



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO.**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ESTUDIO PRELIMINAR DE EXTRACTOS DE *Calendula  
officinalis* POR ELECTROFORESIS CAPILAR

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA**

PRESENTA:

**EDITH CHAVEZ ORTIZ**

ASESORES:

Q.F.B. VICTOR HUGO ABREGO REYES

DR. ENRIQUE RAMON ANGELES ANGUIANO

M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece por el apoyo parcial a la Cátedra de Química Medicinal; proyecto Conacyt No. 8243. Se agradece también por su apoyo técnico a Draucin Jiménez, Carmen Pérez, Moisés Hernández, Fernando Sotres y Raymundo Pérez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a Dios por concederme la oportunidad de dar un paso más en esta vida, el cual constituye un aliciente para continuar con mi superación.

Agradezco profundamente a mis padres y hermanos por el apoyo incondicional en todos los aspectos.

Gracias a mis asesores por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ellos, además del tiempo, apoyo y paciencia recibida.

Gracias a mis sinodales por sus valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo.

Gracias a los compañeros que me han dado su amistad y apoyo a lo largo de toda mi etapa como estudiante.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. RESUMEN	3
3. JUSTIFICACIÓN	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos particulares	5
5. GENERALIDADES	6
5.1 Antecedentes de electroforesis capilar	6
5.2 Movilidad electroforética	7
5.3 Movilidad aparente	8
5.4 Flujo electroosmótico	8
5.5 Solución amortiguadora	9
5.6 Interacciones electrostática	10
5.7 Potencial zeta	10
5.8 Calentamiento de Joule	11
5.9 Equipo de electroforesis capilar	12
5.1.0 Introducción de la muestra	13
5.1.1 Inyección electrocinética	14
5.1.2 Inyección hidrodinámica	14
5.1.3 Detectores de absorbancia UV-Vis	14
5.1.4 Electroforesis capilar de zona	16
5.1.5 Electroforesis capilar electrocinética micelar	17
5.1.7 <i>Calendula officinalis</i>	18
5.1.8 <i>Tagetes erecta</i>	20
6. MATERIAL Y EQUIPO	21
7. REACTIVOS	21
8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	22
9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28

11. CONCLUSIONES	50
ANEXO 1 Análisis estadístico de los picos de <i>Calendula officinalis</i> y <i>Tagetes erecta</i>	51
ANEXO 2 Contraste de significación	60
ANEXO 3 Pruebas fitoquímicas	67
12. BIBLIOGRAFÍA	75

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, los productos fitoterapéuticos y los productos naturales aislados representan un mercado que mueve miles de millones de dólares, tanto en los países industrializados, como en los países en desarrollo. A pesar del progreso de la química de síntesis, la investigación científica sobre el estudio de las plantas medicinales continúa intensamente, dando como resultados la identificación de las plantas dotadas de actividad farmacológica, el descubrimiento de nuevas sustancias farmacológicamente activas, el descubrimiento de nuevas moléculas, las cuales son transformadas en medicamentos mediante procesos de semi-síntesis, y la validación científica del uso de plantas de la medicina tradicional y la medicina popular. El análisis fitoquímico proporciona datos preliminares sobre los constituyentes químicos de la planta que, junto con los resultados de la investigación farmacológica puede orientar la continuación de los estudios.<sup>47</sup> La acción farmacológica de una determinada planta medicinal depende en la mayoría de los casos de varios principios activos y no sólo de uno aislado, existiendo sinergismo y acciones coadyuvantes entre ellos, de modo que por lo general resulta conveniente la acción de toda la planta en su conjunto que la de un determinado compuesto.<sup>5</sup>

Este trabajo se basa en el estudio de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar utilizando exclusivamente los pétalos de las flores, para obtener los perfiles de tres extractos (etanólico, acetónico y hexánico). Debido a la gran variedad de constituyentes químicos como son: saponinas triterpenoides, alcoholes triterpénicos, flavonoides, hidroxycumarinas, carotenoides, aceites volátiles y polisacáridos.<sup>4, 30, 35 y 56</sup> Se ha reportado que *Calendula officinalis* tiene propiedades antiinflamatorias<sup>18</sup>, actividad anti-VIH<sup>28</sup>, efectiva en la prevención de la dermatitis producida por la irradiación en pacientes con cáncer<sup>30</sup>, acción citostática frente al carcinoma de Ehrlich, actividad inmunomoduladora, estimulan la fagocitosis de células polimorfonucleares humanas, estimulan la proliferación linfocitaria mitógeno-inducida, además de su efecto bactericida.<sup>55</sup>

El análisis y la evaluación de la calidad de estas sustancias fitoquímicas es esencial para proporcionar la máxima eficacia, eficiencia y seguridad para los consumidores. La

cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), son herramientas valiosas para el análisis de sustancias fitoquímicas. Sin embargo los dos métodos son laboriosos y necesitan una adecuada etapa de preconcentración y limpieza que aumente las sensibilidades y prolongue la vida de las columnas, el cual redundaría en tiempos de análisis excesivamente largos e instrumentación cara y sofisticada.<sup>10</sup> El estudio realizado a los extractos de *Calendula officinalis* se desarrolló por electroforesis capilar el cual permite el análisis simultáneo de diferentes clases de analitos en tiempos reducidos. Se desarrolla una metodología analítica por electroforesis capilar de zona (*CZE capillary zone electrophoresis*) y por cromatografía capilar electrocinética micelar (*MECC micellar electrokinetic capillary chromatography*), presentando ventajas sobresalientes, sobre otras técnicas, ya que emplea cantidades pequeñas de solvente, es muy sensible, rápida y se requiere poca preparación de la muestra. Como resultado se obtendrá un perfil electroforético de los extractos etanólico, acetónico y hexánico de *Calendula officinalis* identificando y determinando así las diferencias electroforéticas que existen en cada uno de ellos.<sup>44</sup> Además se identificarán las diferencias y semejanzas que existen entre *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta*, comparando sus electroferogramas debido a que son plantas morfológicamente parecidas y de la misma familia. Actualmente no se ha registrado ninguna técnica analítica capaz de determinar conjuntamente y de forma rápida, simple y efectiva, los metabolitos secundarios de *Calendula officinalis*. Qué proporcionará datos preliminares sobre los constituyentes químicos de la planta que puede orientar la continuación de los estudios que permitan la identificación y cuantificación de los compuestos fitoquímicos, además de su actividad protectora frente a enfermedades y su absorción en el organismo.

## 2. RESUMEN

Este trabajo se basó en el estudio electroforético de *Calendula officinalis*, dada a la gran variedad de constituyentes químicos, responsables de su amplia actividad farmacológica y bactericida. El estudio se realizó a tres extractos (etanólico 76%, acetónico 100% y hexánico 100% ) de pétalos de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar, ya que esta técnica nos permite el análisis simultaneo de diferentes clases de analitos en tiempos reducidos. Desarrollando una metodología por electroforesis capilar de zona y cromatografía capilar electrocinética micelar ambos métodos a pH 2, 5 y 9, para determinar los perfiles electroforéticos de los tres extractos y, así establecer una forma de identificación de esta especie vegetal. Concluyendo que el mejor disolvente de extracción, se consigue con el etanol, y el pH 9 es óptimo para los dos métodos debido a que se registra por electroforesis capilar de zona 6 picos y por cromatografía capilar electrocinética micelar 20 picos, registrándose un total de 26 picos a este pH. Y por último se comparan los electroferogramas a las mismas condiciones de trabajo de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* para identificar las diferencias y semejanzas que existen entre ellas, debido a que son plantas morfológicamente parecidas, concluyendo que se detectan sustanciales diferencias en cuanto a los perfiles electroforéticos de cada planta.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de las plantas medicinales no ha perdido vigencia. En la actualidad registra un auge y en el futuro su importancia será mayor. Prueba de que hay un interés creciente por las plantas medicinales es que la Organización Mundial de la Salud ha recomendado movilizar todos los recursos como medio legítimo para alcanzar la salud y, la movilización incluye a la medicina tradicional y a su principal instrumento: las plantas medicinales.

Los vegetales producen una diversidad de moléculas únicas y difíciles de sintetizar, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de su coloración y aromas de las flores y frutos.

Este trabajo se basa en el estudio electroforético de tres extractos (etanólico, acetónico y hexánico) de *Caléndula officinalis*, dada a la gran variedad de metabolitos secundarios responsables de su amplia actividad farmacológica y bactericida. Desarrollándose dos métodos uno por electroforesis capilar de zona y otro por cromatografía capilar electrocinética micelar ambos métodos a pH 2, 5 y 9, para determinar el mejor disolvente de extracción y el pH óptimo de trabajo, en base a sus perfiles electroforéticos obtenidos y, así establecer una forma de identificación de la planta. Se comparará los electroferogramas de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* a las mismas condiciones de trabajo, para determinar las diferencias y semejanzas que existen entre ellas, debido a que son plantas morfológicamente parecidas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Determinar mediante la técnica de electroforesis capilar el perfil de tres extractos (etanólico, acetónico y hexánico) de *Calendula officinalis*, para establecer una forma de identificación de esta especie vegetal.

### 4.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos etanólico, acetónico y hexánico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta*, para su análisis por electroforesis capilar.
- Obtener los electroferogramas de los extractos: etanólico y acetónico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona y los electroferogramas del extracto etanólico, acetónico y hexánico por cromatografía capilar electrocinética micelar, ambos métodos a pH 2, 5 y 9, para definir las condiciones óptimas de trabajo en cuanto a pH.
- Comparar y determinar las diferencias electroforéticas de los tres extractos de *Calendula officinalis*, para identificar el mejor disolvente de extracción.
- Determinar cuántos compuestos catiónicos, aniónicos y neutros se obtienen de los extractos: etanólico, acetónico y hexánico de *Calendula officinalis* y en que extracto se obtiene la mayor cantidad de compuestos dependiendo del pH.
- Identificar las posibles semejanzas y diferencias entre *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta*, a través de la comparación de sus electroferogramas debido a que son plantas morfológicamente parecidas y de la misma familia.

## 5. GENERALIDADES

### 5.1 Antecedentes de electroforesis capilar

La electroforesis capilar es una técnica de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora, a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante.<sup>46</sup> Se aplica una diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos con cargas eléctricas opuestas y los iones presentes en la disolución se mueven hacia uno u otro electrodo según su propia carga.<sup>13</sup>

En 1967, Hjerten empleo capilares milimétricos para especies cargadas y neutras, los que eran rotados a través de su sección longitudinal para evitar los efectos de convección. En 1979 Virtanen y Mikkers emplearon capilares de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno en vidrio y teflón respectivamente. Martin en 1942, separa cloruro, aspartato y glutamato por isotacoforesis. En 1963 Konstantinov, Oshukova y los Evereast en su tesis de graduación en 1964, fueron los precursores de capilares y la medición de la absorción UV a través del mismo, permitió obtener los espectros característicos de absorción. En 1980, Jorgenson y Lukacs emplean capilares de sílice fundida de diámetro de 75  $\mu\text{m}$  y Jorgenson clarifica teóricamente las relaciones entre los parámetros operacionales y la cualidad de la separación revelando el elevado potencial analítico de esta técnica. La separación de péptidos que realizo lo hizo sobre un capilar de sílice fundida a potenciales elevados de 20 kV a 30 kV en un campo de 400 V/cm a 500 V/cm refrigerados por aire, fue un avance de la electroforesis capilar.

El flujo electroosmótico (*EOF*, por sus siglas en inglés) generado por los grupos silanol de la superficie interna del capilar da como resultado una corriente plana del frente del líquido que contrasta con el frente parabólico de la cromatografía de alta resolución. La ventaja de esta técnica es que el capilar de sílice fundida que generalmente se cubre con una capa de polimina para darle mayor rigidez y resistencia, tiene una ventana a través de ella que permite el pasaje de la luz UV de tal manera que la detección es on-line.<sup>11</sup>

## 5.2 Movilidad electroforética

La electroforesis es un proceso en el que un gradiente de potencial produce el transporte de las partículas cargadas. En el transporte electroforético, a la fuerza del campo ( $F_{elec.} = z \cdot e \cdot E$ ) se opone la resistencia viscosa del medio  $F_{res.} = f \cdot v$ , lo que produce, cuando se igualan, una velocidad constante de las partículas. El proceso puede escribirse así:

$$F_{elec.} = F_{res.}$$
$$z \cdot e \cdot E = f \cdot v$$

Donde:

$z$  = número de cargas de unidad  $e^-$

$E$  = valor del campo eléctrico

$v$  = velocidad de las partículas

$f$  = coeficiente de rozamiento

$e$  = carga del electrón ( $-1,602 \times 10^{-19} \text{C}$ )

La movilidad electroforética ( $\mu$ ) de una partícula es la velocidad de migración por unidad de campo eléctrico.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

De  $z \cdot e \cdot E = f \cdot v$  tenemos:

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{f}$$

y sustituyendo este valor de  $v$  se obtiene la ecuación:

$$\mu = \frac{z \cdot e}{f}$$

Así pues, la  $\mu$  de una molécula depende directamente de su carga e inversamente del coeficiente de rozamiento, que a su vez depende directamente del tamaño y la forma de la molécula y la viscosidad del medio. La migración de las partículas depende del pH del medio en que estén, ya que su carga neta depende del pH.<sup>24</sup>

### 5.3 Movilidad aparente

La movilidad aparente ( $\mu_{ap}$ ) de un ión es la suma de la movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) del ión más la movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) de la disolución:

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

Para un catión analito que se mueve en la misma dirección que el flujo electroosmótico, la  $\mu_{ep}$  y  $\mu_{eo}$  tiene el mismo signo, y por tanto la  $\mu_{ap}$  es mayor que  $\mu_{ep}$ . La electroforesis transporta los aniones en dirección opuesta a la electroósmosis, de modo que para los aniones los dos términos de la ecuación tienen signos opuestos. A pH neutro o alto una fuerte electroósmosis transporta aniones al cátodo porque la electroósmosis es normalmente más rápida que la electroforesis. La  $\mu_{ap}$  de una especie dada es la velocidad neta ( $v_{neta}$ ) de la especie dividida por el campo eléctrico (E):

$$\mu_{ap} = \frac{v_{neta}}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_t}$$

donde:  $L_d$  = longitud de la columna desde la inyección al detector,  $L_t$  = longitud total de la columna de un extremo a otro,  $V$  = voltaje aplicado entre los dos extremos y  $t$  = tiempo necesario para que un soluto migre desde el extremo de inyección hasta el detector.

El flujo electroosmótico se mide añadiendo a la muestra un soluto neutro que absorba en el UV y midiendo el tiempo de migración ( $t_{neutro}$ ) hacia el detector. La  $\mu_{eo}$  es la velocidad de las especies neutras ( $v_{neutra}$ ) dividido por el E.

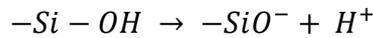
$$\mu_{eo} = \frac{v_{neutra}}{E} = \frac{L_d/t_{neutro}}{V/L_t}$$

La  $\mu_{ep}$  de un analito es la diferencia  $\mu_{ap} - \mu_{eo}$ .<sup>26</sup>

### 5.4 Flujo electroosmótico

La electroforesis capilar es capaz de separar en un mismo proceso cationes, aniones y analitos neutros, debido al denominado flujo electroosmótico, que se define como el movimiento del fluido electrolítico contenido en un capilar de sílice cuando se aplica una diferencia de potencial en sus extremos.

El EOF es consecuencia de la carga neta negativa de las paredes del capilar. En el caso de capilares de sílice fundida, esta superficie de carga es generada principalmente por la ionización de los grupos silanol a partir de pH 2 según el equilibrio ácido-base:



Las cargas negativas de la pared del capilar atraen a los iones positivos del tampón, creando así una doble capa eléctrica. Cuando se aplica un voltaje a lo largo del capilar, los cationes de la doble capa se difunden hacia el cátodo arrastrando agua con ellos. El resultado es un flujo neto de fluido que migra hacia el electrodo negativo. Este flujo es el que va arrastrar a los aniones y moléculas neutras hacia el detector situado en el cátodo. El EOF puede ser controlado. Así a mayor pH, el grado de ionización de los grupos silanol será mayor, y por lo tanto también lo será el EOF. A la inversa si el pH es bajo, disminuirá el porcentaje de grupos silanol ionizados y también lo hará el EOF. La adición de modificadores orgánicos miscibles con el tampón se ha utilizado para regular el EOF.<sup>49</sup>

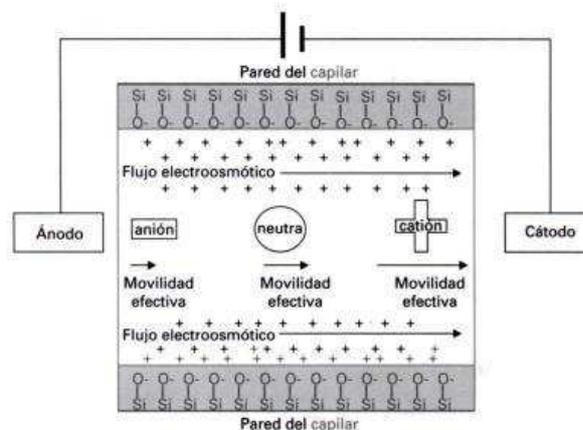


Fig. 1: Representación de la formación de la doble capa eléctrica y del flujo electroosmótico que aparece al aplicar una diferencia de potencial en los extremos de un capilar de sílice.

### 5.5 Solución amortiguadora

En la electroforesis, el amortiguador ejerce dos funciones: por un lado, lleva la carga eléctrica y, por otro, determina la carga neta de las moléculas que se separan y, por ende, la dirección de la migración electroforética. La fuerza iónica del amortiguador determina la anchura de la nube iónica que rodea las moléculas cargadas. Cuanto mayor es la fuerza iónica, más estrechas son las bandas de separación. Sin embargo, mucha fuerza iónica produce un calentamiento mayor y tal vez la desnaturalización de las especies que van a separarse, por lo que hay que llegar a una solución de compromiso.<sup>24</sup>

## 5.6 Interacciones electrostáticas

Un ión se encuentra rodeado de contraiones formando una atmósfera iónica que es la responsable de la acción de dos fuerzas adicionales denominadas: fuerza de retardo electroforético ( $F_{ret}$ ) y fuerza de efecto de relajación ( $F_{rel}$ ). La  $F_{ret}$  se produce debido a que el ión central no migra en un estado estacionario. Puesto que los contraiones se mueven en la dirección opuesta al ión central, la fuerza de rozamiento es mayor, y como resultado la  $\mu$  decrece. Este efecto será mayor a medida que se aumente la concentración del tampón pues la densidad de la carga de la atmósfera de contraiones será mayor.

Por otra parte, a medida que se produce la migración del ión central, la atmósfera iónica se deforma conduciendo a la  $F_{rel}$ . En este proceso a medida que el ión central avanza, la densidad de carga de la atmósfera iónica en la parte frontal del ión es menor que en la parte trasera. Durante este tiempo de relajación, el ión central se frena debido a la fuerza eléctrica,  $F_{rel}$ , que actúa en la dirección contraria a su migración.

Cuanto mayor sea la concentración del electrolito, más fuertes serán las interacciones electrostáticas, no solamente entre los iones de la disolución de electrolito, sino también entre los analitos cargados y sus contraiones. En presencia de interacciones iónicas, la movilidad efectiva será siempre menor que la movilidad aparente.<sup>43</sup>

## 5.7 Potencial zeta

La  $\mu_{ep}$  está relacionada con el potencial zeta (potencial derivado de la teoría de la doble capa que describe la interfase entre una partícula cargada y la disolución tampón). Según el modelo de Stern, la doble capa eléctrica está constituida por una capa de contraiones adsorbidos (capa compacta) y una capa difusa de composición iónicamente heterogénea (con exceso de contraiones), que se extiende hasta una zona de la disolución tampón donde la composición es iónicamente homogénea.

El potencial zeta, ( $\xi$ ), es el potencial eléctrico en la interfase definida por los contraiones adsorbidos y los contraiones que se encuentran en la capa difusa. El potencial zeta es proporcional a la cantidad de contraiones presentes en la superficie de un soluto

cargado. El número de iones adsorbidos viene determinado por el pH y la fuerza iónica de la disolución.

Cuando la concentración del tampón, o más precisamente, la fuerza iónica se incrementa, el espesor de la doble capa eléctrica disminuye y el potencial zeta será menor. Como consecuencia las movilidades electroforéticas de los iones también serán menores.

### **5.8 Calentamiento de joule**

Cuando una corriente ( $I$ ) atraviesa una disolución de electrolito, debido a las colisiones friccionales entre los iones móviles y las moléculas del tampón, parte de la energía eléctrica se convierte en calor. El calor producido se denomina efecto de Joule. La generación del calor va a depender del campo eléctrico (y, por tanto del voltaje y de la longitud del capilar), de la composición del tampón (a través de la conductividad molar) y de su concentración. Cuanto mayor es el voltaje aplicado mayor será la producción del calor debido al efecto de Joule. Si el calor generado no se disipa a la misma velocidad que es generado, la temperatura de la disolución se incrementa y se pueden producir gradientes térmicos a través de la disolución del tampón.

El aumento de la temperatura causa problemas como: evaporación no uniforme de la disolución tampón, por lo que aumentará su concentración iónica del mismo y además provoca la formación de burbujas que impedirá el paso de la corriente eléctrica. La densidad de un líquido homogéneo disminuye al calentarse, de esta forma un líquido que se calienta desigualmente, presenta zonas de diferente densidad que tienden a mezclarse, este fenómeno se llama convección, el cual origina un transporte del analito de interés no debido a la migración lo que producirá un ensanchamiento de las bandas de soluto.

Temperaturas elevadas pueden producir descomposición de solutos. La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura y conduce a un incremento en la velocidad de migración de los iones. A un voltaje fijo, para que se cumpla la ley de Ohm ( $V = I \cdot R$ ), si la resistencia aumenta, la intensidad de corriente tiene que disminuir. Y si disminuye la intensidad de corriente, disminuye también el calor generado.

Los tubos capilares presentan una relación área superficial/volumen elevada por lo que se facilita la disminución de calor, por transferencia. Los gradientes de temperatura en capilares se producen debido a que el calor es producido en todo el capilar pero solamente se disipa a través de las paredes del mismo. Para disminuir la generación del calor se puede reducir el diámetro del capilar, el campo eléctrico, cambiar la composición del tampón y usar sistemas de control de temperatura.<sup>43 Y 54</sup>

### **5.9 Equipo de electroforesis capilar**

La configuración básica de un equipo de electroforesis capilar está constituido por: un capilar de sílice fundida. Tiene entre 15 cm y 100 cm de longitud y 20  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, la pared externa del capilar está recubierta de una capa de poliimida para dotarlo de una mayor flexibilidad y resistencia, dentro del capilar se realiza la separación. Los capilares se sujetan normalmente de un cartucho de plástico que alinea los extremos del capilar en los viales del tampón y los electrodos. Debido a la gran longitud de los capilares, estos se enrollan en círculos en un soporte en la parte superior del cartucho.

El sistema de refrigeración del capilar. Durante la separación se aplican grandes cantidades de corriente. Debido a la resistencia del movimiento de las cargas, se genera una gran cantidad de calor que ha de ser disipado para tener controladas las condiciones y evitar que el capilar se funda. Es por ello que el capilar ha de ser refrigerado.

Fuente de corriente eléctrica de alto voltaje. Debe suministrar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar de hasta 20 kV a 30 kV con una intensidad de hasta 200  $\mu\text{A}$  a 250  $\mu\text{A}$ .

Viales con electrolito y muestra. Contienen una disolución tampón en la que se va a realizar la separación o bien la muestra que va ha ser analizada. Normalmente se colocan en un carrusel de muestras que suele estar termostatizado. El sistema mueve los viales automáticamente y los eleva e inserta en los extremos del capilar mediante un sistema neumático.

Dos electrodos de platino. Cada uno se encuentra en contacto con un extremo del capilar y sumergido en los recipientes que contienen el tampón donde se va a realizar la separación. Se denomina cátodo al electrodo negativo, mientras que el ánodo es el electrodo positivo.

Detector. En el extremo del capilar se encuentra un sistema que registra una propiedad física de los analitos que llegan a él. El detector más común es la de absorbancia de radiación UV-Vis de longitud de onda variable o de batería de diodos, aunque actualmente existen detectores de fluorescencia, electroquímicos o espectrómetros de masa, etc. La representación de la propiedad físico-química medida generalmente en absorbancia en función del tiempo de migración es lo que se le denomina electroferograma.

Un sistema de registro y análisis de señal. La señal del detector es registrada por un ordenador que, con un software apropiado, es capaz de representar dicha señal en función del tiempo para generar el electroferograma.<sup>39</sup>

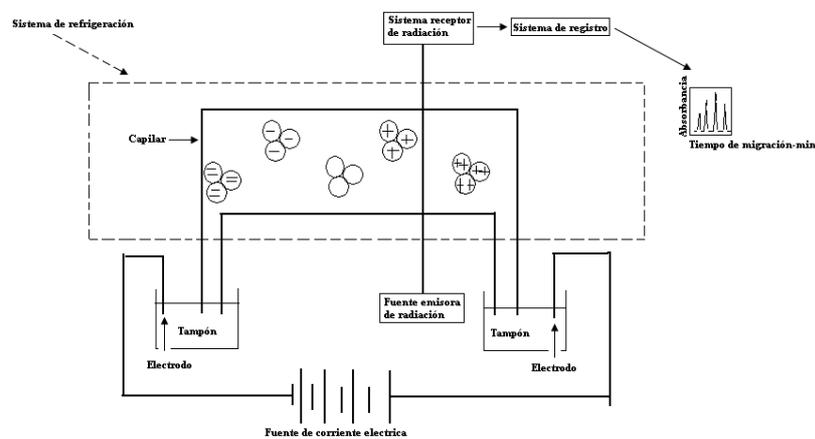


Fig. 2: Esquema de los elementos básicos de un equipo de electroforesis capilar.<sup>39</sup>

### 5.1.0 Introducción de la muestra

Para evitar el ensanchamiento de los picos y la consiguiente pérdida de resolución, el volumen de muestra introducida en el capilar no deberá exceder el 1-2 % del volumen total del mismo. Por ejemplo el volumen total de un capilar de 1 m de longitud y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro es aproximadamente 3  $\mu\text{L}$ , ello implica que la cantidad de muestra consumida para la realización del análisis será de unos pocos nL. Existen dos tipos principales de introducción de la muestra en un capilar.<sup>39</sup>

### **5.1.1 Inyección electrocinética**

Se lleva a cabo reemplazando el reservorio del tampón en el extremo de inyección por el vial de muestra y aplicando un voltaje durante un corto periodo de tiempo. Las fuerzas del campo aplicado son de 3 a 5 veces menores que las aplicadas en las separaciones. El analito entra en el capilar por migración electroforética y debido al bombeo de EOF.

En este tipo de inyección se produce una discriminación de las especies iónicas, debido a que los iones más móviles, son cargados en mayor proporción que los iones menos móviles. De este modo la muestra inyectada no tiene la misma composición que la muestra original. Los solutos con mayor movilidad se inyectaran antes que los que tienen menor movilidad. Los cationes con mayor relación carga/radio entraran primero en el capilar, luego los cationes con menor relación carga/radio, seguidamente las especies neutras, y finalmente los aniones, en orden inverso a su relación carga/radio. La inyección electrocinética es muy simple, no requiere instrumentación adicional, y es ventajosa cuando se inyecta medios muy viscosos o cuando se utilizan capilares rellenos de gel.<sup>36</sup>

### **5.1.2 Inyección hidrodinámica**

Se lleva a cabo por aplicación de presión en el extremo de inyección, succión por vacío aplicado a la salida del capilar o bien debido al efecto sifón obtenido por elevación del reservorio de inyección con respecto al reservorio de salida. Las inyecciones hidrodinámicas proporcionan muestras representativas de la composición de los analitos de la muestra. Los volúmenes de la muestra inyectados dependen del tiempo de inyección, dimensiones del capilar y caída de presión a través del capilar. Se puede producir un ensanchamiento de la banda de muestra debido al perfil parabólico característico de los flujos dirigidos por presión.<sup>36</sup>

### **5.1.3 Detectores de absorbancia UV-Vis**

Ampliamente utilizado, debido a su naturaleza casi universal para compuestos orgánicos. Para adaptar el capilar a esta función, se elimina la protección de poliimida de las paredes externas del capilar en la región donde se va a situar el detector. El paso de la luz es limitado por el pequeño diámetro interno del capilar, además de su curvatura. El haz

de luz incidente deberá ser enfocado hacia el interior del capilar para lograr una cantidad máxima de fotones en esa región y minimizar la luz dispersa que alcanza el fotodetector. La reducción de la luz dispersa puede conseguirse mediante lentes de enfoque colocadas cerca del capilar, fibra óptica o con una simple rendija. Para mejorar la sensibilidad y el rango lineal de la detección es aumentar el camino óptico en la célula sin por ello degradar la eficacia y la resolución. Se puede conseguir de las siguientes maneras:

Utilizando células de burbujas, en el cual se crea una burbuja directamente en el interior del capilar, de manera que es el diámetro interno el que se modifica localmente pero no el diámetro externo del mismo. La burbuja está localizada en la región de detección, no se produce un incremento apreciable en la corriente (por tanto, no se genera calor). En la región de la burbuja se produce una disminución de la velocidad del flujo debido a que disminuye la resistencia eléctrica y, por tanto, el campo eléctrico. De esta forma, la concentración de la banda se mantiene constante pero el camino óptico se incrementa.

La otra forma sería cambiar el sentido de la incidencia de la radiación sobre el capilar. El cual se deforma este en la región de detección formando una zeta, y se hace incidir la luz longitudinalmente. El camino óptico efectivo depende de la longitud del brazo central de la Z (aprox. 3 mm).

En otro método se incrementa el paso de la luz de la radiación mediante reflexión. Las denominadas celdas de multireflexión, son células *on column* que presentan dos ventanas. El extremo del capilar está recubierto de plata y la radiación experimenta múltiples reflexiones antes de salir del capilar. De esta forma el paso óptico se incrementa mientras las propiedades físicas permanecen constantes.<sup>43</sup>

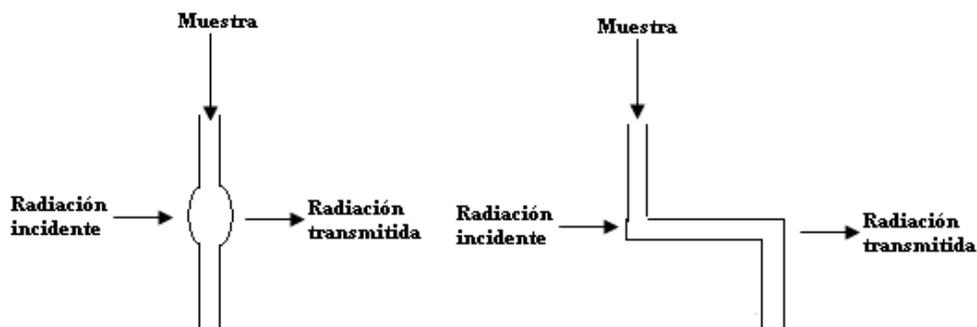


Fig. 3: Capilares con burbuja y doblados en forma de Z, que aumenta la longitud del paso óptico.

#### 5.1.4 Electroforesis capilar de zona

En el interior del capilar solo se encuentra el tampón, cuya composición es uniforme a lo largo de toda la región de separación. La muestra se introduce como una banda estrecha en el capilar, rodeada de la solución tampón. Cuando se aplica el potencial a través de los extremos del capilar, los componentes iónicos de la muestra se mueven de acuerdo con su propia  $\mu$  y, si dichas  $\mu$  son lo suficientemente diferentes, se separan en bandas discretas rodeadas de la disolución tampón. La presencia del flujo electroosmótico será lo suficientemente elevado como para arrastrar los aniones hacia el detector. Si la carga de la pared del capilar es negativa, el flujo electroosmótico se dirige hacia el cátodo y el orden de elución es: primero los cationes, luego las especies neutras todas juntas y finalmente los aniones.

Para una buena separación se deben de cumplir los siguientes requisitos:

- Las  $\mu$  de cada soluto de la muestra deben de ser diferentes.
- El electrolito de fondo debe de ser homogéneo y la distribución de la fuerza de campo uniforme a lo largo de toda la longitud de capilar de separación.
- Ni los solutos ni los compuestos de la matriz de la muestra deben interaccionar o unirse a las paredes del capilar.

Una limitación de este método, es la falta de selectividad para especies neutras que coemigran con el flujo electroosmótico, y para sustancias con igual relación carga/masa. Las separaciones se pueden llevar a cabo en disoluciones tampón no acuosas cuando los

compuestos son insolubles en agua o cuando se desea modificar la selectividad de las separaciones.<sup>43</sup>

### **5.1.5 Cromatografía capilar electrocinética micelar.**

Cuando los solutos no están ionizados al pH del tampón de trabajo, carecerán de la capacidad de migrar bajo la influencia del campo eléctrico. No obstante, se moverán a lo largo del capilar en sentido del flujo electroosmótico, pero todos exactamente con la misma velocidad y, por tanto, no podrán separarse entre sí.<sup>43</sup> La cromatografía capilar electrocinética micelar es una técnica que implica la introducción de un surfactante con un nivel de concentración en el cual se forman micelas. Las micelas se forman en las disoluciones acuosas cuando la concentración de una especie iónica que posee una cola de hidrocarburo de cadena larga se incrementa más allá de cierto nivel que recibe el nombre de concentración crítica micelar (CMC), en este punto el surfactante empieza a formar agregados esféricos formados por 40 o 100 iones con sus colas de hidrocarburos hacia el interior del agregado y sus extremos cargados hacia el exterior expuestos al agua. Las micelas constituyen una segunda fase estable que puede incorporar compuestos no polares en el interior hidrocarbonado de las partículas y solubiliza así especies no polares. Esta solubilización la encontramos comúnmente cuando una superficie o material graso se lava con una disolución detergente. En esta técnica se agrega surfactante al tampón de trabajo en cantidades que exceden la concentración micelar crítica. El surfactante más empleado es el dodecil sulfato de sodio (SDS). La superficie de una micela iónica de este tipo tiene una gran carga negativa que le imparte una fuerte movilidad electroforética. No obstante la mayoría de los tampones, alcanzan una velocidad de flujo electroosmótico tan alta hacia el electrodo negativo, que las micelas son arrastradas, también hacia ese electrodo, pero con una velocidad mucho menor. El mecanismo se basa en las diferencias de la constante de distribución de los analitos entre la fase acuosa móvil y la fase pseudoestacionaria de hidrocarburos. De esta manera, el proceso es una cromatografía auténtica.<sup>48</sup>

### 5.1.7 *Calendula officinalis*.



Figura 4: Imagen de *Calendula officinalis*

**Nombre científico:** *Calendula officinalis* L.

**Clasificación botánica:** Familia Asteraceae

#### **Etimología**

El nombre del género *Calendula* proviene de la palabra latina *Kalendae*, (calendas, primer día del mes) usada por los antiguos romanos para indicar la floración durante el año, en una zona y dado porque la planta florece casi todo el año. El epíteto *officinalis* indica que estaba incluida en la lista de plantas medicinales.<sup>27</sup>

#### **Origen**

Originaria del sur de Europa meridional y del Oriente. Se cultiva en climas fríos y templados desde la edad media como planta medicinal, y por sus cualidades ornamentales, debidas a las hermosas y continuas cabezuelas.<sup>22</sup>

#### **Descripción botánica**

La *Calendula officinalis* Lin., familia de las Asteráceas, es una hierba anual más o menos pelosa, de 30 a 60 cm de altura; hojas simples, alternas, algo gruesas, de obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3,75 a 5 cm de diámetro; los radios planos, extendidos

de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche; a veces la planta es prolifera desde el involucro, y porta varias cabezuelas pedunculadas en un círculo. El olor de la planta es poco grato.<sup>14 y 32</sup>

### **Principales constituyentes químicos**

Presenta aceites esenciales, ricos en monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos (epicubebol y aloaromadendrol): carvona, geranilacetona, cetona de cariofileno, mentona, isomentona,  $\gamma$ -terpineno, y  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -muroleno, cariofileno,  $\alpha$  y  $\beta$ -iónona, 5,6-epoxi- $\beta$ -iónona, pedunculatina, dihidro-actinidiolido. Los flavonoides que presentan son isorhamnetin-3- glucósido, isorhamnetina, heterósidos, rutósidos, quercetina glucósido, calendoflásido, calendoflavósido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutósido y kaempferol. Los alcoholes triterpénicos son: arnadiol, faradiol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, derivados del ácido laurico mirístico, palmítico y margárico, lupeol,  $\psi$ -taraxasterol, taraxasterol, faradiol-3-éster del ácido palmítico, calenduladiol. Incluyendose los ácidos fenólicos como: cumárico, gentísico, vanílico, cafeico, siríngico, o- hidroxifenilacetico, protocatequínico, feluríco, p-hidroxibenzoico, salicílico, clorogénico, veratrico, o-cumárico y ácidos quinicos. También contiene taninos como piragolol. Los carotenoides presentes son:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, galenina, luteína, licopeno, valenciaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epoxicaroteno,  $\beta$ -zeacaroteno, mutatoxantina y luteína epóxida. Se identifican saponinas derivados de ácido oleanólico: calendulosidos A, B, C, D, D<sub>2</sub>, F, G y H. Entre otros principios activos están: cumarinas, escopoletina, umbeliferona y esculetina, esteroles, azúcar y parafina, polisacáridos como pectina y hemicelulosa.<sup>5, 14, 46 y 49,</sup>

### **Aspectos farmacológicos**

Antiinflamatorio, antihemorrágico, antiséptico, astringente para las heridas, diaforético, estimulante de la actividad hepática, para atenuar espasmos gástricos o intestinales, se considera fungicida en infecciones vaginales, combate infecciones cutáneas y úlceras varicosas, depurador de la sangre, diurético, estimulante digestivo, emoliente, elimina forúnculos, para el tratamiento del cáncer de la matriz y estómago. Se utiliza para los trastornos menstruales y mejora la actividad vesicular, cura dolores intestinales, ictericia y gripe.<sup>22 y 27</sup> Tiene una acción citostática frente al carcinoma de Ehrlich y sarcoma

180. Actividad inmunomoduladora, estimula la fagocitosis de células polimorfonucleares humanas, estimulan la proliferación linfocitaria mitógeno-inducida, a concentraciones de 0,1 mg/mL y 10 mg/mL, a concentraciones mayores se observa un efecto inhibitorio. Exhibe actividad antibacteriana frente a *staphylococcus aureus* y *streptococcus fecalis*, antimicótica frente a *Trichomonas vaginalis* y antiviral frente al virus influenza y al virus herpes simple.<sup>5</sup>

### 5.1.8 *Tagetes erecta*



Figura 5: Imagen de *Tagetes erecta*

**Nombre científico:** *Tagetes erecta* L.

**Clasificación botánica:** Familia *Asteraceae*

**Etimología:** Su etimología proviene de "cempoal" (veinte o veintena) y "xóchitl" (flor); es decir, "veinte flores", en náhuatl.

**Origen:** Nativa de México, se cultiva en América y Europa como ornamental, se propaga fácilmente por semilla.

**Descripción botánica:** Herbácea erecta muy aromática, de tallo ramificado y hojas opuestas, divididas. Las inflorescencias vienen en cabezuelas con flores del disco tubulares y de la periferia ligulares, amarillas o anaranjadas. Tienen frutos pequeños en aquenios comprimidos con vilano

**Compuestos químicos:** Zeaxantina, violaxantina, anteraxantina,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ -caroteno, luteína, fitoeno, licopeno, astaxantina, etc.

**Usos terapéuticos:** Tiene propiedades purgantes para expulsar parásitos intestinales, para tratar luxaciones, sirve además como vermífugo.

## 6. MATERIAL Y EQUIPO

Matraz aforado de 50 mL y 100 mL (Kimax)

Vasos de precipitado de 50 mL (Kimax)

Membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ , diámetro: 2,5 mm (Durapore® PVDF)

Balanza analítica (Mettler AT200 Fact)

pH-metro (Beckman Q 310)

Sonicador (Ultrasonic LC 304 Elma)

Rotavapor (Buchi R-114)

Micropipetas: 10  $\mu\text{L}$  -100  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$  -1000  $\mu\text{L}$  (Transferpette, Brand)

Capilar de sílice fundida de 60 cm de largo, 50 cm de largo efectivo, 145  $\mu\text{m}$  de diámetro externo y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (Beckman Coulter, Fullerton CA).

Equipo de electroforesis capilar (Beckman Coulter P/ACE System MDQ Capillary Electrophoresis, Fullerton, CA).

## 7. REACTIVOS

Acido clorhídrico (Productos Químicos Monterrey)

Hidróxido de sodio (Productos Químicos Monterrey)

Solución amortiguadora estándar (Beckman Coulter pH's 4, 7 y 10)

Fosfato de sodio monobásico (Tecnica Química)

Fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker Xalostoc, México)

Borato de sodio (J.T. Baker Xalostoc, México)

Dodecil sulfato de sodio

Refrigerante fluorinert™ FC-77 (Beckman P/ACE™ System 2000 Capillary Cartridge Coolant).

Agua desionizada

Etanol (grado técnico, purificado)

Hexano (grado técnico, purificado)

Acetona (grado técnico, purificado)

## 8. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Lavar el material con agua y jabón especial, para después enjuagar finalmente con agua desionizada, y secar.

### **100 mL de solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1M**

A un matraz aforado de 100 mL se le adiciona aproximadamente 20 mL de agua desionizada, para después añadirle 0,8 mL de HCl, se agita y se completa el volumen con agua destilada hasta la marca de aforo.

### **100 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1M**

Se pesa 0,8323 g de NaOH en un vaso de precipitado de 50 mL y se disuelve con agua desionizada, después se vierte a un matraz aforado de 100 mL, se lava el vaso de precipitado tres veces con agua desionizada depositando el agua de lavado en el matraz aforado de 100 mL y finalmente se agrega agua desionizada hasta la marca de aforo.

### **50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM pH 2**

Se pesa 0,1379 g de ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL y se disuelve aproximadamente con 30 mL con agua desionizada a cual se le mide el pH, agregándole según sea el caso ácido o hidróxido hasta llegar a un pH igual a 2. Posteriormente se vierte en un matraz aforado de 50 mL, enjuagando el vaso tres veces con agua desionizada y vertiendo esta en el matraz, por último agregarle agua desionizada hasta la marca de aforo.

### **50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM pH 5**

Se pesa 0,3581 g de ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL agregándole 30 mL de agua desionizada agitando hasta disolver completamente, después se prosigue a medir el pH agregándole ácido o hidróxido según sea el caso hasta ajustar el pH a 5, a continuación se vierte en el matraz aforado de 50 mL, enjuagar el vaso tres veces con agua desionizada y verter al matraz, aforar hasta la marca con agua desionizada.

**50 mL de solución amortiguadora de borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM pH 9**

Se pesa 0,3814 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitado 50 mL añadiendo agua desionizada agitando hasta disolver completamente, se prosigue a medir el pH y según sea el caso agregar ácido o hidróxido hasta ajustar el pH a 9, verter la solución en un matraz aforado de 50 mL enjuagando el vaso tres veces con agua desionizada añadiendo el lavado en el matraz, para finalmente aforar hasta la marca con agua desionizada.

**50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM y dodecil sulfato de sodio 50 mM pH 2**

Se pesa 0,1379 g de ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL y se disuelve aproximadamente con 30 mL con agua desionizada, el cual se le mide el pH, agregándole según sea el caso ácido o hidróxido hasta llegar a un pH igual a 2. Se prosigue a adicionarle poco a poco la cantidad de 0,7319 g de dodecil sulfato de sodio agitando constantemente hasta disolver. Posteriormente se vierte en un matraz aforado de 50 mL, enjuagando el vaso tres veces con agua desionizada y vertiendo esta en el matraz, por último agregarle agua desionizada hasta la marca de aforo.

**50 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM y dodecil sulfato de sodio 50 mM pH 5**

Se pesa 0,3581 g de ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) en un vaso de precipitado de 50 mL agregándole 30 mL de agua desionizada agitando hasta disolver completamente, después se prosigue a medir el pH agregándole ácido o hidróxido según sea el caso hasta ajustar el pH a 5, a continuación se adiciona poco a poco la cantidad de 0,7319 g de dodecil sulfato de sodio agitando constantemente hasta disolver. Posteriormente se vierte en el matraz aforado de 50 mL, enjuagar el vaso tres veces con agua desionizada y verter al matraz y aforar hasta la marca con agua desionizada.

**50 mL de solución amortiguadora de borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM y dodecil sulfato de sodio 50 mM pH 9**

Se pesa 0,3814 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  en un vaso de precipitado 50 mL añadiendo agua desionizada agitando hasta disolver completamente, se prosigue a medir el pH y según sea el caso agregar ácido o hidróxido hasta ajustar el pH a 9, se prosigue a adicionarle poco

a poco la cantidad de 0,7319 g de dodecil sulfato de sodio agitando constantemente hasta disolver. Verter la solución en un matraz aforado de 50 mL enjuagando el vaso tres veces con agua desionizada añadiendo el lavado en el matraz, para finalmente aforar hasta la marca con agua desionizada.

**Nota:** Todas las soluciones amortiguadoras se filtraron con membrana Durapore® 0,45 µm, recibiendo el filtrado en recipientes adecuados, prosiguiéndose a sonicarlas y por último se taparon y etiquetaron.

## 9. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### **Extracto etanólico de *Calendula officinalis***

Extracto etanólico de *Calendula officinalis*: Se depositan 10 g de pétalos de *Calendula officinalis* en un frasco ámbar y se vierte 250 mL de alcohol al 76% en agua, se deja reposar una semana agitando frecuentemente. Posteriormente se filtra en papel Whatman No. 2. El extracto se somete al rotavapor hasta concentrar la muestra (Tener cuidado de que no precipite). Después se adiciona 10 mL del extracto etanólico concentrado a un embudo de separación y 10 mL de hexano, para conseguir la purificación del extracto<sup>12</sup>. Se agita vigorosamente abriendo la llave frecuentemente para dejar escapar la presión. Dejar reposar la solución hasta que las dos fases estén bien separadas, extraer la fase hexánica, repitiendo dos veces más la extracción con hexano. Guardar la fase etanólica en un vial color ámbar.

### **Extracto acetónico de *Calendula officinalis***

Extracto acetónico de *Calendula officinalis*: Se depositan 10 g de pétalos de *Calendula officinalis* en un frasco ámbar y se vierte 250 mL de acetona al 100%, se deja reposar por una semana agitando frecuentemente. Se prosigue a filtrar en papel Whatman No. 2, enseguida se somete al rotavapor hasta concentrar la muestra. Colocar el extracto concentrado en un vial color ámbar. La purificación se logra con éter etílico y diclorometano (En esta ocasión se omite la purificación).

### **Extracto hexánico de *Calendula officinalis***

Extracto hexánico de *Calendula officinalis*: Se depositan 10 g de pétalos de *Calendula officinalis* en un frasco ámbar y se le adiciona 250 mL de hexano al 100%, se deja reposar por una semana agitando frecuentemente. A continuación se filtra en papel Whatman No. 2. El extracto se somete al rotavapor hasta concentrar la muestra. En un embudo de separación se adicionan 10 mL del extracto hexánico concentrado y 10 mL de etanol. Se agita fuertemente abriendo la llave frecuentemente para dejar escapar la presión. Dejar reposar la solución hasta que las dos fases estén bien separadas, extraer la fase etanólica y repetir la extracción con etanol dos veces más. Recoger la fase hexánica,

someterla al rotavapor hasta la evaporación del disolvente, disolver la oleorresina en acetato de etilo y guardar esta solución en un vial color ámbar.

#### **Preparación de muestras del extracto etanólico para electroforesis capilar**

300 µL de la fase etanólica + 700 µL de buffer de fosfatos pH 2, sonicar.

300 µL de la fase etanólica + 600 µL de buffer de fosfatos/sds pH 2, sonicar.

250 µL de la fase etanólica + 750 µL de buffer de fosfatos pH 5, sonicar.

250 µL de la fase etanólica + 600 µL de buffer de fosfatos/sds pH 5, sonicar.

200 µL de la fase etanólica + 800 µL de buffer de boratos pH 9, sonicar.

250 µL de la fase etanólica + 800 µL de buffer de boratos/sds pH 9, sonicar.

#### **Preparación de muestras del extracto acetónico para electroforesis capilar.**

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de fosfatos pH 2, sonicar.

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de fosfatos/sds pH 2, sonicar.

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de fosfatos pH 5, sonicar.

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de fosfatos/sds 5 pH 2, sonicar.

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de boratos pH 9, sonicar.

200 µL del extracto acetónico + 1000 µL de buffer de boratos/sds pH 9, sonicar.

#### **Preparación de muestras del extracto hexánico para electroforesis capilar**

200 µL de la fase de acetato de etilo + 800 µL de buffer de fosfatos/sds pH 2, sonicar.

200 µL de la fase de acetato de etilo + 800 µL de buffer de fosfatos/sds pH 5, sonicar.

200 µL de la fase de acetato de etilo + 800 µL de buffer de boratos/sds pH 9, sonicar.

Filtrar cada muestra en membrana Durapore® de 0,45 µm y sonicar antes de introducirlas al equipo

**Nota: Se debe observar que las muestras se encuentren bien homogeneizadas y procurar que los marcadores del flujo electroosmótico no estén presentes en un porcentaje mayor del 30 % en la muestra.**

Condiciones del equipo: Inyección hidrodinámica (presión: 1.0 psi, duración: 10,0 seg), separación (Voltaje: 20.0 kV, duración: 60 seg, polaridad: normal, detector: arreglo de diodos UV-Vis).

**Las lecturas se realizan por triplicado, para hacer el análisis estadístico correspondiente. (Ver Anexo 1).**

**Realizar la misma metodología experimental para *Tagetes erecta*.**

**Realizar pruebas fitoquímicas a los extractos purificados de *Calendula officinalis* para los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, saponinas, triterpenos, flavonoides y taninos para verificar su existencia. (Ver Anexo 3).**

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La disolución de una sustancia en un disolvente está determinada por la energía de interacción existente entre los átomos o moléculas del soluto y las del disolvente. Esta energía de interacción será tanto mayor cuanto más parecidas sean las estructuras del soluto y del disolvente. Un soluto se disuelve en aquel disolvente que tenga una estructura parecida a la de ella; en otras palabras la polaridad de un soluto corre pareja con la del disolvente en el cual es soluble.

Por lo que la solubilidad en disolventes de polaridad intermedia, tal como etanol, permite pensar en la presencia de solutos orgánicos de carácter relativamente polar, tales como ácidos orgánicos.<sup>9</sup> En cambio el agua es una molécula altamente polar por lo que va a disolver moléculas muy polares.<sup>50</sup> Por lo tanto diremos que el extracto va a estar constituido de compuestos de polaridad intermedia hasta de compuestos de alta polaridad, hablando en este caso del extracto etanólico. Se puede decir entonces, que el extracto acetónico posee compuestos de mediana polaridad y el extracto hexánico consta de compuestos apolares.

Se realiza la filtración de los extractos etanólico, acetónico y hexánico en papel Whatman No. 2 por decantación, para eliminar residuos sólidos de tamaño considerable.<sup>22</sup> Los extractos etanólico, acetónico y hexánico se concentran a presión reducida, para eliminar la mayor cantidad de disolvente,<sup>10</sup> teniendo la precaución de que no precipite, pues nos interesa que todos los metabolitos se encuentren solubles. Los extractos obtenidos arrastran múltiples impurezas, por ello, una vez separado el extracto de los restos sólidos de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* respectivamente se requiere una purificación. En este caso la naturaleza de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* es vegetal, por lo que cede a los extractos gran cantidad de pigmentos y grasas, que es preciso eliminar. Otras sustancias que interfieren son las ptomainas o bases putrefactivas que han dado históricas disputas toxicológicas por su similitud química con los alcaloides. Dichas sustancias son aminas producidas por la descarboxilación de aminoácidos durante la putrefacción de las materias protéicas; por ello han sido denominados alcaloides animales o alcaloides de la

putrefacción. La purificación del extracto se basó en el reparto diferencial en mezcla de disolventes, es decir mediante una extracción líquido-líquido.<sup>38</sup> La purificación del extracto etanólico se llevó a cabo con hexano,<sup>3</sup> mientras que la purificación del extracto acetónico se lleva a cabo con éter etílico y diclorometano. Ahora bien, en el caso del diclorometano puede haber cloruro de cianógeno, que produce compuestos cianos y los peróxidos en el éter pueden oxidar los compuestos que se extraen, por lo tanto se omite la purificación del extracto. La purificación del extracto hexánico se lleva a cabo con etanol como lo mencionamos anteriormente.<sup>38</sup>

Enseguida para llevar a cabo el análisis electroforético, las muestras etanólicas, acetónicas y hexánicas se filtran a través de una membrana Durapore® 0,45 µm, para proteger al equipo de precipitados y material sólido.<sup>20</sup> La finalidad de realizar la sonicación es para desgasificar la muestra.

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 2

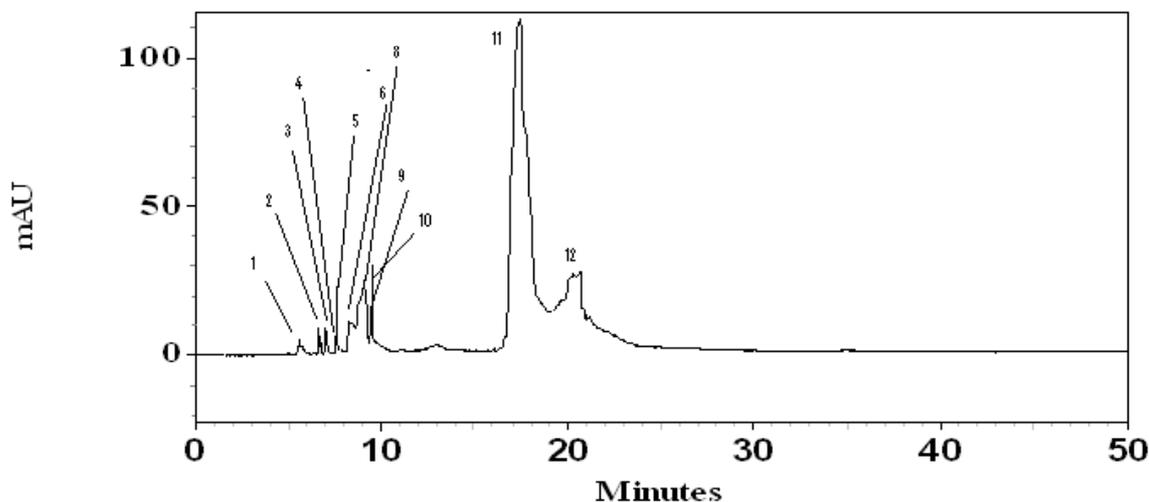


Fig.6 Electroferograma de *Calendula officinalis*

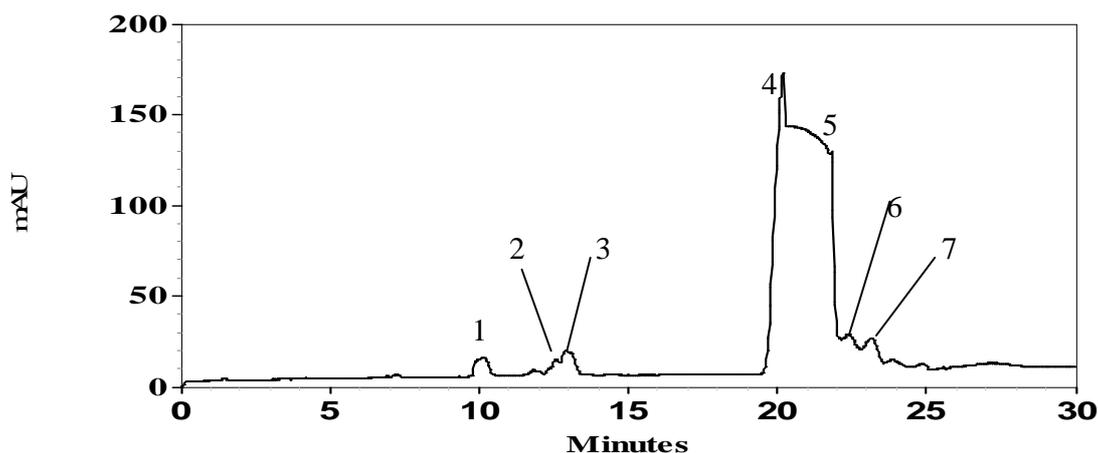


Fig. 7 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Como se mencionó anteriormente que los compuestos catiónicos son los primeros en registrarse antes que el flujo electroosmótico, en este electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 6) observamos la presencia de diez compuestos catiónicos, los compuestos que se registran primero tienen una carga más grande y un tamaño más pequeño que los que se registran al último. En el análisis fitoquímico del extracto etanólico (anexo 3, tabla 31) se detectó la presencia de flavonoides, por ejemplo; isorhamnetina 3-O glucósido, isorhamnetina, rutinósido, quercetina glucósido, kaemferol, etc. Que han sido reportados en trabajos sobre *Calendula officinalis*, estos compuestos tienen algo en común, un oxígeno en

el heterociclo, el cual en medio ácido, en este caso a pH 2 se cree que se encuentre protonado al igual que los oxígenos de los enlaces O-glicosídicos, contribuyendo así a la carga de la molécula. Se habla también de la presencia de taninos, los cuales pueden presentarse en su forma hidrolizada ó condensada, caracterizándose también por los enlaces O-glicosídicos y el oxígeno en el heterociclo. Además se identificaron saponinas en el extracto etanólico, las cuales presentan enlaces O-glicosídicos y oxígenos formando parte del heterociclo en su estructura, estos igualmente logran protonarse, se piensa que estos se registran después que los flavonoides y taninos debido a que tienen un mayor tamaño estructural.

Comparando los electroferogramas de las dos plantas, se observa la cantidad de ocho picos; los primeros cuatro pertenecen a compuestos catiónicos, enseguida el quinto que corresponde al flujo electroosmótico y por último se llega a observar dos picos que salen después del flujo electroosmótico en *Tagetes erecta* (fig.7). Sin embargo en *Calendula officinalis* (fig. 6) se aprecian 11 picos, de igual manera los primeros diez pertenecen a compuestos catiónicos y el último al flujo electroosmótico. En ambos electroferogramas el flujo electroosmótico se ve afectado por diferentes variables, por lo que presenta diferencias en el tiempo de migración de cada analito, por ejemplo el flujo electroosmótico en *Calendula officinalis* se registra en 20,4485, mientras que en *Tagetes erecta* lo hace en 20,9438. En este trabajo uno de los objetivos es comparar los electroferogramas de cada respectiva planta a las mismas condiciones de trabajo, por lo dicho anteriormente sobre el flujo electroosmótico no se recomienda comparar los tiempos de migración de cada pico o los espectros de absorción, si no de usar la movilidad electroforética o el factor de retención, como un dato más seguro. Por lo tanto se deduce que el pico ocho de *Calendula officinalis* con  $\mu_{ef}$  media de 8,5311 m<sup>2</sup>/V.s es muy semejante al pico uno de *Tagetes erecta* con  $\mu_{ef}$  media de 7,7656 m<sup>2</sup>/V.s, pero realizando los cálculos estadísticos de contraste de significación, se rechaza que presentan una  $\mu_{ef}$  media igual para P(0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01), debido a que t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza para cada probabilidad. Sin embargo el pico nueve de *Calendula officinalis*, que presenta una  $\mu_{ef}$  media de 7,9443 m<sup>2</sup>/V.s comparándolo con el pico uno de *Tagetes erecta* con un valor de  $\mu_{ef}$  media de 7,7656 m<sup>2</sup>/V.s, se comprueba que existe evidencia para aceptar que presentan  $\mu_{ef}$

media iguales para P(0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01), a consecuencia de que ahora  $t$  calculada cae dentro del intervalo de confianza para cada caso. Enseguida se compara nuevamente el pico nueve de *Calendula officinalis* con  $\mu_{ef}$  media de 7,7443 m<sup>2</sup>/V.s con el pico dos de *Tagetes erecta* que presenta  $\mu_{ef}$  media de 6,1819 m<sup>2</sup>/V.s, negando que tengan una  $\mu_{ef}$  media igual, porque  $t$  calculada se localiza fuera del intervalo de confianza para P(0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01). Finalmente se compara el pico 10 de *Calendula officinalis* con  $\mu_{ef}$  media de 1,2931 m<sup>2</sup>/V.s y el pico cinco de *Tagetes erecta* con  $\mu_{ef}$  media de 0,2649 m<sup>2</sup>/V.s, habiendo suficiente evidencia para rechazar que la  $\mu_{ef}$  media es diferente, esto a consecuencia de que  $t$  calculada esta exageradamente retirada del intervalo de confianza, debido a que presenta un valor de 313,06. Deduciendo por lo tanto, que la semejanza entre *Tagetes erecta* y *Calendula officinalis* se encuentra en el pico 9, pero los picos 1-8 y 10 de *Calendula officinalis* son los que la diferencian de *Tagetes erecta*. (Ver Anexo 1, Tabla 2 y 3 y Anexo2, Tabla 28).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 2

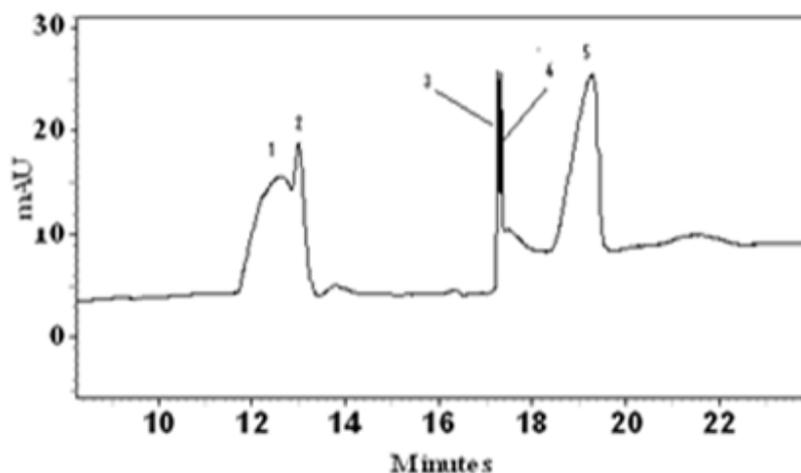


Fig. 8 Electroferograma de *Calendula officinalis*

El flujo electroosmótico se registra antes que las micelas, ya que estas presentan una menor velocidad debido a su carga negativa. La ventana de elución corresponde a un intervalo de tiempo entre el flujo electroosmótico ( $t_0$ ) y el tiempo que tarda en registrarse la micela ( $t_{mc}$ ), y el factor de retención dependerá de las características hidrofílicas o hidrofóbicas del compuesto. Sin embargo en el electroferograma de *Calendula officinalis*

(fig. 8), se observa la ausencia de compuestos neutros, ya que no se registra ningún compuesto después del flujo electroosmótico, pero si lo hacen antes de éste. Cuando un compuesto es totalmente soluble en el tampón eluye junto con el flujo electroosmótico correspondiéndole un valor de retención igual a cero, pero si eluye dentro de la ventana de elución tendrá valores de factor de retención de entre cero a uno, sin embargo aquellos que pasan el mismo tiempo en el tampón y en la micela tienen un factor de retención igual a uno, y por último aquellos que pasan más tiempo en la micela sus valores del factor de retención son mayores a uno. Los picos presentes en este electroferograma de *Calendula officinalis*, presentan valores de factor de retención negativos, demostrándose así que se tratan de compuestos catiónicos, que se logran separar por este método. El tiempo de migración del flujo electroosmótico es de 19,2598 minutos. (Ver Anexo 1, Tabla 4).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 5

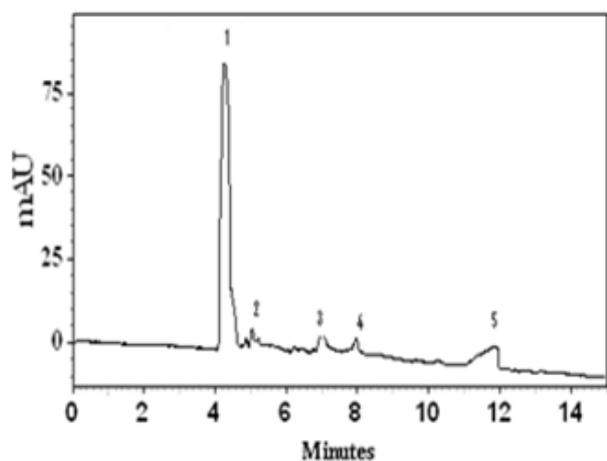


Fig. 9 Electroferograma de *Calendula officinalis*

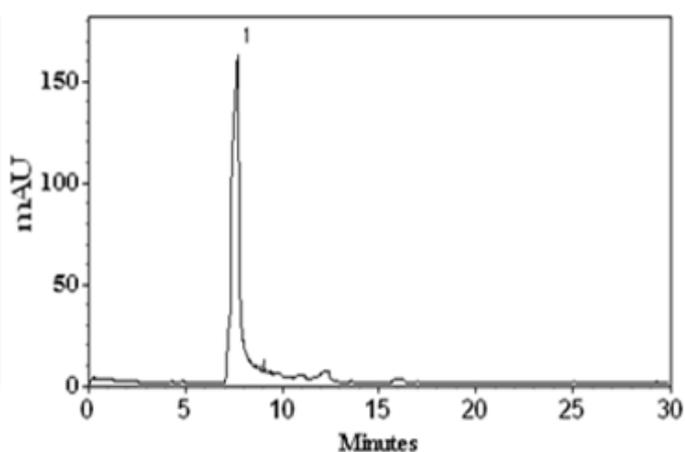


Fig. 10 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Basándonos en el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 9), debido a que el pH 5 es menos ácido que el pH 2, observamos que la velocidad del flujo electroosmótico es más rápido considerablemente ya que se registra en un tiempo mucho menor, además se puede apreciar la existencia de cuatro compuestos aniónicos, ya que estos se registran después del flujo electroosmótico. Los compuestos aniónicos podrían ser principalmente ácidos fenólicos presentes en *Calendula officinalis*, debido a que se ha reportado en

trabajos la existencia de estos en la misma, como por ejemplo; el ácido cafeico, vínilico, salicílico, sirínigico, etc. Se menciona esto, principalmente porque el grupo funcional carboxilo presente en su estructura, posee un valor de pKa entre 3-5, y por lo tanto a este pH el grupo carboxilo se encuentra en su forma aniónica, como ya mencionamos anteriormente se van a registrar primero los que tienen mayor carga, seguidos de los que presentan un menor tamaño estructural.

Lo que podríamos decir al comparar los electroferogramas de *Calendula officinalis* (fig. 9) y *Tagetes erecta* (fig. 10), es inicialmente que el flujo electroosmótico se registra en un tiempo menor en *Calendula officinalis* con un tiempo de 4,2420 minutos que en *Tagetes erecta*, que se registra en 7,6600 minutos, pero como ya lo expresamos antes, este varía por diferentes razones, asimismo en el electroferograma de *Calendula officinalis* se aprecia como ya lo comentamos precedentemente cuatro compuestos aniónicos, sin embargo en *Tagetes erecta* se observa la ausencia de estos, presentándose solamente el flujo electroosmótico. Finalmente comentamos que entre *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* no hay semejanza alguna, y los picos 2-5 son los que diferencian a *Calendula officinalis* de *Tagetes erecta*. (Ver Anexo 1, Tabla 5 y 6).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

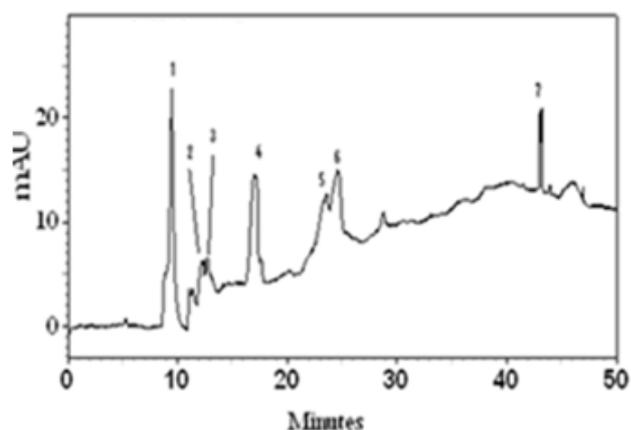


Fig 11. Electroferograma de *Calendula officinalis*

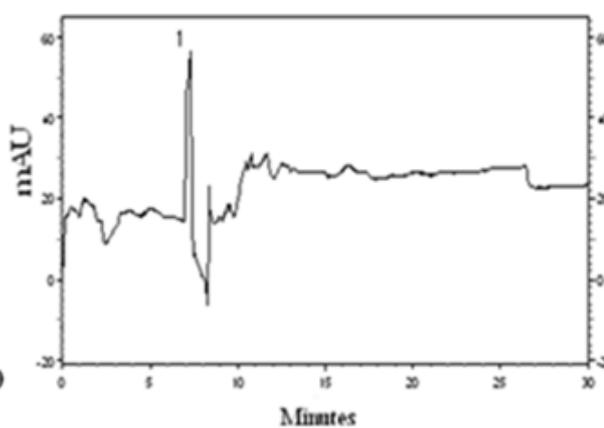


Fig. 12 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Refiriéndonos al electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 11) se percibe la presencia de seis compuestos neutros, que migran dependiendo de su reparto entre la fase

acuosa y la fase micelar, los cuales se registran primero los más hidrofílicos y enseguida los más hidrofóbicos. En este caso el flujo electroosmótico se registra primero que estos. Recordando al electroferograma de *Calendula officinalis* pH 2 por electroforesis capilar de zona, se observa que existen diez compuestos catiónicos, pero a pH cinco por electroforesis capilar de zona, hay una ausencia de compuestos catiónicos, por lo que se cree que este pH es insuficiente para mantenerlos protonados y se encuentren en este caso en su forma neutra.

Comparando el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 11) con el de *Tagetes erecta* (fig. 12), se observa que ahora el flujo electroosmótico en *Calendula officinalis* se registra en un tiempo de 9,5865 minutos, mientras que en *Tagetes erecta* lo hace en un tiempo de 7,2844 minutos, además se percibe en el electroferograma de *Tagetes erecta* una ausencia de compuestos neutros, mientras tanto en *Calendula officinalis* hay seis compuestos neutros, donde el pico dos y tres presentan un factor de retención de 0,2841 y 0,3278 respectivamente, que son valores menores a uno y por lo tanto pasan más tiempo en el tampón por ser más hidrofílicos, en cambio los demás picos presentan valores mayores a uno, por lo tanto son más hidrofóbicos por permanecer más tiempo en las micelas. Finalizando se comenta que los picos 2-7 presentes en el electroferograma de *Calendula officinalis* a estas condiciones de trabajo son los que diferencian a *Calendula officinalis* de *Tagetes erecta* y que no existe alguna semejanza entre ellas. (Ver Anexo 1, Tabla 7 y 8).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH=9

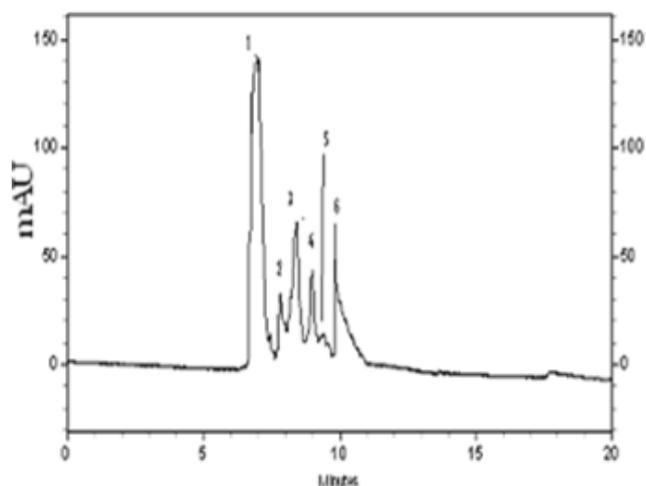


Fig. 13 Electroferograma de *Calendula officinalis*

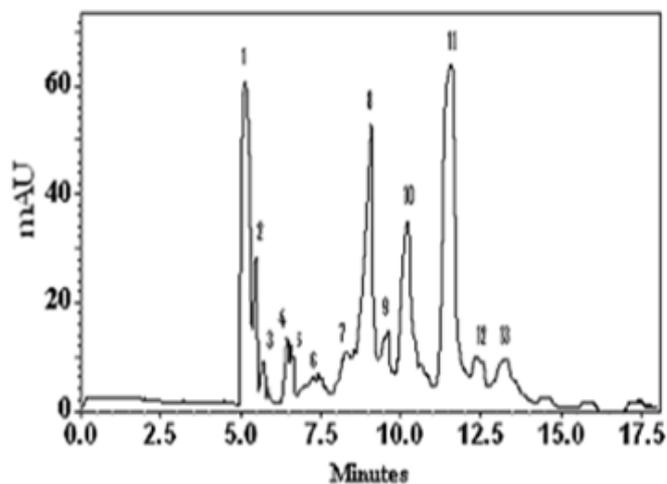


Fig. 14 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Analizando el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 13), se observa que se registran cinco compuestos en su forma aniónica, es decir con carga negativa, los cuales se registran después del flujo electroosmótico, que corresponde al pico número uno. Los compuestos aniónicos que se registran podrían ser principalmente ácidos fenólicos ya que se han reportado en *Calendula officinalis*, y se caracterizan por tener en su estructura un grupo carboxilo y grupos hidroxilo, se dice que el alcohol del ácido carboxílico es más ácido que el grupo hidroxilo del fenol, ya que el pKa del ácido carboxílico se encuentra entre los valores de 3-5, es decir que a pH 9 van a estar en su forma aniónica. Sin embargo los valores de pKa del grupo hidroxilo de un fenol se encuentra entre 8-10, los ácidos fenólicos como: el ácido gálico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido vanílico presentes en *Calendula officinalis*, poseen en su estructura 2 o 3 sustituyentes hidroxilos, los cuales gracias al oxígeno presente hacen que sea más electronegativo, aumentando así el efecto inductivo, por lo tanto el valor de pKa disminuye pensando que su valor podría ser menor de ocho, considerando de esta manera que los grupos hidroxilos estén cooperando con la carga negativa. Por otra parte se considera que algunos flavonoides estén en su forma aniónica, ya que contienen en su estructura bencenos sustituidos por grupos hidroxilos, presentando varias estructuras de resonancia, exhibiendo en este caso una molécula aniónica a pH nueve.<sup>19 y 44</sup>

Al relacionar los dos electroferogramas; nos damos cuenta de que el flujo electroosmótico varía en los dos casos, debido a que en el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 13) se registra en un tiempo de 6,9425 minutos y en el electroferograma de *Tagetes erecta* (fig. 14) lo hace en un tiempo de 5,1137 minutos. Los picos que tienen una  $\mu_{ef}$  muy similar son: el pico número dos de *Calendula officinalis* con una  $\mu_{ef}$  de -1,4957  $m^2/V.s$  y el pico número dos de *Tagetes erecta* con una  $\mu_{ef}$  de -1,8464  $m^2/V.s$ , no obstante, al realizar los cálculos estadísticos de contraste de significación para las probabilidades de: P(0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01), se rechaza la hipótesis de que la  $\mu_{ef}$  media del pico sea la misma para las dos plantas, debido a que t calculada tiene un valor de 20,10, y este cae fuera del intervalo de confianza para las cuatro probabilidades. Asimismo se hace la comparación entre el pico tres de *Calendula officinalis* con una  $\mu_{ef}$  de -2,4803  $m^2/V.s$  y el pico tres de *Tagetes erecta* con una  $\mu_{ef}$  de -2,8453  $m^2/V.s$ , rechazándose que tengan un valor de  $\mu_{ef}$  semejante, debido a que t calculada es igual a 20,73, localizándose fuera del intervalo de confianza para los cuatro tipos de probabilidad P(0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01). Igualmente comparamos el pico seis con un valor de  $\mu_{ef}$  igual a -6,3810  $m^2/V.s$  en *Calendula officinalis* y al pico cuatro con un valor de -6,1656  $m^2/V.s$  en su  $\mu_{ef}$  en *Tagetes erecta*, exhibiendo un valor de t calculada de -8,29, rechazando que tengan  $\mu_{ef}$  media similares para las probabilidades de P(0.1), P(0.05), P(0.02) por caer fuera del intervalo de confianza, sin embargo se acepta en el caso de P(0.01), por localizarse dentro del intervalo de confianza. Enseguida se vuelve a comparar el pico seis de *Calendula officinalis* con una  $\mu_{ef}$  de -6,3810  $m^2/V.s$  con el pico cinco de *Tagetes erecta* con  $\mu_{ef}$  de -6,4835  $m^2/V.s$ , obteniendo t calculada de 3,46, por lo tanto se rechaza que tengan  $\mu_{ef}$  media semejante para: P(0.1) y P(0.05), en cambio para P(0.02) y P(0.01) se acepta debido a que t calculada cae dentro del intervalo de confianza. Y por último se vuelve a comparar el pico seis de *Calendula officinalis* con  $\mu_{ef}$  de -6,3810  $m^2/V.s$  y al pico seis de *Tagetes erecta* con  $\mu_{ef}$  igual a 6,8564  $m^2/V.s$ , obteniendo una t calculada de 16,64, rechazándose para las probabilidades de (0.1), P(0.05), P(0.02) y P(0.01) afirmando que la  $\mu_{ef}$  media no es la misma para las dos plantas, porque t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. Comentando finalmente que los picos 2-4 de *Calendula officinalis* son los que la diferencian de *Tagetes erecta* y que no hay semejanzas entre ellas a estas condiciones de trabajo. (Ver Anexo 1, Tabla 9 y 10 y Anexo 2, Tabla 29).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9.

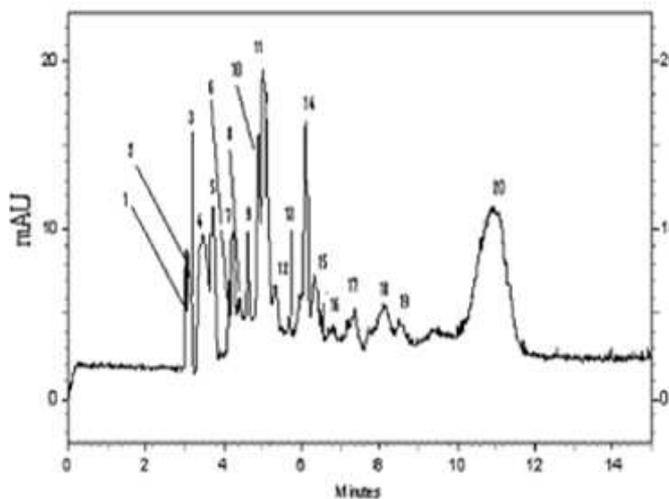


Fig. 15 Electroferograma de *Calendula officinalis*

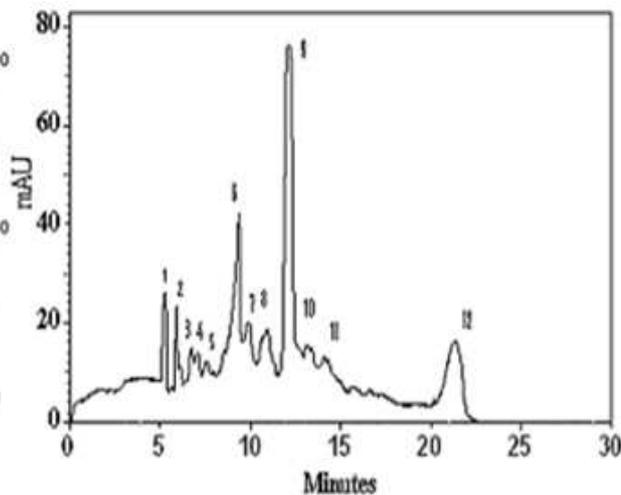


Fig. 16 Electroferograma de *Tagetes erecta*

En el electroferograma de *Calendula officinalis* (fi.15), se puede apreciar que se registran una mayor cantidad de compuestos químicos que se encuentran sin carga, es decir en su forma neutra. Se considera que estén presentes alcoholes alifáticos, además de algunos flavonoides que tengan en su estructura sustituciones no electronegativas. Estimando que las saponinas que tienen en su molécula unidades de glucosa, que se caracterizan por tener grupos hidroxilo, sin estructuras de resonancia, y por esta razón tenga un carácter menos ácido, además de que puedan existir alcoholes de cadena lineal o terpénoides, como por ejemplo carotenoides como las xantinas, algunos podrían ser la luteína, Zeaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, que se caracterizan por poseer uno ó más átomos de oxígeno en su estructura. Los compuestos neutros que presentan características hidrofílicas se encuentran antes del pico doce, pero el compuesto que pasa el mismo tiempo en la micela y en el tampón corresponde al pico catorce debido a que tiene un valor de factor de retención de uno, en cambio los compuestos que pasan más tiempo en la micela que en el tampón se encuentran desde el pico quince y por lo tanto son más hidrofóbicos.

Haciendo la comparación de los dos electroferogramas presentes de *Calendula officinalis* (fig. 15) y *Tagetes erecta* (fig. 16), se nota una mayor presencia de picos en *Calendula officinalis*, debido a que cuenta con veinte picos, en cambio en *Tagetes erecta* se logra apreciar doce picos, contándose el flujo electroosmótico en ambos casos. Con

respecto al flujo electroosmótico se observa que migra en un tiempo de 3,0387 minutos en *Calendula officinalis*, mientras que en *Tagetes erecta* lo hace en un tiempo mayor 5,2320 minutos. Haciendo las comparaciones de los factores de retención de las dos plantas nos damos cuenta que el pico dos de *Calendula officinalis* tiene un factor de retención de 0,1369 muy parecido al pico dos de *Tagetes erecta* con un factor de retención de 0,1341, obteniendo un valor de t calculada de 1,51, el cual se localiza dentro del intervalo de confianza para las probabilidades de P(0.10), P(0.05), P(0.02) y P(0.01), es así que diremos que el factor de retención medio de los dos picos es el mismo. Enseguida comparamos el pico cinco de *Calendula officinalis* con un valor de factor de retención igual a 0,2234 con el pico tres de *Tagetes erecta* que posee un factor de retención de 0,2789, consiguiéndose un valor de t calculada de 20,73, colocándose fuera del intervalo de confianza para las cuatro diferentes probabilidades P(0.10), P(0.05), P(0.02) y P(0.01), rechazando que la media del factor de retención sea la misma para las dos plantas. Después comparamos al pico seis de *Calendula officinalis* con un factor de retención de 0,3691 con el pico cuatro de *Tagetes erecta* con un valor de 0,3351, adquiriendo un valor de t calculada de 24,51, por lo tanto se vuelve a rechazar la media del factor de retención, pues no es la misma para los dos picos. Posteriormente se compara el pico ocho de *Calendula officinalis* con un factor de retención de 0,4576 y al pico cinco de *Tagetes erecta* con un valor de factor de retención igual a 0,4692, hallándose un valor de t calculada de -3,46, rechazándose para las probabilidades de P(0.10) y P(0.05) debido a que el valor se localiza fuera del intervalo de confianza y por tanto se considera que la media del factor de retención es diferente para las dos plantas, pero sí lo es para las probabilidades de P(0.02) y P(0.01) ya que t calculada se localiza dentro del intervalo de confianza, comentándose entonces que la media del factor de retención es la misma para las dos plantas. Luego se compara el pico 12 con un factor de retención de 0,7548 en *Calendula officinalis* y al pico seis de *Tagetes erecta* con un valor de factor de retención de 0,7949, logrando una t calculada de -10,12, por lo tanto para las cuatro probabilidades de P(0.10), P(0.05), P(0.02) y P(0.01) se sitúa fuera del intervalo de confianza, por consiguiente se rechaza que la media de factor de retención sean iguales. Posteriormente se compara el pico trece de *Calendula officinalis* con un valor de factor de retención de 0,9777 con el pico ocho de *Tagetes erecta* con un valor de factor de retención de 1,0872, resultando una t calculada de -39,89. Sin embargo este valor cae fuera del

intervalo de confianza para las probabilidades de  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , negándose que la media del factor de retención sea la misma para las dos plantas. Asimismo se compara el pico catorce de *Calendula officinalis* atribuyéndose un factor de retención de 1,0242 con el pico ocho de *Tagetes erecta* con un factor de retención de 1,0872, adquiriendo una  $t$  calculada de -19,49, por lo tanto se puede apreciar que este valor se localiza fuera del intervalo de confianza de las probabilidades de  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , significándose que la media del factor de retención es diferente para las dos plantas. A continuación se compara el pico quince con un factor de retención igual a 1,1142 de *Calendula officinalis* con el pico ocho de *Tagetes erecta* que posee un factor de retención de 1,872, estimándose con esto  $t$  calculada de 15,18, colocándose fuera del intervalo de confianza para los cuatro tipos de probabilidad  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , denotándose que la media del factor de retención para las dos plantas es diferente. De igual modo se hace la comparación del pico diecisiete de *Calendula officinalis* con un factor de retención igual a 1,4377 y el pico nueve de *Tagetes erecta* con un factor de retención de 1,3244, estimando una  $t$  calculada de 86,56, hallándose esta fuera del intervalo de confianza para  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , rechazando que la media del factor de retención sea semejante para las dos plantas. Proseguimos a comparar el pico dieciocho de *Calendula officinalis* con un factor de retención igual a 1,6863 encontrándose muy próximo al pico diez de *Tagetes erecta* con un factor de retención de 1,5507, obteniéndose así una  $t$  calculada con valor de 27,05 ubicándose fuera del intervalo de confianza de  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , considerándose que la media del factor de retención para las dos plantas no es la misma. Finalmente se compara el pico diecinueve de *Calendula officinalis* con factor de retención igual a 1,8358 y el pico once de *Tagetes erecta* con un factor de retención igual a 1,7096, surgiendo así el valor de  $t$  calculada de 23,55, notando que este valor aparece fuera del intervalo de confianza para  $P(0.10)$ ,  $P(0.05)$ ,  $P(0.02)$  y  $P(0.01)$ , considerando que la media del factor de retención es diferente para las dos plantas. Terminamos diciendo que los picos 2, 3, 5, 6, 7 y 9-20 de *Calendula officinalis* son los que la diferencian de *Tagetes erecta* y que las semejanzas se encuentran en el pico 4 y 8 de *Calendula officinalis*. (Ver Anexo 1, Tabla 11 y 12 y Anexo 2, Tabla 30).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH=2

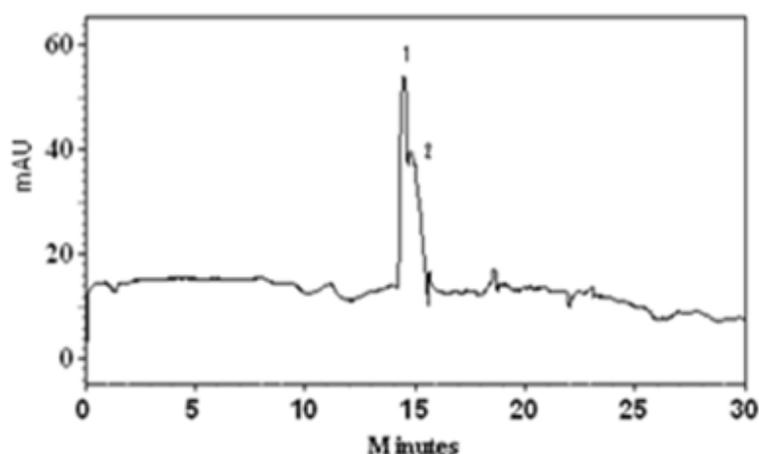


Fig. 17 Electroferograma de *Calendula officinalis*

En el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 17), se presenta la cantidad de dos picos que nos indica que el primero de ellos se trata de un compuesto catiónico, se cree que podría tratarse de la presencia de algún flavonoide el cual a pH 2 el oxígeno que está formando parte del heterociclo se llega a protonar, sin olvidar que las pruebas fitoquímicas (anexo 3, tabla 31) resultan positivas para flavonoides y taninos. No obstante al referirnos al electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 18) nos dice que existen 2 compuestos catiónicos y no sólo uno como se aprecia en el electroferograma de la fig. 17 lo que nos indica que ambos compuestos son indistinguibles por electroforesis capilar de zona, pero que al agregar las micelas se pueden resolver, pues las micelas en algunas ocasiones logran ayudar a separar compuestos que presenten la misma movilidad en electroforesis capilar de zona. El segundo pico corresponde al flujo electroosmótico que se registra en un tiempo de 14,8710 minutos, recordando lo que mencionamos anteriormente, este se registra después de los cationes. (Ver Anexo 1, Tabla 13).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=2

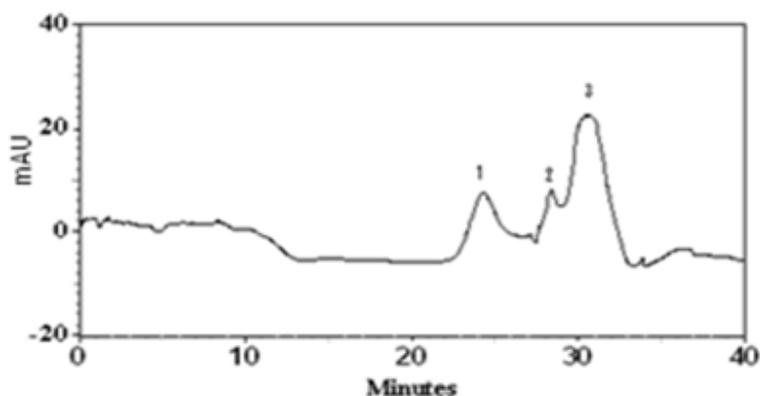


Fig. 18 Electroferograma de *Calendula officinalis*

Observamos en el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 18) que el flujo electrosmótico se registra en un tiempo de 30,8574 minutos, y después de este no se registran más picos, que corresponderían a compuestos neutros. Sin embargo se registran dos picos antes del flujo electrosmótico que corresponden a compuestos catiónicos. (Ver Anexo 1, Tabla 14).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH=5

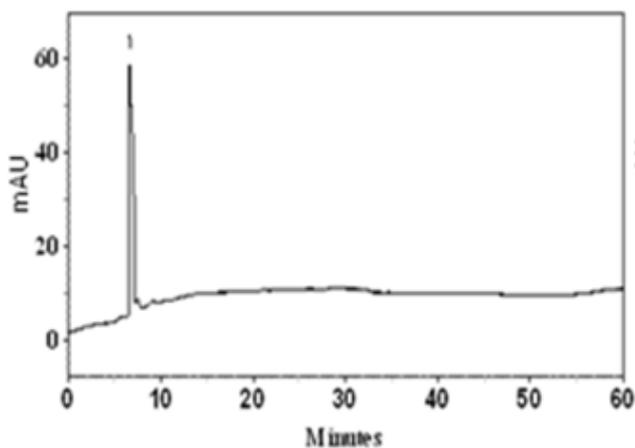


Fig. 19 Electroferograma de *Calendula officinalis*

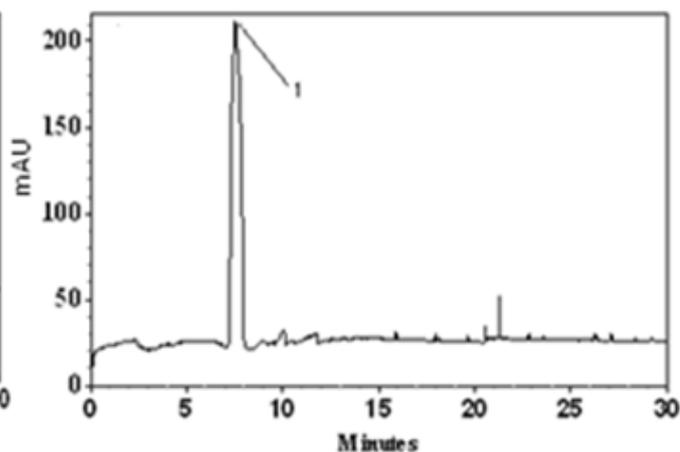


Fig. 20 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Basándonos en el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig.19), se observa que solo existe el flujo electrosmótico, careciendo de compuestos catiónicos y el pico que se registro a pH dos es incapaz de mantenerse protonado a pH cinco. Sin embargo al comparar este electroferograma con el de *Tagetes erecta* (fig. 20), nos damos cuenta que son muy

parecidos, debido a que en los dos electroferogramas solo se registra el flujo electroosmótico, en el electroferograma de *Calendula officinalis* se registra en un tiempo de 6,2307 minutos y en *Tagetes erecta* se registra en 7,5867 minutos. (Ver Anexo 1, Tabla 15 y 16)

Muestra del extracto acetónico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=5

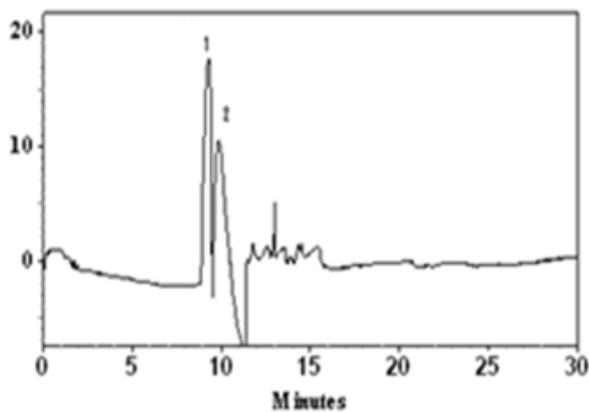


Fig. 21 Electroferograma de *Calendula officinalis*

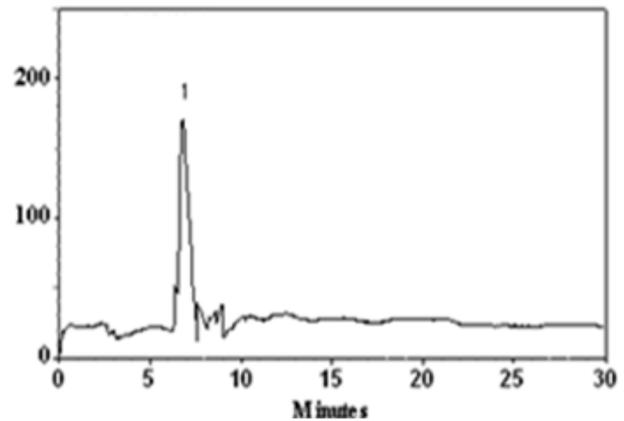


Fig. 22 Electroferograma de *Tagetes erecta*

A estas condiciones de trabajo, el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 21), presenta en primer lugar al flujo electroosmótico en 9,3818 minutos y enseguida la presencia de un compuesto que se presenta sin carga, recordando que a este pH por electroforesis capilar de zona es insuficiente mantener al compuesto con carga positiva que se registra a pH dos, por lo tanto proponemos, que a este pH se encuentra en su forma neutra y por lo tanto se logra registrar por cromatografía capilar electrocinética micelar en esta forma. No obstante al comparar el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 21) con el de *Tagetes erecta* (fig. 22), se percibe que en *Tagetes erecta* solo se registra el flujo electroosmótico en un tiempo de 7,5867 minutos, por ello se manifiesta que el pico que migra después del flujo electroosmótico en *Calendula officinalis*, es el que lo diferencia de *Tagetes erecta*. (Ver Anexo 1, Tabla 17 y 18).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH=9

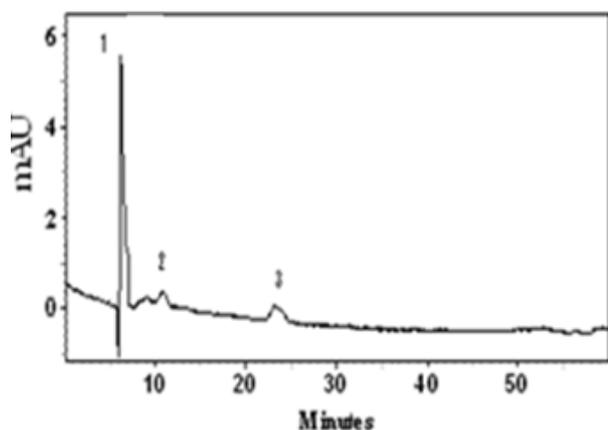


Fig. 23 Electroferograma de *Calendula officinalis*

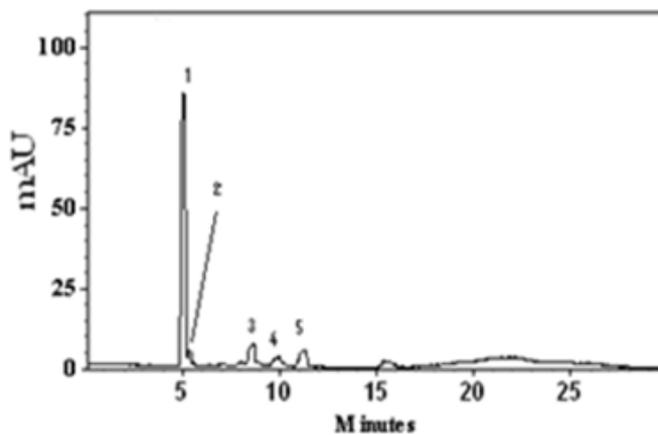


Fig 24 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Refiriéndose al electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 23) el flujo electroosmótico es el primero en registrarse, sin embargo después de este se logra apreciar la existencia de dos picos que pertenecen a dos compuestos aniónicos con una escasa concentración, creemos que pueden tratarse principalmente de algún tipo de flavonoide que se logra extraer con acetona.

Sin embargo al hacer la comparación de los dos electroferogramas, se ve que el flujo electroosmótico en *Calendula officinalis* se registra en un tiempo de 8,9959 minutos y en *Tagetes erecta* (fig. 24) lo hace en 6,8393 minutos. También se manifiesta que en *Tagetes erecta* presenta cuatro compuestos aniónicos, mientras como lo mencionamos anteriormente el de *Calendula officinalis* sólo presenta dos compuestos aniónicos. Finalmente se considera que los diferentes picos presentes en ambos electroferogramas tienen movilidades electroforéticas características, por lo tanto se manifiesta que los picos presentes en el electroferograma de *Calendula officinalis* son los que la diferencian de *Tagetes erecta*. (Ver Anexo 1, Tabla 19 y 20).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=9

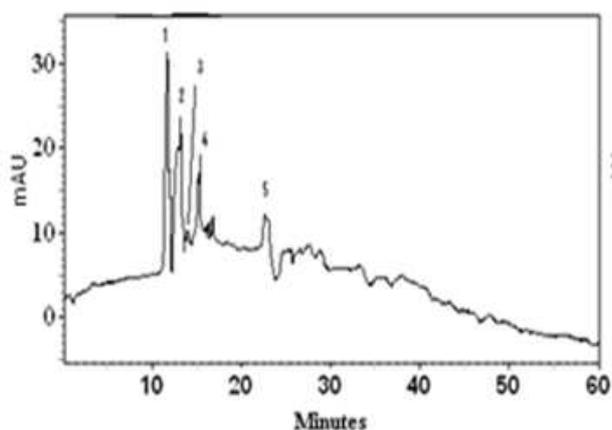


Fig. 25 Electroferograma de *Calendula officinalis*

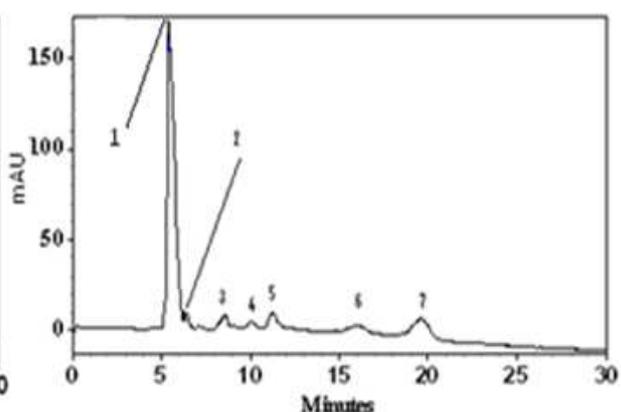


Fig. 26 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Se percibe en el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 25), que se registra en primera instancia el flujo electroosmótico, y en seguida se aprecia la existencia de cuatro compuestos neutros. Los pétalos de *Calendula officinalis* se caracterizan por poseer carotenoides, caracterizándose por sus grupos hidroxilos que están unidos a grupos alquilo sin resonancia, por lo tanto es muy difícil que pierda un hidrógeno, como consecuencia su pKa se encuentra a valores superiores de nueve, sin olvidar que los carotenos están presentes en esta planta y son las responsables del color, como también lo hacen algunos tipos de flavonoides.

Si comparamos el electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 25) con el de *Tagetes erecta* (fig. 26), percibimos que en el de *Calendula officinalis* el flujo electroosmótico tarda más tiempo en registrarse, pues lo hace en 11,7143 minutos, mientras que en *Tagetes erecta* se registra en 5,4442 minutos, además de que presenta seis compuestos neutros. Sin embargo los valores de retención de los picos de *Calendula officinalis* son los que la diferencian de *Tagetes erecta*. (Ver Anexo 1, Tabla 21 y 22).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 2

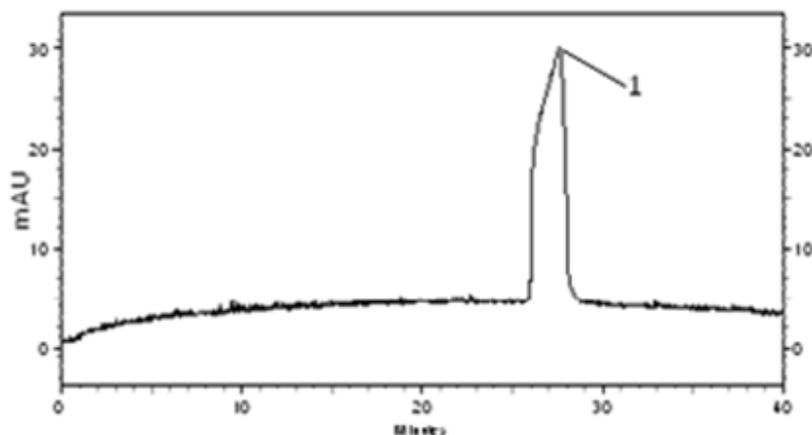


Fig. 27 Electroferograma de *Calendula officinalis*

Este electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 27) se caracteriza por presentar solamente al flujo electroosmótico que se registra en un tiempo de 27,8956 minutos, en este caso para marcar el tiempo del flujo electroosmótico se utilizó acetato de etilo, debido a que es el que solubiliza mejor los componentes químicos del extracto hexánico, además de solubilizarse con las micelas. Comparando el electroferograma con el extracto etanólico y acetónico por el mismo método, observamos que los compuestos que se registran son catiónicos, ya que se registran antes del flujo electroosmótico, y en las pruebas fitoquímicas (anexo 3, tabla 31) resultaban positivas para flavonoides, taninos y saponinas principalmente, mencionando que el oxígeno del heterociclo y del enlace O-glicósido se podría protonar a este pH, la mayoría de estos se registraban con el método de electroforesis capilar de zona, pero algunos de ellos lo hacían por el método de cromatografía capilar electrocinética micelar. Por lo tanto expresamos que en las pruebas fitoquímicas para el extracto hexánico resultó negativo para flavonoides, taninos y saponinas, sospechándose que estos compuestos químicos fueron extraídos cuando se realizó la purificación con etanol, dando como resultado que no se registre en el electroferograma algún compuesto neutro o catiónico por este método. (Ver Anexo 1, Tabla 23).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=5

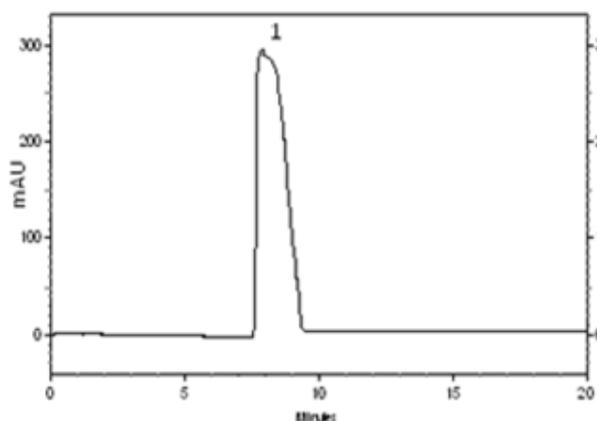


Fig. 28 Electroferograma de *Calendula officinalis*

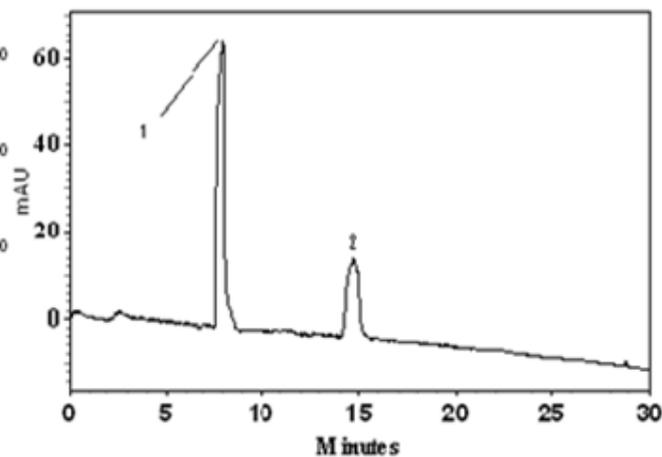


Fig. 29 Electroferograma de *Tagetes erecta*

Refiriéndonos al electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 28), se vuelve a observar que solo se registra el flujo electroosmótico en un tiempo de 7,8851 minutos. Sin embargo al compararlo con el electroferograma de *Tagetes erecta* (fig. 29), el flujo electroosmótico se registra en 8,0070 minutos, además existe un compuesto de naturaleza neutra. (Ver Anexo 1, Tabla 24 y 25).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=9

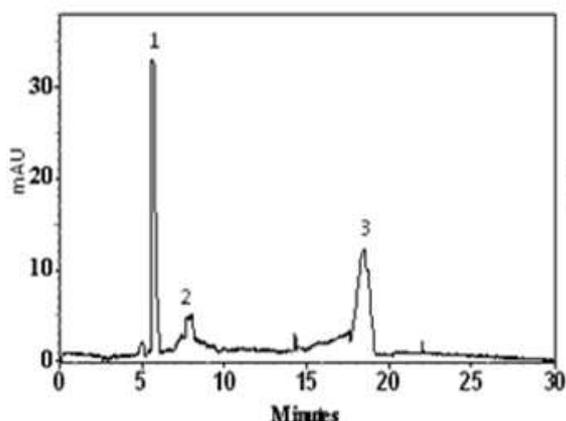


Fig. 30 Electroferograma de *Calendula officinalis*

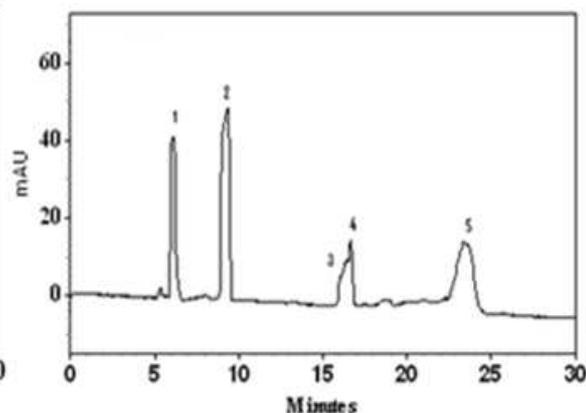


Fig. 31 Electroferograma de *Tagetes erecta*

El electroferograma de *Calendula officinalis* (fig. 30) nos muestra la presencia del flujo electroosmótico en un tiempo de 5,6463 minutos, también está acompañado de dos picos, que corresponden a compuestos neutros. Debido a que las pruebas fitoquímicas para este extracto resultaron negativas para flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas, pero resultaron positivas para triterpenos, se dice que podrían tratarse de algún tipo de alcoholes lineales y terpénicos, dialcoholes terpénicos, por ejemplo;  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, auroxantina, luteína, etc. Que son algunos tipos de carotenoides que se encuentran presentes en *Calendula officinalis*. Comparándolo con el electroferograma de *Tagetes erecta* (fig. 31) se aprecia que el flujo electroosmótico se registra en un tiempo después, pues hace su aparición en 6,0827 minutos, siendo acompañado de cuatro compuestos de naturaleza neutra, con factores de retención diferentes a comparación de *Calendula officinalis*. Finalmente se dice que los picos en *Calendula officinalis* que se llegan a registrar son los que la diferencian de *Tagetes erecta* y que no existe ninguna semejanza entre ellas a estas condiciones de trabajo. (Ver Anexo 1, Tabla 26 y 27).

**Tabla 1. Resultados de los extractos etanólico, acetónico y hexánico de *Calendula officinalis*.**

<b>Método</b>	<b>Extracto etanólico</b>	<b>Extracto acetónico</b>	<b>Extracto hexánico</b>
<b>CZE pH=2</b>	12	2	
<b>MECC pH=2</b>	5	3	1
<b>CZE pH=5</b>	5	1	
<b>MECC pH=5</b>	7	2	1
<b>CZE pH=9</b>	6	3	
<b>MECC pH=9</b>	20	5	3
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>16</b>	<b>5</b>

## 11. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos de los extractos de *Calendula officinalis* mediante los dos métodos propuestos a diferentes pH's.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 1), concluimos que el mejor disolvente de extracción es el etanol, por registrarse la cantidad total de 55 especies químicas, por CZE y MECC a los tres diferentes pH's.

El pH óptimo para llevar a cabo el análisis electroforético para la identificación de *Calendula officinalis*, se consigue a pH 9 para los tres extractos, debido a que se logran detectar 26 especies químicas, (6 por CZE y 20 por MECC) en el extracto etanólico, 8 especies químicas, (3 por CZE y 5 por MECC) en el extracto acetónico y 3 especies químicas por MECC en el extracto hexánico.

Del presente trabajo se plantea que los métodos propuestos aquí, pueden ser una opción viable y barata de hacer la identificación de *Calendula officinalis* de entre otras que son parecidas a ella como *Tagetes erecta*, considerando algunas modificaciones y su optimización de ellos.

La técnica de electroforesis capilar aplicada a *Calendula officinalis* fue útil para separar una gran variedad de compuestos fitoquímicos, por medio de los dos métodos CZE y MECC. Ofreciendo principalmente ventajas de ser rápida y sensible. Brindando al trabajo preliminar la potencialidad de la técnica, al análisis de los componentes contenidos en los pétalos de *Calendula officinalis*, logrando detectar sustanciales diferencias en los electroferogramas.

Este trabajo propone realizar en estudios posteriores la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar.



## ANEXO # 1

### Análisis estadístico de los picos en *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta*.

Movilidad electroosmótica:

$$\mu_{eo} = \frac{v_{neutra}}{E} = \frac{L_d/t_{neutro}}{V/L_t}$$

Movilidad aparente:

$$\mu_{ap} = \frac{v_{neta}}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_t}$$

Donde:

$L_d$  = longitud de la columna desde la inyección al detector.

$L_t$  = longitud total de la columna de un extremo a otro.

$V$  = voltaje aplicado entre los dos extremos.

$t$  = tiempo necesario para que un soluto migre desde el extremo de inyección hasta el detector.

$t_{neutro}$  = tiempo necesario para que el marcador de flujo migre desde el extremo de inyección hasta el detector.

$$\mu_{ep} = \mu_{ap} - \mu_{eo}$$

Factor de retención:

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o \left(1 - \frac{t_r}{t_{mc}}\right)}$$

Donde:

$k$  = factor de retención.

$t_r$  = tiempo de retención de las especies neutras.

$t_o$  = tiempo de migración del flujo electroosmótico.

$t_{mc}$  = tiempo de migración de la micela.

La media,  $\bar{x}$  de las medidas viene dado por:  $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

Desviación estándar,  $s$ , de  $n$  medidas viene dada por:  $S = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Varianza: el cuadrado de la desviación estándar,  $s^2$

Coefficiente de variación:  $100 \left(\frac{s}{\bar{x}}\right)$

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 2

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ $\mu_{eo}$	$\bar{x}$ $\mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	5,6184		19,3622	0,0123	0,0001	0,0637
2	6,6272		15,2984	0,0179	0,0003	0,1171
3	6,7192		14,9884	0,0162	0,0002	0,1082
4	7,0159		14,0445	0,0574	0,0033	0,4089
5	7,0535		13,9311	0,1434	0,0206	1,0298
6	7,5913		12,4240	0,0526	0,0028	0,4234
7	9,1234		9,1060	0,0838	0,0070	0,9206
8	9,4541		8,5311	0,1084	0,0118	1,2715
9	9,8168		7,9443	0,0124	0,0001	0,1569
10	17,3841		1,2931	0,0056	$3,15 \times 10^5$	0,4344
11	20,4485	7,3355		0,0050	$2,56 \times 10^5$	0,0688

**Tabla 2:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 2

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ $\mu_{eo}$	$\bar{x}$ $\mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	10,0489		7,7656	0,1287	0,0165	1,6579
2	11,2414		6,1819	0,0981	0,0096	1,5881
3	11,5521		5,8226	0,0435	0,0018	0,7483
4	12,7367		4,6155	0,1057	0,0111	2,2915
5	20,1965		0,2649	0,0010	1,0402	0,3849
6	20,9438	7,1621		0,0260	0,0006	0,3636
7	22,3625		-0,4544	0,0026	$7,14 \times 10^6$	-0,5879
8	26,5501		-1,5123	0,0187	0,0003	-1,2415

**Tabla 3:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH=2

No. Picos	$\bar{x}t_r$	$\bar{x}t_o$	$\bar{x}k$	s	$s^2$	C.V.
1		19,2598		0,0448	0,0020	0,2326
2	12,5833		-0,3510	0,0016	$2,48 \times 10^{-6}$	-0,4488
3	12,9989		-0,3293	0,0003	$7,03 \times 10^{-8}$	-0,0805
4	17,2698		-0,1051	0,0004	$1,61 \times 10^{-7}$	-0,3822
5	17,3374		-0,1016	0,0019	$3,55 \times 10^{-6}$	-1,8558

**Tabla 4:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	4,2420	35,3607		0,1601	0,0256	0,4528
2	4,9755		-5,2128	0,0557	0,0031	-1,0686
3	6,4985		-12,2783	0,0279	0,0008	-0,2271
4	8,0214		-16,6602	0,1141	0,0130	-0,6852
5	11,9564		-22,8149	0,0396	0,0016	-0,1737

**Tabla 5:** Movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, velocidad electroforética  $v_{ef}$  (cm.s<sup>-1</sup>), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	s	$s^2$	C.V.
1	7,6600	19,5822	0,0152	0,0002	0,0777

**Tabla 6:** Movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} t_o$	$\bar{x} k$	s	$s^2$	C.V.
1		9,5865		0,0261	0,0007	0,2723
2	12,2765		0,2841	0,0042	1,79x10 <sup>-5</sup>	1,4891
3	12,6897		0,3278	0,0006	3,14x10 <sup>-7</sup>	0,1708
4	23,4876		1,4849	0,0026	6,62x10 <sup>-6</sup>	0,1733
5	24,5623		1,6015	0,0020	4,19x10 <sup>-6</sup>	0,1278
6	27,3454		1,9045	0,0044	1,93x10 <sup>-5</sup>	0,2308
7	42,7865		3,6179	0,0017	3,04x10 <sup>-6</sup>	0,0482

**Tabla 7:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electrosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x} t_o$	s	$s^2$	C.V.
1	7,2844	0,0356	0,0013	0,4887

**Tabla 8:** Tiempo del flujo electrosmótico  $t_o$  (minutos), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	6,9425	21,6078		0,2421	0,0586	1,1203
2	7,4582		-1,4957	0,0181	0,0003	-1,2094
3	7,8421		-2,4803	0,0002	$5,95 \times 10^{-8}$	-0,0098
4	8,4213		-3,7959	0,0161	0,0003	-0,4250
5	9,0212		-4,9803	0,0405	0,0016	-0,8146
6	9,8511		-6,3810	0,0424	0,0018	-0,6644

**Tabla 9:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	5,1137	29,3330		0,0609	0,0037	0,2077
2	5,4572		-1,8464	0,0242	0,0006	-1,3126
3	5,6630		-2,8453	0,0305	0,0009	-1,0711
4	6,4746		-6,1656	0,0150	0,0002	-0,2434
5	6,5647		-6,4835	0,0279	0,0008	-0,4313
6	6,6736		-6,8564	0,0255	0,0006	-0,3716
7	8,3020		-11,2651	0,0313	0,0009	-0,2780
8	9,0897		-12,8300	0,1457	0,0212	-1,1354
9	9,5703		-13,6595	0,0187	0,0003	-0,1372
10	10,0497		-14,4057	0,1828	0,0334	-1,2691
11	11,5577		-16,3546	0,0223	0,0005	-0,1362
12	12,4490		-17,2839	0,0074	$5,49 \times 10^{-5}$	-0,0428
13	13,2716		-18,0307	0,0028	$7,88 \times 10^{-6}$	-0,0155

**Tabla 10:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ t <sub>o</sub>	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		3,0387		0,0461	0,0021	1,5190
2	3,0782		0,0130	6,60x10 <sup>-5</sup>	4,36x10 <sup>-9</sup>	0,5063
3	3,1333		0,0312	0,0002	5,34x10 <sup>-8</sup>	0,7400
4	3,4532		0,1369	0,0027	7,78x10 <sup>-6</sup>	2,0381
5	3,7150		0,2234	0,0018	3,49x10 <sup>-6</sup>	0,8369
6	4,1558		0,3691	0,0024	5,93x10 <sup>-6</sup>	0,6598
7	4,2598		0,4035	0,0083	6,88x10 <sup>-5</sup>	2,0554
8	4,4232		0,4576	0,0043	1,84x10 <sup>-5</sup>	0,9371
9	4,6213		0,5232	0,0026	6,89x10 <sup>-6</sup>	0,5020
10	4,9191		0,6219	0,0024	5,85x10 <sup>-6</sup>	0,3890
11	5,0696		0,6717	0,0030	9,10x10 <sup>-6</sup>	0,4490
12	5,3200		0,7548	0,0035	1,25x10 <sup>-5</sup>	0,4680
13	5,9918		0,9776	0,0044	1,91x10 <sup>-5</sup>	0,4467
14	6,1319		1,0242	0,0053	2,80x10 <sup>-5</sup>	0,5169
15	6,4029		1,1142	0,0025	6,13x10 <sup>-6</sup>	0,2222
16	6,8153		1,2513	0,0003	1,07x10 <sup>-7</sup>	0,0261
17	7,3752		1,4377	0,0017	2,81x10 <sup>-6</sup>	0,1167
18	8,1212		1,6863	0,0022	5,03x10 <sup>-6</sup>	0,1330
19	8,5696		1,8358	0,0090	8,18x10 <sup>-5</sup>	0,4927
20	10,9396		2,6288	0,0010	1,01x10 <sup>-6</sup>	0,0383

**Tabla 11:** Tiempo de retención del soluto t<sub>r</sub> (minutos), tiempo del flujo electroosmótico t<sub>o</sub> (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto etanólico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ t <sub>o</sub>	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		5,2390		0,0241	0,0006	0,4600
2	5,9372		0,1341	0,0018	3,30x10 <sup>-6</sup>	1,3549
3	6,6903		0,2789	0,0001	1,07x10 <sup>-8</sup>	0,0365
4	6,9824		0,3351	0,0002	3,37x10 <sup>-8</sup>	0,0548
5	7,6784		0,4692	0,0039	1,51x10 <sup>-5</sup>	0,8281
6	9,3647		0,7949	0,0059	3,53x10 <sup>-5</sup>	0,7472
7	9,8872		0,8961	0,0018	3,28x10 <sup>-6</sup>	0,2022
8	10,8731		1,0872	0,0018	3,38x10 <sup>-6</sup>	0,1692
9	12,0939		1,3244	0,0015	2,34x10 <sup>-6</sup>	0,1154
10	13,2554		1,5507	0,0084	7,05x10 <sup>-5</sup>	0,5414
11	14,0697		1,7096	0,0022	5,09x10 <sup>-6</sup>	0,1320
12	21,2147		3,1155	0,0001	1,53x10 <sup>-8</sup>	0,0039

**Tabla 12:** Tiempo de retención del soluto t<sub>r</sub> (minutos), tiempo del flujo electroosmótico t<sub>o</sub> (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 2

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	s	$s^2$	C.V.
1	14,5696		0,2086	0,0010	$9,94 \times 10^{-7}$	0,4778
2	14,8710	10,0867		0,0165	0,0003	0,1633

**Tabla 13:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 2

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} t_o$	$\bar{x} k$	s	$s^2$	C.V.
1	24,2535		-0,2193	0,0004	$2,10 \times 10^{-7}$	-0,2092
2	28,5052		-0,0776	0,0019	$3,47 \times 10^{-6}$	-2,4015
3		30,8574		0,0132	0,0002	0,0428

**Tabla 14:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	s	$s^2$	C.V.
1	6,2307	24,0788	0,4015	0,1612	1,6673

**Tabla 15:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} \mu_{eo}$	s	$s^2$	C.V.
1	7,5867	19,7716	0,0639	0,0041	0,3232

**Tabla 16:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ )  $m^2/V.s$ , movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ )  $m^2/V.s$ , velocidad electroforética  $v_{ef}$  ( $cm.s^{-1}$ ), desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x} t_o$	$\bar{x} k$	s	$s^2$	C.V.
1		8,9959		0,0152	0,0002	0,1695
2	9,3818		0,0433	0,0009	$8,05 \times 10^{-7}$	2,0723

**Tabla 17:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza ( $s^2$ ), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ to	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1	6,8393	0,0426	0,0018	0,6229

**Tabla 18:** Tiempo del flujo electroosmótico  $t_0$  (minutos), desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por electroforesis capilar de zona pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ $\mu_{eo}$	$\bar{x}$ $\mu_{ef}$	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1	6,2307	24,0743		0,1345	0,0181	0,5586
2	11,2113		-10,6954	0,0193	0,0004	-0,1810
3	23,2722		-17,6288	0,0858	0,0074	-0,4867

**Tabla 19:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, velocidad electroforética  $v_{ef}$  (cm.s<sup>-1</sup>), desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Tagetes erecta* por electroforesis capilar de zona pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ $\mu_{eo}$	$\bar{x}$ $\mu_{ef}$	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1	5,0471	29,7236		0,4007	0,1606	1,3482
2	5,3559		-1,7171	0,0260	0,0007	-1,5129
3	8,5925		-12,2664	0,0620	0,0038	-0,5052
4	9,9034		-14,5773	0,0067	4,47x10 <sup>-5</sup>	-0,0459
5	11,2130		-16,3463	0,0276	0,0008	-0,1691

**Tabla 20:** Movilidad electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, movilidad electroforética ( $\mu_{ef}$ ) m<sup>2</sup>/V.s, velocidad electroforética  $v_{ef}$  (cm.s<sup>-1</sup>), desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ to	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		11,7143		0,0112	0,0001	0,0961
2	12,8927		0,1019	0,0019	3,63x10 <sup>-6</sup>	1,8694
3	13,1737		0,1262	0,0008	7,06x10 <sup>-7</sup>	0,6657
4	14,4693		0,2386	0,0013	1,75x10 <sup>-6</sup>	0,5544
5	15,3628		0,3163	0,0024	6,02x10 <sup>-6</sup>	0,7760
6	22,7175		0,9611	0,0012	1,54x10 <sup>-6</sup>	0,1293

**Tabla 21:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_0$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto acetónico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ to	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		5,4442		0,0364	0,0013	0,6695
2	6,1907		0,1379	0,0031	9,77x10 <sup>-6</sup>	2,2661
3	8,5803		0,5810	0,0003	1,13x10 <sup>-7</sup>	0,0578
4	10,0418		0,8531	0,0139	0,0002	1,6380
5	11,2267		1,0742	0,0023	5,15x10 <sup>-6</sup>	0,2113
6	16,0349		1,9770	0,0106	0,0001	0,5354
7	19,6556		2,6627	0,0037	1,38x10 <sup>-5</sup>	0,1396

**Tabla 22:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 2

No. Picos	$\bar{x}$ to	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1	27,8956	0,0064	4,10x10 <sup>-5</sup>	0,0230

**Tabla 23:** Tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos), desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ to	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1	7,8851	0,0175	0,0003	0,2219

**Tabla 24:** Tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos), desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto hexánico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 5

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ to	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		8,007		0,0230	0,0005	0,2879
2	14,7295		0,8521	0,0037	1,37x10 <sup>-5</sup>	0,4350

**Tabla 25:** Tiempo de retención del soluto  $t_r$  (minutos), tiempo del flujo electroosmótico  $t_o$  (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto hexánico de *Calendula officinalis* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ t <sub>o</sub>	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		5,6463		0,0064	4,11x10 <sup>-5</sup>	0,1135
2	7,8857		0,3998	0,0017	3,07x10 <sup>-7</sup>	0,4387
3	18,4056		2,3031	0,0031	9,95x10 <sup>-7</sup>	0,1370

**Tabla 26:** Tiempo de retención del soluto t<sub>r</sub> (minutos), tiempo del flujo electroosmótico t<sub>o</sub> (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

Extracto hexánico de *Tagetes erecta* por cromatografía capilar electrocinética micelar pH 9

No. Picos	$\bar{x}$ tiempo	$\bar{x}$ t <sub>o</sub>	$\bar{x}$ k	s	s <sup>2</sup>	C.V.
1		6,0827		0,0142	0,0002	0,2341
2	9,284		0,5312	0,0015	2,32x10 <sup>-6</sup>	0,2867
3	16,468		1,7359	0,0018	3,18x10 <sup>-6</sup>	0,1027
4	16,6266		1,7627	0,0015	2,19x10 <sup>-6</sup>	0,0839
5	23,406		2,9162	0,0014	2,01x10 <sup>-6</sup>	0,0487

**Tabla 27:** Tiempo de retención del soluto t<sub>r</sub> (minutos), tiempo del flujo electroosmótico t<sub>o</sub> (minutos) y k el factor de retención k, desviación estándar (s), varianza (s<sup>2</sup>), coeficiente de variación (C.V.).

## ANEXO No.2

### Contraste de significación

Los resultados de un método analítico nuevo se pueden contrastar mediante comparación con los obtenidos utilizando un segundo método (quizá uno de referencia). En este caso tenemos dos medias muestrales  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$ . Tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , se necesita probar si  $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$  difieren significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar,  $s$ , a partir de las dos desviaciones estándar individuales  $s_1$  y  $s_2$ . Para decidir si la diferencia entre las dos medias muestrales  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$ , es significativa, es decir para contrastar la hipótesis nula,  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ , se calcula el estadístico  $t$ :

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

donde  $s$  se calcula a partir de:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

y  $t$  tiene  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad.

Este método supone que las muestras se extraen de poblaciones con desviación estándar iguales.

Cuando sea poco probable que las desviaciones estándar de las poblaciones sean iguales, no es muy adecuado mezclar las desviaciones estándar muestrales para dar una estimación global o conjunto de la desviación estándar. Un método aproximado en estas circunstancias se propone a continuación. Para contrastar  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  cuando no puede suponerse que las dos muestras procedan de poblaciones con desviación estándar iguales, se calcula el estadístico  $t$  donde:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

Con grados de libertad:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{S_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{S_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

redondeándose el valor obtenido a un número entero<sup>31</sup>.

TABLA No. 27				
Desviación estándar significativamente diferente pH 2 CZE				
$t_4$	P (0,10)	P (0,05)	P (0,02)	P (0,01)
7,88	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 8,5311$ $S_1 = 0,1084$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 7,7656$ $S_2 = 0,1287$ $t = 3,89 \approx 4$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (3), obtenemos $t = 7,88$ y de la ec. (4) g.l. = $3,98 \approx 4$ . P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P (0,10)	P (0,05)	P (0,02)	P (0,01)
2,39	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 7,9443$ $S_1 = 0,0124$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 7,7656$ $S_2 = 0,1287$ $t = 2,04$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 2,39$ y de la ec. (2) g.l. = $2,04 \approx 2$ . P(0,10): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,05): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,02): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,01): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza.				
$t_2$	P (0,10)	P (0,05)	P (0,02)	P (0,01)
30,87	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 7,9443$ $S_1 = 0,0124$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 6,1819$ $S_2 = 0,0981$ $t = 2,06$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 30,87$ y de la ec. (2) g.l. = $2,06 \approx 2$ . P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P (0,10)	P (0,05)	P (0,02)	P (0,01)
313,06	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 1,2931$ $S_1 = 0,0056$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,2649$ $S_2 = 0,0010$ $t = 2,13$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 313,06$ y de la ec. (2) g.l. = $2,13 \approx 2$ . P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				

<b>TABLA No. 28</b>				
<b>Desviación estándar significativamente diferente pH 9 CZE</b>				
$t_4$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
20,10	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = -1,4957$ $S_1 = 0,0181$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = -1,8464$ $S_2 = 0,0242$ $t = 3,70$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 20,10$ y de la ec. (2) g.l. = $3,70 \approx 4$ P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
20,73	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = -2,4803$ $S_1 = 0,0002$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = -2,8453$ $S_2 = 0,0305$ $t = 2,00$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 20,73$ y de la ec. (2) g.l. = $2,00$ . P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
-8,29	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = -6,3810$ $S_1 = 0,0424$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = -6,1656$ $S_2 = 0,015$ $t = 2,49 \approx 2$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = -8,29$ y de la ec. (2) g.l. = $2,49$ . P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza.				
$t_4$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
3,49	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = -6,3810$ $S_1 = 0,0424$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = -6,4835$ $S_2 = 0,028$ $t = 3,46 \approx 3$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 3,49$ y de la ec. (2) g.l. = $3,46$ P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,02): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,01): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza.				

$t_3$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
16,64	2,35	3,18	4,54	5,84
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = -6,3810$ $S_1 = 0,0424$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = -6,8564$ $S_2 = 0,0255$ $t = 3,27 \approx 3$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 16,64$ y de la ec. (2) g.l. = 3,27. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				

<b>TABLA No. 29</b>				
<b>Desviación estándar significativamente diferente pH 9 MECC</b>				
$t_3$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
1,51	2,35	3,18	4,54	5,84
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,1369$ $S_1 = 0,0028$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,1340$ $S_2 = 0,0018$ $t = 3,41 \approx 3$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 1,51$ y de la ec. (2) g.l.= 3,41 P(0,10): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,05): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,02): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,01): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza.				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
20,73	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,2234$ $S_1 = 0,0019$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,2789$ $S_2 = 0,0001$ $t = 2,01 \approx 2$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 20,73$ y de la ec. (2) g.l.= 2,01. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
24,51	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,3691$ $S_1 = 0,0024$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,3351$ $S_2 = 0,0001$ $t = 2,00$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 24,51$ y de la ec. (2) g.l.= 2,00 P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_4$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
-3,46	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,4576$ $S_1 = 0,0043$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,4692$ $S_2 = 0,0039$ $t = 3,96 \approx 4$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = -3,46$ y de la ec. (2) g.l.= 3,96 P(0,10): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,05): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,02): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza. P(0,01): Se acepta la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa dentro del intervalo de confianza.				

$t_3$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
-10,12	2,35	3,18	4,54	5,84
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,7548$ $S_1 = 0,0035$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 0,7949$ $S_2 = 0,0059$ $t = 3,25 \approx 3$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = -10,12$ y de la ec. (2) g.l. = 3,25. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_3$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
-39,89	2,35	3,18	4,54	5,84
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 0,9777$ $S_1 = 0,0044$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 1,0872$ $S_2 = 0,0018$ $t = 2,65 \approx 3$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = -39,89$ y de la ec. (2) g.l. = 2,65. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
-19,49	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 1,0242$ $S_1 = 0,0053$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 1,0872$ $S_2 = 0,0018$ $t = 2,45 \approx 2$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = -19,49$ y de la ec. (2) g.l. = 2,45. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
$t_4$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
15,18	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$ $\bar{x}_1 = 1,1142$ $S_1 = 0,0025$ $n_2 = 3$ $\bar{x}_2 = 1,0872$ $S_2 = 0,0018$ $t = 3,63 \approx 4$ $H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas. $H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas. $H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ $H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$ Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 15,18$ y de la ec. (2) g.l. = 3,63. P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza. P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				

<b>Desviación estándar significativamente iguales pH 9 MECC</b>				
$t_4$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
86,56	2,13	2,78	3,75	4,60
$n_1 = 3$	$\bar{x}_1 = 1,4377$	$S_1 = 0,0017$		
$n_2 = 3$	$\bar{x}_2 = 1,3244$	$S_2 = 0,0015$		
$t = 4$				
$H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas.				
$H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas.				
$H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$				
$H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$				
Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 86,56$ y de la ec. (2) g.l.= 4.				
P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
<b>Desviación estándar significativamente diferente pH 9 MECC</b>				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
27,05	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$	$\bar{x}_1 = 1,6863$	$S_1 = 0,0022$		
$n_2 = 3$	$\bar{x}_2 = 1,5507$	$S_2 = 0,0084$		
$t = 2,27$				
$H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas.				
$H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas.				
$H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$				
$H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$				
Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 27,05$ y de la ec. (2) g.l.= 2,27.				
P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
<b>Desviación estándar significativamente iguales pH 9 MECC</b>				
$t_2$	P(0,10)	P(0,05)	P(0,02)	P(0,01)
23,55	2,92	4,30	6,96	9,92
$n_1 = 3$	$\bar{x}_1 = 1,8359$	$S_1 = 0,0090$		
$n_2 = 3$	$\bar{x}_2 = 1,7096$	$S_2 = 0,0023$		
$t = 2,26 \approx 2$				
$H_0 =$ La movilidad media del pico es la misma para las dos plantas.				
$H_1 =$ La movilidad media del pico es diferente para las dos plantas.				
$H_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$				
$H_1 = \mu_1 - \mu_2 \neq 0$				
Sustituyendo los valores en la ec. (1), obtenemos $t = 23,55$ y de la ec. (2) g.l.= 2,26.				
P(0,10): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,05): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,02): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				
P(0,01): Se rechaza la hipótesis nula, el valor de t calculada se sitúa fuera del intervalo de confianza.				

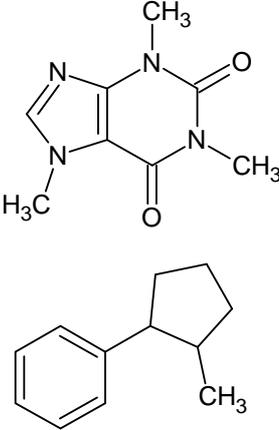
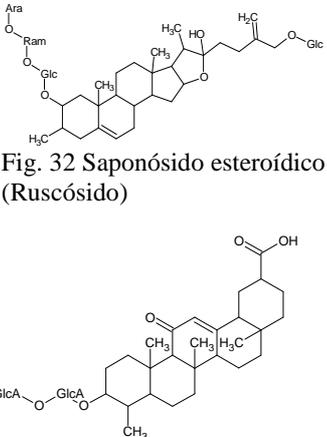
### **ANEXO No. 3**

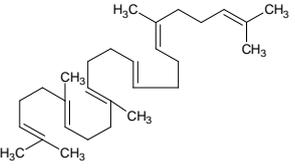
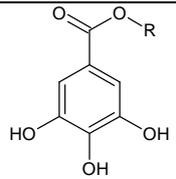
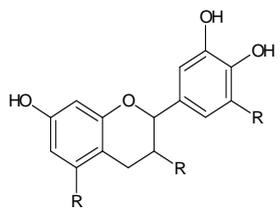
#### **Análisis fitoquímico**

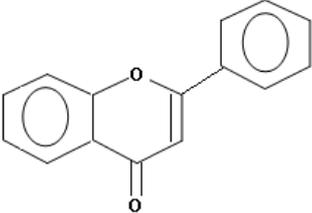
Las pruebas fitoquímicas son sencillas, sensibles, específicas y rápidas de realizar. Las reacciones de coloración y precipitación nos permiten observar la existencia de determinados compuestos químicos en las plantas. Estos ensayos fitoquímicos cualitativos se pueden realizar sobre la misma droga, entera o pulverizada, o sobre extractos a partir de la droga con diferentes disolventes. En este caso los disolventes utilizados son: etanólico, acetónico y hexánico.

Los principios activos existentes en las plantas medicinales provienen del metabolismo secundario y esos se encuentran en las drogas en porcentaje raramente superior al 1%, son por ello moléculas poco abundantes e inmersas en células vegetales junto a otras moléculas, muchas de las cuales presentan estructuras muy relacionadas. Por lo que la fitoquímica permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica.<sup>55</sup>

Debido a que se ha lidiado con bajas concentraciones de componentes, este trabajo no se dirige a la obtención de principios activos, sino al hecho de comprobar la existencia de algunos de ellos. Por lo que este análisis es fundamentalmente cualitativo y no cuantitativo.

Metabolito secundario	Características físicas y químicas	Acción farmacológica	Ejemplo de la estructura
Alcaloides	<p>Sustancias naturales de origen vegetal. Compuestos constituidos de N, C, H, O, y S. Actividad óptica. p.f. &lt; 200.</p> <p>Los alcaloides en su forma base son poco solubles en agua, mientras en forma de sal son hidrosolubles. Se dividen en 3 grupos: alcaloides verdaderos; con el nitrógeno heterocíclico y procedente de aminoácidos, protoalcaloides; son aminas simples con carácter básico, nitrógeno no heterocíclico y formado de aminoácidos, y pseudoalcaloides; propiedades idénticas a los alcaloides verdaderos, pero que no proceden de aminoácidos.<sup>12</sup></p> <p>Los alcaloides oxigenados, son sólidos de color blanco de sabores amargos y cristalizables, también son bases terciarias o sales de amonio cuaternario. Los alcaloides que se encuentran no oxigenados, son líquidos oleaginosos y volátiles con un olor característico y suelen poseer función de amina secundaria.<sup>23</sup></p>	<p>La actividad farmacológica de los alcaloides se da en dosis muy bajas. Son sustancias muy tóxicas. Debido a la gran cantidad de compuestos y a sus estructuras tan variadas sus aplicaciones son distintas. Son antifibrilantes, espasmolíticos, bloqueantes neuro-musculares, antimaláricos, anticancerígenos, actividad sedante, se utiliza en estados de ansiedad, insomnio,<sup>30</sup> antiinflamatorio, antipirética, antihiper glucémica, tienen efecto antiséptico intestinal de <i>Cryptolepis sanguinolenta</i> y <i>Mahonia aquifolium</i> y actividad antipsoriática y antihelmíntica en <i>Evodia rutaecarpa</i>, antiagregante plaquetaria en <i>Melicope confusa</i> y efecto antiséptico intestinal en <i>Corydalis pallida</i>,<sup>51</sup> antimicrobiano,<sup>34</sup> y citotóxica frente al carcinoma humano.<sup>45</sup></p>	 <p>Fig. 31 Ejemplos de alcaloides oxigenados (cafeína) y nitrogenados (nicotina)</p>
Saponinas	<p>Son heterósidos que constan de una parte glucídica (con 1 ó más azúcares) y de una genina (parte no glucídica), denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica, por tanto de carácter poco polar. Los azúcares más frecuentes son: la glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa y en los saponósidos triterpénicos es frecuente el ácido glucurónico.<sup>35</sup></p> <p>Saponinas triterpénicas (C<sub>30</sub>): (pentacíclicas y tetracíclicas). Las saponinas triterpénicas pentacíclicas son más frecuentes, sus grupos representativos son: β-amirina y α-amirina y lupeol. Las saponinas triterpénicas tetracíclicas, presentan la estructura básica del dammarano. Saponinas esteroídicas (C<sub>27</sub>): Las monodesmosídicas (en las que se une la parte azucarada por una sola posición).</p> <p>Las saponinas son solubles en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos de media y baja polaridad. Sin embargo, las geninas libres en agua no son solubles, pero sí en disolventes orgánicos apolares. Su principal propiedad física es que en solución acuosa son agentes tensoactivos, es decir, son capaces de formar espuma (poder afrógeno) y formar emulsiones. Son difíciles de cristalizar.</p>	<p>La acción farmacológica de las saponinas triterpénicas se basan en su poder protector de la pared vascular, venotónico, antiinflamatorio, cicatrizante, adaptógeno, expectorante, antitussivo, antiulceroso, adaptógeno, balsámico. Hablando de las saponinas esteroídicas, se utilizan como fuente de esteroides, venotónico, antihemorroidal, diurético.<sup>55</sup></p> <p>El poder hemolítico es característico de las saponinas triterpénicas, ya que interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos. La mayoría de las saponinas son icotóxicas, es decir, son tóxicas para animales de sangre fría, sobre todo para los peces.<sup>35</sup></p>	 <p>Fig. 32 Saponósido esteroídico (Ruscósido)</p> <p>Fig. 33 Saponósido triterpénico (Glicirricina).</p>

Metabolito secundario	Características físicas y químicas	Acción farmacológica	Ejemplo de la estructura
Triterpenos	<p>Son productos naturales cuya estructura consta de 30 C de seis unidades de isopreno.<sup>25</sup> Se distinguen cuatro clases: triterpenos de cadena abierta, triterpenos tricíclicos, triterpenos tetracíclicos y triterpenos pentacíclicos. El escualeno es un triterpeno de cadena abierta, considerado el precursor de los demás triterpenos y esteroides.<sup>40</sup></p> <p>Un ejemplo de los triterpenos tricíclicos es la ambreína, del ámbar de la ballena. Los triterpenos tetracíclicos son algo más abundantes, por ejemplo: el lanosterol. Los triterpenos pentacíclicos se encuentran muy difundidos entre las plantas, aparecen libres o combinados (como aglicones) con diversos azúcares, entre ellos tenemos la <math>\alpha</math>-amirina y el ácido oleanólico, principalmente de las hojas de olivo, corteza del guayaco y la remolacha.<sup>40 y 53</sup></p>	<p>A pesar de los limitados usos reportados para los triterpenos, se están haciendo investigaciones en esta línea y los resultados indican el gran potencial que tienen como drogas y posibles agroquímicos. En este sentido se puede mencionar la reconocida actividad antiinflamatoria del calenduladiol.<sup>41</sup></p>	 <p>Fig. 34 Escualeno</p>
Taninos	<p>Nombre común aplicado a varios productos vegetales, tanto amorfos como cristalinos. Tienen composiciones diferentes. Tienen un ligero olor característico y un color que va desde el amarillo al castaño oscuro. La exposición a la luz oscurece su color. Sabor amargo y astringentes, se disuelven con facilidad en agua, alcohol y acetona, pero son insolubles en benceno, éter o cloroformo. A 210°C se descomponen produciendo dióxido de carbono y pirogalol. La propiedad química que determina la mayoría de sus aplicaciones es la rápida precipitación que se produce al mezclarlos con albumina, gelatina, y con sales alcaloideas y metálicas.<sup>40</sup></p> <p>Los taninos vegetales se clasifican en dos grupos: Taninos hidrolizables; son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples, son más pequeños que los taninos condensados y se hidrolizan más fácilmente.<sup>52</sup> Los taninos condensados o catéquicos también conocidos como procianidinas o catéquicos, son polímeros aromáticos multihidroxilados, basados en una unidad flavonoide de 15 carbonos (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>), son conocidos por su amplia distribución en la naturaleza.<sup>42</sup></p>	<p>Se caracterizan por poseer acciones antidiarreicas, astringentes, cicatrizantes y hemostáticos.<sup>55</sup></p>	 <p>Fig. 35 Taninos hidrolizables</p>  <p>Fig. 36. Taninos condensados</p>

Metabolito secundario	Propiedades físicas y químicas	Acción farmacológica	Ejemplo de la estructura
Flavonoides	<p>Los flavonoides son pigmentos naturales presentes<sup>2</sup> en plantas superiores, principalmente en las partes aéreas: hojas, flores y frutos. Las principales familias que contienen flavonoides son: Rutáceas, Polygonáceas, Asteráceas y Umbelíferas.<sup>55</sup> Su nombre deriva del latín flavus: amarillo, dan colores a las flores.</p> <p>Los flavonoides son compuestos polifenólicos que presentan un esqueleto de 15C (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) de tipo 2-fenil benzopirona, compuesto de dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).<sup>6 y 21</sup></p> <p>Los flavonoides se encuentran ligados a moléculas de carbohidratos y se les denomina glicósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se les denomina agliconas flavonoides, los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos.</p> <p>La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de los sustituyentes presentes. Los glicósidos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las pocas hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en disolventes menos polares como éter de petróleo y cloroformo. Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos.<sup>45</sup></p> <p>Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C<sub>3</sub>. De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavanonas, isoflavona, chalconas, auronas, isoflavonas, catequinas, antocianos y leucoantocianos.</p> <p>Diferentes tipos de flavonoides realizan funciones muy diversas en la planta, incluyendo la pigmentación y la defensa.<sup>21</sup></p>	<p>En general los flavonoides son protectores capilares y venosos. Favoreciendo la correcta síntesis de colágeno, inhiben la agregación plaquetaria y muchos de ellos son protectores hepáticos. Algunos presentan además propiedades diuréticas, espasmolíticas, antiinflamatorias, antiagregante plaquetario, protector ocular y protectores de la pared vascular.<sup>55</sup></p>	 <p>Fig. 37 Estructura básica de un flavonoide</p>

## **Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en las muestras de *Calendula officinalis***

### **Objetivo**

Realizar la marcha fitoquímica para los extractos etanólico, acetónico y hexánico de *Calendula officinalis*, para determinar la presencia de alcaloides, saponinas, triterpenos, taninos y flavonoides.

### **Material y Equipo**

1 Embudo Buchner mediano  
1 Gradilla  
1 Matraz kitazato de 250mL  
Pipetas Pasteur  
Papel filtro No. 1  
Trampa de vacío  
10 Tubos de ensaye  
1 Vaso de precipitado de 50mL  
1 Parrilla eléctrica  
3 Vasos de precipitado de 100mL  
4 Matraces aforados de 100MI  
1 Matraz aforado de 50mL  
3 Pipetas volumétricas de 10mL, 5mL, 1mL.  
Rotavapor

### **Reactivos**

Agua destilada  
Ácido nítrico  
Ácido clorhídrico  
Ácido sulfúrico  
Cloroformo  
Hidróxido de sodio  
Ácido pícrico  
Cloruro de mercurio  
Yoduro de potasio  
Yodo resublimado  
Nitrato de bismuto pentahidratado  
Vainillina  
Cloruro férrico  
Ácido silicotúngstico  
Viruta de magnesio amalgamado

## **Preparación de soluciones**

Reactivo Hager: Solución saturada de ácido pícrico

Reactivo de Mayer: Pesar 1,36g de cloruro de mercurio y disolver en 60mL de agua destilada. Enseguida pesar 5g de yoduro de potasio en 20mL de agua destilada. Mezclar las soluciones y aforar a 100mL con agua destilada.

Reactivo de Wagner: Pesar 1,27g de yodo resublimado y disolver con 20mL de agua destilada agregarle 2g de yoduro de potasio, aforar a 100mL.

Reactivo de Drangendorff: Pesar 8g de nitrato de bismuto pentahidratado y disolver con 20mL de ácido nítrico. Pesar 27.2g de yoduro de potasio y disolver con 20mL de agua destilada. Mezclar las dos soluciones y dejar en reposo durante 24hr. Decantar la solución (para separar los cristales de nitrato de potasio) y aforar con agua los 100mL.

Reactivo de silicotungstico: Pesar 5g de ácido silicotúngstico y disolver con 20mL de ácido sulfúrico al 6N y aforar a 100mL.

Reactivo de Rosenthaler: Pesar 1g de vainillina en 100mL de etanol.

Cloruro férrico: Disolver 1,25g de cloruro férrico en 25mL de agua destilada y aforar a 50mL con alcohol metílico.

Reactivo de gelatina: Pesar 1g de gelatina y disolver con 30mL de agua destilada caliente, y agregarle 10g de cloruro de sodio agitar hasta disolver y finalmente aforar 100mL con agua destilada.

## **Metodología**

Usar los extractos etanólico, acetónico y hexánico purificados de *Calendula officinalis*.

## **Alcaloides**

Una porción del residuo se disuelve en ácido clorhídrico diluido (0,1M) y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. El filtrado se ensaya con los reactivos para alcaloides: Mayer, Drangendorff, Wagner, Hager y ácido silicotúngstico. Resultado de Mayer (precipitado color blanco crema), Drangendorff (precipitado anaranjado-marrón), Wagner (precipitado color marrón).

*Nota: Una gota de reactivo, es suficiente para cada prueba, comparar contra un estándar.*

## **Saponinas**

Disolver en un tubo de ensaye una porción de residuo etanólico con agua caliente, agitar vigorosamente por algunos minutos. La formación de espuma estable por algunos minutos con apariencia de panal de abejas se considera positiva.

Otra porción del residuo se ensaya con el reactivo de Rosenthaler: si añadimos al extracto una gota del reactivo y una gota de ácido sulfúrico concentrado; la aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase se considera positiva.

### **Triterpenos**

Disolver una porción del residuo, con 1mL de cloroformo, agregar 1mL de anhídrido acético y dejar resbalar por las paredes del tubo, dejar reposar en frío. Añadir 1 ó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado: la aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase se considera positiva.

### **Taninos**

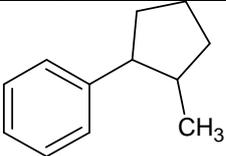
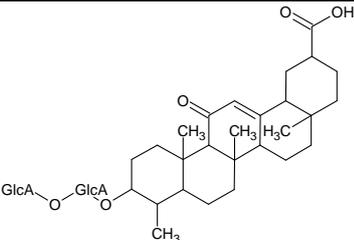
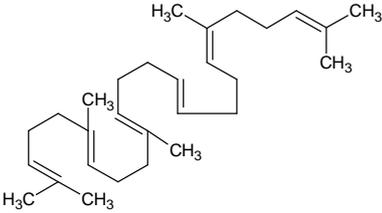
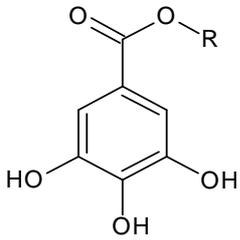
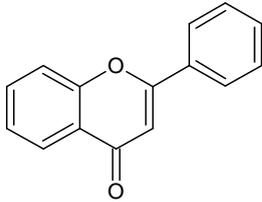
Disolver con agua una porción del extracto, filtrar, tomar dos alícuotas de 1mL para las pruebas con cloruro férrico (la aparición de coloraciones verdes, azul o marrón se considera positiva) y con reactivo de gelatina (se considera positivo un precipitado abundante).

### **Flavonoides**

Una porción del extracto se diluye con etanol y se divide en dos tubos. A un tubo con el extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y se le agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (Reacción de Shinoda). La aparición de colores amarillo ocre se considera positiva para alcaloides.

Al otro tubo se le agregan unas gotas de hidróxido de sodio diluido (0.1M) la aparición de amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides.<sup>8</sup>

## RESULTADOS

	<b>Pruebas</b>	<b>E.E.</b>	<b>E.A.</b>	<b>E.H.</b>	<b>Ejemplo de la estructura</b>
<b>Alcaloides</b>	Mayer	+/-	-	-	 <p style="text-align: center;"><i>Nicotina</i></p>
	Drangendorff	-	-	-	
	Wagner	-	-	-	
	Hager	-	-	-	
	Ácido silicotungstico	-	+/-	-	
<b>Saponinas</b>	Espuma	+	-	-	 <p style="text-align: center;"><i>Saponósido triterpénico</i></p>
	Rosenthaler	+	-	-	
<b>Triterpenos</b>	Triterpenos	+	+	+	 <p style="text-align: center;"><i>Escualeno</i></p>
<b>Taninos</b>	Cloruro férrico	+	+	-	 <p style="text-align: center;"><i>Tanino hidrolizable</i></p>
	Gelatina	+	+	-	
<b>Flavonoides</b>	Magnesio	+	+	-	 <p style="text-align: center;"><i>Estructura básica de un flavonoie</i></p>
	Hidróxido de sodio	+	+	-	

**Tabla 31:** E.E. (Extracto Etanólico), E.A. (Extracto Acetónico), E.H. (Extracto Hexánico), + (positivo), - (negativo), +/- (mas ó menos).



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta L., Rodríguez C. y Sánchez E. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Rev. Cubana Farm.* 1:7-23.2001
2. Aherne S.A. y O'Brien N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* 18:75-81. 2002
3. Aparicio R. y Harwood J. *Manual del aceite de oliva*. Editorial Mundi-Prensa. 1ª Ed. Madrid. pp. 407. 2003
4. Bako E., Deli J. y Tóth G. HPLC: study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J Biochem. Biophys. Methods.* 53: 241–250. 2002
5. Bernat V. y Cañigüeral S. *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. Editorial Elsevier. 1ª Ed. España. pp. 156-157. 2003
6. Bors W., Heller W., Christa M y Cols. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186:343-355. 1990
7. Boucaud-Maitre Y., Algernon O. y Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie.* 43:220-221. 1988
8. Bruneton J. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Editorial: Acribia, España. 1991
9. Buscarons U.F. *Análisis inorgánico cualitativo y sistemático*. Editorial Reverté. 7ª Ed. Barcelona. pp. 63-64. 1986
10. Carmenza D.B. y Morales P.A. *El aroma frutal de Colombia*. Editorial Unibiblos. 1ª Ed. Colombia. pp. 318. 2005
11. Castagnino J.M. Electroforesis capilar. *Bioquímica Clínica.* 3:297-329. 1999
12. Castillo G.E. y Martínez S.I. *Manual de fitoterapia*. Editorial: Masson. 1ª Ed. España. pp. 38. 2007
13. Castiñeiras L.M., Fuentes A.X. y Queraltó C.J. *Bioquímica clínica y patología molecular*. Ediciones Reverté. 2ª Ed. Barcelona. pp. 169. 1998
14. Cela R., Lorenzo R.A. y Casais M.C. Técnicas de separación en química analítica. Editorial Síntesis. 1ª Ed. España. pp. 558-620. 2002
15. Climent O.M. *Experimentación química: química orgánica, ingeniería química*. 2005
16. Costa J.M. *Diccionario de química física*. Editorial Diaz de Santos. 1ª Ed. Madrid. pp. 36. 2005
17. Daniel M. *Medicinal plants*. Editorial Science. 1ª Ed. Madrid. pp. 66-67. 2006
18. Della L.R., Tubaro A., Sosa A., Becker H., Saar S. y Issac O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60:516-520. 1994
19. Doménech X., Peral J. y Peral P.J. *Química ambiental de sistemas terrestres*. Editorial Reverté. 1ª Ed. Barcelona. pp. 11. 2006
20. Fernández L.L. *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Editorial Instituto Nacional de Ecología. 2ª Ed. México. pp. 44. 2006
21. Flanzky C. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Editorial: Mundi-Prensa. 2ª Ed. Madrid. pp. 115-116. 2003

22. Fonnegra G.R. y Jiménez R.S. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Ediciones Universidad de Atioquia. 2ª Ed. Colombia. pp. 72-75.2007
23. Gisbert C.J. y Villanueva C.E. *Medicina legal y toxicología*. Editorial: Masson. 6ª Ed. Barcelona. pp. 896. 2005
24. González B.J. *Técnicas y métodos de laboratorio clínico*. Editorial Masson. 2ª Ed. España. pp. 229-230. 2004
25. González E. y Martínez A. *Tratado del dorado, plateado y su policromía: tecnología, conservación y restauración*. Editorial: Publicaciones. 2ª Ed. Valencia. pp. 99. 1997
26. Harris D.C. *Análisis Químico*. Editorial Reverté. 2ª Ed. México. pp. 748-761. 2001
27. Hernández M.R. y Gally J.M. *Plantas medicinales*. Editorial Pax México. 1ª Ed. México. pp. 130. 1981
28. Kalvatchev Z., Walder R. y Garzaro D. Anti-VIH activity of extracts from *Calendula officinalis* Flowers. *Biomed Pharmacoter.* 51:176-180. 1997
29. Lastra V.H. y Piquet G.R. *Calendula officinalis*. *Rev. Cubana Farm.* 3:94-188.1999
30. Martínez L.J. *Investigaciones etnobotánicas en el parque natural de cabo de Gata-nígar*. Editorial: SAHN. 1ª Ed. Almería. pp. 472.1997
31. Miller J.N. y Miller J.C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Editorial Prentice Hall. 4ª Ed. España. pp. 21-71. 2002
32. Muñoz L.B. *Plantas medicinales y aromáticas*. Editorial: Mundi-Prensa. 2ª Ed. Madrid. pp.311-312, 320. 1987
33. Muñoz L.F. *Plantas medicinales y aromaticas*. Editorial Mundi-prensa. 4ª Ed. México. pp. 125-126. 1998
34. Navarro V. y Delgado G. Two antimicrobial alkaloids from *bocconia arborea*. *J. Ethnopharm.* 66: 223-226. 1999
35. Nerukirch H., D'Ambrosio M., Dall-Via J. y Guerriero A. Simultaneous quantitative determination of eight triterpenoid monoesters from flowers of 10 varieties of *Calendula Officinalis* L. and characterization of a new triterpenoid monoester. *Phytochem. Anal.* 15:30-35. 2004
36. Pappas T., Gayton-Ely M y Holland L. *Electrophoresis.* 26:719-734.2005
37. Pommier P., Gomez F., Sunyach M.P., D'Hombres A. y Carrie C. Montbarbon X: Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 22:1447-1453. 2004
38. Repetto M. *Toxicología fundamental*. Editorial Díaz de Santos. 3ª Ed. España. pp. 364-369. 1997
39. Rodés G.R. y Collazo O.M. *Manual de prácticas de fotosíntesis*. Editorial UNAM. 1ª Ed. México. pp. 28. 2006.
40. Romo V.A. *Productos naturales de la flora mexicana*. Editorial: Limusa. 1ª Ed. México. pp. 155. 1985
41. Romo V.A. *Química de la flora mexicana*. UNAM. 1ª Ed. México. pp. 89-90

42. Rosales M., Galindo A. y González R.F. Taninos condensados en la corteza de *pinus chihuahuana* y *pinus durangensis*. *Información Tecnológica*. 1:39-42. 2002
43. Rouessac F., Rouessac A. y Ourisson G. *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas*. Editorial Mc Graw Hill. 1ª Ed. España. pp. 121-134. 2003
44. Rudolf C.H. *Química general*. Editorial Reverté. 7ª Ed. Barcelona. pp. 188. 1977
45. Sakurai N., Nakagawa-Goto K., Ito J., Sakurai I., Nakanishi Y., Bastow K.F., Gragg G. y Lee K.H. Cytotoxic Alangium alkaloids from *Alangium longiflorum*. *J. Phytochem.* 67:894-897. 2006
46. Sarabia M.M., López A.R., Rivera G.P., Díaz E.J. y Cervantes S.A. *Estabilidad de fármacos y alimentos*. UNAM. 1ª Ed. México. pp. 192 y 197. 2004
47. Sharapin N., Machada R.L. y Pinzón R. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. 1ª Ed. Editorial Cyted. Colombia. Pág. 191-192. 2000
48. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. y Crouch S.R. *Fundamentos de química analítica*. Editorial Thomson. 8ª Ed. pp. 1026. 2005
49. Sogorb S.M., Vilanova E. y Vilanova Gisbert. *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*. Editorial Díaz de Santos. 1ª Ed. España. pp. 225-244. 2004
50. Starr C., Taggar R., Starr L. y Aguilar O.T. *Biología: la unidad y la diversidad de la vida*. Editorial Thomson Learning. 10ª Ed. México. pp. 28. 2004
51. Suntornsuk L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27: 679-698. 2002
52. Taiz L. y Zeiger E. *Fisiología vegetal. Volumen 1: Las células vegetales*. Editorial: Universitat Jaume. 3ª Ed. Castello de la plana. pp.55 y 550. 2006
53. Teijon R.J. y Garrido P.A. *Fundamentos de bioquímica estructural*. Editorial: Tébar. 2ª Ed. Madrid. pp.382. 2006
54. Valcárcel C.M., Gómez V.M. y Gómez H.A. *Técnicas analíticas de separación*. Editorial Reverté. 1ª Ed. España. pp. 118-119. 1988
55. Vanaclocha V.B. y Cañigüeral F.S. *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. Editorial: Masson. 4ª Ed. Barcelona. pp. 29, 32-33, 38-39. 2003
56. Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H.; *Chem. Pharm. Bull.* 49:863-870 2001
57. Restrepo F.M. El milagro de las plantas. Editorial: San Pablo. pp. 152. 2005.

#### **Páginas web**

58. [www.gardeninginarizona.com/Plants/Asteraceae/...](http://www.gardeninginarizona.com/Plants/Asteraceae/)
59. [http://es.encarta.msn.com/encyclopedia\\_761576643/Tanino.html](http://es.encarta.msn.com/encyclopedia_761576643/Tanino.html)
60. <http://external.doyma.es/pdf/4/4v20n06a13015492pdf001.pdf>
61. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

