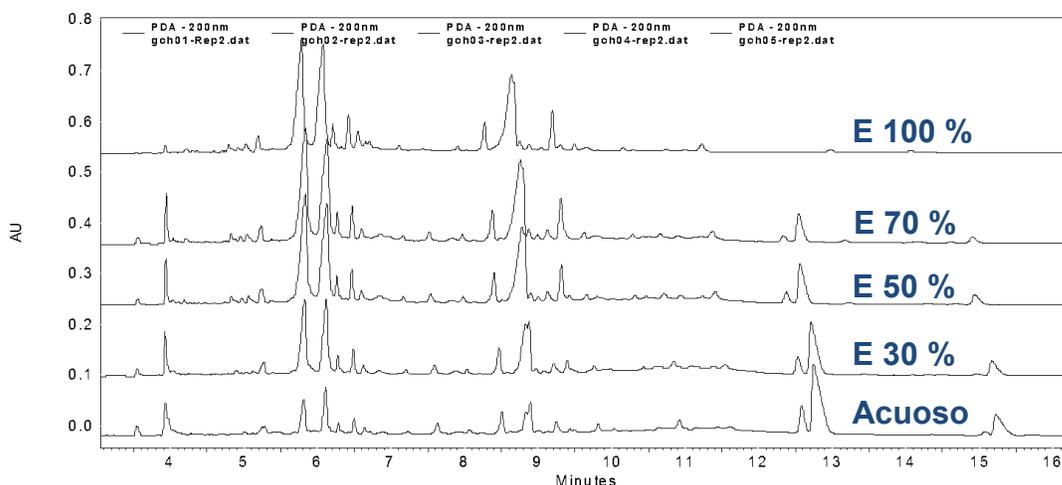


Figura 5.3 Electroferograma de extracto a diferentes proporciones de etanol-agua.

La proporción de disolventes con la que se decidió trabajar fue la proporción de etanol-agua (70:30) ya que se observa la mayoría de las señales del perfil electroforético de gobernadora. Curiosamente, dicha proporción coincide con la utilizada para lograr la inhibición del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* en las pruebas *in vitro* reportadas por González Melchor (2012), por lo que se verifica que es la composición del extracto más adecuada a utilizar en las películas.

5.3 Resolución del ácido nordihidroguayarático (NDGA).

En “condiciones normales” para determinar todos los compuestos del extracto de gobernadora, la separación se realiza usando un buffer de boratos (a partir de tetraboratos) 50 mM de pH 9.4 y un voltaje aplicado de 28 kV, sin embargo no fue posible resolver el NDGA sin afectar los demás compuestos identificados. Ejemplo de esto, en la figura 5.4 se observan las señales no resueltas de la mezcla de los estándares de NDGA (4) y derivado metilado (5) medidos a las condiciones normales, imposibilitando su integración.

Por tal motivo fue necesario encontrar otras condiciones de separación, realizando cambios en el buffer (concentración y pH) así como voltaje aplicado para poder resolver estos compuestos. Ver anexo 3.

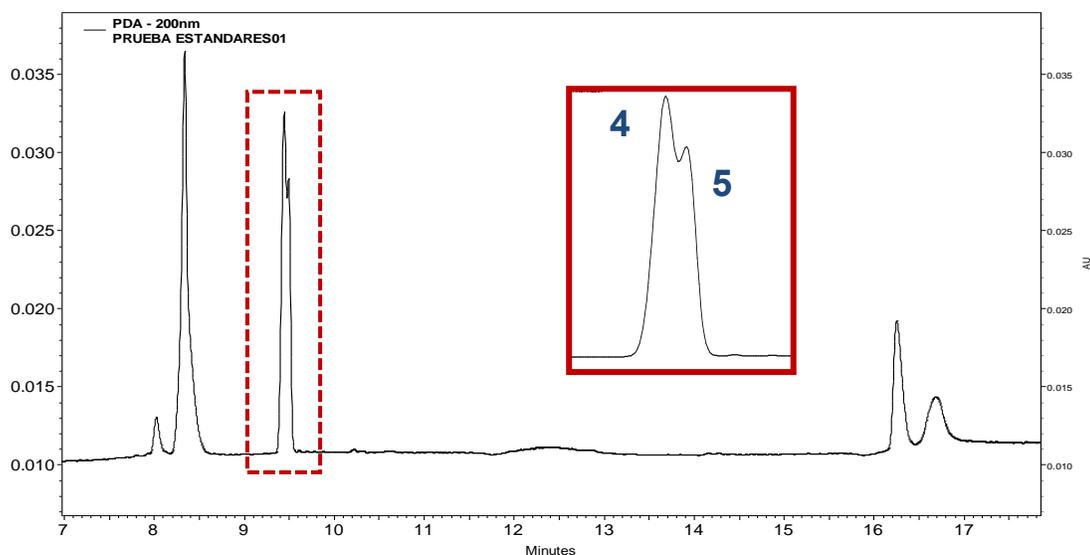


Figura 5.4 Mezcla NDGA (4) y derivado metilado (5) medidos a condiciones normales.

5.3.1 Condiciones finales para resolver NDGA.

Para lograr separar el NDGA del su derivado metilado (del que se habla mas adelante), se modificó la concentración y el pH del buffer de separación además de disminuir el voltaje aplicado, decidiéndose que las condiciones adecuadas son: utilizar un buffer de boratos 30 mM, pH 9.0 y voltaje de 20 kV a las que se llamará en adelante como “condiciones NDGA”. Cabe mencionar que se tuvo que realizar un dilución de 1mL de extracto en 10 mL etanol-agua (70:30) que llamaremos dilución D (ver anexo 3), debido a la alta concentración de éstos 2 compuestos en el extracto etanólico.

Al realizar la medición del extracto diluido D medido a las nuevas condiciones, el pico del NDGA se observa mejor resuelto del pico del derivado metilado aunque no en línea base, pero con una buena reproducibilidad, además de ser fácil de integrar y lograr su cuantificación. Ver figura 5.5.

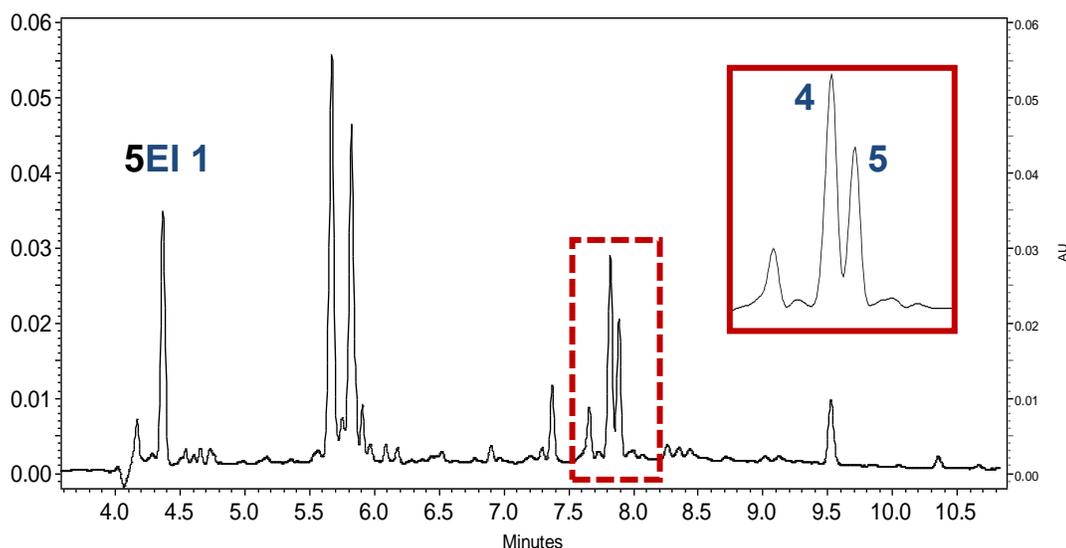


Figura 5.5 Extracto diluido medido a las condiciones NDGA. Pico 4. NDGA y 5. derivado metilado

Sin embargo al realizar la medición de una mezcla de estándares NDGA y derivado metilado medido a las condiciones NDGA migra a un menor tiempo (7.75 min) que el NDGA (ver Fig. 5.6) al comparar el espectro de absorción del pico 5 es similar al del NDGA, hecho que hace sospechar, que el pico 5 pertenece a uno de

los derivados metilados de NDGA, de los cuales ya existen reportes de su existencia en *Larrea tridentata* (Lambert, y otros, 2005) aunque no existen estándares en el mercado de éstos derivados para confirmarlo con una adición.

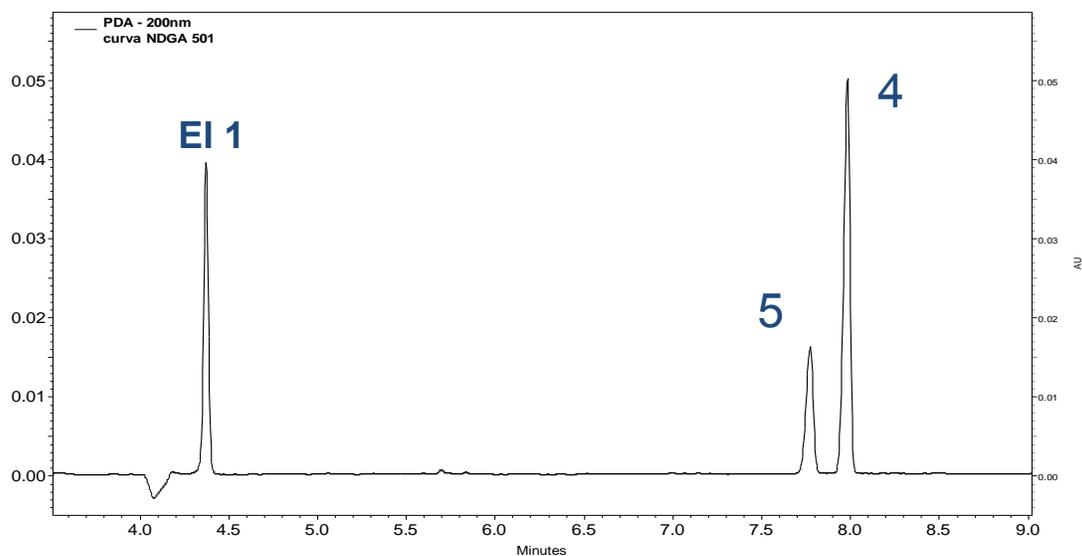


Figura 5.6 Electroferograma de NDGA (4) y derivado metilado (5) medidos a condiciones NDGA.

5.4 Condiciones de hidrólisis del extracto.

Algunos de los polifenoles presentes en plantas se encuentran unidos a azúcares (glicosilados) modificándose el tiempo de migración de tales compuestos y causando problemas para determinarlos al no contar con estándares de referencia de muchos polifenoles unidos a azúcares, por lo que se planteó la realización de una hidrólisis del extracto de gobernadora como se indica en el apartado 4.5. La hidrólisis se llevó a cabo en medio básico utilizando una solución fresca que contiene NaOH 1.8 N, EDTA 10 mM y Ácido Ascórbico 1 % de acuerdo a Sánchez Soto (2013), estudiándose las condiciones adecuadas de temperatura y tiempo de hidrólisis que se puede ver en subsecuentes apartados.

5.4.1 Efecto de la temperatura.

Para determinar la temperatura adecuada se realizó la hidrolisis del extracto a una temperatura de 30 y 60 °C. Al comparar los electroferogramas se observa que para ambos casos los perfiles son similares, en cuanto a cantidad de señales y tiempos de migración, sin embargo se decidió realizar la hidrolisis a 60 °C para mediciones posteriores debido a que se presenta una mayor intensidad de las señales entre los minutos 15 y 25. Ver figura 5.7.

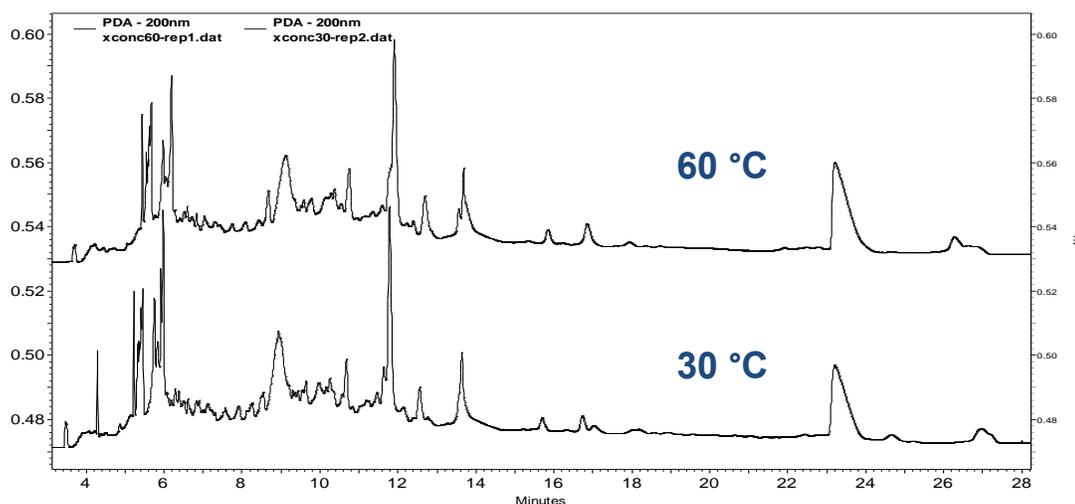


Figura 5.7 Electroferograma de extracto hidrolizado (60 y 30 °C).

5.4.2 Efecto del tiempo de hidrólisis.

Para determinar el tiempo adecuado se realizó la hidrólisis a 60°C por 30 y 60 minutos, al comparar éstos electroferogramas frente a un extracto resuspendido en solución hidrolizante sin calentamiento alguno ó minuto cero, se observan las mismas señales entre los minutos 5 y 8.5 pero muy disminuidas en la hidrolisis a 30 y 60 minutos, determinándose que visualmente no hay diferencia entre ambos tiempos de hidrólisis. Sin embargo, a fin de reducir el tiempo de análisis para mediciones posteriores se decidió realizar la hidrólisis a un tiempo de 30 min. Ver figura 5.8

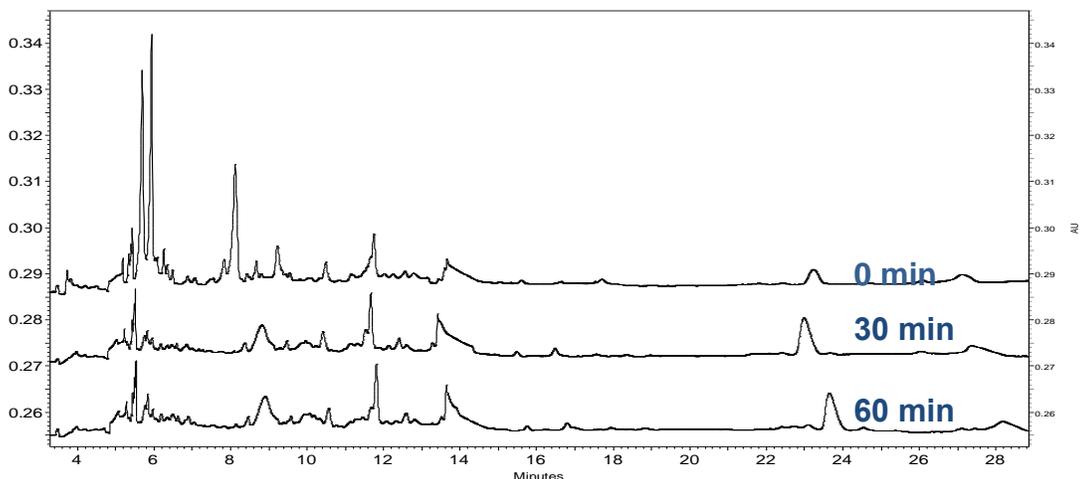


Figura 5.8 Electroferograma de extracto hidrolizado a diferentes tiempos.

5.4.3 Condiciones finales de hidrólisis.

Se determinó que las condiciones adecuadas son: realizar la hidrólisis en medio básico durante 30 minutos a una temperatura de 60 °C. Al comparar el electroferograma del extracto hidrolizado con el extracto “Normal” (sin hidrolizar), se observa que la mayoría de las señales del extracto etanólico también se encuentran en extracto hidrolizado pero de mucho menor altura, además se observa la aparición de 2 señales nuevas no identificadas en el extracto normal aproximadamente en los minutos 15.5 y 16.5 resultado muy posiblemente de la ruptura de enlaces de azúcares presentes en algunos fenoles. La señal a los 23 min corresponde al ácido ascórbico el cual fue adicionado en la solución hidrolizante (como estabilizante) ver figura 5.9.

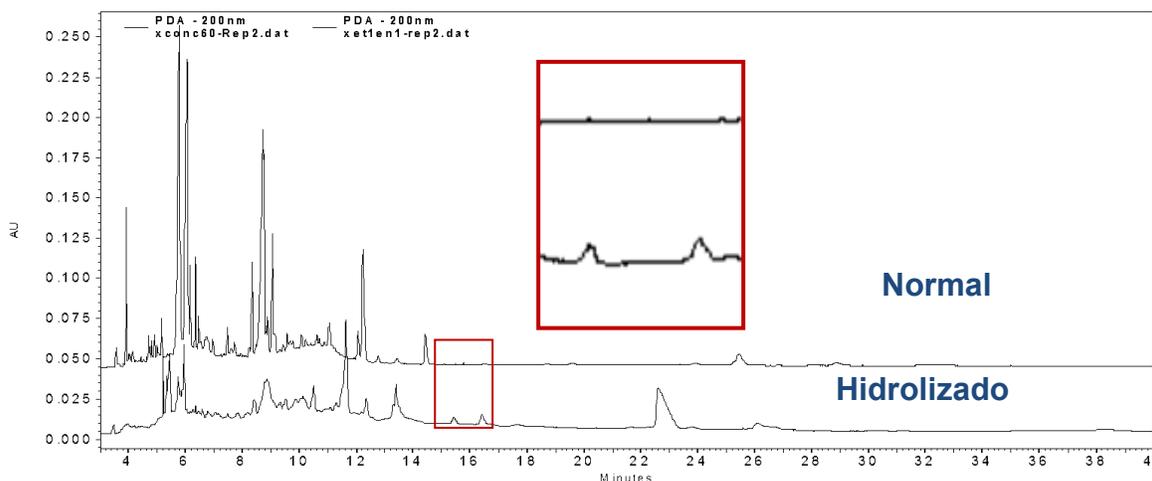


Figura 5.9 Electroferograma de extracto etanólico normal e hidrolizado.

5.5 Determinación de los polifenoles.

5.5.1 Identificación de polifenoles presentes en extracto de Gobernadora.

En la tabla 5.2 se muestra la identificación de los compuestos que se realizó por adición del estándar como se indica en el apartado 4.8.1, lográndose identificar 13 compuestos polifenólicos en los extractos, de los cuales 11 están presentes en el extracto etanólico y 2 en el extracto hidrolizado.

Tabla 5.2 Compuestos identificados en extracto de gobernadora.

Std	Nombre	Tipo de extracto	
		Etanol 70 %	Hidrolizado
01	2-(4-Hidroxifenil) etanol	✓	
02	Rutina	✓	
03	(+)-Catequina	✓	
04	Ácido nordihidroguayarético	✓	
05	Ácido clorogénico	✓	
06	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	✓	
07	Apigenina	✓	
08	Ferúlico	✓	
09	Kaempferol	✓	
10	Ácido p-cumárico		✓
11	Ácido vanílico		✓
12	Ácido p-hidroxibenzoico	✓	
13	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	✓	

En la figura 5.12 se presenta el electroferograma de una mezcla de los estándares identificados donde se observa el orden de migración para para cada compuesto.

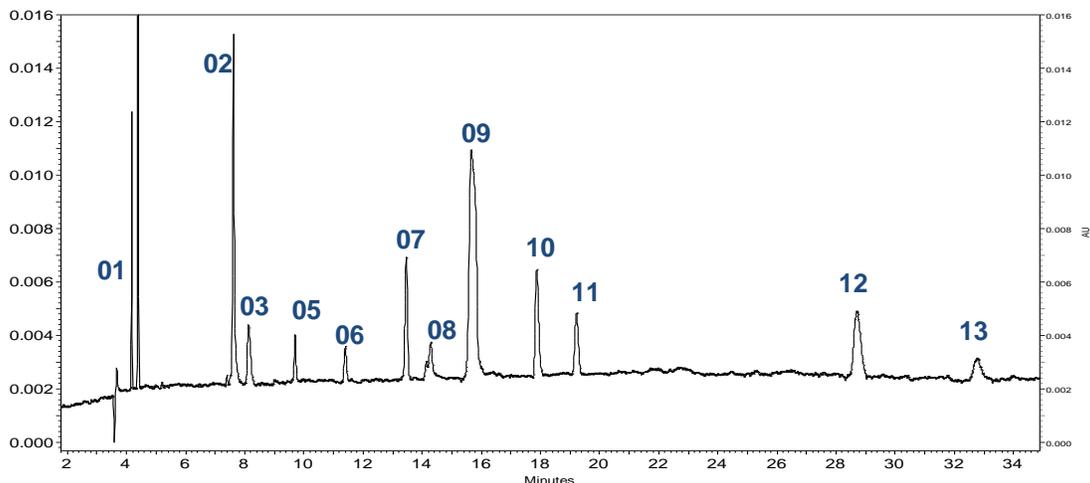


Figura 5.10 Mezcla de estándares de los compuestos identificados.

5.5.2 Elección de Estándar Interno (E.I).

Al ser la introducción de la muestra al equipo de CE de tipo hidrodinámica, pequeños cambios de viscosidad entre las muestras, sobre todo en matrices complejas como son los extractos vegetales, causan variaciones en la cantidad introducida por el capilar y en el tiempo de migración, por lo que se requiere utilizar un estándar interno (E.I). El uso del E.I mejora la reproducibilidad del volumen introducido de la muestra, además de disminuir errores en la toma de alícuotas y volúmenes de aforo. Por tal motivo fue necesario seleccionar un E.I de estructura similar a los analitos, de una pureza alta y que no presentara traslapes con las señales propias del extracto con lo cual relacionar la respuesta del E.I con la respuesta del analito de interés, minimizando así la variación en la inyección.

En la figura 5.11 se muestra la adición de 4 estándares (como posibles candidatos a E.I) en muestras independientes de extracto etanólico (3-Aminofenol, etilparabeno, propilparabeno y ácido benzoico). La traza inferior es la del extracto como tal, mientras la traza superior es la fortificada con el estándar. Podemos observar que 3-aminofenol es el único estándar que no presenta traslape con alguna otra señal propia del extracto de la planta, ya que con los otros compuestos el método no es selectivo, además de que 3-aminofenol tiene un pico eficiente, no es un componente natural en las muestras y no aumenta el tiempo de análisis, razón por lo que se seleccionó como E.I a ser adicionado en el extracto etanólico.

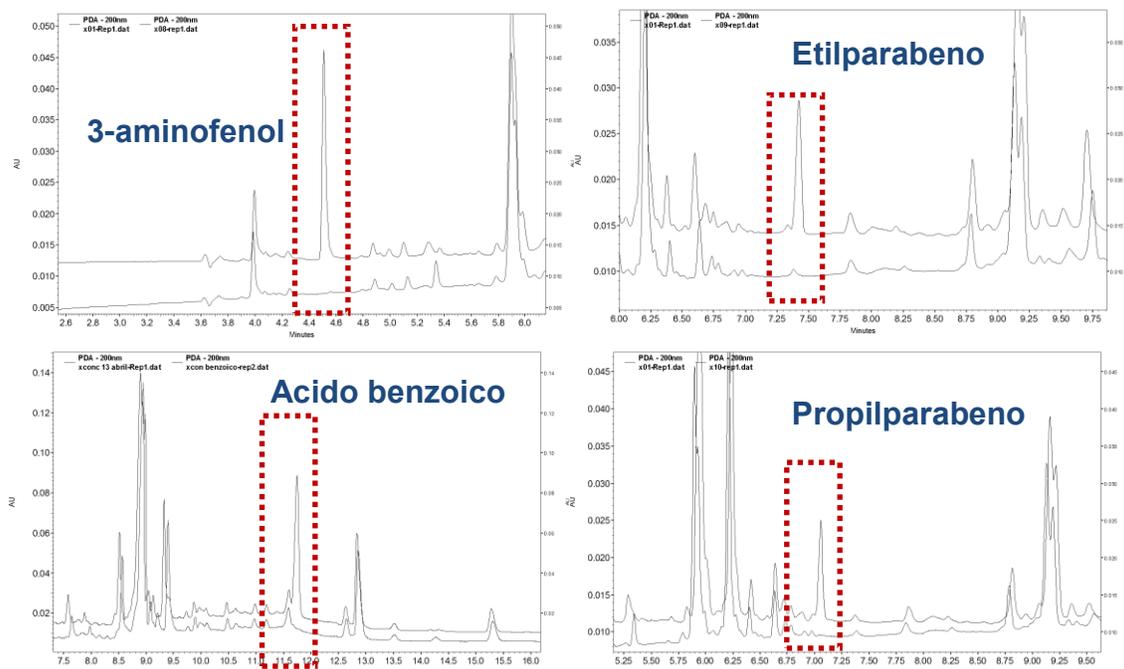


Figura 5.11 Adición de estándares en el extracto etanólico para la elección del E.I.

En el extracto hidrolizado no fue posible usar 3-aminofenol y ninguno otro de los estándares como E.I. ya que se traslapan con otras señales, por lo que se seleccionó quercetina como E.I., del cual se sabía que su tiempo de migración aproximadamente en el min 23 no presenta traslape con ninguna señal propia del extracto hidrolizado. Ver figura 5.12.

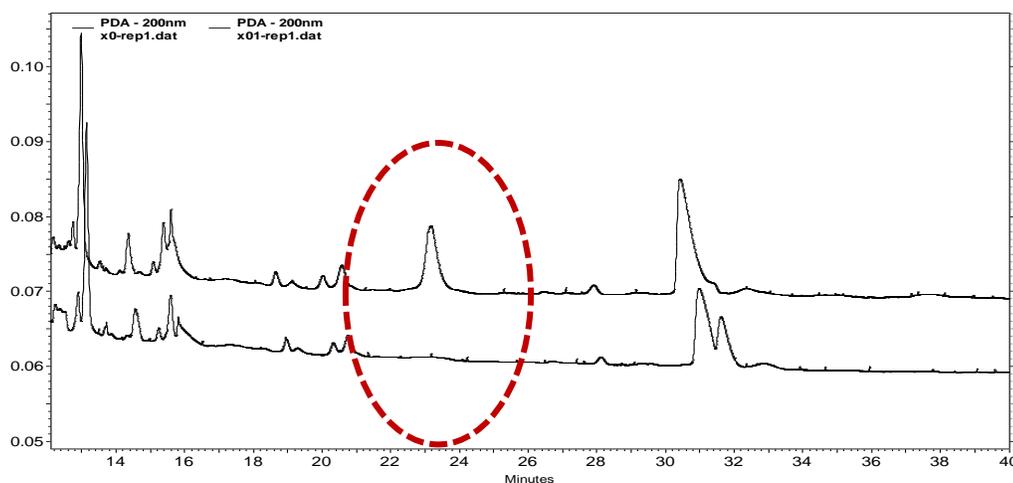


Figura 5.12 Elección de quercetina como E.I. en extracto hidrolizado.

5.5.3 Resumen de las condiciones finales de los 2 métodos desarrollados

En la tabla 5.3 se resumen las condiciones a utilizar en los 2 métodos desarrollados, con la finalidad de referirse a éstas solo con el nombre del método:

Tabla 5.3. Resumen de las condiciones finales de los métodos desarrollados

Título del Método	Tipo de Extracto	Condiciones a utilizar en CE	Estándar interno (E.I.)
Condiciones NDGA	Etanol:agua (70:30)	buffer boratos 30 mM, pH 9.0 y 20 kV	3-aminofenol
Condiciones Normales	Etanol:agua (70:30)	buffer boratos 50 mM, pH 9.4 y 28 kV	3-aminofenol
Extracto hidrolizado	Hidrolizado	buffer boratos 50 mM, pH 9.4 y 28 kV	Quercetina

5.5.4 Precisión.

Se evaluó la precisión en tiempo, área y altura de los picos de cada uno de los polifenoles. El método utilizado, así como el número de replicas medidas se especifica en la tabla 5.4 De la respuesta analítica se obtuvo el promedio, desviación estándar y %RSD.

Tabla 5.4 Condiciones utilizadas para la evaluación de la precisión

Método utilizado	Compuestos	Réplicas
Condiciones NDGA	NDGA	9
Condiciones Normales	Los 10 fenoles restantes	8
Extracto hidrolizado	ácido p-cumárico ácido vanílico	8

En la tabla 5.5 se muestran los resultados de precisión en tiempos de migración, por lo que se puede decir que el sistema es preciso para la mayoría de los estándares ya que las respuestas presentan un mínimo de variabilidad con un %RSD <2%, a excepción de los ácidos: vanílico, p-hidroxibenzoico y 3,4-dihidroxibenzoico, para los cuales se tiene una variación mayor en tiempos de migración durante las corridas con un %RSD entre 2.3 y 3.3.

Tabla 5.5 Precisión en tiempo de migración de los compuestos.

Estándar	Tiempo de migración (min)		
	Prom	Desvest	%RSD
ácido 2,4-hidroxifeniletanol	4.21	0.03	0.68
Rutina	7.66	0.09	1.18
Catequina	8.17	0.09	1.12
NDGA	7.90	0.04	0.49
ácido clorogénico	9.74	0.14	1.45
ácido 2,5-dihidroxibenzoico	11.38	0.17	1.5
Apigenina	13.49	0.26	1.94
Ferúlico	13.99	0.25	1.79
Kaempferol	14.3	0.25	1.74
ácido p-cumárico	17.66	0.33	1.9
ácido Vanílico	18.85	0.45	2.38
ácido p-hidroxibenzoico	27.98	0.8	2.58
ácido 3,4-dihidroxibenzoico	31.88	1.31	3.3

Para precisión en relación de áreas ($A_{\text{Fenol}}/A_{\text{E.I}}$) el sistema es preciso para NDGA (compuesto principal de gobernadora) al tener un $\%RSD < 2\%$ mientras que para el caso de relación de alturas ($H_{\text{Fenol}}/H_{\text{E.I}}$) se determinó que la variabilidad es grande y que el sistema no es preciso para ninguno de los estándares al tener un $\%RSD > 8\%$, razón por la cual se decidió utilizar el área de cada pico como respuesta analítica para la medición de las correspondientes curvas de calibración. Ver tabla 5.6.

Tabla 5.6 Precisión en Área y Altura.

Estándar	Relación de Área (A _{Fenol} /A _{E.I})			Relación de altura (H _{Fenol} /H _{E.I})		
	Prom	Desvest	%RSD	Prom	Desvest	%RSD
Ácido 2,4-hidroxifeniletanol	0.51	0.01	2.25	0.61	0.05	8.44
Rutina	0.32	0.02	4.92	0.20	0.03	13.52
Catequina	1.46	0.04	2.81	0.43	0.05	11.24
NDGA	1.00	0.02	1.71	0.99	0.15	14.81
Ácido clorogénico	0.44	0.01	2.85	0.20	0.03	12.96
Ácido 2,5- dihidroxibenzoico	1.43	0.05	3.79	0.50	0.05	10.13
Apigenina	1.36	0.03	1.89	0.44	0.04	8.76
Ácido ferúlico	1.14	0.02	2.16	0.41	0.03	8.20
Kaempferol	2.72	0.14	5.01	0.50	0.08	15.47
Ácido p-cumárico	3.55	0.11	2.99	0.34	0.03	9.32
Ácido vanílico	4.50	0.17	3.78	0.36	0.03	8.67
Ácido p-hidroxibenzoico	0.44	0.01	2.85	0.20	0.03	12.96
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1.43	0.05	3.79	0.50	0.05	10.13

5.5.5 Curvas de calibración.

Se realizaron las curvas de calibración como se indica en el ANEXO 4 los datos obtenidos fueron analizados en el software estadístico Statgraphics Centurion XV con los que se pudieron evaluar algunos parámetros de validación.

En la tabla 5.7 se muestran las ecuaciones del modelo seleccionado (lineal) que describen la relación entre relación de área (Rel A) y concentración para cada una de las curvas de calibración, además se observa que todas las curvas tienen un coeficiente de determinación $r^2 > 0.98$ (a excepción de ácido ferúlico con 0.9654 y kaempferol con 0.9727), indicando que el modelo lineal explica más del 98 % de la variabilidad en la relación de áreas (Rel A). Con relación a las $r^2 < 0.98$ de los modelos lineales de ácido ferúlico y kaempferol, en el Anexo 5 se observa que criterios más importantes que la r^2 ; como la homocedasticidad de los datos (para la correcta aplicación del método de mínimos cuadrados) y el ANOVA, soportan la selección del modelo lineal como correcto para ser aplicado para a la predicción.

Tabla 5.7 Ecuaciones del modelo lineal para las curvas de calibración.

Fenol	$A_{Std}/AE.I = (\text{Intercepto} \pm S) + (\text{Pendiente} \pm S) * ([\text{Fenol}] / [\text{E.I.]})$	r^2
2,4-Hfe	$\text{Rel A} = (-0.0054 \pm 0.0025) + (0.0036 \pm 0.0000) * \left(\frac{[2,4\text{-Hfe}]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9991
Rut	$\text{Rel A} = (-0.0180 \pm 0.0126) + (0.0023 \pm 0.0000) * \left(\frac{[Rut]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9963
Cat	$\text{Rel A} = (-0.0719 \pm 0.0077) + (0.0114 \pm 0.0002) * \left(\frac{[Catequina]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9948
NDGA	$\text{Rel A} = (-0.0062 \pm 0.0086) + (0.0113 \pm 0.0001) * \left(\frac{[NDGA]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9993
Clo	$\text{Rel A} = (-0.0159 \pm 0.0047) + (0.0018 \pm 0.0001) * \left(\frac{[Clorogenico]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9800
2,5-DHB	$\text{Rel A} = (-0.0092 \pm 0.0037) + (0.0099 \pm 0.0003) * \left(\frac{[2,5\text{-Dhb}]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9908
Api	$\text{Rel A} = (-0.0371 \pm 0.0123) + (0.0107 \pm 0.0003) * \left(\frac{[Apigenina]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9898
Fer	$\text{Rel A} = (-0.0454 \pm 0.0074) + (0.0105 \pm 0.0006) * \left(\frac{[Ferulico]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9654
Kae	$\text{Rel A} = (-0.0801 \pm 0.0195) + (0.0246 \pm 0.0015) * \left(\frac{[kaempferol]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9727
Cum	$\text{Rel A} = (-0.2432 \pm 0.0913) + (0.0426 \pm 0.0017) * \left(\frac{[p - Cumarico]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9831
Van	$\text{Rel A} = (-0.0123 \pm 0.0047) + (0.0049 \pm 0.0002) * \left(\frac{[Vanílico]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9840
Phb	$\text{Rel A} = (-0.1871 \pm 0.0207) + (0.0296 \pm 0.0006) * \left(\frac{[Phb]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9944
3,4-Dhb	$\text{Rel A} = (-0.1627 \pm 0.0202) + (0.0332 \pm 0.0014) * \left(\frac{[3,4\text{-Dhb}]}{[3 - \text{aminofenol}]} \right)$	0.9868

NOTA: En la ecuación para cada modelo se muestran los parámetros de la ecuación lineal - su desviación estándar.

2,4-Hfe (ácido 2-4-Hidroxifenil etanol), Rut (Rutina), Cat (Catequina), NDGA (ácido nordihidroguayarético), Clo (ácido clorogénico), 2,5-DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico), Api (apigenina), Fer (ácido ferúlico), Kae (kaempferol), Cum (ácido p-cumárico), Van (ácido vanílico), Phb (ácido p-hidroxibenzoico), 3,4-Dhb (ácido 3,4-dihidroxibenzoico).

Para poder probar la validez de los modelos propuestos en la Tabla 5.7, necesariamente se deben realizar varias pruebas estadísticas:

- 1) La observación del gráfico de Relación de áreas vs [Fenol] para ver su tendencia
- 2) El análisis de los residuales para determinar si existe homocedasticidad
- 3) La prueba de análisis de varianza (ANOVA) con falta de ajuste al modelo
- 4) La evaluación del coeficiente de determinación (r^2)

En el análisis de los resultados de estas pruebas se observa una tendencia lineal en las curvas de calibración y el análisis de los residuales presenta homocedasticidad (datos distribuidos al azar y sin tendencias), lo que significa que las varianzas de las repeticiones para todos los niveles de concentración pueden considerarse iguales. Se muestran detalles del análisis en el ANEXO 5.

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) con falta de ajuste se compara el cociente de la varianza de la falta de ajuste al modelo, dividida entre la varianza del error puro (MS_{FDA}/MS_{PE}) con la F_{Tablas} , y mediante una prueba de hipótesis se determina si hay o no ajuste a dicho modelo, se observa que la F_{exp} (calculada por el software) para cada compuesto es menor que la F_{Tablas} (de distribución de Fisher para un 95 % de confianza), por lo que se cumple la Hipótesis nula (H_0), determinando que sí hay ajuste al modelo lineal para cada curva de calibración.

$$\begin{array}{l}
 H_0 = F_{exp} < F_{Tablas} = \text{Hay ajuste al modelo} \\
 H_1 = F_{exp} > F_{Tablas} = \text{Falta de ajuste al modelo}
 \end{array}$$

En la tabla 5.8 se muestran los datos de F_{exp} y F_{tablas} con los que se determinó dicho ajuste al modelo.

Tabla 5.8 Resumen de ANOVA con falta de ajuste.

Estándar	F exp		F tablas	Ajuste al modelo
ácido 2,4-hidroxifeniletanol	3.15	<	3.838	✓
Rutina	0.74	<	3.863	✓
Catequina	0.38	<	3.357	✓
NDGA	0.51	<	3.357	✓
ácido Clorogénico	0.6	<	3.259	✓
ácido 2,5- dihidroxibenzoico	0.25	<	3.687	✓
Apigenina	1.47	<	3.357	✓
Ferúlico	3.72	<	4.347	✓
Kaempferol	1.33	<	5.409	✓
ácido p-cumárico	3.85	<	4.12	✓
ácido Vanílico	0.8	<	3.357	✓
ácido p-hidroxibenzoico	2.14	<	3.633	✓
ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0.55	<	5.409	✓

Posterior a la validación del modelo lineal, se determinaron los intervalos de confianza para la pendiente ($IC = b1 \pm t_{0.95, n-2} S_{b1}$), los límites de detección ($LOD = (3.3 \times S_{y/x})/b1$) y límite de cuantificación ($LOQ = (10 \times S_{y/x})/b1$) para cada sistema de calibración los cuales se muestran en la tabla 5.9. De acuerdo a los criterios de aceptación en la Guía de Validación de Métodos Analíticos editada por el Colegio Nacional de QFB's, al tener una $r^2 > 0.98$ y el IC para la pendiente ($b1$) no incluir al cero, se aceptan nuestros límites de detección y cuantificación.

5.5.6 Cuantificación de los compuestos en el extracto de gobernadora.

La cuantificación de los compuestos polifenólicos en los extractos se realizó utilizando 3-aminofenol de concentración 150.14 mg/L como E.I 1 para el extracto etanólico y Quercetina 150.06 mg/L como E.I 2 para el extracto hidrolizado, para el caso de la cuantificación del NDGA se utilizó 3-aminofenol como E.I en el extracto diluido "D" (1 mL de extracto en 10 mL de etanol-agua) debido a la alta concentración de dicho compuesto.

En la tabla 5.10 se muestra el promedio de la concentración de los compuestos presentes en el extracto etanólico de gobernadora así como la cantidad de cada compuesto por cada 100 g de planta medidos por triplicado.

Tabla 5.9 I.C, LOD y LQD de las curvas de calibración.

Fenol	IC =		LOD= (3.3 X	LOQ=(10 X
	$b1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$		$S_{y/x}/b1$	$S_{y/x}/b1$
	inferior	superior	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
Ácido 2,4-Hidroxifeniletanol	0.0036	0.0037	3.4230	10.3728
Rutina	0.0022	0.0024	29.4100	89.1212
Catequina	0.0109	0.0118	3.3634	10.1921
NDGA	0.0111	0.0114	4.6979	14.2359
Ácido Clorogénico	0.0017	0.0020	15.6716	47.4898
Ácido 2,5-Hidroxibenzoico	0.0093	0.0104	2.0347	6.1658
Apigenina	0.0101	0.0113	6.8952	20.8945
Ácido ferúlico	0.0091	0.0119	2.0989	6.3602
Kaempferol	0.0213	0.0280	2.5207	7.6386
Ácido p-cumárico	0.0389	0.0463	11.1222	33.7037
Ácido vanílico	0.0045	0.0052	5.6457	17.1082
Ácido p-hidroxibenzoico	0.0283	0.0310	3.3191	10.0578
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	0.0301	0.0363	1.6019	4.8543

Tabla 5.10 Cuantificación de los polifenoles de *Larrea tridentata* en extracto etanol-agua (70:30).

Compuesto	[Fenol] ($\mu\text{g/mL}$)	mg/100 g de planta	S	% RSD
Ácido 2,4-hidroxifeniletanol	63.85	67.22	1.73	2.57
Rutina	332.51	350.01	11.67	3.33
Catequina	29.39	30.94	4.70	15.18
NDGA	603.48	635.24	4.15	0.65
Ácido Clorogénico	99.27	104.49	32.83	31.42
Ácido 2,5- Dihidroxibenzoico	10.30	10.84	0.80	7.41
Apigenina	44.68	47.03	4.19	8.91
Ácido ferúlico	8.91	9.38	0.20	2.19
Kaempferol	11.39	11.99	0.20	1.65
Ácido p-Hidroxibenzoico	36.33	38.24	10.31	26.95
Ácido 3,4 Dihidroxibenzoico	14.74	15.52	*	*

*Solo se pudo realizar la integración correcta en una de las replicas

Mientras que en la tabla 5.11 se muestra la concentración de los compuestos presentes en el extracto hidrolizado de gobernadora así como la cantidad de cada compuesto por cada 100 g de planta.

Tabla 5.11 Cuantificación de los polifenoles en extracto Hidrolizado

Compuesto	[Fenol] ($\mu\text{g/mL}$)	mg / g planta	mg / 100 g de planta
ácido p-cumárico	13.76	0.0145	1.45
ácido Vanílico	45.25	0.0476	4.76

Como podemos observar en las tablas 5.10 y 5.11, todos los compuestos son cuantificables de una forma confiable (es decir con un error bajo) ya que las concentraciones obtenidas son superiores al límite de cuantificación (ver tabla 5.9) con excepción del ácido p-cumárico con un LOQ= 33.7 $\mu\text{g/mL}$ y LOD= 11.12 $\mu\text{g/mL}$, que aunque puede ser interpolado, su cuantificación tendrá asociado un error mayor. Cabe hacer mención que para el ácido clorogénico y el ácido p-hidroxibenzoico se dificultó la integración, debido a su asimetría y su baja altura, lo que se refleja en sus altos valores de %RSD.

De acuerdo a la tabla 5.12, tenemos como componentes mayoritarios (>10%) al NDGA y la Rutina, y como minoritarios (<10%) a los compuestos: ácido 2,4-hidroxifeniletanol, catequina, ácido clorogénico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, apigenina, ácido ferúlico, kaempferol, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzoico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

La totalidad de estos compuestos polifenólicos presentes en *Larrea tridentata* muy posiblemente son los responsables de la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporoides*, aplicados como película en un recubrimiento adicionado con extracto de gobernadora en mangos de la variedad *Keitt* (González Melchor, 2012), ya que existen reportes de la actividad de los polifenoles sobre una gran cantidad de microorganismos. Moreno (2011), Garduño Pizaña (2009),

López Benites (2005), Lira Saldivar (2003), Heron & Yarnell (2001), Elakovich & Stevens (1985).

Tabla 5.12 Porcentaje de cada polifenol por cada 100 g de planta

Compuesto	% Fenol
ácido 2,4-hidroxifeniletanol	5.0651415
Rutina	26.37385
Catequina	2.3313817
NDGA	47.866416
ácido Clorogénico	7.8734996
ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	0.8168125
Apigenina	3.5437906
ácido Ferúlico	0.706799
Kaempferol	0.9034669
ácido p-Hidroxibenzoico	2.8814492
ácido 3,4-Dihidroxibenzoico	1.1694584
ácido p-cumárico	0.10926
ácido Vanílico	0.3586741

5.5.7 Determinación de los compuestos en el recubrimiento.

A pesar de la dilución de los compuestos al elaborar el recubrimiento y debido a las dificultades para concentrar dicho recubrimiento (ver anexo 6), se decidió cuantificar el contenido de NDGA en el recubrimiento fresco. Al realizar la medición directa del recubrimiento bajo las condiciones NDGA, utilizando 3-aminofenol a 150.14 mg/L como E.I y comparar los electroforegramas del recubrimiento con y sin E.I, se obtuvieron los electroferogramas de la figura 5.13, donde se observa la diferencia en la intensidad de los picos del E.I. y NDGA, debido a la gran dilución realizada (13 mL de extracto para preparar 500 mL de recubrimiento), además de una señal interferente propia de los excipientes que aparece debajo del pico del E.I. la cual podría causar problemas de integración.

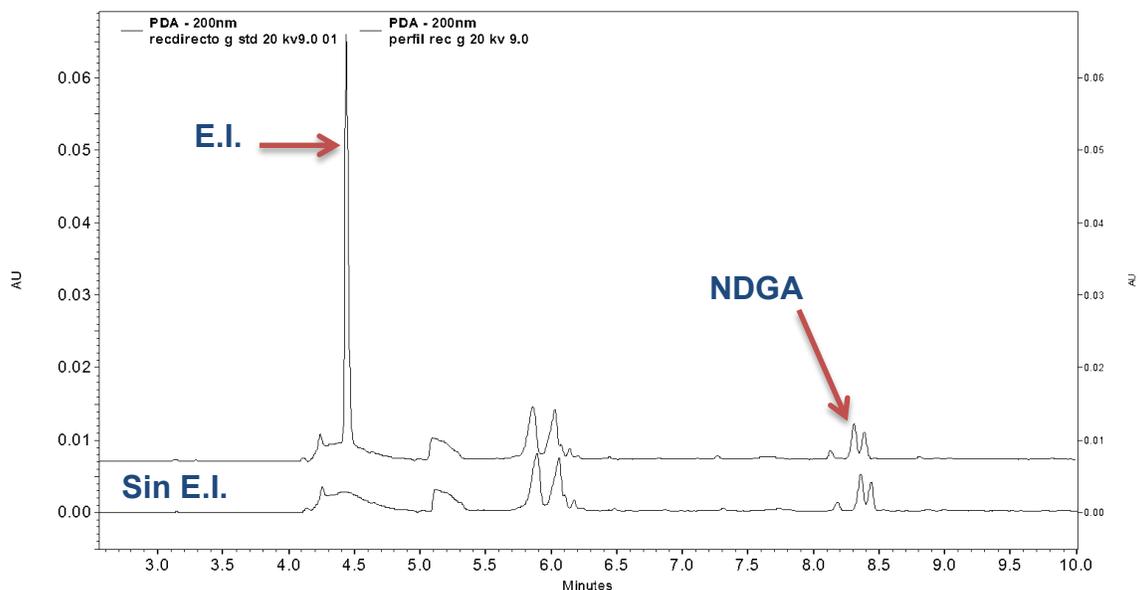


Figura 5.13 Perfil de los recubrimientos frescos adicionado y sin adicionar E.I.

En la tabla 5.13 se muestran los datos de la determinación cuantitativa de NDGA presente en el recubrimiento elaborado.

Tabla 5.13 Cuantificación de NDGA en el recubrimiento

Método de cuantificación	[NDGA] µg/mL	% RSD
Curva de calibración	9.60	1.62

Para monitorear por CE el perfil de los recubrimientos ya secos, las muestras de fueron disueltas en 30 mL de agua debido a que el alginato de sodio es poco soluble en mezclas con alta proporción de etanol. En la figura 5.14 se muestra la comparación de los perfiles del recubrimiento fresco comparado con el recubrimiento disuelto en agua a los 7,10, 15 y 20 días, medidos a las “condiciones NDGA” donde podemos ver una disminución de todas las señales incluyendo a la del NDGA (4) y su derivado entre los minutos 8 y 8.5.

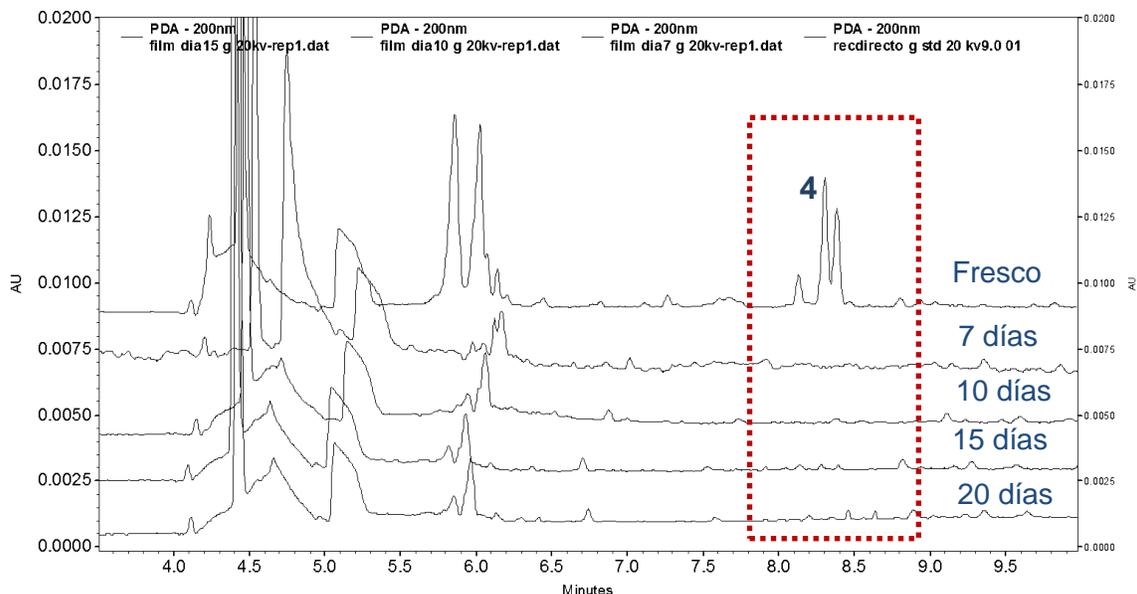


Figura 5.14 Comparación del recubrimiento fresco y los recubrimientos disueltos a 7, 10, 15 y 20 días.

La pérdida de las señales de tales compuestos a los 7 días de elaborado el recubrimiento posiblemente se deba a:

- a) Una degradación de los polifenoles a los 7 días de realizado dicho recubrimiento ya que son inestables con la luz, el oxígeno del ambiente y el calor (Reyes Aguilar, 2014).
- b) Que los polifenoles hayan quedado encapsulados en el alginato (Rowe, Sheskey, & Owen, 2006).
- c) Que la poca solubilidad de los polifenoles en agua produjera bajas señales, ya que muchos de éstos son más solubles en mezclas con etanol. (Rowe, Sheskey, & Owen, 2006).

Dicha pérdida no es de preocupación ya que a pesar de que NDGA es el componente principal de la Gobernadora, los efectos o bondades de tal compuesto se han asociado a un efecto sinérgico con la gran cantidad de compuestos antioxidantes con actividad antifúngica presentes en toda la planta ampliando el efecto del compuesto activo primario NDGA. Lo anterior sugiere usar un extracto de todos los constituyentes de la estructura de la planta (hoja/ramas) en comparación con solo usar una preparación de NDGA purificado o sintetizado. (Lira Saldivar, 2003) y en la aplicación de dicho recubrimiento con esta formulación en mangos de la variedad *keitt* se logró prolongar su tiempo de vida útil frente a antracnosis además de mejorar sus propiedades (González Melchor, 2012).

Cabe mencionar que mediante este estudio se determinó que la cantidad de NDGA empleada para realizar el recubrimiento es mínima ya que en un mango se encontraría aproximadamente 0.288 mg NDGA en el recubrimiento. Si se considera que en estudios previos, no se reportó toxicidad alguna en la administración de hasta 250-3000 mg NDGA en humanos administrada como infusión, Alonso (2004), sería seguro consumir hasta 10,416 mangos con todo y piel, por lo que no representa un peligro para el consumidor. Además el recubrimiento fue aplicado en un fruto del cual no se consume la cáscara y se ha reportado que el efecto tóxico de la gobernadora está relacionado al consumo prolongado y en grandes cantidades de infusión directa de gobernadora. No obstante, organismos regulatorios como la COFEPRIS requerirían estudios de toxicidad específicos por para su posible aplicación.

6 CONCLUSIONES.

- En el presente trabajo se desarrollaron exitosamente dos métodos de identificación y cuantificación por CE, uno para la determinación de NDGA y otro para la determinación de los demás polifenoles.
- Se determinaron las condiciones de extracción de la mayor cantidad de polifenoles en Gobernadora, que son: realizar la extracción asistida por sonicación durante 90 min, empleando una solución de etanol-agua (70:30) y realizar la hidrólisis alcalina a 60 °C durante 30 minutos.
- Mediante la adición del estándar y por comparación de los espectros de absorción, se lograron identificar 11 compuestos fenólicos presentes en el extracto etanólico y 2 compuestos en el extracto hidrolizado.
- La cuantificación de los 13 compuestos fenólicos se realizó utilizando los modelos obtenidos con las curvas de calibración correspondientes, determinando que los compuestos mayoritarios (>10 %) en el extracto de gobernadora son: NDGA y Rutina, presentando los 11 compuestos restantes señales más pequeñas (<10%). Y debido a sus propiedades antioxidantes y fungicidas muy posiblemente la totalidad de estos compuestos en el extracto de *Larrea tridentata* son los responsables de la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporoides* en las películas aplicadas en mango por González Melchor (2012).
- Por todo lo anterior en este trabajo, respecto a la seguridad del uso de extractos de *Larrea tridentata*, sugerimos el empleo de gobernadora como una buena alternativa para enfrentar plagas de importancia económica que afectan a frutos mexicanos y aumentar su vida postcosecha, realizando para tal efecto los estudios de toxicidad correspondientes para que sea aceptada su utilización por organismos gubernamentales.

7 BIBLIOGRAFIA.

- Alonso, J. (2004). *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*, 1 ed. Argentina, Rosario: Corpus libros.
- Arteaga, S., Carmona, A., Luis, J., Andrade Cetto, A., & Cárdenas, R. (2005). Effect of *Larrea tridentata* (creosote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. *Journal of Pharmacy and pharmacology*, 1-7.
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20, 30-40.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 02 de 02 de 2014, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Gobernadora&id=7544>
- Castagnino, J. M. (2000). Electroforesis Capilar. *Redalyc-Bioquimia*, 25(1), 13-32.
- Castillo Rodriguez, M. A., Revilla Vázquez, A. L., López Arellano, R., & Rivera Garcia, P. (2005). *Fundamentos de Electroforesis Capilar*. México: Universidad Nacional Autónoma De México.
- Cervantes Romero, V. (2012). *Perfil electroforético y cuantificación de polifenoles de extractos etanólicos de calendula officinalis L. e Hippocratea excelsa K. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Elakovich, S. D., & Stevens, K. L. (1985). Phytotoxic properties of Nordihydroguaiaretic acid, a lignan from *Larrea tridentata* (Creosote Bush). *Journal of Chemical Ecology*, Vol. II, 27-33.
- Garduño Pizaña, C. (2009). *Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de Fusarium oxysporum f.sp. gladioli (Massey) Snyder y Hansen*

e identificación de compuestos volátiles. Tesis que para obtener el título de Maestra en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional.

González Jiménez, F. E. (2010). *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en Ika semilla y aceite de Chía (Salvia Hispánica L.) mediante Electroforesis Capilar. Tesis de maestría para obtener el título de M. en C. en alimentos. Instituto Politécnico Nacional.*

González Melchor, M. M. (2012). *Aplicación de un recubrimiento a base de alginato de sodio y un extracto natural para el control de antracnosis en mangos "Tomyatkins y Keitt". Tesis para obtener el título de Ingeniera en alimentos. Mexico: UNAM.*

Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo. España: Editorial Reverté.*

Heron, S., & Yarnell, E. (2001). The Safety of Low-Dose *Larrea tridentata* (DC) Coville (Creosote Bush or Chaparral): A Retrospective Clinical Study. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 175–185.

Instituto de Biología. (27 de 05 de 2010). "*Larrea tridentata* (Sessé & Mo. ex DC.) Coville - IBUNAM:MEXU:PVsn38222". Recuperado el 02 de 02 de 2014, de UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.:

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn38222>
2

Jardine, K., Abrell, L., Kurc, S. A., Huxman, T., Ortega, J., & Guenther, A. (2010). Volatile organic compound emissions from *Larrea tridentata* (creosotebush). *Atmos. Chem. Phys.*, 12191–12206.

Lambert, J. D., Dorr, R. T., & Timmermann, B. N. (2004). Nordihydroguaiaretic Acid: A Review of Its Numerous and Varied. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 42, 149-158.

- Lambert, J. D., Sang, S., Dougherty, A., Caldwell, C. G., Meyers, R. O., Dorr, R. T., y otros. (2005). Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 66, 811–815.
- Lira Saldivar, R. H. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la Gobernadora (*Larrea tridentata* D.C. Coville). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 214-222.
- Lira, R. H., Hernández, M., & Hernández, F. D. (2006). Activity of *larrea tridentata* (D.C.) Coville L. Extracts and Chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 211-216.
- López Benites, A., López Betancourt, S. R., Vázquez Badillo, M. H., Rodríguez Herrera, S. A., Mensoza Elos, M., & Padrón, C. E. (2005). Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, Sch lechtend. f. sp.lycopersici (Sacc.) Snayder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante Extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 23, 183-190.
- Martínez, M. (1991). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2011). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves. *Elsevier*, 163-167.
- Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2011). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Elsevier*, 163-167.
- Mendez, M., Rodríguez, R., Ruiz, j., Morales, D., Castillo, F., Hernandez Castillo, F., y otros. (2011). Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvents against food-borne pathogen bacteria. *Elsevier*, 445-450.

- Moreno Limón, S., Salcedo Martínez, S. M., Cárdenas Ávila, M. L., Hernández Piñero, J. L., & Núñez González, M. A. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín. *Polibotánica*, 171-184.
- Moreno, S., Gonzáles, L. N., Salcedo, S. M., Cárdenas, M. L., & Perales, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, 193-205.
- Muñoz Ramírez, E. (2007). *Desarrollo de Métodos para la Determinación de Poliaminas por Electroforesis Capilar utilizando la Detección UV y la Fluorescencia Inducida por Láser. Informe de trabajo para optar por el grado de Maestro en Ciencias*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Naumburg, E., Loik, M. E., & Smith, S. D. (2004). Photosynthetic responses of *Larrea tridentata* to seasonal temperature extremes under elevated CO₂. *New phytologist*, 323-330.
- Núñez Luna, I. G. (2013). *"Evaluación de la capacidad alelopática de las fracciones hidrosolubles del extracto etanólico de cuachalalate (*Amphiterygium adstringens* Shiede ex Schlecht)"*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Osatinsky, R. (2007). ¿Que es la electroforesis capilar? *Redalyc*, 71(2), 60-66.
- Peng, Y., Liu, F., Peng, Y., & Ye, J. (2004). Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Elsevier*, 169-175.
- Pérez Martínez, G. (2013). *Extracción de compuestos activos de plantas para su aplicación en recubrimientos comestibles para controlar podredumbre gris en la fresa. Tesis de licenciatura para obtener el título de Ingeniería en alimentos*. . UNAM.

- Pérez Tortosa, V. (21 de 04 de 2008). *Evaluación de la actividad antioxidante de plantas de tomillo*. Recuperado el 02 de 02 de 2014, de Repositorio Digital UPCT, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica: <http://hdl.handle.net/10317/159>
- Piñeiro Méndez, Z. (2005). *Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. memoria para optar al grado de Doctora en Ciencias Químicas*. Universidad de Cádiz.
- Reyes Aguilar, L. S. (Octubre de 2014). Efecto de procesamiento sobre la estabilidad de polifenoles en extracto de mango (*Mangifera indica* L.). Honduras.
- Rodríguez Dorado, R. M. (2010). *Estudio de compuestos antiulcerosos, sus metanolitos y productos de degradación por Electroforesis Capilar*. Universidad De Castilla La Mancha. Tesis doctoral.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Owen, S. C. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.
- Ruiz Martínez, J., Ascacio, J. A., Rodríguez, R., Morales, D., & Aguilar, C. N. (2011). Phytochemical screening of extracts from some. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(13), , pp. 2791-2797.
- Rzedowsky, J., & Equihua, M. (1987). *Atlas Cultural de México*. México: Grupo Editorial Planeta.
- Sakakibara, M., Difeo, D., Nakatani, N., Timmermann, B., & Mabry, T. J. (1976). Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry* Vol. 15, 727-731.
- 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*. . México:: UNAM.

- Suárez Jiménez, G. M., Cortez Rocha, M. O., Rosas Burgos, E. C., Burgos Hernández, A., Plascencia Jatomea, M., & Cinco Moroyoqui, F. J. (2007). Antifungal Activity of Plant Methanolic Extracts Against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and Fumonisin B1 Production. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 134-142.
- Tenorio Lezama, P. (2006). *malezas de México. Ficha- Larrea tridentata (Moç. & Seseé ex DC.) Coville*. Recuperado el 02 de Febrero de 2014, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygophyllaceae/larrea-tridentata/fichas/pagina1.htm>
- Vaya, J., & Aviram, M. (2001). Nutritional Antioxidants Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry. Vol 1*, 99-117.
- Vázquez Yanes, & otros. (2009). *Malezas de México, Ficha - Larrea tridentata (Moç. & Seseé ex DC.) Coville*. Recuperado el 02 de Febrero de 2014, de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/70-zygop2m.pdf
- Youngren, J. F., Gable, K., Penaranda, C., Maddux, B. A., Zavodovskaya, M., Lobo, M., y otros. (2005). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits the IGF-1 and c-erbB2/HER2/neu. *Breast Cancer Research and Treatment*, 37-46.

8 ANEXOS.

ANEXO 1 Identificación del material vegetal utilizado, realizado por el herbario de IZTA de FES-Iztacala y su certificación como *Larrea tridentata*.

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


 Oficina de gobierno, primer piso
Tel: 5625 1147 • 5625 1149
Fax: 5625 2148
Av. de los Reyes 289, Los Reyes Iztacala,
Toluqueño, CP 54000,
Estado de México, México

Herbario IZTA
Edificio L4, Planta Baja
Av. de los Reyes No 1
Los Reyes Iztacala, Toluqueño,
Estado de México, CP 54000 México
Tel: Fax: 5625 1219
Se trata_016 @campus.izta.unam.mx



ANEXO 2 Identificación de polifenoles en extracto de Gobernadora.

Identificación en extracto etanólico.

Ácido nordihidroguayarático.

Como podemos ver en la figura 8.1 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 8.7 min existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de NDGA en el extracto etanólico de gobernadora.

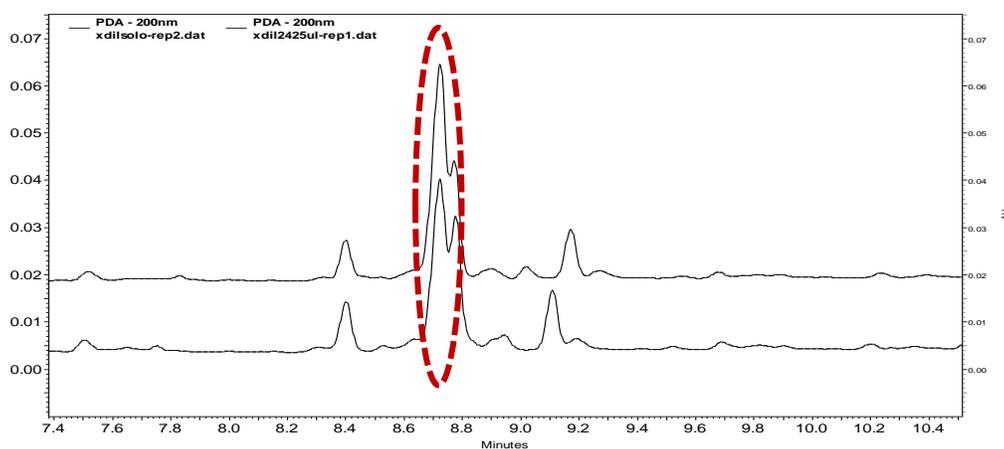


Figura 8.1 Identificación de NDGA en extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al NDGA, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y del extracto de gobernadora en el min 8.7, que muestra la similitud entre ambos espectros de absorción confirmando que corresponde al NDGA. Ver figura 8.2

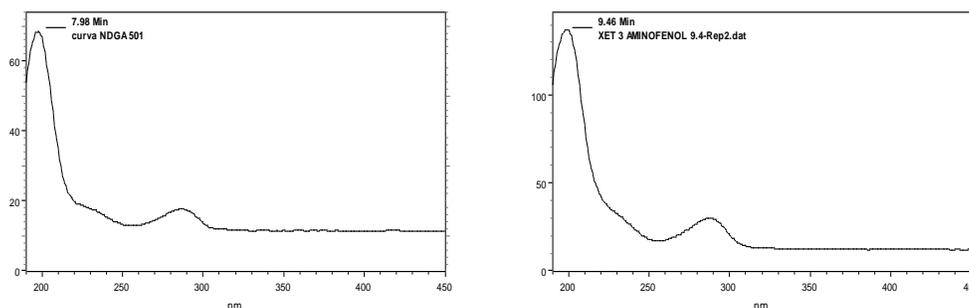


Figura 8.2 Espectro de absorción de A) Estándar NDGA y B) Extracto etanólico

Derivado de NDGA.

Como podemos ver en la figura 8.3 comparando la traza de extracto etanólico con la traza de extracto fortificado con estándar de ácido trans-cinámico (Std con tm similar), a un tiempo de migración de aproximadamente 8.4 min existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, dado que este estándar en el extracto adicionado migra en un tiempo donde se encuentran 2 picos traslapados se adicionó nuevamente ese extracto para pico verificar que era el segundo pico el que vio incrementado en altura.

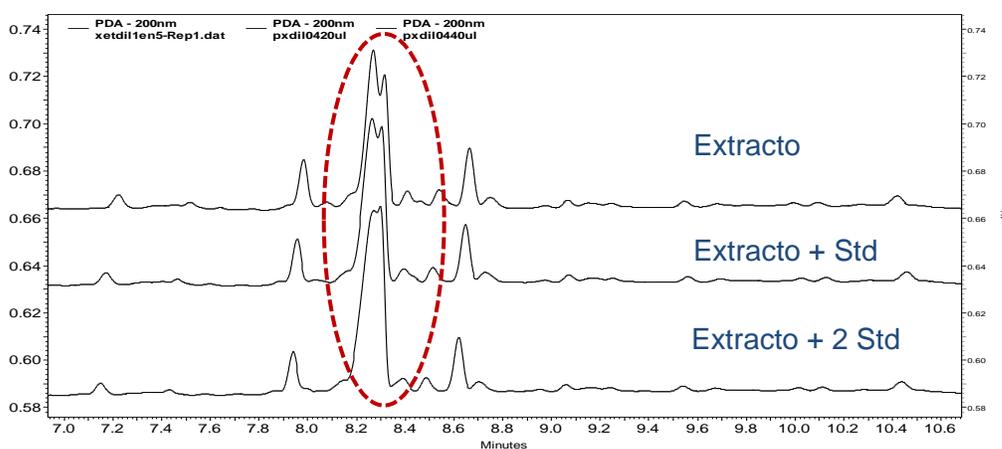


Figura 8.3 Identificación de ácido trans-cinámico en extracto etanólico.

Sin embargo, al comparar el espectro de absorción del extracto con el del estándar de ácido trans-cinámico no hay coincidencia en los perfiles (Fig. 8.4). Por lo anterior, podemos concluir que el ácido trans-cinámico migra a estas mismas condiciones muy probablemente con un derivado del NDGA (metilado) ya que existen referencias de su existencia (Lambert, y otros, 2005) y presenta un espectro de absorción similar al NDGA (ver Fig. 8.4 B). Lamentablemente no existe un estándar disponible de este derivado para corroborar la hipótesis planteada.

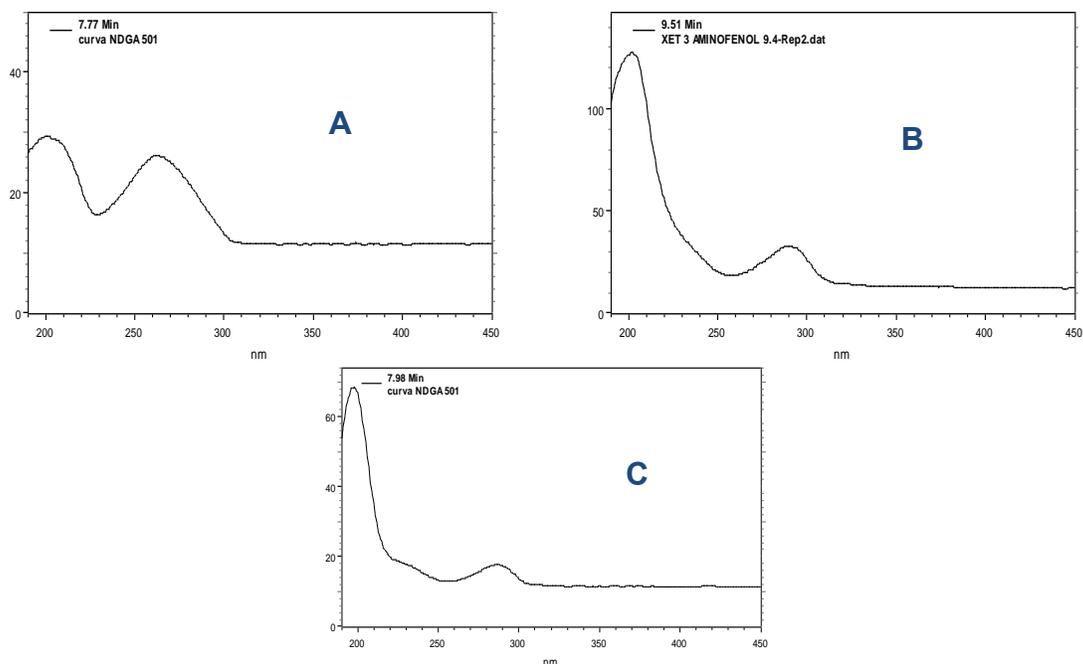


Figura 8.4 Espectro de absorción de A) ácido trans-cinámico, B) Extracto etanólico y C) NDGA.

2-(4-Hidroxifenil) etanol.

Como podemos ver en la figura 8.5 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 4.2 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de 2-(4-hidroxifenil) etanol en el extracto etanólico de gobernadora.

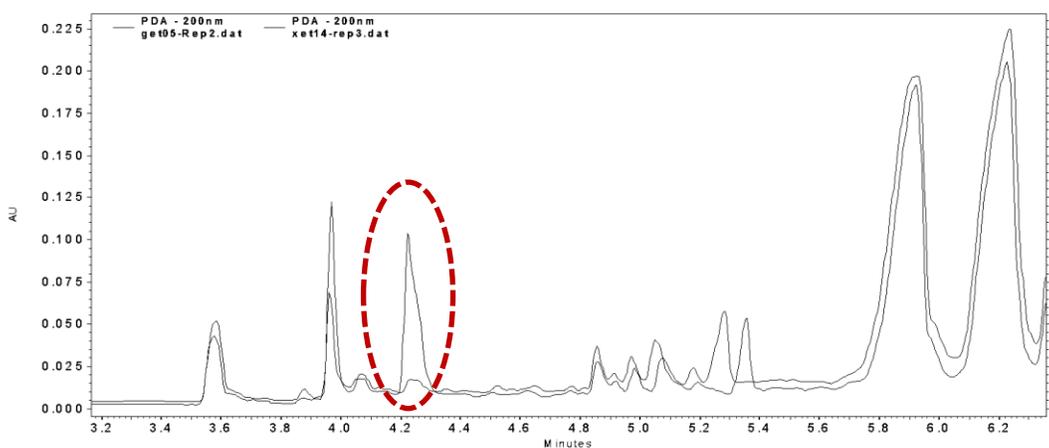


Figura 8.5 Identificación de 2-(4-hidroxifenil) etanol en extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 4.2 que muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia del ácido 2-(4-hidroxifenil) etanol. Ver figura 8.6.

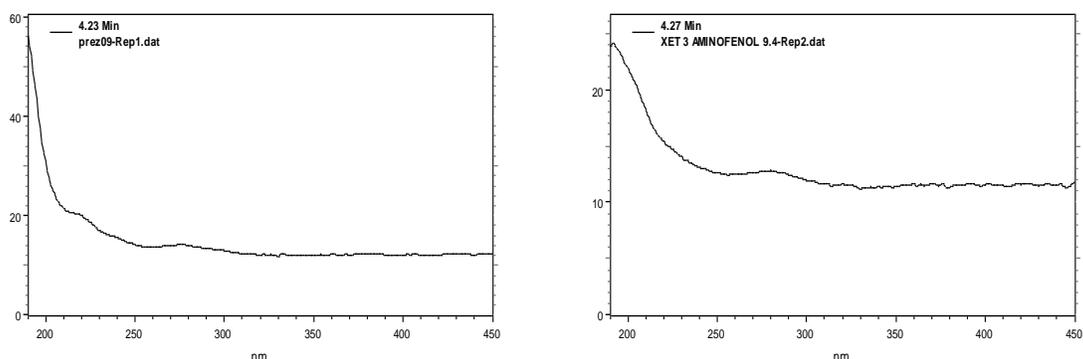


Figura 8.6 Espectro de absorción de A) 2-(4-hidroxifenil) etanol y B) Extracto etanólico

Rutina

Como podemos ver en la figura 8.7 comparando la traza de arriba (extracto etanólico) con la traza de abajo (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 8.6 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de rutina en el extracto etanólico de gobernadora.

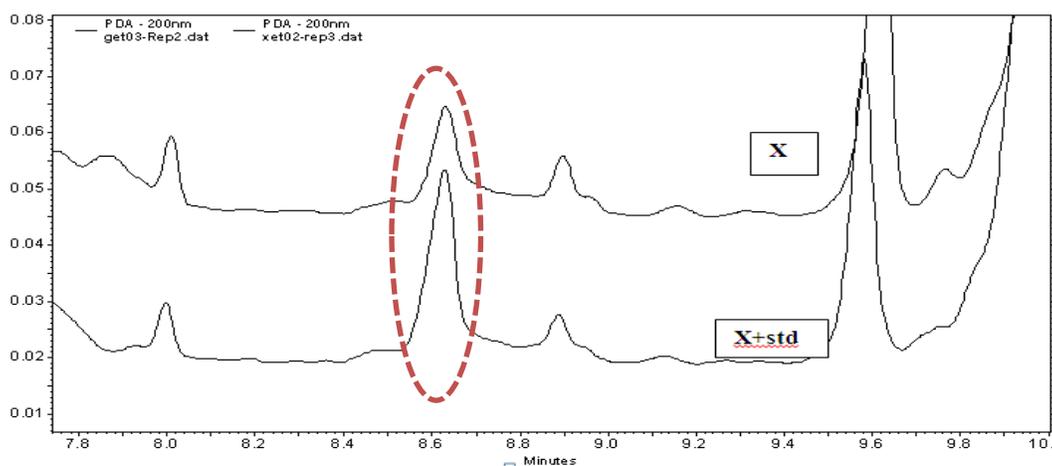


Figura 8.7 Identificación de rutina en extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 8.6 que muestra la similitud entre ambos espectros de absorción confirmando que corresponde a rutina. Ver figura 8.8.

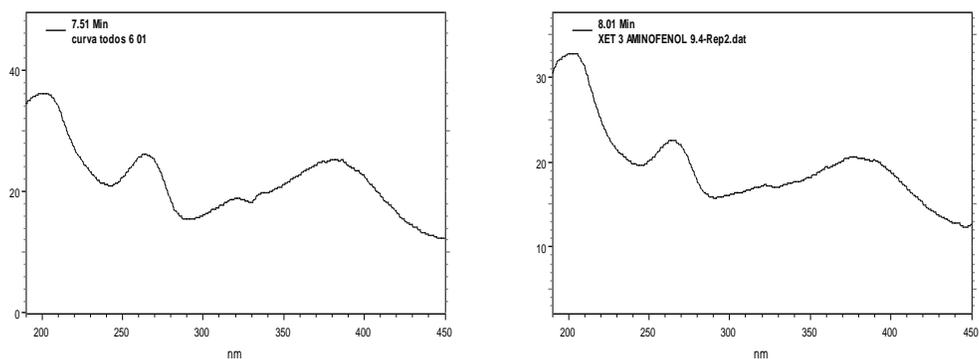


Figura 8.8 Espectro de absorción de A) Rutina y B) Extracto etanólico

Catequina

Como podemos ver en la figura 8.9 comparando la traza de arriba (extracto etanólico) con la traza de abajo (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 7.8 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de catequina en el extracto etanólico de gobernadora.

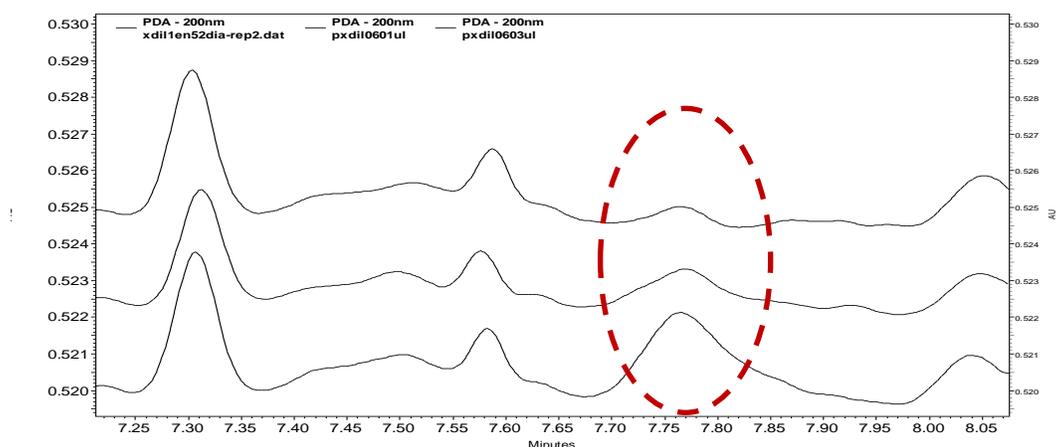


Figura 8.9 Identificación de catequina en extracto etanólico

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 7.8 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de catequina. Ver figura 8.10.

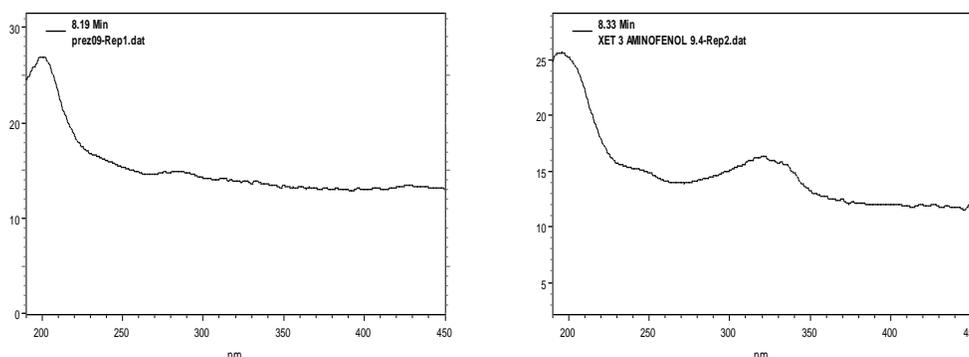


Figura 8.10 Espectro de absorción de A) Catequina y B) Extracto etanólico

Ácido clorogénico

Como podemos ver en la figura 8.11 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 9.4 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido clorogénico en el extracto etanólico de gobernadora.

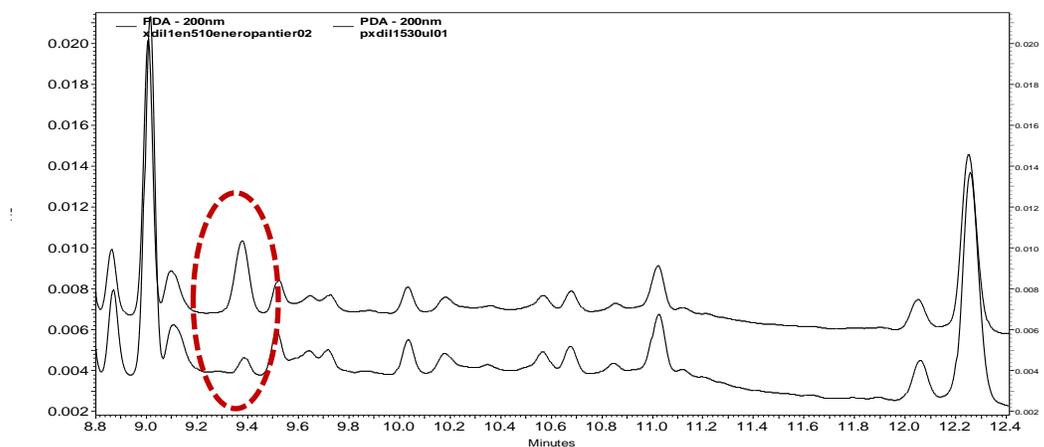


Figura 8.11 Identificación de ácido clorogénico en el extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y el extracto de gobernadora en el min 9.4 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de ácido clorogénico. Ver figura 8.12.

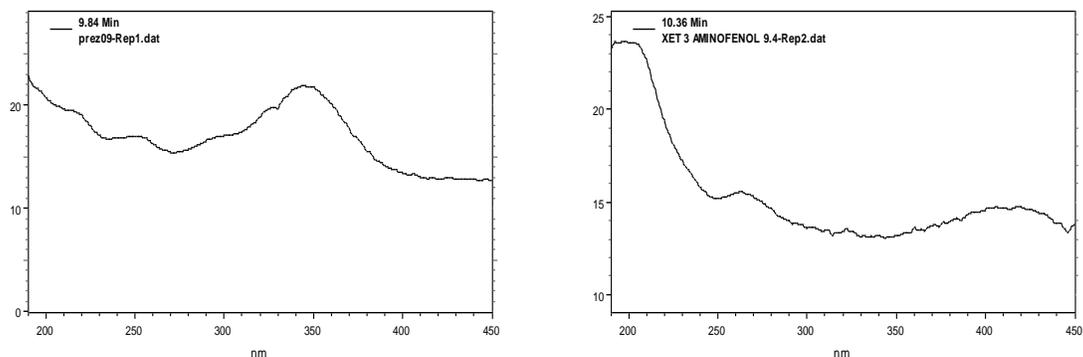


Figura 8.12 Espectro de absorción de A) Ácido clorogénico y B) Extracto etanólico

Ácido 2,5-dihidroxibenzoico

Como podemos ver en la figura 8.13 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 10.6 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en el extracto etanólico de gobernadora.

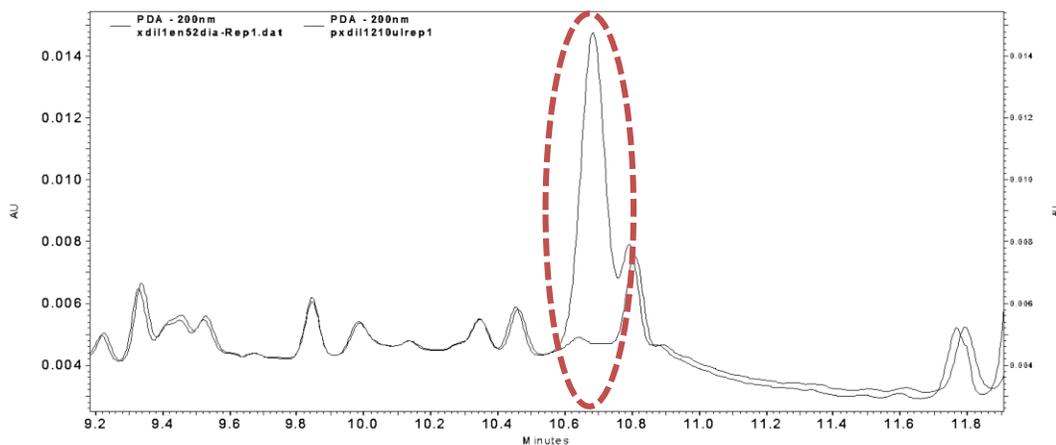


Figura 8.13 . Identificación de ácido 2,5-dihidroxibenzoico en el extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 10.6 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de ácido 2,5-dihydroxibenzoico. Ver figura 8.14.

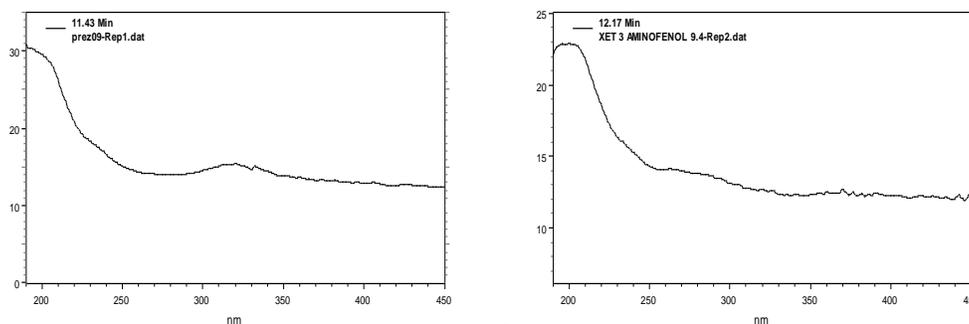


Figura 8.14 Espectro de absorción de A) Ácido 2,5-dihydroxibenzoico y B) Extracto etanólico

Apigenina

Como podemos ver en la figura 8.15 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 12.6 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de apigenina en el extracto etanólico de gobernadora.

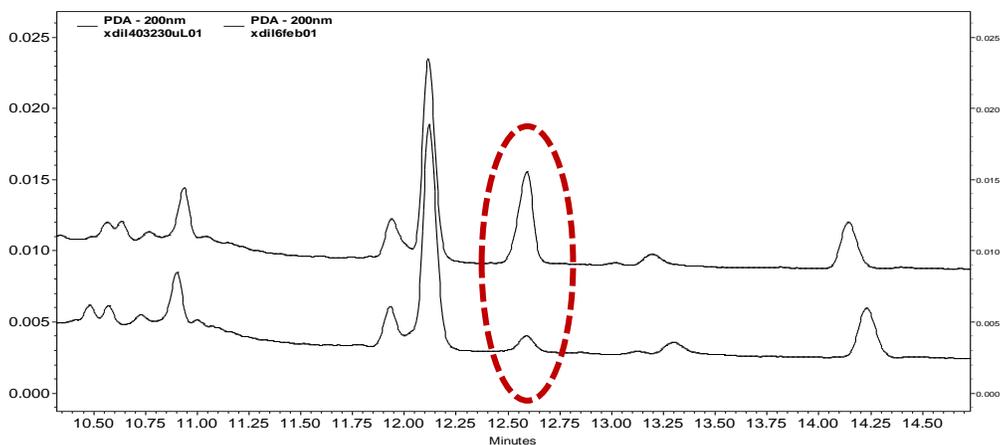


Figura 8.15 Identificación de apigenina en el extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 12.6 que demuestra la similitud entre ambos espectros de absorción confirmando que corresponde a apigenina. Ver figura 8.16.

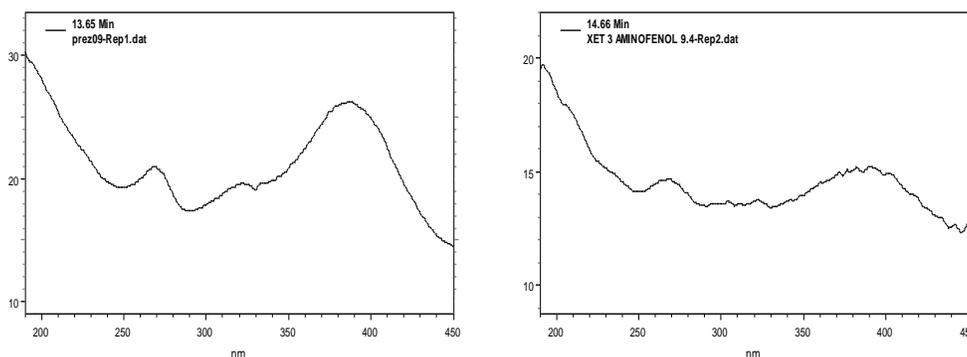


Figura 8.16 Espectro de absorción de A) Apigenina y B) Extracto etanólico

Ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico (Ferúlico)

Como podemos ver en la figura 8.17 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 15.8 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido ferúlico en el extracto etanólico de gobernadora.

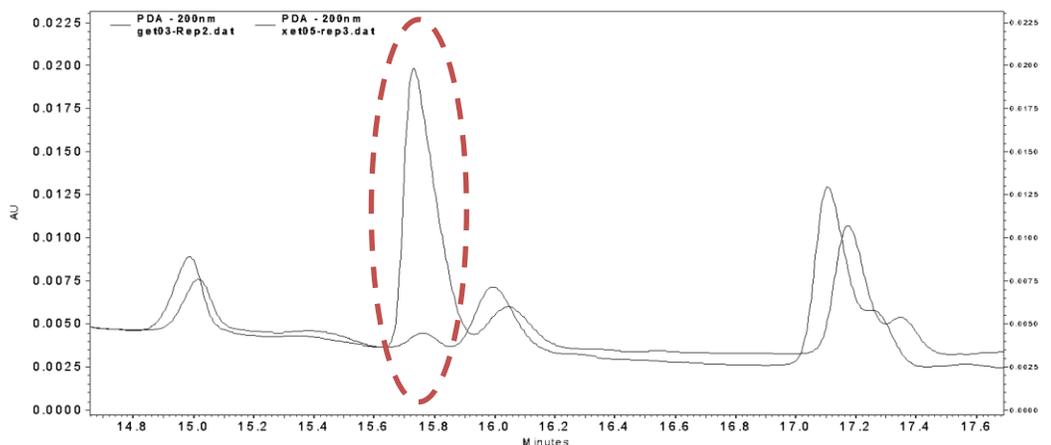


Figura 8.17 Identificación de ácido ferúlico en el extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 15.8 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de ácido ferúlico. Ver figura 8.18.

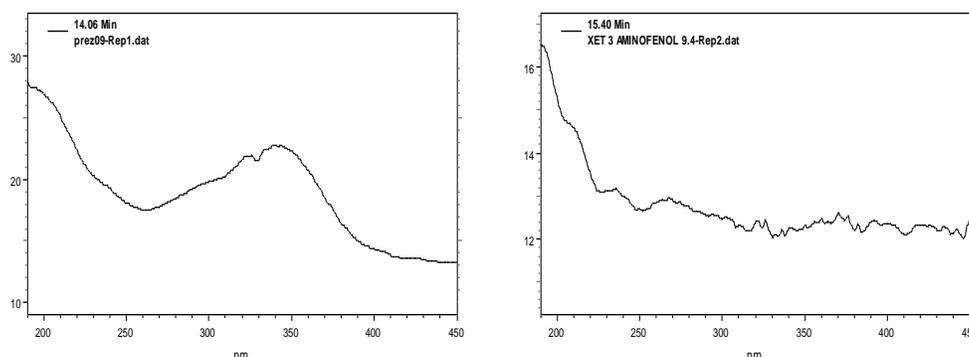


Figura 8.18 Espectro de absorción de A) ácido ferúlico y B) Extracto etanólico Kaempferol

Como podemos ver en la figura 8.19 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 13.3 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de kaempferol en el extracto etanólico de gobernadora.

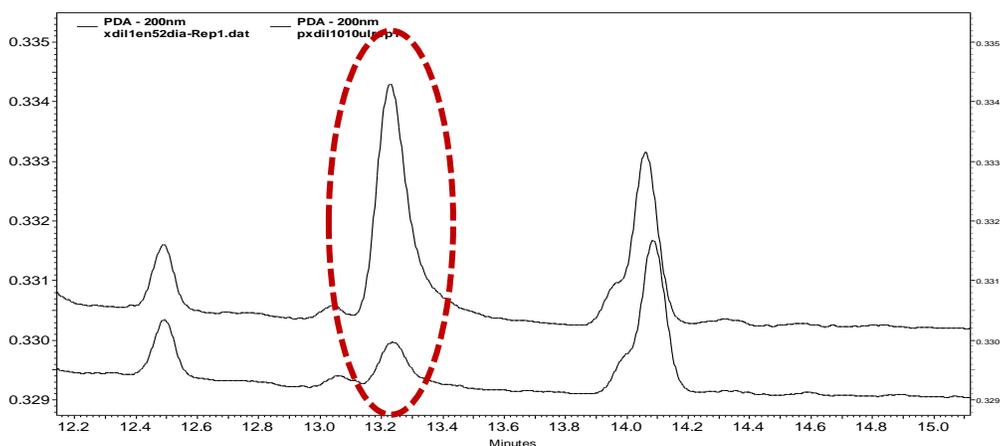


Figura 8.19 Identificación de kaempferol en el extracto etanólico

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 13.3 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de kaempferol. Ver figura 8.20.

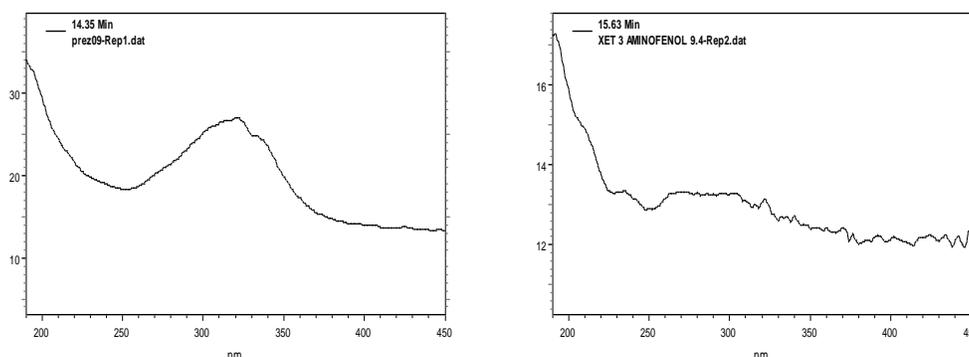


Figura 8.20 Espectro de absorción de A) Kaempferol y B) Extracto etanólico

Ácido p-hidroxibenzoico

Como podemos ver en la figura 8.21 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 24 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido p-hidroxibenzoico en el extracto etanólico de gobernadora.

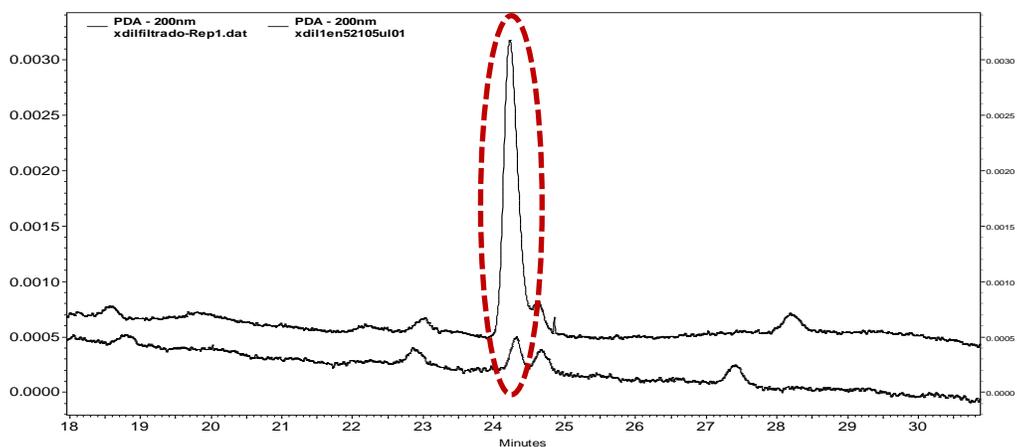


Figura 8.21 Identificación de ácido p-hidroxibenzoico en el extracto etanólico.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 24 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de ácido p-hidroxibenzoico. Ver figura 8.22.

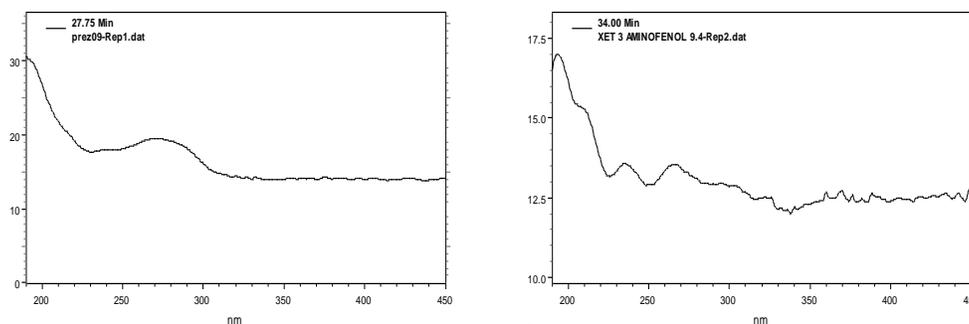


Figura 8.22 Espectro de absorción de A) Ácido p-hidroxibenzoico y B) Extracto etanólico.

Ácido 3,4-dihidroxibenzoico

Como podemos ver en la figura 8.23 comparando la traza de abajo (extracto etanólico) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 27 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido 3,4-dihidroxibenzoico en el extracto etanólico de gobernadora.

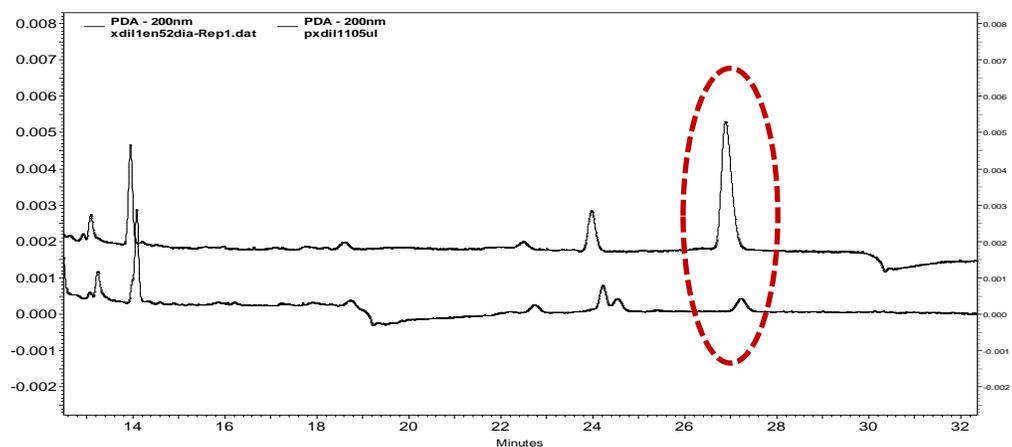


Figura 8.23 Identificación de ácido 3,4-dihidroxibenzoico en extracto etanólico

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 27 que debido a su baja concentración en extracto muestra una baja similitud entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia de ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Ver figura 8.24.

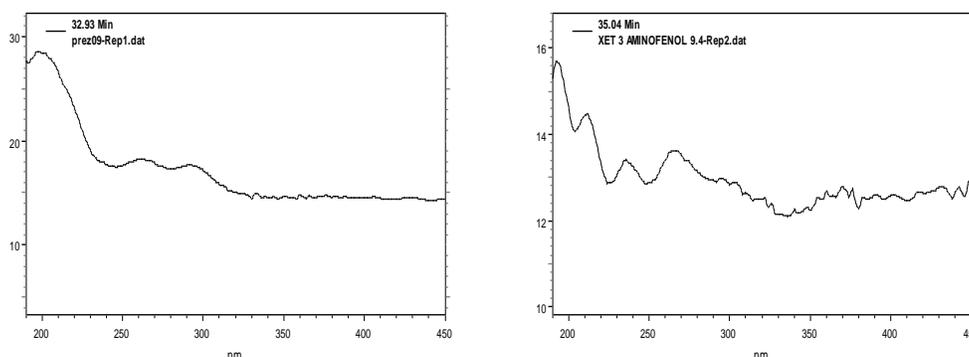


Figura 8.24 Espectro de absorción de A) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico y B) Extracto etanólico

Identificación en extracto hidrolizado

Ácido p-cumárico

Como podemos ver en la figura 8.25 comparando la traza de abajo (extracto hidrolizado) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 17 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido p-cumárico en el extracto hidrolizado de gobernadora.

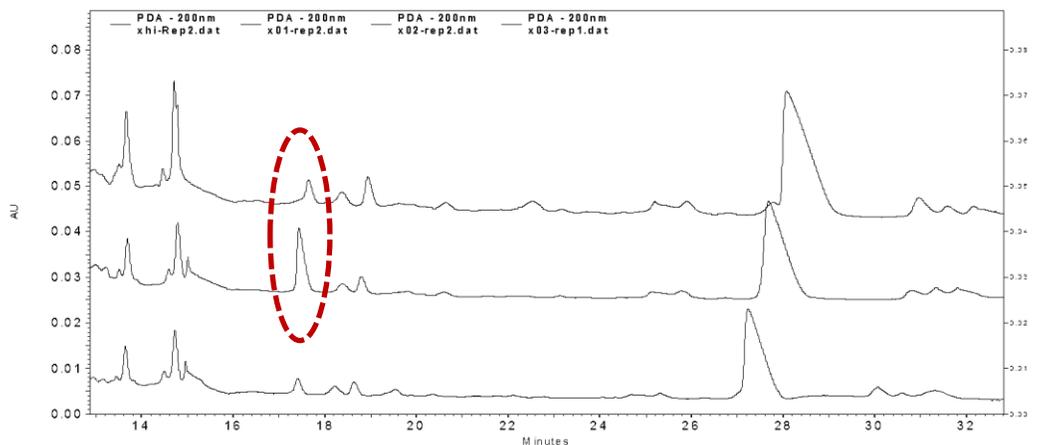


Figura 8.25 Identificación de ácido p-cumárico en extracto hidrolizado.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 17 que muestra una baja similitud (ya que los espectros mostrados están a diferentes pH's) entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia al ácido p-cumárico. Ver figura 8.26. Para hacer la comparación correcta de espectros de absorción deberían ser medidos a las mismas condiciones.

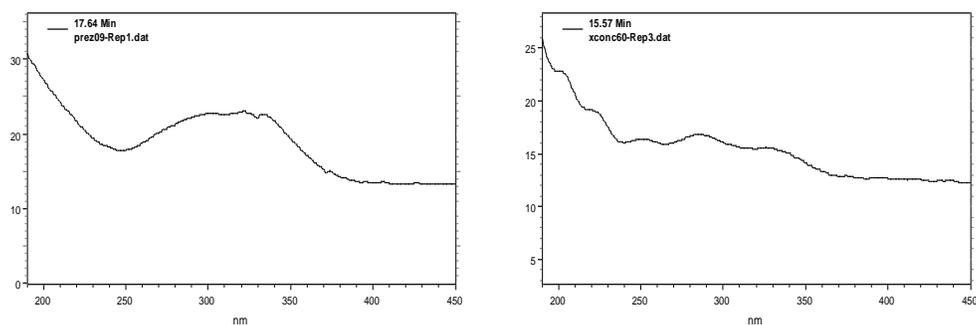


Figura 8.26 Espectro de absorción de A) Ácido p-cumárico y B) Extracto hidrolizado.

Ácido vanílico

Como podemos ver en la figura 8.27 comparando la traza de abajo (extracto hidrolizado) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 21 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido vanílico en el extracto hidrolizado de gobernadora.

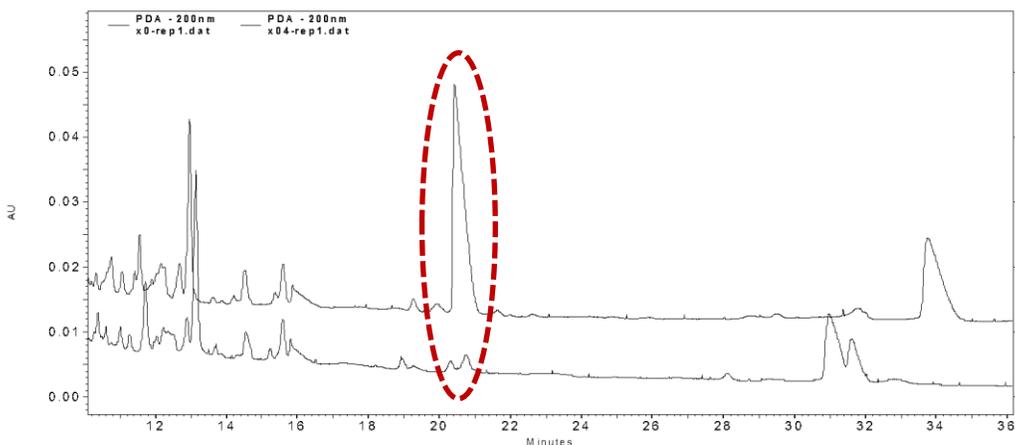


Figura 8.27 Identificación de ácido vanílico en extracto hidrolizado.

Para confirmar que el pico incrementado corresponde al estándar, se presenta la comparación de los espectros de absorción del estándar y extracto de gobernadora en el min 21, que muestra una baja similitud (ya que los espectros mostrados están a diferentes pH's) entre ambos espectros de absorción por lo que en este caso es difícil usar los espectros de absorción para confirmar la presencia al ácido vanílico. Ver figura 8.28. Para hacer la comparación correcta de espectros de absorción deberían ser medidos a las mismas condiciones.

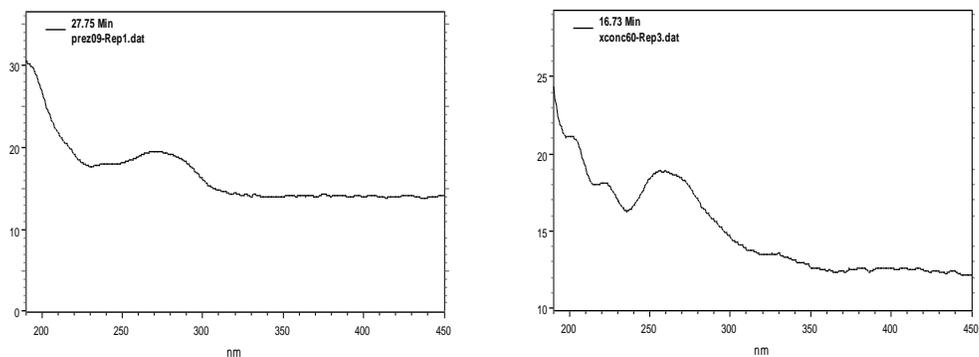


Figura 8.28 Espectro de absorción de A) ácido vanílico y B) Extracto hidrolizado.

Ácido p-hidroxibenzoico

Como podemos ver en la figura 8.29 comparando la traza de abajo (extracto hidrolizado) con la traza de arriba (extracto fortificado con estándar) a un tiempo de migración de aproximadamente 31 min, existe un aumento del pico debido a la adición del estándar, con lo cual comprobamos la presencia de ácido p-hidroxibenzoico en el extracto hidrolizado de gobernadora, aunque no fue posible obtener un espectro de absorción del pico del extracto para confirmarlo.

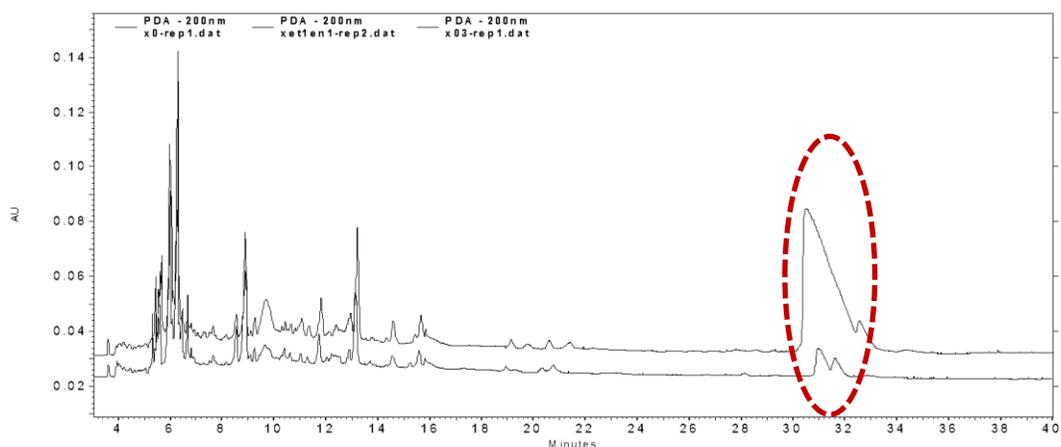


Figura 8.29 Identificación de ácido p-hidroxibenzoico en extracto hidrolizado.

ANEXO 3 Resolución de NDGA.

Al realizar la medición del extracto de gobernadora para intentar resolver NDGA utilizando una concentración de buffer de separación desde 30 mM hasta 70 mM se observa ganancia en resolución conforme disminuye la concentración de buffer hasta 30 mM, donde NDGA parece estar más separado de su interferencia que a una concentración más alta, pero sin lograrse una separación completa, además de un evidente aumento en el tiempo de corrida debido al aumento en la concentración del buffer de separación. Ver figura 8.30.

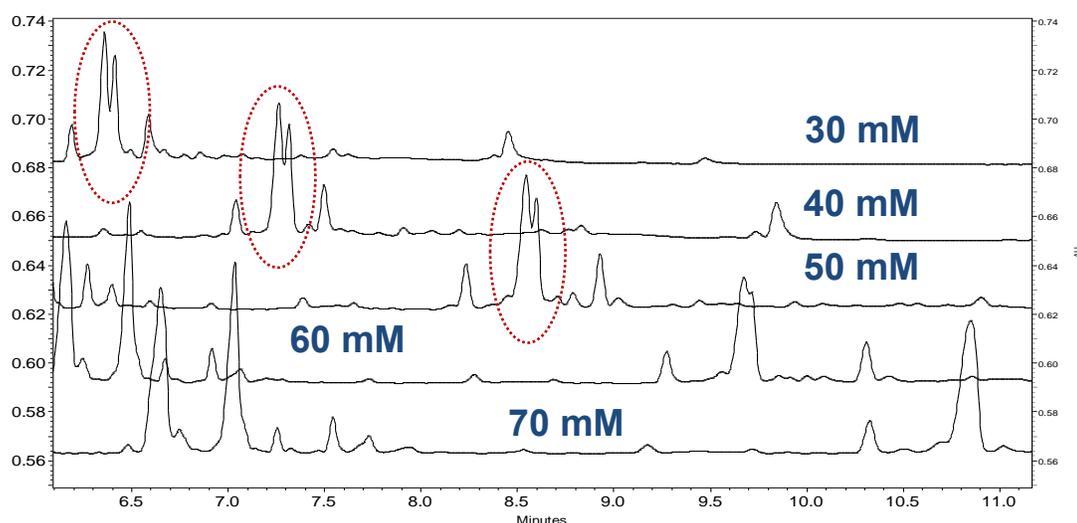


Figura 8.30 Perfiles de separación a diferentes [buffer] (30-70 mM de arriba hacia abajo) medidos a 28 kV

Se midió el mismo extracto a las diferentes concentraciones de buffer disminuyendo el voltaje aplicado a 20 kV, esperando que la migración de los compuestos fuera más lenta y se resolvieran mejor dichos compuestos. A pesar de que disminuyendo el voltaje aplicado a 20 kV el pico del NDGA parece estar más separado de su interferencia obteniéndose ganancia en resolución, igual no se separa en línea base. Ver figura 8.31.

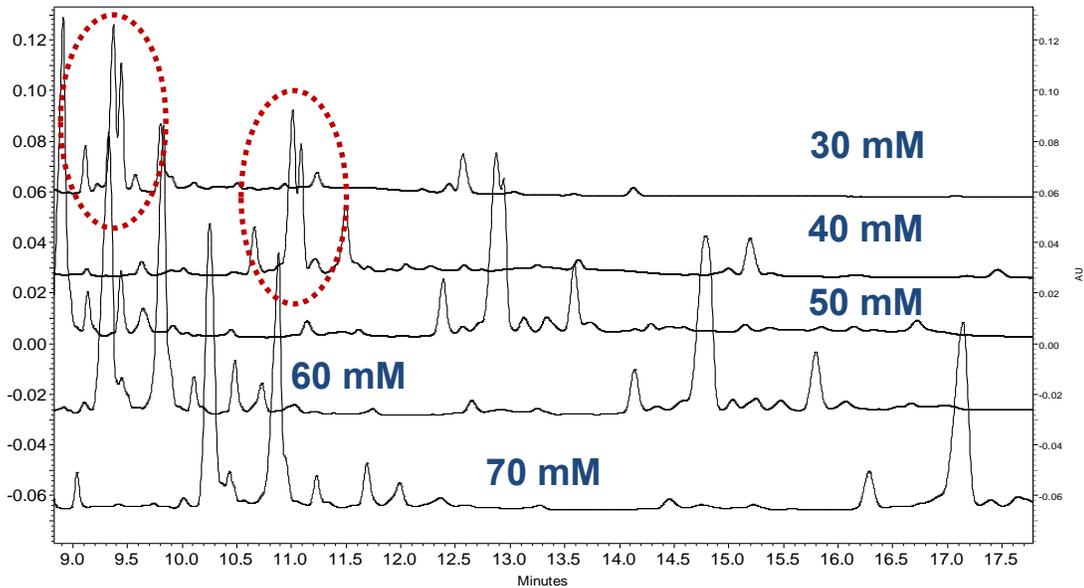


Figura 8.31 Perfiles de separación a diferentes [buffer] (30-70mM de arriba hacia abajo) medidos a 20 kV.

Al realizar la separación del extracto a diferentes valores de pH de buffer (Fig. 8.32) como se muestra en los perfiles obtenidos (a los pH's 9.4, 9.2, 9.0, y 8.5), hubo ganancia en resolución a pH's menores de 9.4 y mayores a 8.5. Ver figura 8.32-A, donde se observa que a pH de 9.2 la movilidad de los compuestos cercanos a NDGA y su derivado metilado es diferente, migrando dos picos cercanos a NDGA mientras que a pH de 9.0 sigue el mismo perfil pero mejor resueltos. En cuanto al E.I, se observa que a los pH's 9.0 y 9.2 no presentan traslapes como en el extracto medido a pH de 8.5, por lo que se seleccionó los pH's 9.0 y 9.2. Ver figura 8.32-B

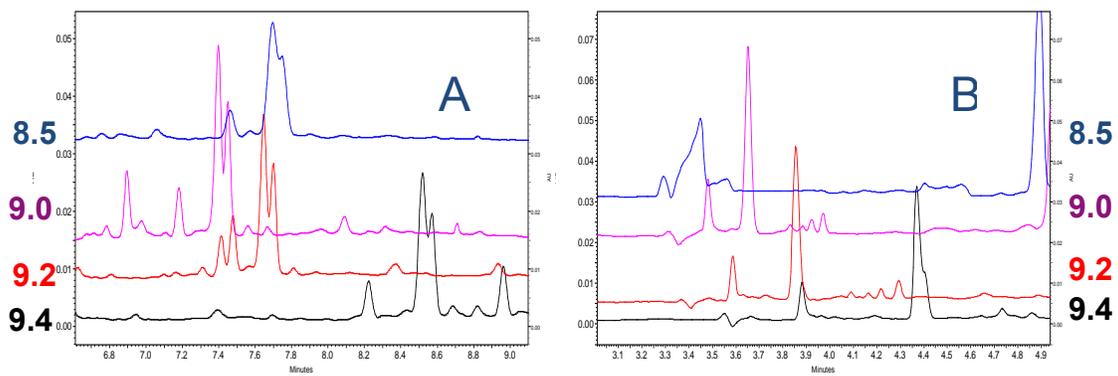


Figura 8.32 A) NDGA y su derivado B) E.I. 3-aminofenol, a diferentes pH's.

Al realizar la separación a las condiciones seleccionadas anteriormente: se observó que utilizando un buffer boratos 30 mM, pH 9.2 y 20 kV (A) y 30 mM pH 9.2 y 28 kV (B), para ambos casos no hay ganancia en resolución de NDGA, y existe un traslape con picos cercanos, por lo que se pierde selectividad. Ver figura 8.33.

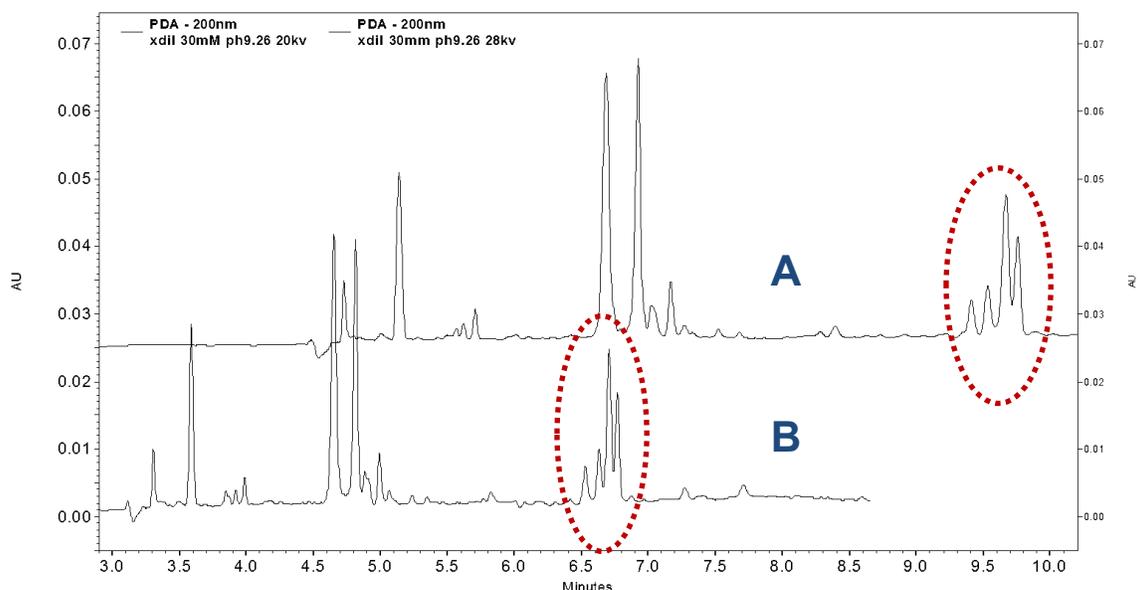


Figura 8.33 Perfiles de la separación de NDGA con buffer 30 mM, pH 9.2 a 20 y 28 kV

Al realizar la separación utilizando un buffer 30 mM pH 9.0 y 20 kV (C) se logró una mayor resolución de NDGA y su derivado, mientras que para 30 mM pH 9.0 y 28 kV (D) se observa el mismo perfil solo que los tiempos de migración son menores juntándose más todas las demás señales y no hay problemas de traslape con el E.I. (3-aminofenol) para ambos casos. Ver figura 8.34

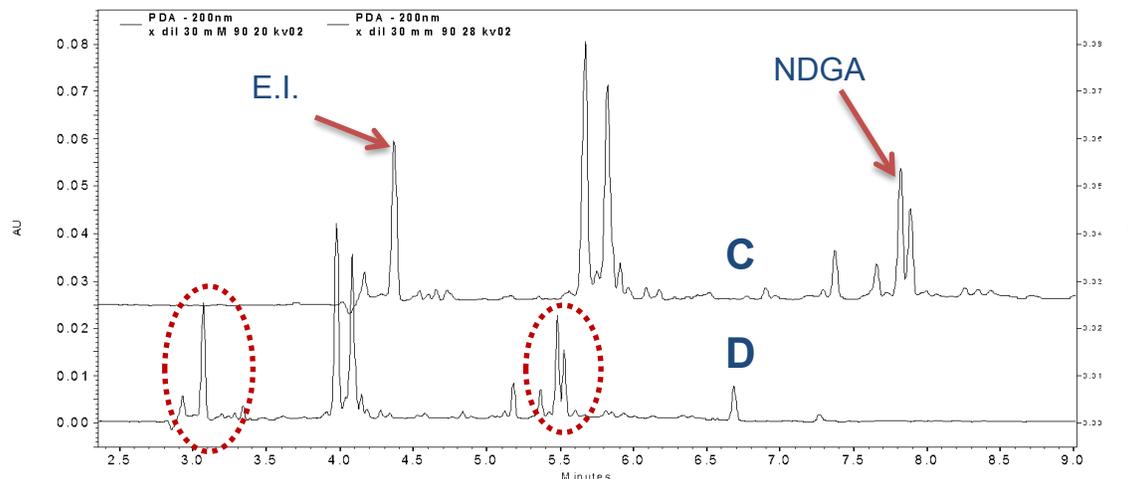


Figura 8.34 Perfiles de la separación de NDGA con buffer 30 mM pH 9.0 a 20 y 28 kV

Adicionalmente para la separación de NDGA se realizó la dilución de extracto etanólico de gobernadora tomando las alícuotas del extracto y llevando al aforo como se indica en la tabla 8.1.

Tabla 8.1 Dilución del extracto etanólico de Gobernadora.

Dilución	Vol. de extracto (ml)	Vol. aforo con EtOH 70% (ml)
A	Sin dilución	Sin dilución
B	1	2
C	1	5
D	1	10
E	1	20
F	1	25

En la figura 8.35 se muestra la comparación de los perfiles del extracto etanólico a los diferentes volúmenes, donde se observa el efecto de la dilución y una ligera ganancia en la resolución de los dos picos que se encuentran traslapados entre los minutos 8.5 y 9.

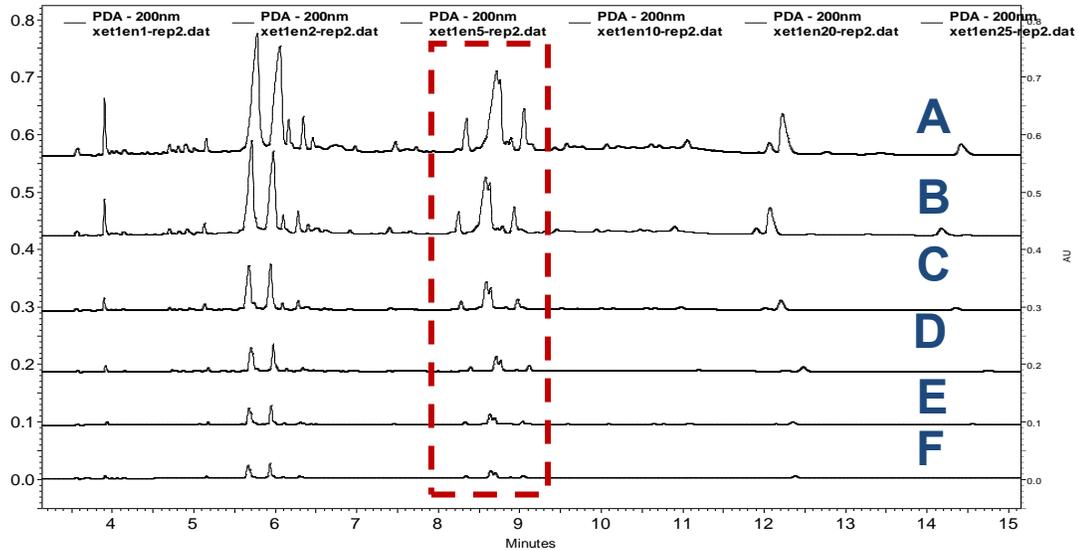


Figura 8.35 Dilución de extracto de gobernadora.

En la figura 8.36 se muestra un acercamiento de la dilución del extracto, donde se observa que las señales traslapadas con tiempo de migración entre los minutos 8.5 y 9.0 son dos compuestos traslapados los cuales posteriormente se identificó uno de ellos como ácido nordihidroguayarático (NDGA) ver ANEXO 2 de identificación de polifenoles.

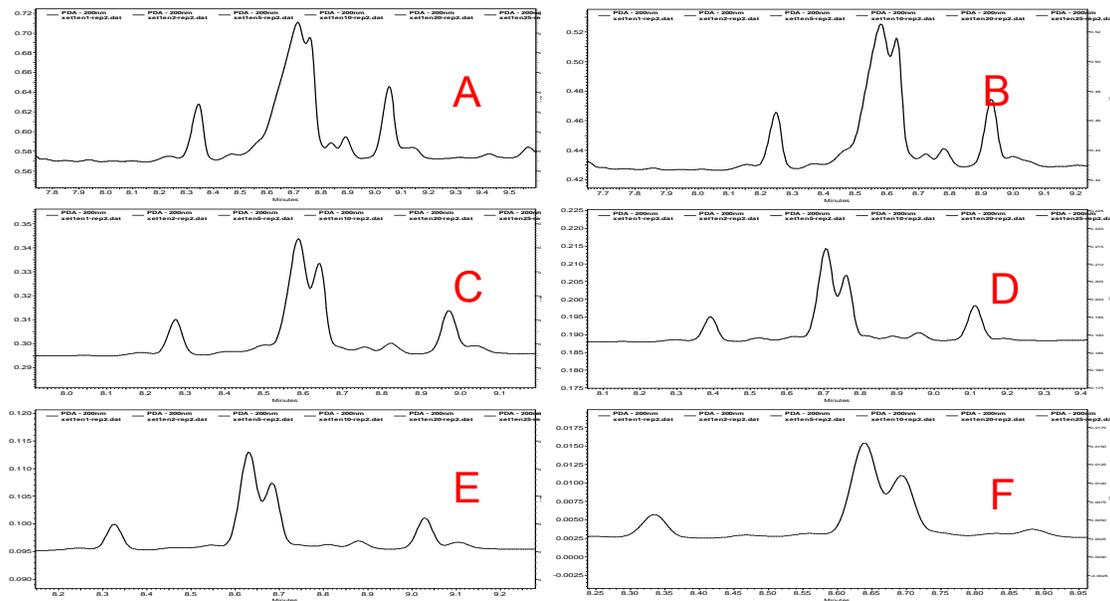


Figura 8.36 Acercamiento de NDGA.

ANEXO 4 Curvas de calibración.

Grupos de estándares.

Para no rebasar el volumen de aforo al realizar las curvas de calibración, se decidió realizar grupos de estándares para preparar las soluciones stock. Ver tabla 8.2.

Tabla 8.2 Concentración experimental de las soluciones stock.

Gpo	Estándar	[Fenol] (mg/L)	Aforo (mL)	Pureza (%)	Peso (g)	[Fenol] (mg/L)
A	Ácido 2,4-hidroxifeniletanol	500	50	100	0.0252	504
	Rutina	2500	50	94	0.1337	2513.56
	Ácido clorogénico	460	50	95	0.0242	459.80
	Apigenina	290	50	97	0.0152	294.88
	Ácido p-cumárico	360	50	98	0.0184	360.64
B	Catequina	190	200	98	0.0389	190.61
	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	75	200	98	0.0159	77.91
	Ácido ferúlico	50	200	99	0.0109	53.95
	Kaempferol	67	200	97	0.0137	66.44
	Ácido p-hidroxibenzoico	180	200	100	0.0359	179.50
	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	75	200	97	0.0155	75.17
C	Ácido vanílico	180	200	97	0.0379	183.81
	E.I. 1 (3-aminofenol)	3750	50	98	0.1915	3753.40
D	E.I. 2 (quercetina)	3750	50	98	0.1914	3751.44
E	NDGA	760	100	90	0.0846	761.40

Una vez preparadas las soluciones stock se tomó con pipetas volumétricas los diferentes volúmenes para preparar los sistemas de calibración, llevando al aforo indicado con etanol-agua (70:30) y se realizó la medición por CE a sus respectivas condiciones de análisis. Ver tablas 8.3 y 8.4.

Tabla 8.3 Curva de calibración (condiciones NDGA).

Volumen (mL)				
Sol	Grupo E	Grupo C	Agregado (mL)	aforo (mL)
1	1	1	2	25
2	2	1	3	25
3	3	1	4	25
4	4	1	5	25
5	5	1	6	25
6	6	1	7	25

Tabla 8.4 Curva de calibración (condiciones normales).

Volumen (mL)						
Sol	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Adicionado	Aforo
1	1	1	1	1	4	25
2	2	2	1	1	6	25
3	3	3	1	1	8	25
4	4	4	1	1	10	25
5	5	5	1	1	12	25
6	6	6	1	1	14	25
7	0	7	1	1	9	25

Concentración experimental en cada sistema de calibración.

En las tablas 8.5 y 8.6 se muestran las concentraciones de los compuestos a cuantificar en cada solución de los sistemas de calibración.

Tabla 8.5 Concentración experimental en soluciones del sistema de calibración (condiciones NDGA).

Compuesto	Concentración en cada sol (mg/L)					
	1	2	3	4	5	6
NDGA	30.46	60.91	91.37	121.82	152.28	182.74
E.I. (3-aminofenol)	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14

Tabla 8.6 Concentración experimental en soluciones del sistema de calibración a condiciones normales.

Compuesto	Concentración (mg/L)					
	1	2	3	4	5	6
Ácido 2,4-hidroxifeniletanol	20.16	40.32	60.48	80.64	100.80	120.96
Rutina	100.54	201.08	301.63	402.17	502.71	603.25
Ácido clorogénico	18.39	36.78	55.18	73.57	91.96	110.35
Apigenina	53.94	53.94	53.94	53.94	53.94	53.94
Ácido p-cumárico	1057.72	528.86	352.57	264.43	211.54	176.29
E.I. (3-aminofenol)	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14

Tabla 8.7 Concentración experimental en soluciones del sistema de calibración (condiciones normales).

Compuesto	Concentración (mg/L)						
	1	2	3	4	5	6	7
Catequina	7.62	15.25	22.87	30.50	38.12	45.75	53.37
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	3.12	6.23	9.35	12.47	15.58	18.70	21.81
Ácido ferúlico	2.16	4.32	6.47	8.63	10.79	12.95	15.11
Kaempferol	2.66	5.32	7.97	10.63	13.29	15.95	18.60
Ácido p-hidroxibenzoico	7.18	14.36	21.54	28.72	35.90	43.08	50.26
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3.01	6.01	9.02	12.03	15.04	18.04	21.05
Ácido vanílico	7.35	14.71	22.06	29.41	36.76	44.12	51.47
E.I. (3-aminofenol)	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14	150.14
E.I. (quercetina)	150.06	150.06	150.06	150.06	150.06	150.06	150.06

En la tabla 8.8 se muestra el método de integración con el que se realizó la obtención de los datos.

Tabla 8.8 Método de integración para los electroferogramas

Parámetro	Tiempo inicio (min)	Tiempo final (min)	Valor
Width	4.8	40	0.2
Threshold	4.8	40	350
Valley to Valley	0	40	0
Shoulder Sensitivity	0	0	10000
Minimum Area	0	40	1500
Width	0	4.79	0.02
Threshold	0	4.79	500
Integration Off	0.08	4.2	0
Integration Off	4.7	7.85	0
Integration Off	8.53	10.2	0
Integration Off	12.8	14.3	0
Integration Off	16.49	32	0
Integration Off	11	11.9	0

ANEXO 5 Gráficos de ajuste al modelo lineal y gráficos de residuales para cada sistema de calibración.

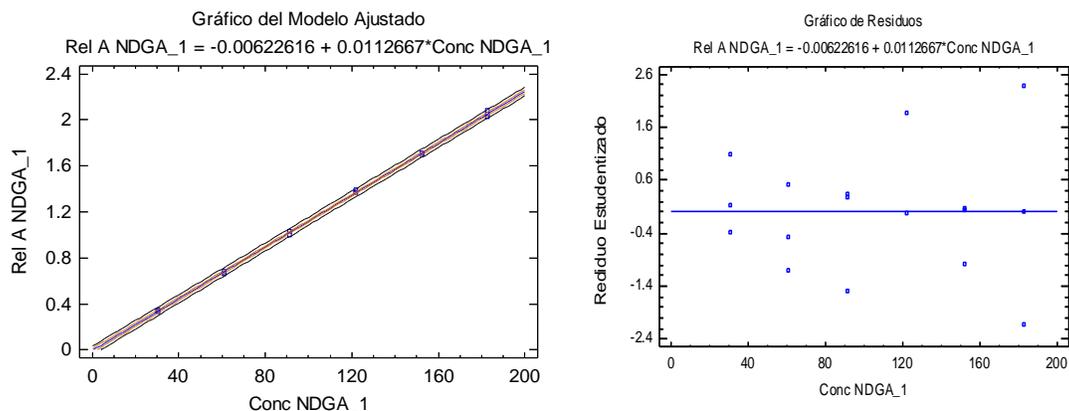


Figura 8.37 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de NDGA.

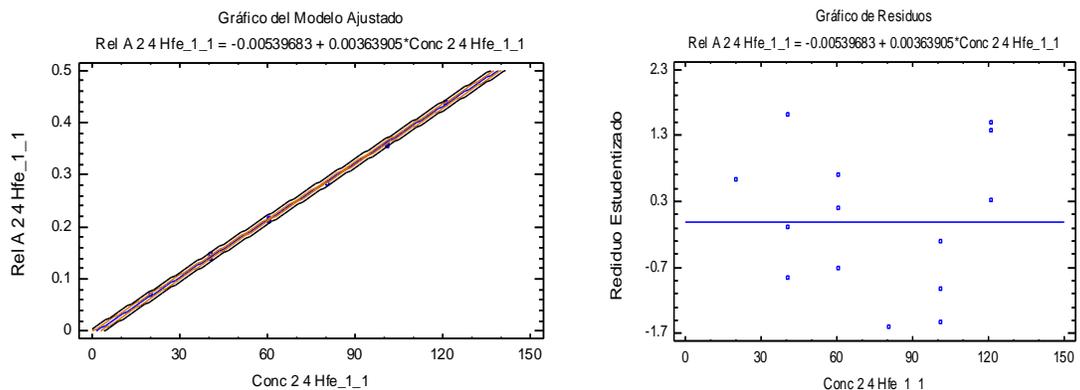


Figura 8.38 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido 2,4 hidroxifeniletanol.

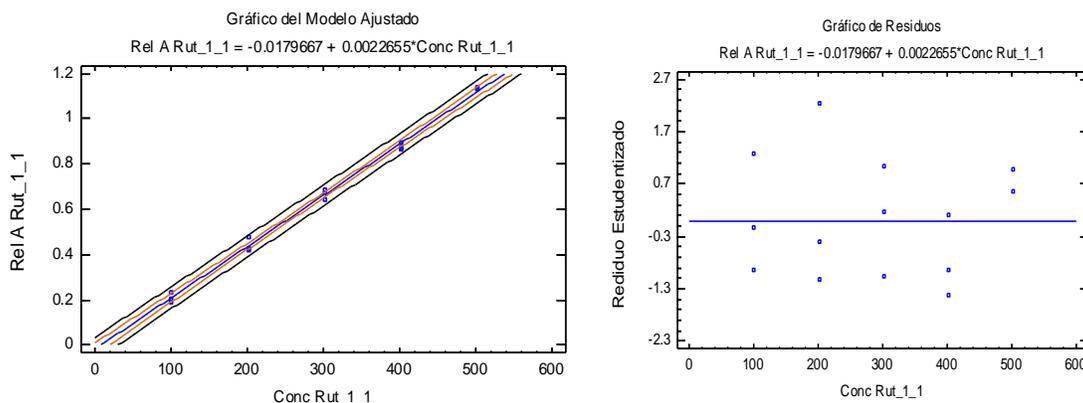


Figura 8.39 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de rutina.

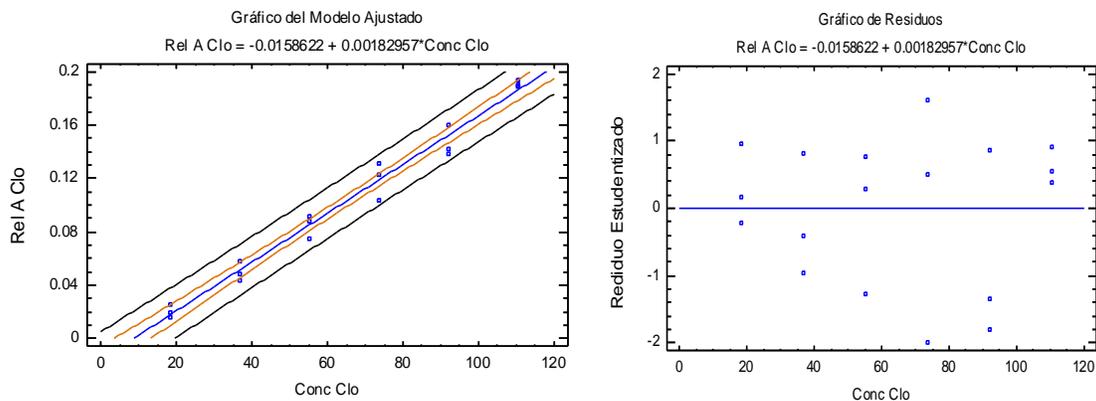


Figura 8.40 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido clorogénico.

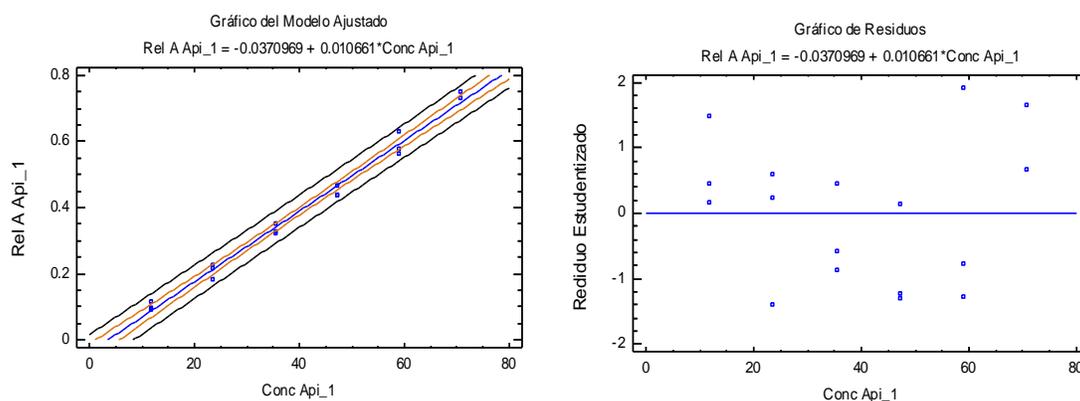


Figura 8.41 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de apigenina.

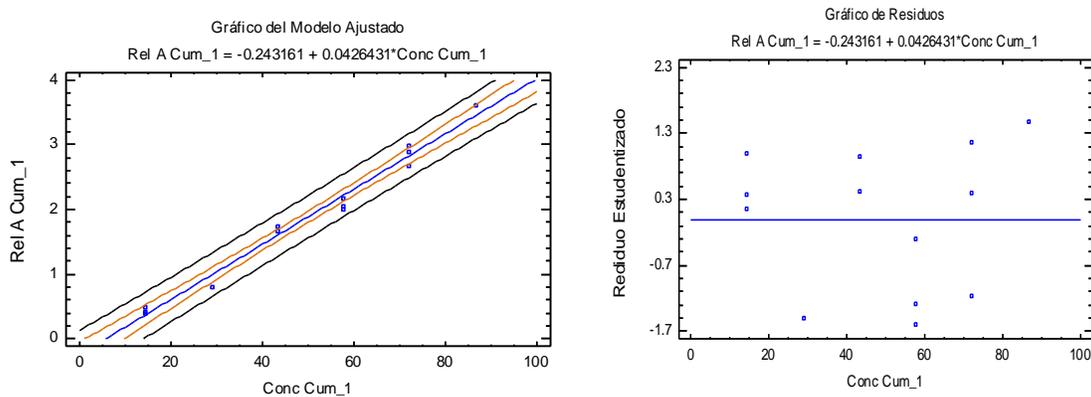


Figura 8.42 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido p-cumárico.

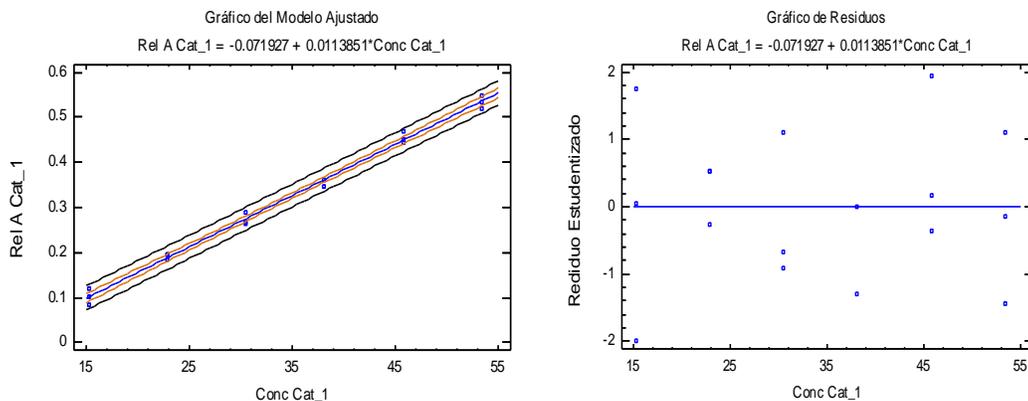


Figura 8.43 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de catequina.

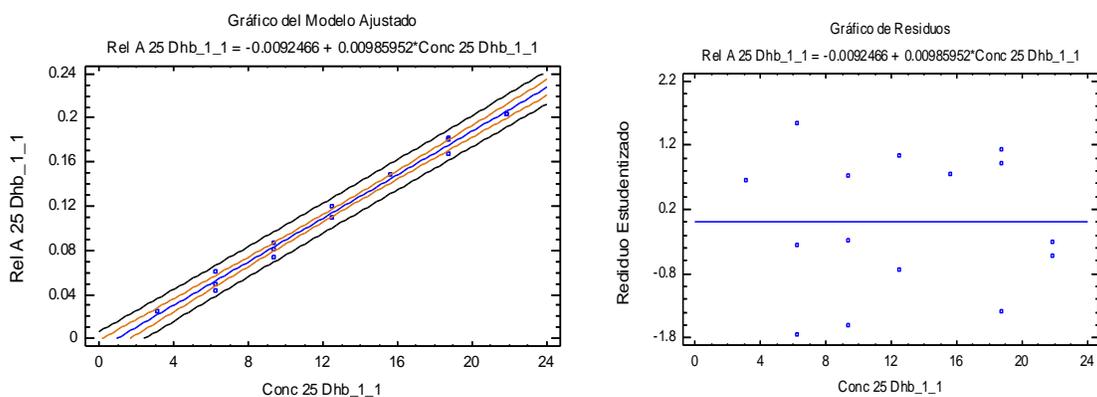


Figura 8.44 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

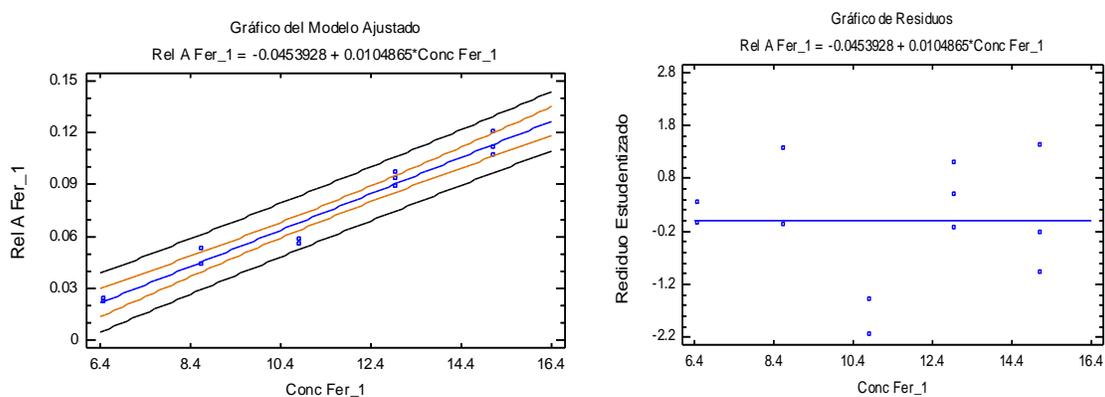


Figura 8.45 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido ferúlico.

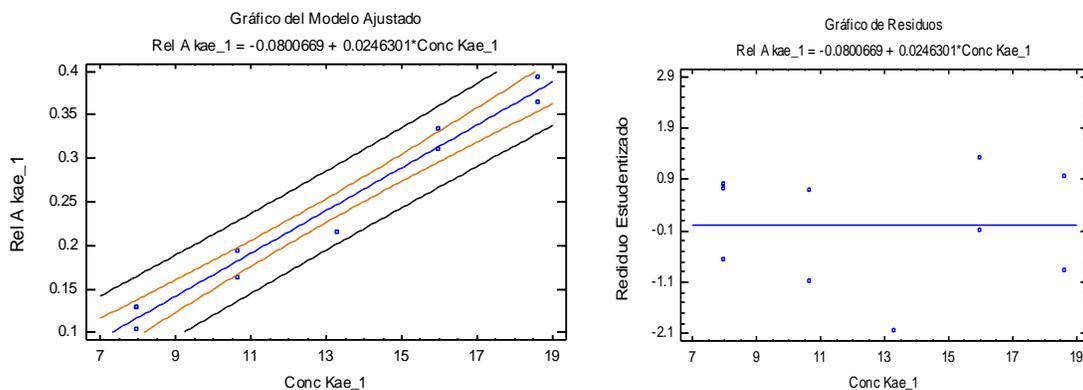


Figura 8.46 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de kaempferol.

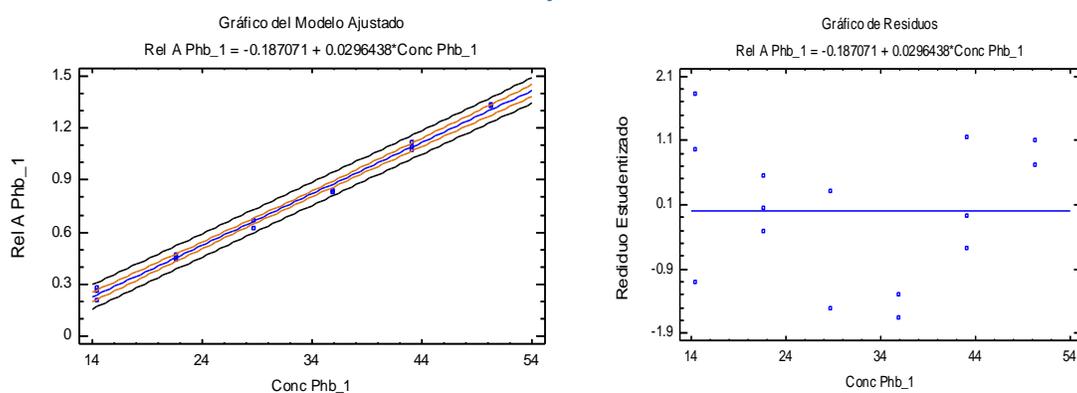


Figura 8.47 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido p-hidroxibenzoico.

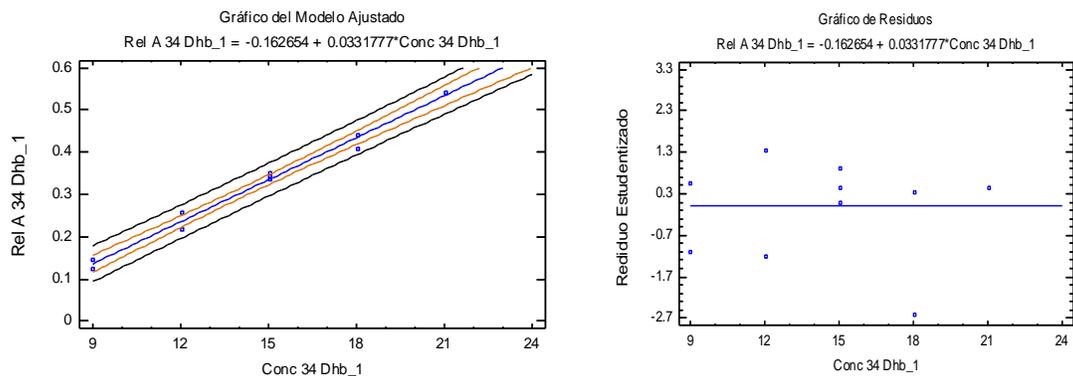


Figura 8.48 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

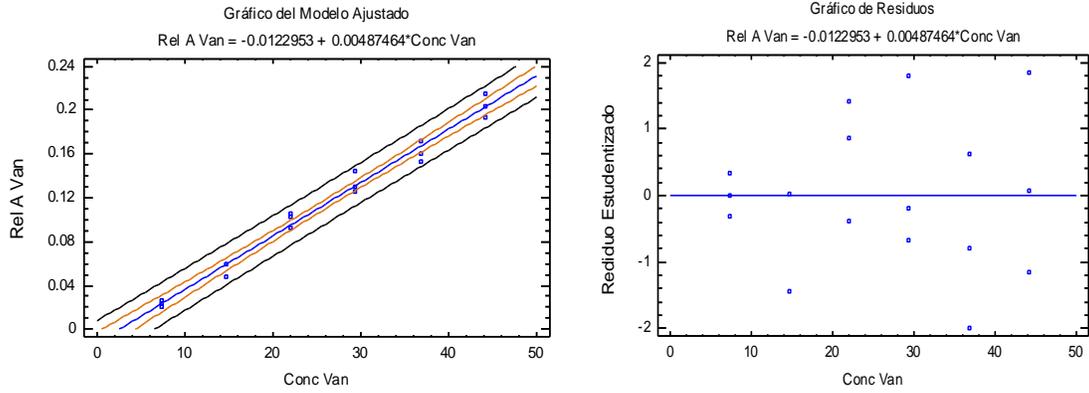


Figura 8.49 Gráficos de (A) ajuste al modelo lineal y (B) residuales para la curva de ácido vanílico.

ANEXO 6 Tratamiento al recubrimiento

Se realizó la elaboración del recubrimiento a base de Alginato de Sodio y extracto etanólico de gobernadora como se indica en el apartado 4.6, y se midió por CE.

Recubrimiento fresco de Gobernadora.

Al comparar los electroferogramas de la figura 8.50 del recubrimiento fresco adicionado con E.I. (Traza de arriba) y un blanco con todos los excipientes (traza de abajo) medido a las condiciones normales, se observa que hay dos señales en el perfil del recubrimiento que corresponden a los excipientes; la primera señal del blanco aparece en el recubrimiento en el minuto 4 con forma de un pico ancho y muy cercano al E.I., y la segunda aproximadamente en el min 6, además se observa que todas las señales de los compuestos en el recubrimiento fresco son de menor intensidad que la del E.I debido a la gran dilución del extracto al elaborar el recubrimiento.

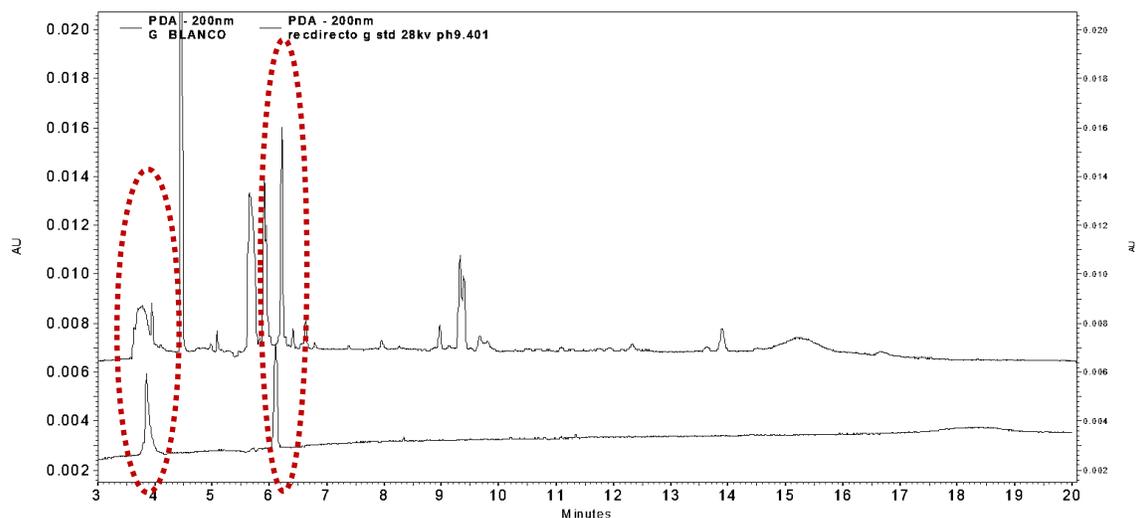


Figura 8.50 Electroferograma de recubrimiento fresco y blanco. (Buffer boratos 50 mM pH 9.4 y 28 kV)

En la figura 8.51 al comparar el electroferograma del recubrimiento fresco adicionado con E.I (traza de arriba) y sin adicionar (traza de abajo) a las condiciones para determinar NDGA se observa que la señal atribuida por los excipientes del recubrimiento a estas condiciones migra aproximadamente en el minuto 4.5 justo debajo del E.I ocasionando problemas de integración. De igual

forma las señales de NDGA y el derivado metilado del NDGA son de menor intensidad que la del E.I por lo que se decidió concentrar el recubrimiento.

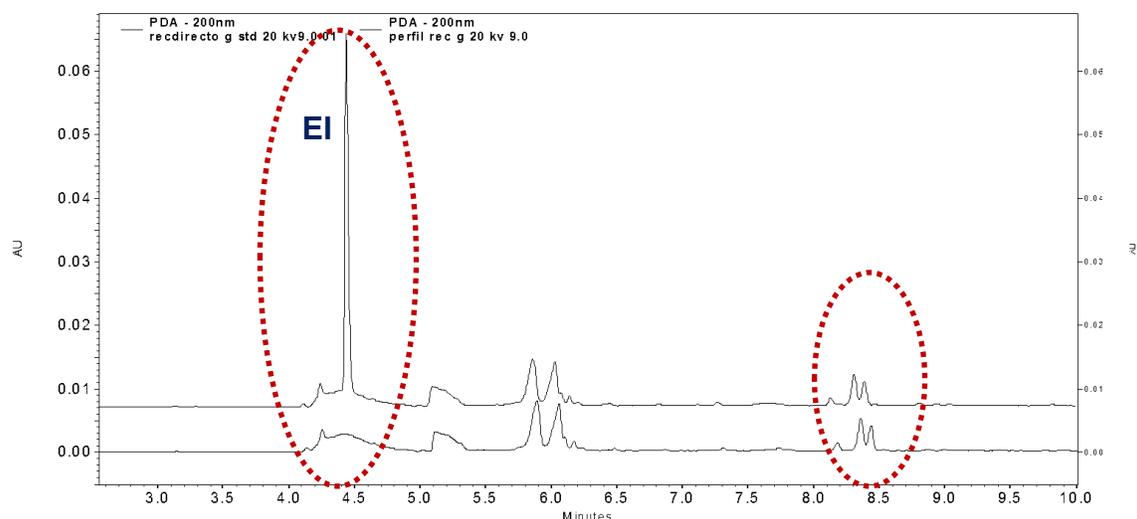


Figura 8.51 Electroferograma de recubrimiento adicionado con E.I. y sin adicionar (buffer boratos 30 mM, pH 9.0 y 20 kV).

Para obtener una concentración de los compuestos que sea comparable al extracto etanólico 70% se decidió concentrar el recubrimiento utilizando un evaporador, llevando la muestra de 5 ml iniciales a 1 mL. Sin embargo; a medida que se concentra forma una especie de goma adhiriéndose a las paredes del tubo y ocasionando una pérdida evidente de los compuestos además de un aumento en la viscosidad del recubrimiento (debido a las propiedades fisicoquímicas de Alginato de sodio) y una probable caramelización. Ver figura 8.52.



Figura 8.52 Proceso para concentrar el recubrimiento.

Al comparar los electroforegramas del recubrimiento concentrado y recubrimiento directo medidos a las condiciones para NDGA, se observa un incremento en las señales anchas propias de los excipientes (en óvalos Fig. 8.53) pero no se detectan las señales de interés quizás debido a la pérdida (degradación debido a la temperatura) de los compuestos en la goma ya mencionada. Ver figura 8.53.

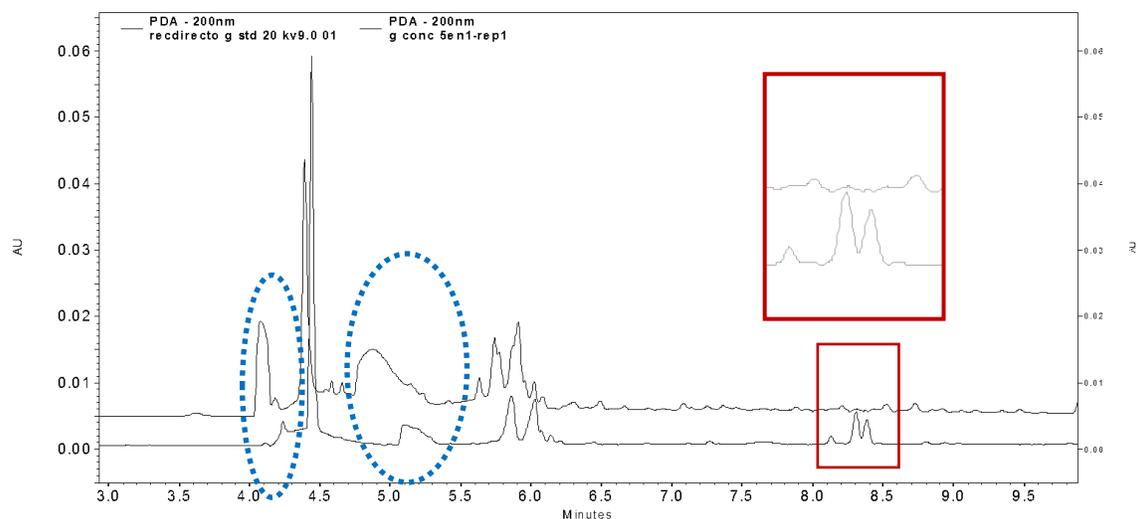


Figura 8.53 Recubrimiento concentrado de 5 a 1 mL (buffer boratos 30mM pH 9.0 y 20 kV)

Extracción del polímero

Considerando que el polímero es insoluble en etanol, caso contrario a los polifenoles, se decidió hacer unas pruebas para extraer dicho polímero antes de concentrar, agregando etanol 70 % y se somete a sonicación durante 5 minutos, posteriormente se retira el polímero con una varilla de vidrio, se concentra en evaporador y se lleva a la marca de aforo. Ver figura 8.54.



Figura 8.54 Extracción del polímero en el recubrimiento.

Una vez retirado el polímero se midió por CE y en la figura 8.55 se muestra la comparación del recubrimiento concentrado comparado con el recubrimiento fresco inicial, observándose que las señales de NDGA y su derivado, de igual forma no aparecen, lo cual nos hace pensar en una pérdida de los compuestos al ser posiblemente encapsulados en el polímero o en una degradación de dichos compuestos a los 7 días de realizado el recubrimiento. Por lo anterior, se decidió no remover el polímero y determinar los componentes en el recubrimiento fresco para tener una buena aproximación.

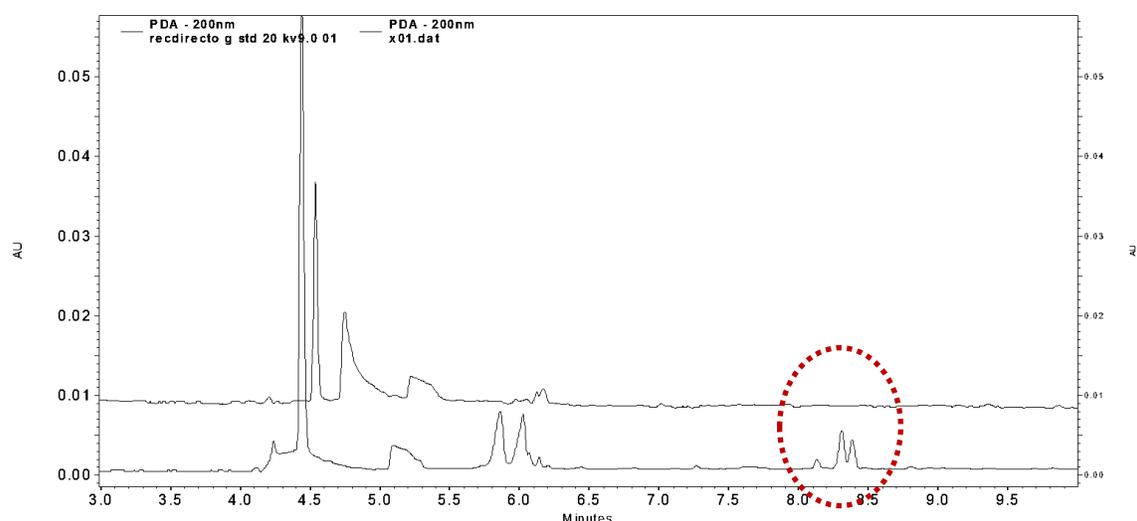


Figura 8.55. Comparación de recubrimiento fresco y recubrimiento concentrado a los 7 días de realizado el recubrimiento.

En vista de la ausencia de NDGA a los 7 días de elaborado el recubrimiento, y considerando que en la aplicación de éste en mangos de la variedad *Keitt* se aplicó durante 20 días (obteniendo buenos resultados en cuanto a la mejora del tiempo de vida postcosecha y mejora de sus propiedades) se decidió monitorear el perfil del recubrimiento durante 20 días situando el interés en el componente mayoritario NDGA. Dicha comparación del perfil, se mostró anteriormente en el apartado de análisis de resultados.