



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**PERFIL ELECTROFORÉTICO Y CUANTIFICACIÓN
DE POLIFENOLES DE EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE *Calendula officinalis* L. E *Hippocratea excelsa* K.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

VIVIANA CERVANTES ROMERO

ASESORES:

Q.F.B. VICTOR HUGO ABREGO REYES

M.V.Z.GERARDO CRUZ JIMENEZ

DR. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO



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

Cuando un sueño se hace realidad no siempre se le atribuye al empeño que pongamos en realizarlo. Detrás de cada sueño siempre hay personas que nos apoyan y creen en nosotros. Son seres especiales que nos animan a seguir adelante en nuestros proyectos, brindándonos de diferentes maneras su solidaridad.

Por ello mi mayor agradecimiento a ti que diriges mi vida día con día, a ti que me acompañas en cada momento, gracias por tu amor, por tus promesas, por tu misericordia, gracias por dejarme ver lo que tienes preparado para mí. Te amo Jehová

Gracias a mis padres por estar siempre a mi lado, por el esfuerzo, por el amor que tienen por sus hijos, el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me han dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como una mujer de bien y especial agradecimiento a mi madre por darme la vida y enseñarme a vivirla, no hay palabras en este mundo para agradecerte mamá. Los amo

Gracias a mis hermanos Aldo y Brenda por la compañía y por apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mis tíos, primos, sobrinos... por el apoyo moral y buenos deseos. Tío Carozo gracias por creer en mí, por esas tardes de tarea divertidas y a veces no tanto, sin ti tampoco hubiera sido posible esto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por su apoyo decidido, generoso y desinteresado durante mis estudios y por supuesto a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por dejarme ser parte de ella.

Agradezco a M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez por haber confiado en mí para la realización de este proyecto, a Q.F.B. Víctor Abrego Reyes por la paciencia, por la dirección de este trabajo, por los consejos, la amistad, el apoyo y el ánimo que me brindaste. Gracias por todo Vic.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y en especial a aquellos que estuvieron más cerca, Dr. Enrique Ángeles, Prof. Enrique Ramos por dejarme ver la luz... como decía Jaimie, Prof. José Luis Frías, y por supuesto a todos los que participaron en este trabajo con sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y correcciones.

Gracias también a mis compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida conviviendo dentro y fuera del salón de clase. Gracias Jaimie Avilés por tu amistad sincera y ser parte importante para lograr esto, Nelly Ramírez, Víctor Licea, Daniel Ley, Santiago Betanzos, José Luis Rodríguez, Iván Sotero, Araceli Zavala, gracias a todos los que constituyeron parte de mi formación académica.

Extractos Sigma S.A de C.V®. gracias por el apoyo otorgado durante todo este tiempo a este proyecto, que es también suyo.



INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	2
III.GENERALIDADES	3
1.0 Métodos Fotométricos.....	3
1.1 Transmitancia y Absorbancia.....	5
1.2 Ley de Lambert-Beer	5
1.3 Instrumentación de Uv-Visible	6
1.4 Espectro de absorción	7
1.5 Aplicaciones	7
2.0 Antecedentes de Electroforesis Capilar	7
2.1 Proceso electroforético	8
2.2 Fundamentos de la técnica de electroforesis capilar	9
2.3 Principios de la separación electroforética	10
2.3.1 Movilidad electroforética.	10
2.3.2 Flujo electroosmótico	10
2.4 Técnicas de Inyección.....	12
2.5 Electroforesis capilar de zona.....	13
2.6 Cromatografía capilar micelar electrocinética	14
2.7 Principales ventajas de la electroforesis capilar.	14
2.8 Aplicaciones	15
2.9 <i>Caléndula officinalis</i>	16
2.10 <i>Hippocratea excelsa</i>	18
IV. MATERIAL Y EQUIPO.....	19
V. REACTIVOS	19
VI. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	20
VII. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	21
VIII.RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	24
IX. CONCLUSIONES	37
X. PERSPECTIVAS	37
ANEXO 1.....	39
ANEXO 2.....	40
ANEXO 3.....	47
XI. REFERENCIAS.....	50



SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
ϵ	Coefficiente de absorptividad molar
C.V.	Coefficiente de variación
MECK	Cromatografía capilar micelar electrocinética
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
S	Desviación estándar
EC	Electroforesis capilar
FEO	Flujo electroosmótico
g	Gramos
I.C.	Intervalo de confianza
kV	Kilovoltios
λ	Longitud de onda
\bar{x}	Media
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μm	Micrometros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
μef	Movilidad electroforética
μeO	Movilidad electrosmótica
nm	Nanómetros
P	Probabilidad
t_m	Tiempo de migración
S^2	Varianza



I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está fuertemente arraigada en la sociedad mexicana siendo preferida por un importante número de personas, sobre cualquier otro tipo de tratamiento médico. Desempeña un papel ampliamente importante en comunidades aisladas y de bajos recursos, siendo la única opción conocida a la que la población tiene acceso en la mayoría de los casos (Bye R., Linares E., y Estrada E., 1995).

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades es una práctica ampliamente difundida en el mundo desde tiempos remotos. Las plantas medicinales constituyen la base de la medicina tradicional y representan una fuente valiosa de compuestos biológicamente activos, y de prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos para la medicina moderna.

La cantidad de estudios fitoquímicos realizados a las plantas medicinales abarca un número limitado de especies que representa un porcentaje muy bajo comparado con la diversidad de plantas medicinales de las que se conoce su existencia desde tiempos prehispánicos (Illescas P., 2007).

El presente trabajo se basa en el estudio de dos extractos naturales *Calendula officinalis* L., e *Hippocratea excelsa* K., mediante electroforesis capilar para establecer una forma de identificación de estas especies vegetales. Debido a la diversidad de constituyentes químicos que poseen han mostrado distintas actividades biológicas, mismas que se correlacionan con las propiedades que se le atribuyen popularmente por lo que también se lleva a cabo la cuantificación de polifenoles totales mediante espectrofotometría UV-Vis aunado a que estos metabolitos secundarios presentes en los extractos forman parte de la actividad farmacológica que poseen las plantas medicinales antes mencionadas.

Existen herramientas importantes para el análisis de sustancias fitoquímicas como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases, entre otras. No obstante los dos métodos presentan grandes desventajas frente a la electroforesis capilar, ya que esta técnica nos permite el análisis simultáneo de diferentes clases de analitos en tiempos muy reducidos, y nos permite emplear pequeñas cantidades de muestra y de reactivos. Por ello se desarrolló una metodología haciendo uso de la electroforesis capilar de zona (ECZ) para realizar los perfiles electroforéticos de los extractos etanólicos y, así establecer una forma de identificación “huella digital” de estas especies vegetales.



II. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar el perfil electroforético de los extractos etanólicos de *Calendula officinalis L.*, e *Hippocratea excelsa K.*, mediante la técnica de electroforesis capilar empleada como método de identificación de especies vegetales.
- Evaluar el contenido de polifenoles totales presentes en dichos extractos por espectroscopia UV-Vis, empleando el reactivo de Folin Ciocalteu, con el fin de conocer la cantidad de este tipo de metabolitos secundarios.

Objetivos Particulares

- Obtener los perfiles electroforéticos de los extractos de *Calendula officinalis L.*, e *Hippocratea excelsa K.* por electroforesis capilar a pH 9.3.
- Establecer la longitud máxima de absorción (λ máx.) del complejo Folin-Rutina, mediante espectrofotometría UV-Vis utilizado en la cuantificación de polifenoles totales.
- Preparar una curva de calibración indirecta para llevar a cabo la cuantificación de polifenoles totales.
- Estimar la cantidad de polifenoles totales presentes en los extractos de *Calendula officinalis L.* e *Hippocratea excelsa K.*, mediante el método de Folin- Ciocalteu.



III. GENERALIDADES

1.0 Métodos Fotométricos

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

El fundamento de la espectrofotometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las del espectro UV-Visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio como: pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica, por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas (Díaz N., Barcena J., Fernandez E., y Galvan A., 2003).

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, "E1", a un estado de mayor energía (estado excitado), "E2", y sólo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula, su espectro de absorción constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental.

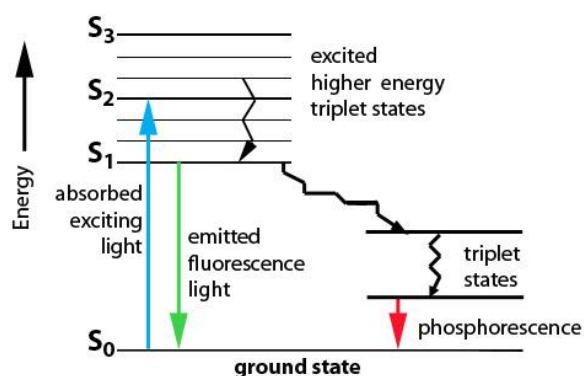


Figura 1. Niveles de energía en una molécula.



En espectroscopia el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el Visible (400-780 nm).

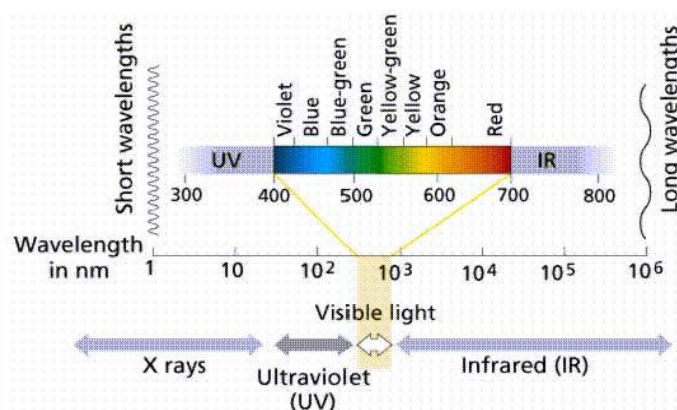


Figura 2. Espectro electromagnético

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente alteran la carga de las moléculas, provocando desplazamientos de los espectros UV (Miller N., y Miller J., 2008).

La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio. En la región visible del espectrofotómetro apreciamos el color de una solución que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite.

Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

LONGITUD DE ONDA APROXIMADA	COLOR DE LUZ QUE SE ABSORBE	COLOR DE LUZ QUE SE REFLEJA U OBSERVA
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado



1.1 Transmitancia y Absorbancia

Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad (I_0) incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o cromóforo, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_a + I_t$

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, I_t , y la cantidad de luz que incidió sobre ella, I_0 , y se representa normalmente en tanto por ciento: $\% T = I_t/I_0 \times 100$. La transmitancia nos da una medida física de la relación de intensidad incidente y transmitida al pasar por la muestra. La relación entre $\%T$ y la concentración no es lineal, pero asume una relación logarítmica inversa.

La absorbancia (A) es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$, en consecuencia: $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t/I_0$.

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ($I_0 = I_t$), la transmitancia es del 100% e indica que la muestra no absorbe a una determinada longitud de onda, y entonces A vale $\log 1 = 0$.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y de la concentración de éste.

1.2 Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log I_t/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot \ell$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra, más moléculas se encontrará; y por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de (ϵ) dependen de las de (c) y (ℓ). La segunda magnitud (I_t/I_0) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de (ϵ) resultan ser: ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina

coeficiente de extinción molar (ϵM). Cuando se desconoce el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, las dimensiones de (ϵ) resultan ser distintas, por ejemplo $\text{g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$, y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico (Harris D., 2001).

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de concentración altos, (ϵ) varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

1.3 Instrumentación de UV-visible

Los espectrofotómetros pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la **Fig. 3**, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra. Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

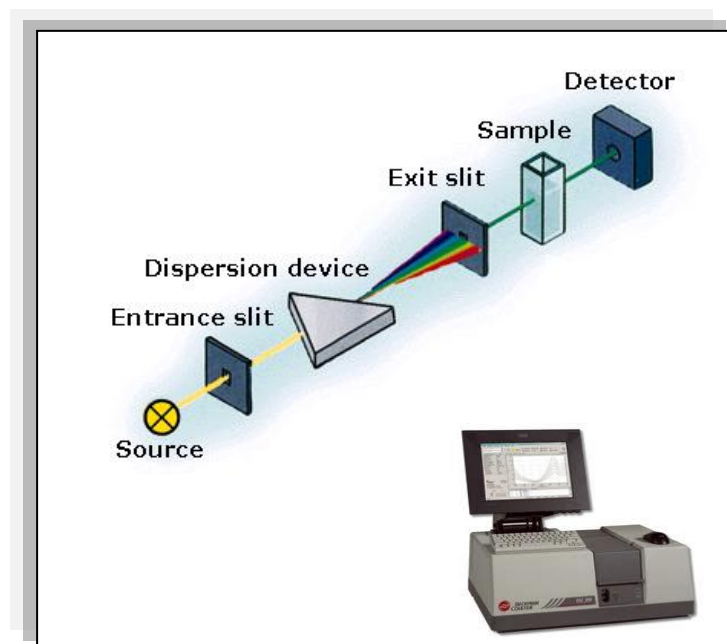


Figura 3. Componentes de un espectrofotómetro



1.4 Espectro de absorción

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida a diferentes valores de longitud de onda.

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

El espectro de absorción de un compuesto depende fundamentalmente de la estructura química de la molécula. No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de λ (máx.) y ϵ , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de las moléculas vecinas; y cada uno afecta de forma particular.

1.5 Aplicaciones

Los métodos espectrofotométricos están entre los más sensibles de todos los procedimientos analíticos. Las aplicaciones más importantes de la fotometría y espectrofotometría en la región visible son para la determinación de trazas de iones inorgánicos. Aunque algunas de estas sustancias son suficientemente coloreadas para hacer posible su determinación directa, la mayoría no absorben fuertemente radiación ultravioleta o visible. No obstante la mayoría de los iones inorgánicos se combinan con varios reactivos complejantes para formar disoluciones intensamente coloreadas, haciendo de esta manera posible su análisis (Willard H., Merrit L., & Dean J., 1992).

2. Antecedentes de Electroforesis Capilar

La Electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica de separación que se utiliza también para identificación y cuantificación. Fue introducida a México a partir del año 2000 y crece el número de aplicaciones debido al interés de investigadores y de la industria en todo el mundo, además de su inclusión en la USP 26 como método general de análisis.

La versatilidad de esta técnica reside en los elementos del equipo que se pueden controlar como: la polaridad de los electrodos, el diámetro interno y la longitud del capilar, el tipo de introducción de la muestra, el uso de diferentes detectores, la variedad de los electrolitos soporte, así como el uso de aditivos que permiten un amplio rango de aplicaciones que van desde pequeños iones hasta macromoléculas.

2.1 Proceso electroforético

Es el fenómeno que se lleva a cabo cuando en un sistema dado, las especies cargadas (iones) se mueven y separan bajo la influencia de un campo eléctrico en función de su distinta velocidad de migración.

El mecanismo de separación de la electroforesis capilar es el mismo que el de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de las zonas discretas es debida a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales están a su vez vinculadas a la relación masa/carga y a la conformación de los analitos **Fig. 4** (Castillo M., et. al.2005).



Figura 4. Equipo de electroforesis capilar

Empleando la técnica de electroforesis capilar, las sustancias pueden separarse en una gran variedad de electrolitos soporte, incluyendo buffer acuosos, parcialmente acuosos, y buffer completamente no acuosos, cuando se trabaja con sustancias poco solubles o insolubles (Adamovics J., 1997).

Esta técnica consiste en introducir en un capilar una muestra de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su carga y su movilidad iónica en el medio en el que se encuentran bajo la influencia de un campo eléctrico. Un sistema de EC consiste básicamente de las siguientes partes (**Fig. 5**):

- I. Dos Electrodo de platino (ánodo y cátodo).
- II. Fuente de poder de alto voltaje.
- III. Depósito (viales) en donde se colocan los electrodos respectivamente.
- IV. Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación).
- V. Sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido).
- VI. Sistema de introducción de muestra.
- VII. Un detector

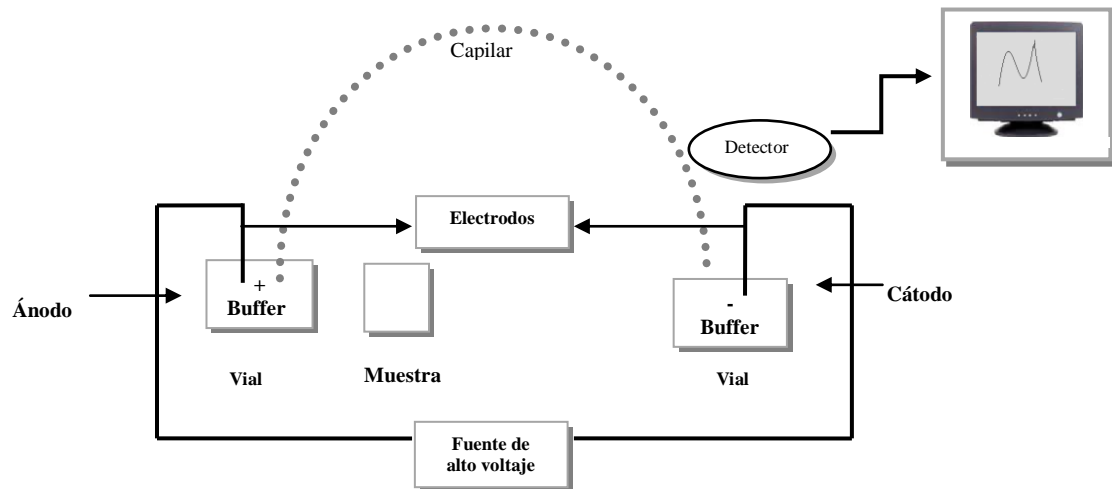


Figura 5. Componentes básicos de un equipo de EC

2.2 Fundamentos de la técnica de electroforesis capilar

Muchas moléculas importantes poseen grupos ionizables y pueden tenerse en solución en forma de especies con carga eléctrica, ya sea como cationes (+) o como aniones (-). Además las moléculas que poseen cargas similares suelen tener distintas relaciones carga/masa. En conjunto, estas diferencias constituyen base suficiente para una migración diferencial, cuando los iones en disolución se someten a un campo eléctrico. (Castillo M., et. al.2005).

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas. La corriente se mantiene por todo el circuito ya que los electrodos, están sumergidos en viales que contienen buffer. Durante la separación en los electrodos se producen iones hidroxilo e hidrógeno en el cátodo, mientras que en el ánodo se forman iones oxígeno e hidrógeno. Las separaciones electroforéticas se originan por las diferentes movilidades de los analitos. La movilidad electroforética se ve afectada por la carga, la forma y tamaño del analito así como de la viscosidad del medio y del flujo electroosmótico.



2.3 Principios de la separación electroforética

2.3.1 Movilidad electroforética.

La separación de los analitos por electroforesis convencional está determinada por las diferencias en sus velocidades dentro de un campo eléctrico (Watson D., 2005). La velocidad está dada por la fórmula:

$$v = \mu_c E$$

Donde:

v: Velocidad del ion

μ_c : Movilidad electroforética

E: Campo eléctrico aplicado

El campo eléctrico esta dado en volts/cm y depende del largo del capilar usado y de la fuerza de potencial aplicado a través de este. La movilidad electroforética depende de la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito (Watson D., 2005).

2.3.2 Flujo electrosmótico

Un constituyente fundamental de la EC es el flujo electrosmótico (FEO), el cual es el flujo que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interface se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 7) y conjuntamente son sus iones forman una doble capa eléctrica, los iones presentes en el sistema bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electrosmótico. **Fig.6** (Castillo M., et. al.2005).

El perfil plano del flujo electrosmótico se presenta fundamentalmente por el manejo fuerza del flujo uniformemente distribuida a lo largo del capilar al momento de aplicar el campo eléctrico, este perfil es benéfico porque no contribuye directamente al ensanchamiento de picos. Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones, ya que los cationes son impulsados por este a una mayor velocidad. Si por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye.

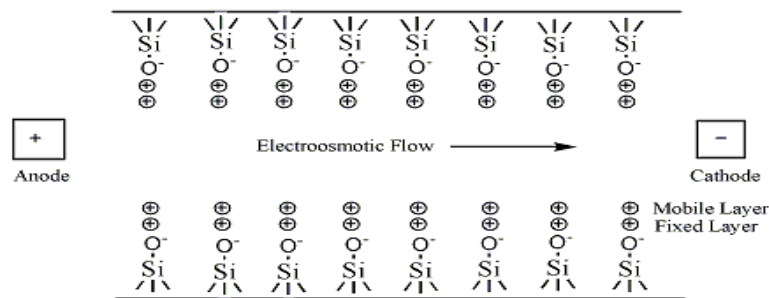


Figura 6. Proceso llevado a cabo dentro del capilar en presencia del flujo electroosmótico

El potencial zeta es proporcional a la densidad de carga en la pared del capilar, el cual es dependiente del pH. Por lo tanto, la movilidad del FEO varía de acuerdo al pH del buffer, observándose que a pH alto la movilidad del FEO es significativamente más grande que a pH bajo. En la **Fig. 7**, se describe la variación del FEO en función del pH para un capilar de sílice fundida. Arriba de pH 9, los grupos silanol se encuentran totalmente ionizados y la movilidad del FEO es grande. A pH por debajo de 4, la ionización de los grupos silanol es baja y la movilidad del FEO es insignificante.

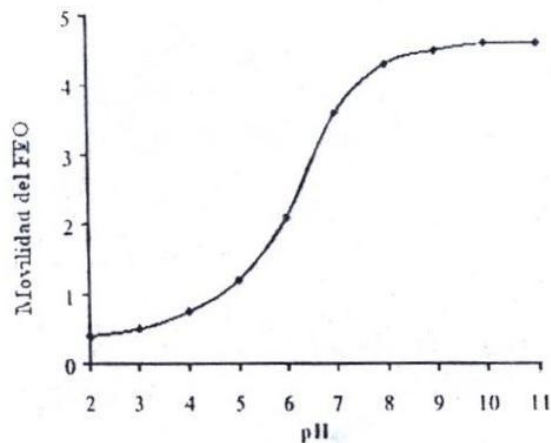


Figura 7. Variación del FEO en función del pH

El potencial Z también depende de la fuerza iónica del buffer, porque cuando la fuerza iónica se incrementa, la doble capa se comprime resultando en una disminución del potencial Z y una reducción de la movilidad del FEO.

Debido a lo anterior se observa que la velocidad de migración de un soluto no está directamente relacionada con la movilidad electroforética. Necesariamente, está relacionada con la combinación de ambos, la movilidad electroforética y la movilidad del FEO.

2.4 Técnicas de Inyección

En general la cantidad de muestra inyectada debe ser menor del 1 al 2 % del total de la longitud del capilar. Esto es una ventaja cuando el volumen de muestra es pequeño pues se puede realizar numerosas inyecciones con una sola muestra, por otro lado, volúmenes pequeños aumentan las dificultades de sensibilidad para muestras diluidas. La sobrecarga de muestra puede tener dos efectos significativos, y los dos perjudican la resolución (Altria K., 2001).

- I. Si la magnitud de la inyección es más grande que el ensanchamiento de pico, entonces este será proporcional al ancho de pico.
- II. Esto puede alterar la homogeneidad del campo y distorsionar la forma del pico provocando la mala conductividad entre el electrolito soporte y la de la muestra.

La inyección cuantitativa de la muestra se puede lograr por diversos métodos: los dos más usados son el hidrodinámico y el electrocinético.

Inyección hidrodinámica: También llamada inyección neumática, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar **Fig. 8** Este sistema confiable y no selectivo. Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener inyecciones altamente reproducibles (Castillo M., et. al.2005).

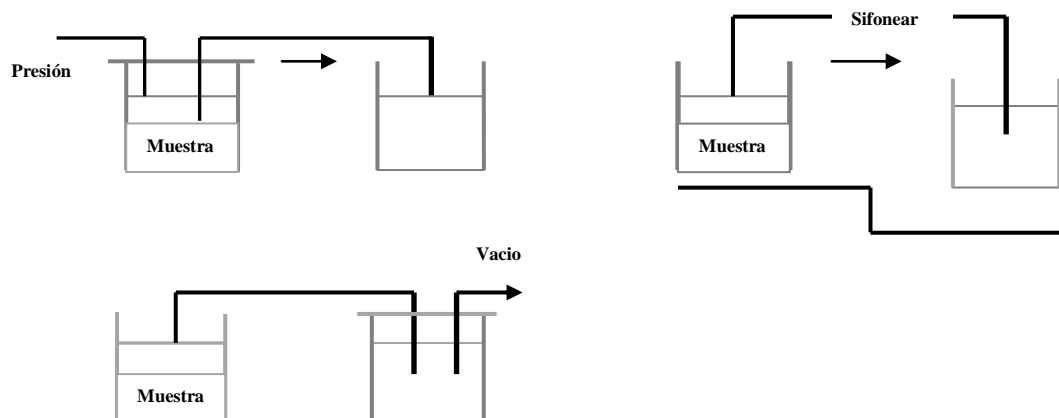


Figura 8. Inyección hidrodinámica

Inyección electrocinética: Se realiza mediante electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico, por lo que el flujo electroosmótico es un factor que afecta esta modalidad de inyección.

La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje normalmente de 5 kV por un tiempo determinado. El voltaje provoca que los iones de la muestra migren selectivamente al interior del capilar. **Fig. 9**

Generalmente este tipo de inyección no es tan reproducible como la hidrodinámica.

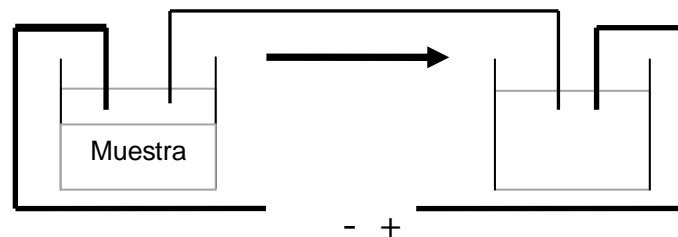


Figura 9. Inyección electrocinética

2.5 Electroforesis capilar de zona

En el interior solo se encuentra el buffer, 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 buffer. Cuando se aplica el potencial a través de los extremos del capilar, los compuestos iónicos de la muestra se mueven de acuerdo con su propia movilidad (μ) y si son lo suficientemente diferentes, se separan en bandas discretas rodeadas de la disolución buffer. 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 migración es: primero los cationes, luego las especies neutras todas juntas y finalmente los aniones.

Para una buena separación se deben cumplir los siguientes requisitos:

- Las movilidades (μ) de cada soluto deben ser diferente.
- El electrolito de fondo debe 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 comigran con el flujo electroosmótico y para sustancias con igual relación carga/masa. Las separaciones se pueden llevar a cabo en disoluciones buffer no acuosas cuando los compuestos son insolubles en agua o cuando se desea modificar la selectividad de las separaciones.



2.6 Cromatografía capilar electrocinética micelar

Cuando los solutos no están ionizados al pH del buffer 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 lo tanto no podrán separarse entre sí. (Rouessac F., Rouessac A., y Ourisson G., 2003) La electroforesis 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 sus colas de hidrocarburo 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 hidrofóbico de las partículas y solubiliza así especies o material graso se lava con una disolución detergente. En esta técnica se agrega surfactante al buffer 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. La mayoría de los buffer, 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 estacionaria de hidrocarburos. De esta manera, el proceso es una cromatografía auténtica (Sogorb S., y Vilanova G., 2004).

2.7 Principales ventajas de la electroforesis capilar.

La implementación de la electroforesis en tubos capilares en los últimos años ha aumentado el interés de esta técnica analítica. La EC tiene un número de ventajas comparado con CLAR, estas incluyen: (Altria K., Kelly M., y Clark B., 1998).

- I. La disipación del calor en el tubo capilar es buena y, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños y los resultados presentan mayor reproducibilidad.
- II. Dada la rápida disipación del calor, es posible utilizar voltajes muy altos (hasta 30 kV), lo cual disminuye los tiempos de análisis y aumenta la resolución entre los picos.
- III. El gasto de disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al medio ambiente.
- IV. La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros.
- V. El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- VI. Se puede utilizar una gran variedad de detectores tanto en línea o fuera de línea o bien varios a la vez.



- VII. Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
- VIII. Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.

2.8 Aplicaciones

La versatilidad que presenta la técnica de electroforesis capilar hace que esta sea idónea para la separación de diversas sustancias químicas incluyendo iones, metabolitos de fármacos, péptidos, proteínas, oligoglucósidos y DNA. En los últimos años, el número de métodos por CE que son empleados exitosamente en laboratorios analíticos, biomédicos, farmacéuticos, ambientales de alimentos, forenses y clínicos se han incrementado notablemente (Elosta S., Havel J., 2006).

Una de las características más atractivas que presenta esta técnica es que permite la separación simultánea de una gran variedad de analitos, incluyendo analitos que forman complejos a través de interacciones moleculares. Por lo que la electroforesis capilar continúa creciendo rápidamente como una técnica analítica en un amplio rango de áreas de aplicación (Castillo M., et. al.2005).

El área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de los medicamentos.

2.9 *Calendula officinalis* L.



Fig. 10 Imagen de *Calendula officinalis* L.

Nombre Científico: *Calendula officinalis* L.

Nombres Populares: Calendula, maravilla, virreina, clavel de muerto, marquesita.

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 (Alonso J., 2004).

Origen: La *Calendula* es originaria de la región mediterránea y se encuentra propiamente distribuida en todo el mundo, como planta ornamental. Es cultivada en zonas de clima templado, tolerando todo tipo de suelos, preferentemente arcillosos.

Descripción Botánica: Se trata de una planta aromática anual, perteneciente a la familia de las Asteráceas (Compuestas), caracterizada por presentar una altura cercana al medio metro, tallos erectos y ramificados, hojas oblongo-lanceoladas, conformada por flores singulares de color amarillo-rojizo, brillantes y dispuestas en filas simples o dobles. El fruto es un aquenio espinoso y curvado.

Composición Química

Aceite esencial: Presenta una concentración variable hasta 0.12 % en las flores linguladas y hasta un 4 % en el receptáculo. Es abundante en mono y sesquiterpenos oxigenados: carvona, geranulacetona, cariofilencetona, mentona, isomentona, γ -terpineno, y δ -cadineno, α -muroloeno, cariofileno, α y β -ionona, 5,6-epoxi- β -ionona, pedunculatina, dihidro-actinidiolido.



Carotenoides: : α , β y γ -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, galenina, luteína, licopeno, valenciaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epoxicaroteno, β -zeacaroteno, mutatoxantina y luteína epóxida. Los carotenoides son compuestos relativamente estables, siendo solubles en grasas e insolubles en agua.

Flavonoides: En las flores linguladas hasta 0.88 % y en el receptáculo hasta 0.33 %. Los flavonoides presentes son: isorhamnetin-3-glucósido, isorhamnetina, heterósidos, rutina, quercetina glucósido, calendoflasido, calendoflavosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, y kaempferol.

Alcoholes triterpénicos: Arnadiol, faradiol, α y β -amirina, derivados del ácido laurico, palmítico y margárico, lupeol, ψ -taraxasterol, taraxasterol, faradiol-3-éster del ácido palmítico.

Entre otros: Cumarinas, escopoletina, umbeliferona y esculetina, esteroles, azúcar y parafina, polisacáridos como pectina y hemicelulosa.

Acciones Farmacológicas: Antiinflamatorio, antihemorrágico, antiséptico, astringente para las heridas, espasmolítico, vulnerario, diaforético, emenagogo, resolutivo; estimulante de la actividad hepática, especialmente de la secreción biliar, para atenuar espasmos gástricos o intestinales, se considera fungicida en infecciones vaginales, combate infecciones cutáneas y úlceras varicosas. Se utiliza como espasmódico, depurador de la sangre, diurético, sudorífico, estimulante digestivo, emoliente, elimina forúnculos, cura el cáncer de la matriz y estómago. Se utiliza para los trastornos menstruales y mejora la actividad vesicular, cura dolores intestinales, ictericia y gripe. Actividad inmunomoduladora, estimulan la fagocitosis de células polimorfonucleares humanas, estimulan la proliferación linfocitaria, a concentraciones de 0,1 mg/mL y 10 mg/mL, a concentraciones mayores se observa un efecto inhibitorio. Calma los problemas musculares y desinflama las anginas (Alonso J., 2004).

2.10 *Hippocratea excelsa* K.



Fig.11 Imagen de *Hippocratea excelsa* K.

Nombre Científico: *Hippocratea excelsa* K.

Nombres Populares: Cancerina, Mata piojo, Bejuco del piojo.

Origen: La especie *Hippocratea excelsa* K. (Hippocrateaceae) es originaria de América central y en México se encuentra en los Estados de Durango, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Yucatán (Sánchez E., y Durand D., 1985).

Descripción Botánica: Los individuos de esta especie son bejuco leñosos que llegan a medir hasta 17 metros de largo y poseen una corteza café-rojiza. La recolección de la raíz de cancerina puede hacerse durante todo el año, pero en tiempo de lluvias aumenta el riesgo para el recolector por la presencia de víboras y plantas aledañas espinosas.

Composición Química

Los principales metabolitos secundarios de esta especie son triterpenoides y alcaloides. También se ha descrito la presencia de grandes cantidades de politerpenoide del tipo de la guta, epicatequina en la corteza de la planta y la presencia de flavonoides (rutina). Algunos metabolitos secundarios aislados de *Hippocratea excelsa* K. son: Friedelina, Canofilol, Ácido canofílico, Excelsita, β - amirina, β - sitosterol, Epicatequina, Hipocrateína I y II (Alonso J., 2004).

Acciones Farmacológicas: Se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de cáncer de piel, úlceras pépticas, dolencias de la piel, enfermedades del riñón, y los desordenes de la menstruación, también presenta características pesticidas. Las semillas y las hojas se emplean para el tratamiento de piojos y algunas especies de ácaros, de ahí que en las zonas rurales se le designe como “mata piojo” (Muñoz L., 1998).



IV. MATERIAL Y EQUIPO

- Equipo de electroforesis capilar “MDQ Capillary Electrophoresis System” (Beckman Coulter)
- Balanza analítica (Mettler AT200 Fact) precisión 0.1 mg
- Frascos ámbar
- Matraces aforados Pirex (10 mL, 100 mL)
- Membranas de 0.45µm, diámetro: 2.5mm (Durapore® PVDF)
- Micropipetas (1-10 y 1-100 µL)
- pH-metro (Beckman Q 310)
- Pipetas volumétricas 1mL, 2mL, 10mL.
- Piseta
- Sonicador (Ultrasonic LC 304 Elma)
- Vasos de precipitado 50mL, 100mL

V. REACTIVOS

- Acido clorhídrico
- Acido fosfomolibdínico
- Agua desionizada
- Carbonato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Solución buffer Diborato de sodio $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ (pH 9.3)
- Solución buffer Fosfato 20 mM/SDS 25 mM (pH 7.0)
- Estándar de Rutina (Pureza 95 %)
- Extracto de *Calendula officinalis* L. e *Hippocratea excelsa* K.



VI. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Los extractos etanólicos de *Calendula officinalis* L. e *Hippocratea excelsa* K, fueron proporcionados por Extractos Sigma S.A de C.V.®

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

Reactivo de Folin-Ciocalteu: El reactivo contiene Ácido fosfomolibdínico, Ácido clorhídrico y Carbonato de sodio.

100 mL de solución de ácido fosfomolibdínico ($H_3 [P (Mo_3O_{10})_4] * H_2O$) 5%

Pesar 5.05g de $H_3 [P (Mo_3O_{10})_4] * H_2O$ en un vaso de precipitado de 100 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.

100 mL de solución de ácido clorhídrico (HCl) 2.5%

A un matraz aforado de 100 mL se le adiciona aproximadamente 20 mL de agua desionizada, para después 2.5 mL de HCl, se agita y se completa el volumen con agua destilada hasta la marca de aforo.

100 mL de solución de carbonato de sodio ($NaHCO_3$) 10%

A un matraz aforado de 100 mL se le adiciona aproximadamente 20 mL de agua desionizada, para después añadirle 10 g de $NaHCO_3$, se agita y se completa el volumen con agua destilada hasta la marca de aforo.

100 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10%

Pesar 10g de NaOH en un vaso de precipitado de 100 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.

100 mL de solución buffer de di borato de sodio $Na_2B_2O_7$ [20 mM] pH 9.3

Pesar 0.641g de $Na_2B_2O_7$ en un vaso de precipitado 100 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 9.3, verter la solución en un matraz aforado de 100 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: Las soluciones buffer se filtran con membrana Durapore® 0.45 μm , recibiendo el filtrado en recipientes adecuados, prosiguiéndose a sonicarlas, taparlas y etiquetarlas.



VII. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Cuantificación de polifenoles totales por espectrofotometría UV- VIS.

- **Preparación de la solución estándar**

Pesar 14.25 mg con exactitud de Rutina en un vaso de precipitado de 100 mL añadiendo agua desionizada, y agitando hasta disolver completamente, verter a un matraz aforado de 100 mL, tomar de esta solución una alícuota de 1 mL y aforar a 10 mL con agua desionizada.

A partir de la solución anterior preparar los sistemas que conforman la curva de calibración, el sistema más concentrado se emplea para determinar la longitud de onda óptima a la cual se leen los sistemas de la curva de calibración indirecta, así como las muestras problema.

- **Preparación de curva de calibración indirecta.**

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Alícuota de rutina (mL)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
mL de Folin Ciocalteu (5%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
mL HCl (2.5%)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
mL NaHCO ₃ (10%)	1	1	1	1	1	1	1
Aforo (ml)	10						

- **Preparación de muestras**

- Leer a longitud de onda óptima

Sistema	1	2
mL de Ácido Fosfomolibdínico (5%)	0.5	0.5
mL HCl (2.5%)	0.5	0.5
mL NaHCO ₃ (10%)	1	1
Aforo (ml)	10	10
mL de <i>Calendula officinalis</i> L.	2	---
mL de <i>Hippocratea excelsa</i> K.	---	7

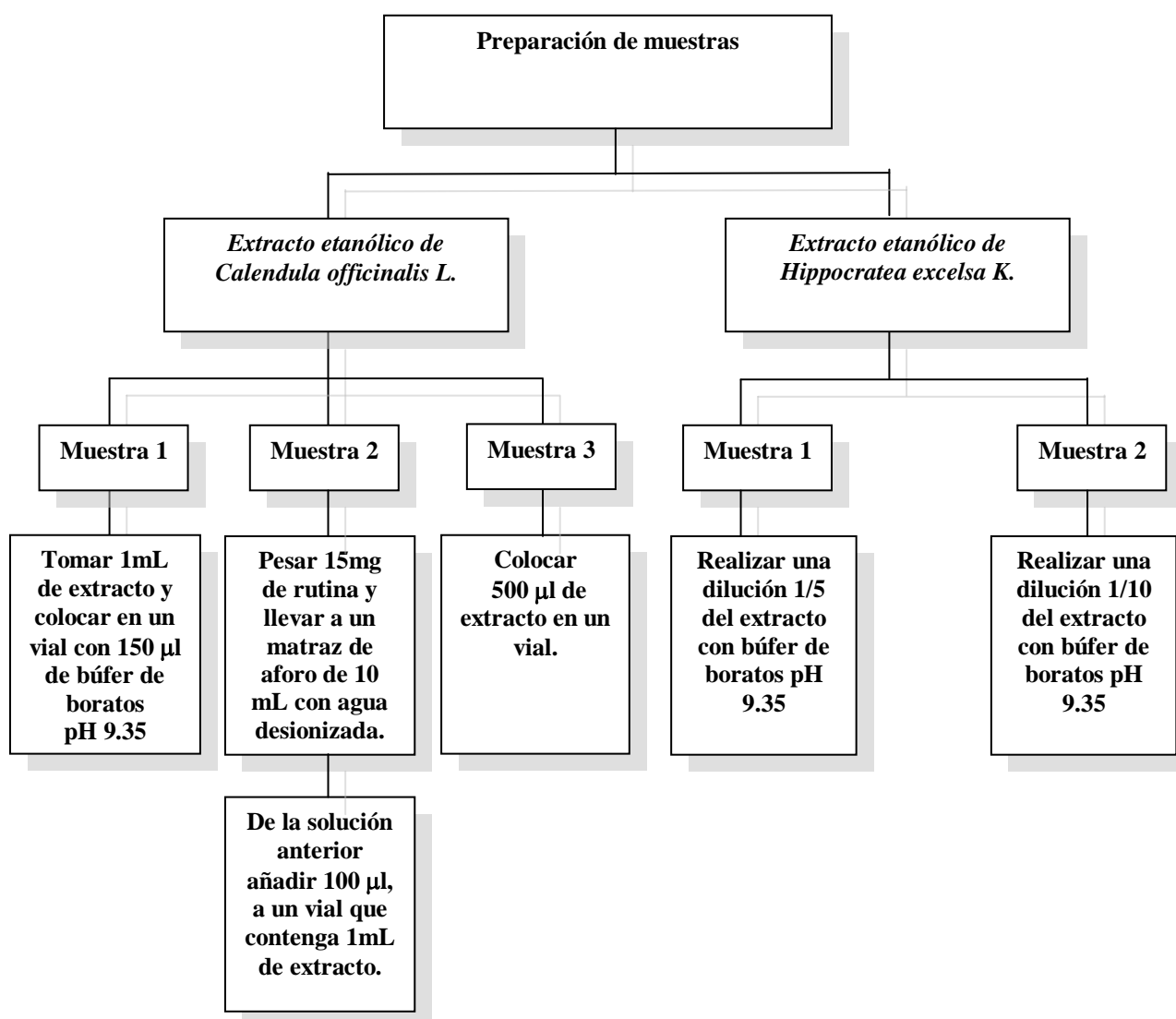
*Acido fosfomolibdínico, HCl, NaHCO₃, corresponden al reactivo de Folin Ciocalteu.



- Establecer las concentraciones de las soluciones de análisis de tal forma que se encuentren dentro de las establecidas en la curva de calibración.
- Reportar las concentraciones en g equivalentes de rutina/100 ml de extracto.

Todas las soluciones se filtran con membranas de 0.45 μm , diámetro: 2.5 mm (Durapore® PVDF).

Determinación del perfil electroforético de extractos etanólicos de *Caléndula officinalis* L. e *Hippocratea excelsa* K.





- Las muestras se analizan en el equipo, enseguida de su preparación.
- Dimensiones del capilar y condiciones de arranque

Emplear un capilar nuevo de sílice fundida, las dimensiones del capilar son 75 μ L diámetro interno y 375 μ L de diámetro externo, además de una longitud total de 60 cm y 50 cm de longitud efectiva.

- Condiciones de análisis

Condiciones del equipo para el extracto de *Caléndula officinalis* L.: Inyección hidrodinámica (presión: 0.5 psi, duración: 5 seg.), separación (Voltaje: 15.0 kV, duración: 30 min., polaridad: normal, detector: arreglo de diodos UV-Vis).

Condiciones del equipo para el extracto de *Hippocratea excelsa* K.: Inyección hidrodinámica (presión: 0.5 psi, duración: 5 seg.), separación (Voltaje: 20.0 kV, duración: 15 min., polaridad: reversa, detector: arreglo de diodos UV-Vis)

VIII. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Los extractos de *Calendula officinalis L.* e *Hippocratea excelsa K.*, poseen una gran cantidad de polifenoles lo cual está en relación con la diversidad de acciones biológicas y farmacológicas que presentan, lo que hace a los polifenoles un grupo de gran interés.

Existen numerosas investigaciones de farmacología moderna con diferentes extractos y preparaciones en el que se encontraron que las flores de *Calendula officinalis L.*, son antimicrobianas y antibacterianas, principalmente contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, levaduras como *Candida monosa*, entre otras especies por la presencia de flavonoides (Angeles M., Cruz G., y et.al., 2010).

Así mismo *Hippocratea excelsa K.* presenta propiedades antiinflamatorias y anti cancerígenas lo cual se relaciona con la presencia de un grupo de polifenoles presentes en la corteza (Romo V., 1985).

De aquí la importancia del estudio de polifenoles en los extractos, aunado a que hoy en día no se encuentra reportado en la literatura la cantidad de polifenoles totales presentes en ambos extractos.

Para ello existen diversos métodos analíticos mediante los cuales es posible determinar de forma cualitativa y/o cuantitativa compuestos orgánicos que contienen ciertos grupos funcionales en diferentes sustancias. Entre los más comunes de todos los procedimientos analíticos, se encuentra la espectrofotometría UV-Vis, mediante la cual se realizó la estimación de polifenoles totales como g equivalentes de rutina, debido a que este polifenol es uno de los más comunes y disponibles de forma comercial. Por lo que la curva de calibración se creó con este compuesto, empleando el reactivo de Folin Ciocalteu.

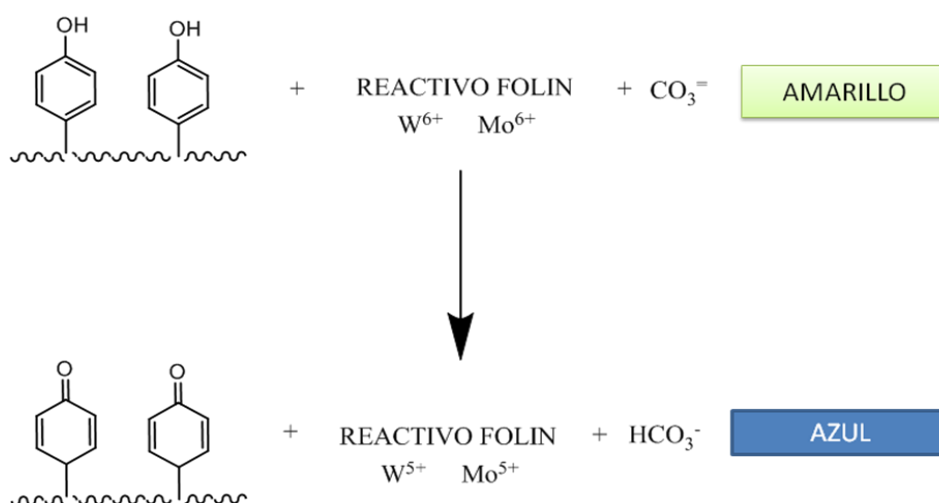


Fig. 12 Reacción entre polifenoles y el reactivo de Folin Ciocalteu



La naturaleza química exacta del reactivo es aún desconocida, pero se cree que contiene heteropolifosfotungstato-molibdano. La secuencia de reacciones reversibles de reducción de 1 o 2 electrones da origen a las especies azules, posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{-4}$. En esencia se cree que el molibdeno es fácil de ser reducido en el complejo y que la reacción de transferencia de electrones ocurre entre los agentes reductores y el Mo(VI).

La disociación de un protón fenólico origina un anión fenolato el cual es capaz de reducir el reactivo de Folin. El mecanismo de la reacción es a través de una transferencia de electrones. Los compuestos azules formados entre el fenolato y el reactivo de Folin Ciocalteu son independientes de la estructura del compuesto fenólico, por lo tanto no prevalece la posibilidad de la coordinación de complejos formados entre el centro metálico y el compuesto fenólico.

Dejando de lado la naturaleza química indefinida del reactivo, este método es simple y reproducible, razón por la cual se ha convertido en un ensayo ampliamente utilizado en el estudio de polifenoles. (Garrido D., Parada R., 2008)

Para realizar la curva de calibración, se determinó la longitud de onda óptima mediante un espectro de absorción desde la región UV (200 nm) hasta la región Visible (800 nm). La rutina se empleó a una concentración de $[1.42 \times 10^{-04} \text{ mg}/100 \text{ ml}]$, pero debido a que la lectura era baja y no se apreciaba el máximo de absorción, no era posible realizar diluciones a partir de esta solución, por lo que se incrementó la concentración a $[1.42 \times 10^{-03} \text{ mg}/100 \text{ ml}]$, y a partir de esta, se realizaron las diluciones correspondientes para la preparación de las diversas curvas de calibración de manera independiente, obteniéndose una banda máxima de absorción en la región visible del espectro de absorción a 710 nm. **Ver Gráfica 1.**

Las concentraciones de la curva de calibración indirecta de rutina se encuentran en un rango de 1.42×10^{-05} a 9.94×10^{-05} , expresadas como g/100 ml o bien $2.34 \times 10^{-7} \text{ M}$ a $1.64 \times 10^{-6} \text{ M}$. **Ver. Tabla 1.**

Las concentraciones de los extractos se determinaron por medio de interpolación de sus absorbancias en la curva de calibración. Para disminuir el error en las curvas realizadas se tomó la media de las absorbancias obtenidas de las diferentes curvas, y la concentración de cada sistema que compone la curva de calibración indirecta de rutina.

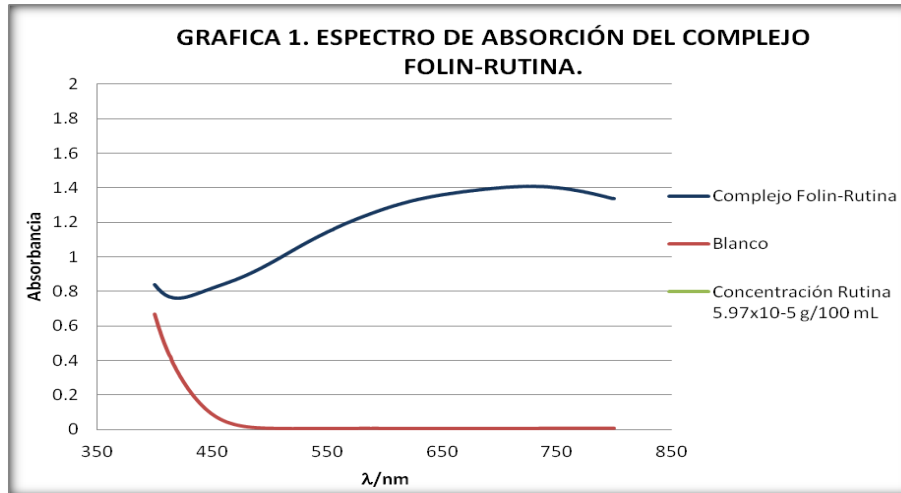


Tabla1. Curva de calibración indirecta de rutina

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Alicuota (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
mL Folín (5%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ml HCl (2.5%)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ml NaHCO ₃ (10%)	1	1	1	1	1	1	1
Aforo (ml)	10						
Concentración [g/100mL]	1.42E-05	2.84E-05	4.26E-05	5.68E-05	7.10E-05	8.52E-05	9.94E-05
Curva de calibración 1	0.2079	0.4509	0.6488	0.8687	1.0221	1.2038	1.5665
Curva de calibración 2	0.2369	0.4178	0.6431	0.8649	1.0536	1.2355	1.5187
Curva de calibración 3	0.2037	0.3909	0.6191	0.8559	1.0655	1.2906	1.5505
Curva de calibración 4	0.2121	0.4633	0.611	0.8619	1.0575	1.2806	1.4892
Curva de calibración 5	0.2151	0.4447	0.6162	0.8979	1.1151	1.2425	1.5222
Curva de calibración 6	0.2019	0.4373	0.6296	0.8645	1.0199	1.2962	1.5222
\bar{x} Curva de calibración	0.2129	0.4342	0.6280	0.8690	1.0556	1.2582	1.5282
DESVEST	0.0127	0.0260	0.0153	0.0148	0.0348	0.0367	0.0270
C.V.	5.9852	5.9970	2.4366	1.7025	3.2932	2.9130	1.7674

Concentración Stock [g/100ml]= 0.00142

De esta curva de calibración indirecta se realizó la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se ajustó a la ecuación de la recta:

$$A = mx + b$$



Donde:

A= absorbancia de la muestra

m= pendiente [15145]

x= concentración de analito expresada como [polifenoles g/100ml]

b= ordenada al origen [-0.0051]

Por lo tanto la ecuación de ajuste de la curva es:

$A = 15145 \text{ [polifenoles g/100ml]} - 0.0051.$

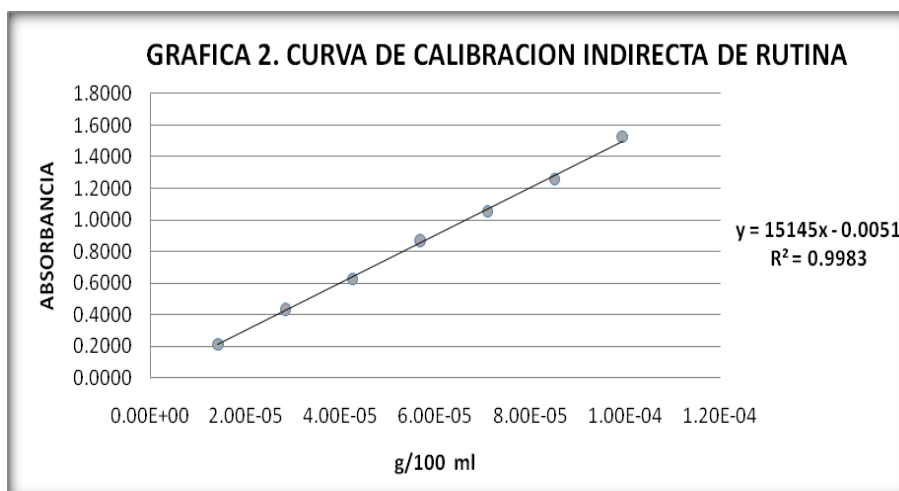
El coeficiente de correlación fue de: 0.9991

El coeficiente de determinación fue de: 0.9983.

Los cálculos para determinar la ordenada al origen, concentraciones, desviación estándar y coeficiente de variación de la curva de calibración, se encuentran en el **Anexo 2**. Es importante mencionar que se obtuvieron coeficientes de variación entre 1.7025 y 5.9970 para los estándares, sin embargo la literatura reporta que al emplear un método espectrofotométrico el coeficiente de variación no debe ser mayor a 2% (García, Cortés, 2002), no obstante los resultados superan este límite, uno de los factores que pudieron alterar los resultados es que la muestra se dejó reposar durante una hora pero probablemente no fue el tiempo suficiente para dejar reaccionar la mezcla por completo. Actualmente se llevan a cabo estudios donde se observa que las concentraciones de polifenoles pueden variar en función del tiempo de reacción por lo que el tiempo es un factor muy importante a controlar durante la determinación de polifenoles, así como la temperatura y la luz.

Por otro lado se realizó el análisis estadístico a los coeficientes de absorptividad molar de las diferentes curvas de calibración realizadas de manera individual para comparar los datos obtenidos y determinar si existe variación entre ellas (**Anexo 2, Tabla 10**), así también se compararon los coeficientes de un mismo sistema de las seis curvas de calibración indirectas (**Anexo 2, Tabla 11**) en donde se observó que en ambos casos no existe variación significativa con una probabilidad de $P=0.05$.

En la **Gráfica 2**. Se puede observar la tendencia lineal de la curva de calibración indirecta. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9991, el cual es muy cercano a 1, mostrando la relación que existe entre el aumento de la absorbancia y el incremento de la concentración de rutina, así mismo el coeficiente de determinación (r^2) es cercano a 1, lo que indica el ajuste de los datos obtenidos al modelo lineal.

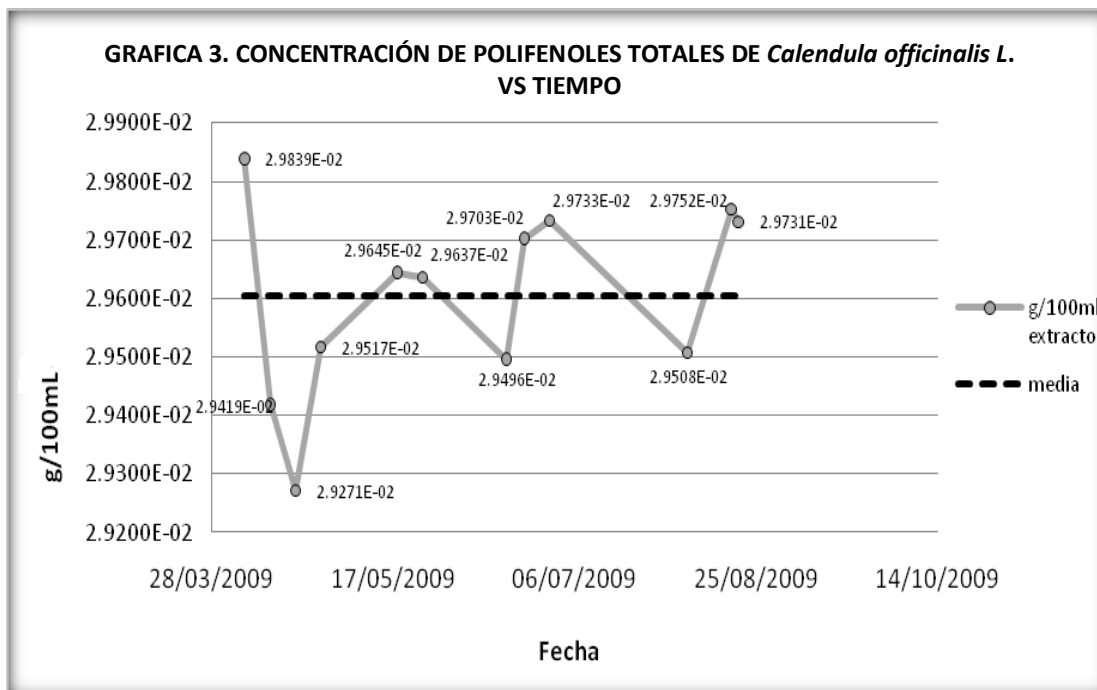


La **Tabla 2**, muestra las concentraciones estimadas de polifenoles totales del extracto de *Calendula officinalis L.*, y como se puede observar en la **Grafica 3**, no hay variación significativa de la cantidad de polifenoles con respecto a la media de las concentraciones, lo cual se demuestra con el análisis de varianza realizado a dichas concentraciones (**Ver Anexo 2**), lo que indica que los polifenoles se mantienen estables, por un periodo de tiempo prolongado, y con ello la actividad biológica que depende de los polifenoles se mantendrá constante, al ser proporcional. Cabe mencionar que es necesario realizar posteriormente un análisis propio de estabilidad ya que esta determinación solo hace referencia al tiempo que duró el experimento (4 meses), pero posteriormente habrá que establecer hasta que momento deja de ser constante.

Tabla2. Concentración de polifenoles totales de *Caléndula officinalis L.*

Fecha	(g equivalentes de rutina/100ml de extracto)
06/04/09	2.9839E-02 ± 0.0001
13/04/09	2.9419E-02 ± 0.0007
20/04/09	2.9517E-02 ± 0.0003
27/04/09	2.9517E-02 ± 0.0003
18/05/09	2.9645E-02 ± 0.0062
25/05/09	2.9637E-02 ± 0.0060
17/06/09	2.9496E-02 ± 0.0004
22/06/09	2.9703E-02 ± 0.0060
29/06/09	2.9733E-02 ± 0.0065
06/08/09	2.9508E-02 ± 0.0001
18/08/09	2.9752E-02 ± 0.0066
20/08/09	2.9731E-02 ± 0.0069
C.V.	0.4407

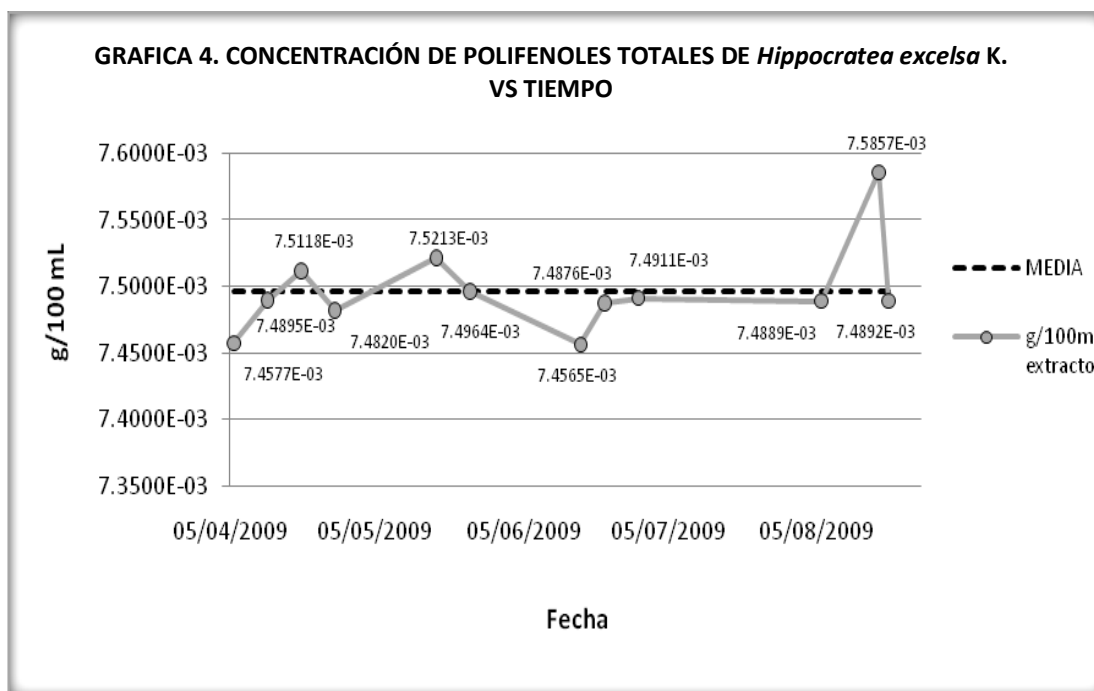
El resultado que se reporta es el promedio de tres mediciones por fecha durante 4 meses, realizadas bajo las mismas condiciones de análisis.



En el caso de *Hippocratea excelsa* K., se tiene que la concentración de polifenoles estimada es menor comparada con la del extracto de *Calendula officinalis* L. (Ver **Tabla 3 y Grafica 4**), manteniendo la misma tendencia de estabilidad con respecto al tiempo. El análisis estadístico realizado a las concentraciones estimadas de este extracto indican que no hay variación mayor a una probabilidad de $P=0.05$, por lo que las muestras no difieren significativamente en concentración.

Tabla 3. Concentración de polifenoles totales de *Hippocratea excelsa* K.

Fecha	(g equivalentes de rutina/100ml de extracto)
06/04/09	7.4577E-03 ± 0.0065
13/04/09	7.4895E-03 ± 0.0013
20/04/09	7.5118E-03 ± 0.0077
27/04/09	7.4820E-03 ± 0.0007
18/05/09	7.5213E-03 ± 0.0131
25/05/09	7.4964E-03 ± 0.0001
17/06/09	7.4565E-03 ± 0.0066
22/06/09	7.4876E-03 ± 0.0002
29/06/09	7.4911E-03 ± 0.0005
06/08/09	7.4889E-03 ± 0.0002
18/08/09	7.5857E-03 ± 0.0003
20/08/09	7.4892E-03 ± 0.0008
C.V.	0.4476



Se reitera la importancia de realizar estudios de estabilidad para este tipo de extractos, ya que en base a los resultados obtenidos, se puede observar que no existe variación significativa en las concentraciones de los extractos con respecto al tiempo, y debido a la actividad biológica que poseen estos compuestos es necesario saber, por cuanto tiempo es estable y en un futuro poder determinar la fecha de caducidad para un producto farmacéutico, alimenticio, o cosmético en el que sea empleado cualquiera de los extractos analizados en el presente trabajo.

Otro objetivo de este trabajo fue determinar el perfil electroforético de los extractos ya mencionados mediante la técnica de electroforesis capilar, con el propósito de observar su comportamiento y huella digital para evitar confusión con otro tipo de plantas muy semejantes entre sí, que tengan propiedades farmacológicas y/o biológicas diferentes a las esperadas.

Para llevar a cabo el análisis electroforético, las muestras etanólicas se filtraron a través de una membrana Durapore® 0.45 µm para proteger el equipo de precipitados y material sólido. La muestra se sónico durante 10 minutos con la finalidad de desgasificar la muestra.

Para la optimización de un método de electroforesis capilar, hay una serie de parámetros a considerar como son el voltaje, el pH y la concentración del buffer, la cual debe proporcionar una buena medida de separación con un alto número de picos con diferencias significativas en sus tiempos de migración para los picos vecinos, la exactitud de las mediciones experimentales (o movilidad) dependen en gran parte de estos factores.

Se prepararon tres muestras distintas bajo las siguientes condiciones de análisis para el extracto de *Calendula officinalis* L.

Capilar de sílice de 75 μm de diámetro interno (d.i.), 60 cm de longitud total (Lt), 50 cm de longitud efectiva (Le), se empleó un buffer de boratos 20mM pH 9.3, con una inyección hidrodinámica a 0.5 psi de presión, durante 5 segundos, se separó con un voltaje de 15 KV, durante 30 minutos a polaridad normal. Se utilizó un detector de arreglo de diodos UV-Vis, a una longitud de onda (λ) de 254nm debido a que los compuestos aromáticos tiene absorción a esa longitud de onda. Todas las lecturas se realizaron por triplicado.

De este análisis se obtuvieron una serie de electroferogramas en los cuales se detectaron compuestos aniónicos. Como se mencionó anteriormente los compuestos aniónicos son los últimos en registrarse y se presentan después del flujo electrosmótico.

La Muestra 1 de *Calendula officinalis* L. contiene buffer de boratos pH 9.35, para mantener el pH en la muestra. La fuerza iónica del amortiguador o buffer determina el ancho de la nube iónica que rodea a las moléculas cargadas. Cuanto mayor es la fuerza iónica, más estrechas son las bandas de separación de los compuestos.

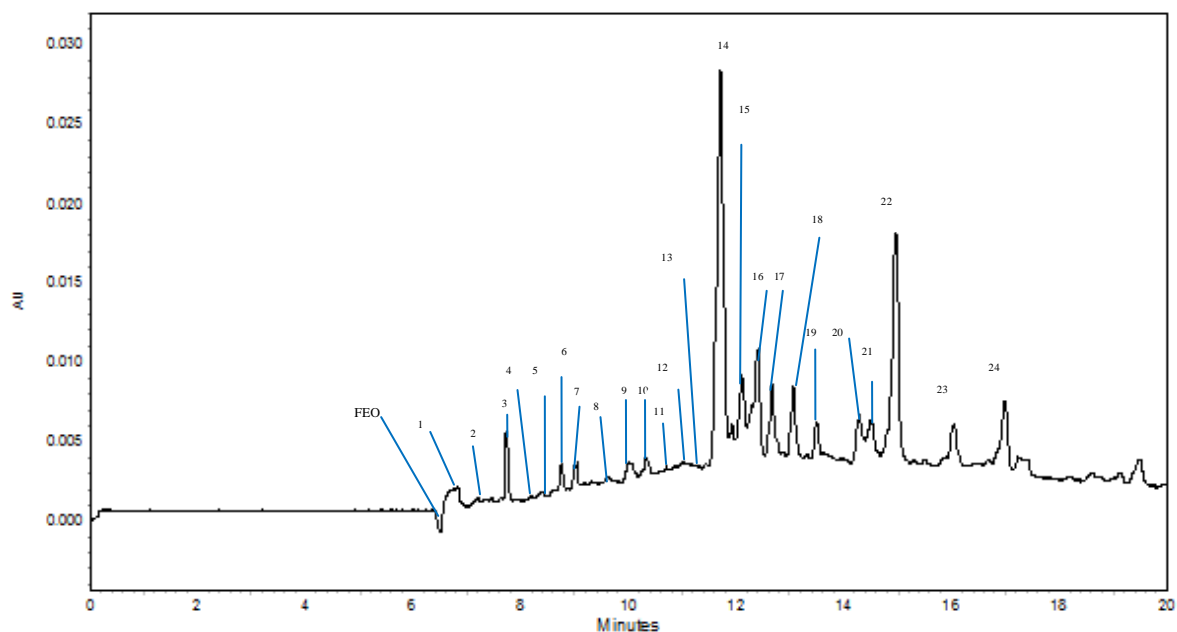


Fig. 13 Electroferograma de *Calendula officinalis* L. (Muestra 1)

La Figura anterior muestra uno de los electroferogramas obtenidos para la muestra 1, en cada electroferograma se observaron 24 picos, pertenecientes a compuestos aniónicos, el pico 1 corresponde al flujo electrosmótico, el cual es influenciado por distintas variables por lo que se presentan diferencias mínimas en el tiempo de migración en los electroferogramas aún siendo de la misma muestra, y por ello no es recomendable comparar los tiempos de migración de cada pico o los espectros de

absorción, la movilidad electroforética o el factor de migración ($tm/\text{área}$) es un dato más confiable.

En base a la movilidad electroforética de cada pico se deduce que los picos de *Calendula officinalis L.* de la muestra 1 son muy semejantes entre si, al realizar los cálculos estadísticos de contraste de significación, se observa que dicha movilidad presenta una varianza de 0.0028, la cual es muy pequeña, y el contraste F indica que no existe variación significativa con probabilidad P (0.05), aceptando la hipótesis nula. Por otro lado el coeficiente de variación muestra que los tiempos de migración son precisos, al obtener un coeficiente de variación menor a 1.5 (**Ver Anexo 3**)

Como ya se mencionó *Calendula officinalis L.* presenta diversos polifenoles entre ellos rutina, debido a esto a la muestra 2 se le adicionó un estandar de dicho polifenol para comprobar su presencia, y se observó en la **Fig. 14** que el pico No. 15 pertenece a la rutina, ya que al comparar uno de los electroferogramas de la muestra 2, con los obtenidos en la muestra 1, existe un crecimiento de este pico, verificando la existencia de los polifenoles una vez más en la planta.

Al relacionar los electroferogramas de los distintas muestras, nos damos cuenta que el flujo electroosmótico de la muestra 1 se registra un tiempo de 6.519 minutos, el electroferograma de la muestra 2 lo hace en un tiempo de 6.548, mientras que la muestra 3 se registra a los 6.521 minutos, el coeficiente de variación para estos datos es de 0.2480, por lo que no hay variación significativa entre ellos. Esto nos indica que el extracto se comporta de manera muy similar en las diferentes muestras, lo cual se puede apreciar al ver los diversos electroferogramas, en los que se registran el mismo número de compuestos aniónicos, por lo que es un buen avance en la determinación del perfil electroforetico pues en un futuro está técnica podría ser una forma de identificación de distintas especies vegetales.

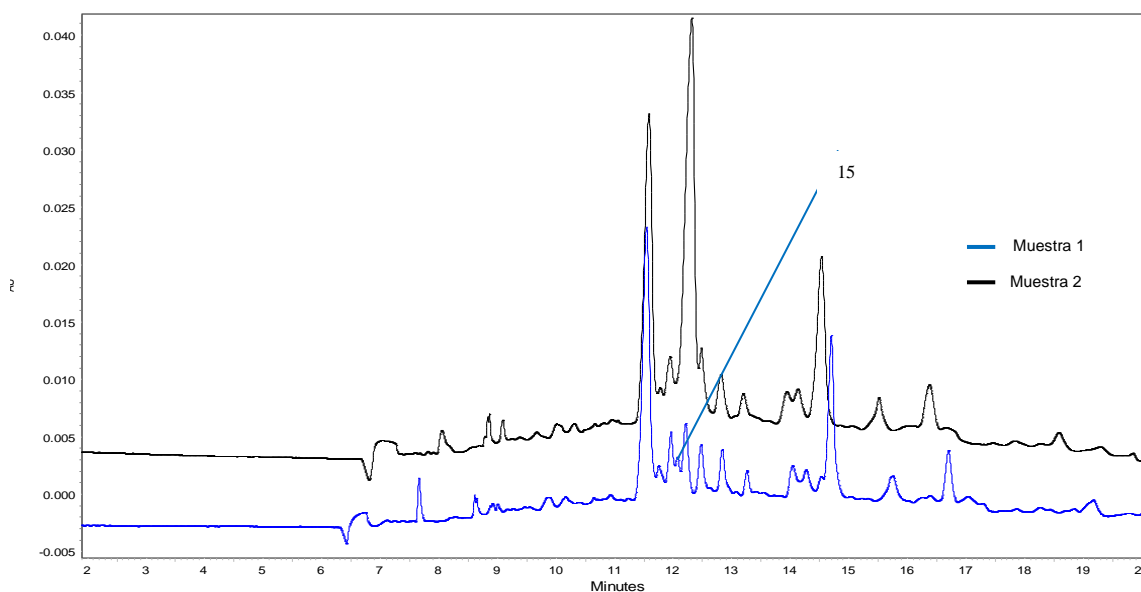


Fig. 14 Electroferograma de *Calendula officinalis L.* (Muestra 1 y 2)

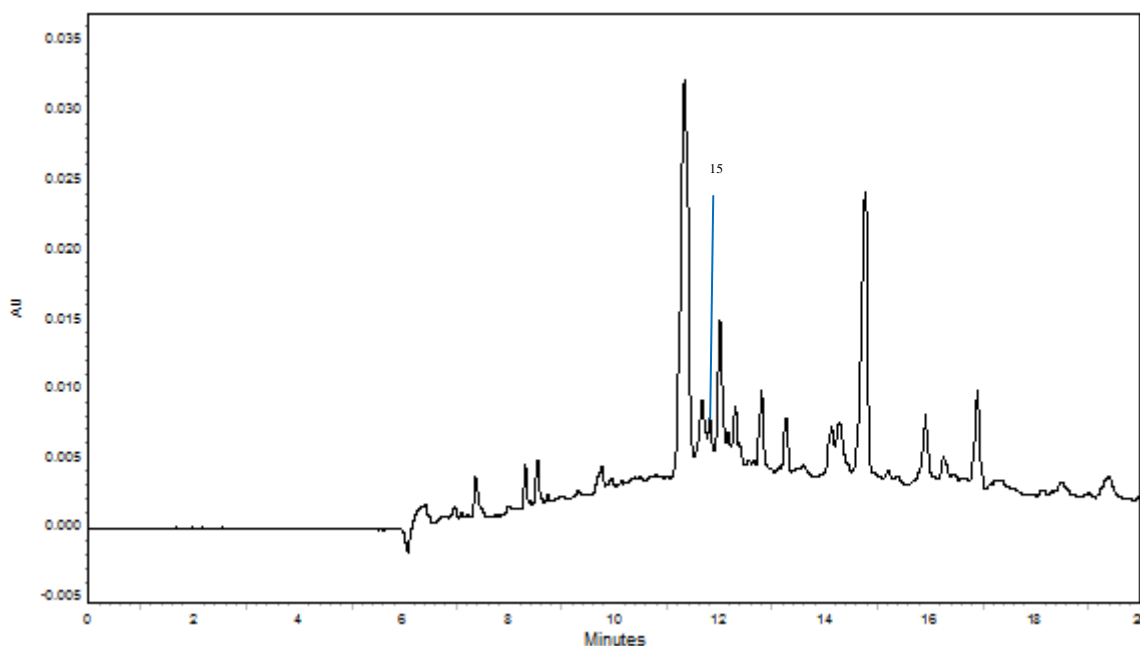


Fig. 15 Electroferograma de *Calendula officinalis* L. (Muestra 3)

Siguiendo la comparación de los electroferogramas de las muestras 1, 2 y 3, de *Calendula officinalis* L., observamos que en ninguno de ellos se encuentran compuestos catiónicos, ni tampoco neutros porque no se registran compuestos antes del flujo electroosmótico al pH de trabajo, sin embargo con ello no se concluye que no existan. Para el propósito de este trabajo no fue necesario determinarlo, hoy en día existe reportado en la literatura la cantidad de compuestos catiónicos y neutros encontrados en el extracto, a diferentes pH's y distintas concentraciones (Chavez E., 2009).

Los trabajos reportados acerca de *Calendula officinalis* L. indican que probablemente los compuestos aniónicos, es decir con carga negativa, los cuales se registran después del flujo electroosmótico podrían ser principalmente ácidos fenólicos ya que se caracterizan en tener en su estructura un grupo carboxilo y grupos hidroxilo, el pKa del ácido carboxílico se encuentra entre los valores de 3 a 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 encuentran entre 8 a 10, los ácidos fenólicos como: el ácido gálico, ácido siríngico, ácido cafeico, ácido vanílico presentes en *Calendula officinalis* L., 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 ácidos obteniendo carga negativa a pH de 9. (Rudolf C., 1977)

Hippocratea excelsa K. es otra planta a la que se le realizó un perfil electroforético empleando el mismo buffer de boratos 20mM pH 9.3, a diferencia de *Calendula officinalis* L., en este método se invirtió la polaridad (-20 kV), con un tiempo de

separación de 15 minutos, debido a que a polaridad normal el tiempo de separación de la muestra era muy prolongado aproximadamente después de una hora comenzaban a mostrarse los compuestos presentes (datos no incluidos), mientras que a polaridad reversa los resultados se mostraron inmediatamente.

Para realizar la huella digital de este extracto se realizaron diluciones con el buffer de boratos. La primer dilución fue 1:5 a la cual se denominó como Muestra 1, en la Muestra 2 se realizó una dilución de 1:10, y en ambas muestras se realizaron tres repeticiones continuas de los cuales en la **Fig. 16** se presenta un electroferograma de los obtenidos en la muestra 1

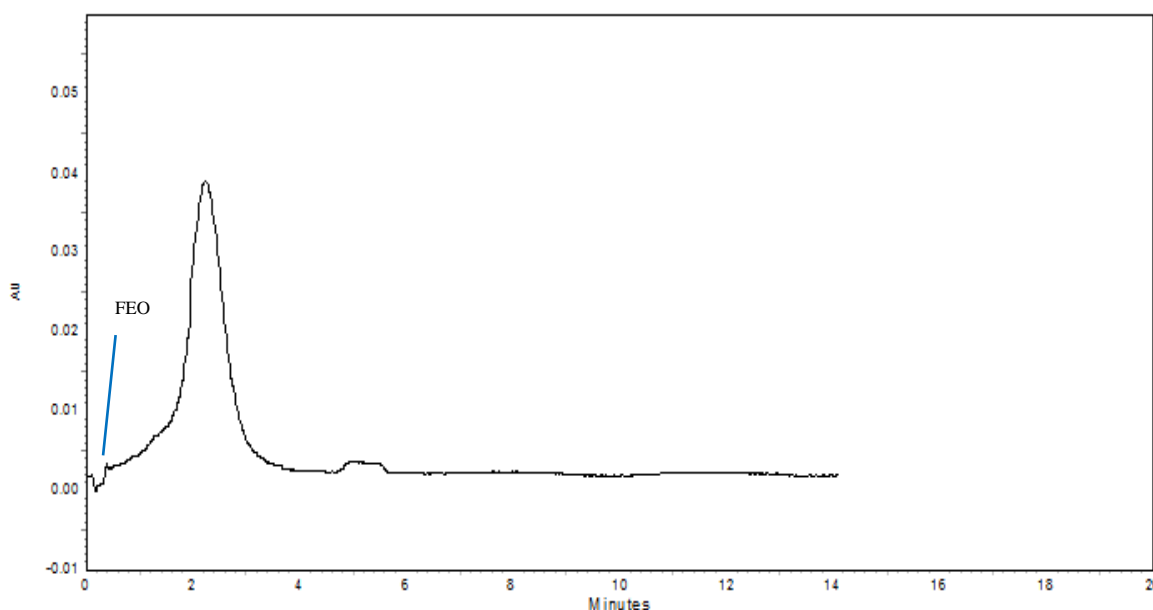


Fig. 16 Electroferograma de *Hippocratea excelsa* K. (Muestra1)

Todos presentan un compuesto registrado después del flujo electroosmótico, por lo que se considera como aniónico. La **Tabla 4** muestra una comparación de las movilidades electroforéticas del único compuesto registrado en las tres repeticiones de la muestra 1.

Tabla. 4 Movilidades electroforéticas del extracto de *Hippocratea excelsa* K. (Muestra 1).

No. Pico	t_{m_1}	t_{m_2}	t_{m_3}	$\bar{x} \mu_{ef_1}$	$\bar{x} \mu_{ef_2}$	$\bar{x} \mu_{ef_3}$	$\bar{x} \mu_{\epsilon O}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	S	C.V.
1	2.096	2.462	2.083	-1.171	-1.178	-1.171	1.253	-1.174 (± 0.0045)	0.004	0.343

Para determinar si existen compuestos que comigren, se realizó una dilución 1:10 con buffer de boratos 20 mM, pero se registro nuevamente el mismo pico a un tiempo de

migración similar **Fig.17**. El que se haya registrado solo un pico no indica que la planta contenga químicamente un único componente, sería necesario someter la muestra a distintos pH y diferentes concentraciones de buffer para favorecer la disociación de ciertos componentes que a pH 9.3 no es posible observar.

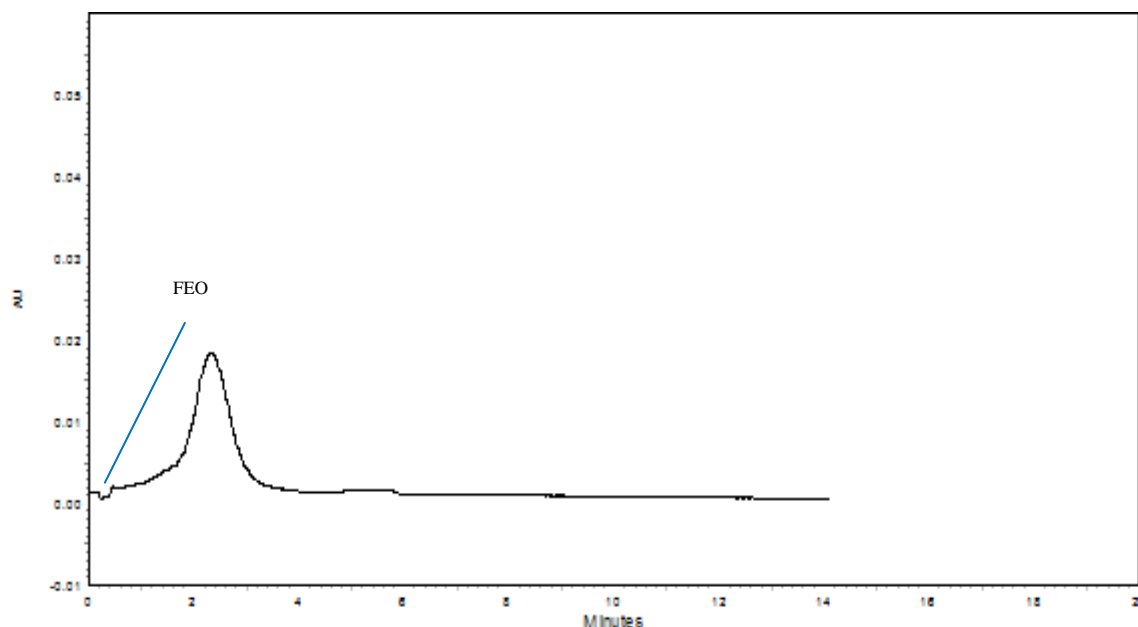


Fig. 17 Electroferograma de *Hippocratea excelsa* K. (Muestra 2)

Se observa para la muestra 2 un perfil semejante a la muestra 1 con la diferencia de que los picos se aprecian a una menor absorbancia incluyendo el pico del flujo electroosmótico, pero los tiempos de migración en las tres repeticiones de la muestra 2 (**Tabla 5**) son similares respecto a los indicados en la **Tabla 3**.

Tabla. 5 Movilidades electroforéticas del extracto de *Hippocratea excelsa* K. (Muestra 2).

No. Pico	tm ₁	tm ₂	tm ₃	\bar{x} μ_{ef1}	\bar{x} μ_{ef2}	\bar{x} μ_{ef3}	\bar{x} μ_{eo}	\bar{x} μ_{ef}	S	C.V.
1	2.402	2.373	2.220	-1.197	-1.198	-1.195	0.346	-1.197 \pm (0.0022)	0.002	-0.150

Los polifenoles son compuestos muy lábiles, los cuales se descomponen fácilmente, y en este estudio se evaluó su comportamiento durante un periodo de cuatro meses, obteniendo resultados contrarios a lo reportado en la literatura. Los polifenoles se mantienen estables sin cambios significativos y esto probablemente se debe a que el extracto contiene algún estabilizador como por ejemplo el ácido benzoico, que hace que los polifenoles se mantengan estables por periodos de tiempo prolongados. Sin embargo esto no es posible comprobarlo.

Ahora bien, existe una gran relación entre la cantidad de polifenoles estimados y los electroferogramas obtenidos para cada extracto. *Calendula officinalis L.*, contiene una cantidad 10 veces mayor de polifenoles que *Hippocratea excelsa K.*, por otro lado se aprecia en los electroferogramas que la cantidad de compuestos detectados en los extractos de *Calendula officinalis L.*, también es mayor, mientras que en *Hippocratea excelsa K.*, ocurre lo contrario solo se aprecia un polifenol de gran peso molecular basándonos en el orden de aparición de este componente, recordando que se registran primero los que poseen una carga más pequeña y un tamaño más grande que los registrados al final.

Hippocratea excelsa K. fue analizada también mediante cromatografía capilar micelar electrocinética (MECK) a pH 7 empleando buffer Fosfato 20 mM /SDS 25 mM a polaridad normal, en el que el flujo electroosmótico se registra antes que las micelas, ya que estas presentan una menor velocidad debido a su carga negativa. La ventana de migración 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. Cuando un compuesto es totalmente neutro en el buffer migra junto con el flujo electroosmótico correspondiéndole un valor de cero, pero si migra dentro de la ventana de migración tendrá valores de factor de retención de entre cero a uno, sin embargo aquellos que pasan al mismo tiempo en el buffer 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, por lo que probablemente los compuestos del extracto son totalmente solubles en el buffer y eluyeron junto con el FEO, y por lo tanto no se observó pico alguno. **Fig. 18**

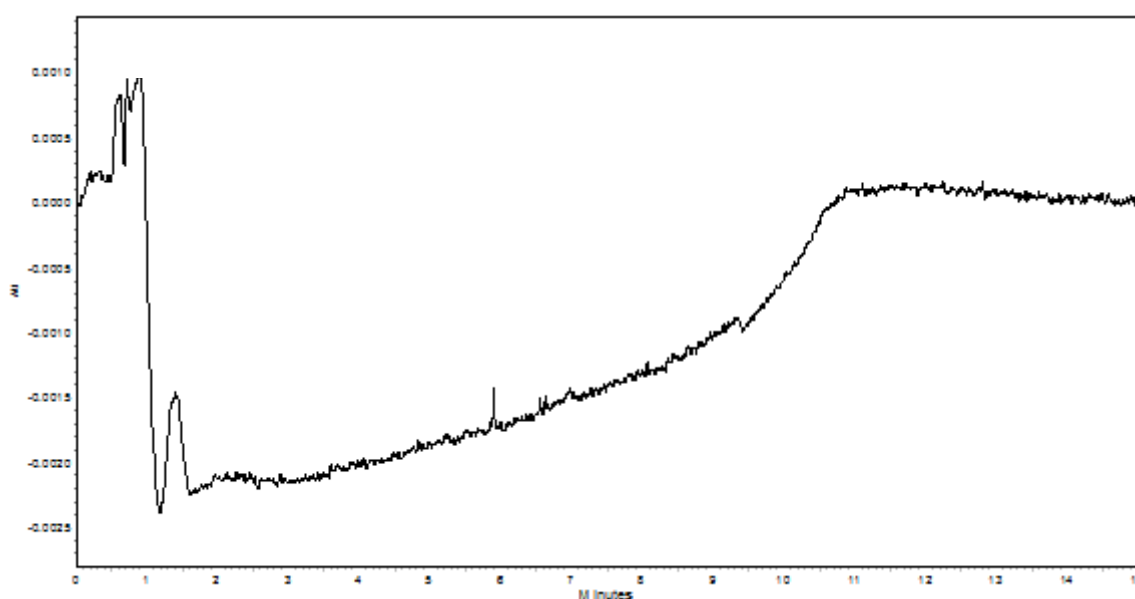


Fig. 18 Electroferograma de *Hippocratea excelsa K.* por MECK.



IX. CONCLUSIONES

- Se determinaron los perfiles electroforéticos de los extractos etanólicos de *Calendula officinalis L.*, e *Hippocratea excelsa K.*, mediante la técnica de electroforesis capilar, empleada como método de identificación de especies vegetales.
- La técnica de electroforesis capilar fue útil para separar una gran variedad de compuestos fitoquímicos, y así caracterizar los extractos etanólicos, brindando al estudio preliminar ventajas frente a otras técnicas desde el punto de vista económico y ecológico. La dificultad que presenta la técnica es la optimización de los parámetros de separación, sin embargo una vez obtenidos, la aplicación del método de caracterización es fácil y rápida.
- Por otro lado se estimó el contenido de polifenoles totales presentes en dichos extractos por espectroscopia UV-Vis estableciendo las condiciones de lectura óptimas, empleando el reactivo de Folin Ciocalteu mediante una curva de calibración indirecta del polifenol rutina, observando que la cantidad de polifenoles totales no varía significativamente con respecto al tiempo.
- El análisis espectrofotométrico es muy útil para determinar polifenoles totales ya que reduce el tiempo de análisis y se obtienen resultados reproducibles, esto nos permitió conocer la cantidad de polifenoles, en donde observamos que *Calendula officinalis L.* contiene mayor cantidad de estos con respecto a *Hippocratea excelsa K.*



X. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos se sugiere continuar con el estudio fitoquímico de los extractos de *Calendula officinalis* L. e *Hippocratea excelsa* K., lo que permitiría realizar una mejor separación de los compuestos, y de esa forma identificar cada uno de los agentes activos presentes en los extractos.

Posteriormente se recomienda la purificación de cada uno de los compuestos activos para realizar la evaluación farmacológica de los mismos.

Finalmente podemos decir que este trabajo es un avance en la identificación de diversas especies vegetales, por lo que también se propone realizar estudios de estabilidad de los extractos en un futuro, para poder determinar el tiempo de vida media de los polifenoles en extractos naturales, y con ello determinar en su momento fecha de caducidad de algún producto farmacéutico, cosmético o alimenticio que sea elaborado a base de estos.



ANEXO 1.

Análisis estadístico de la curva de calibración indirecta de rutina

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

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

Varianza: el cuadrado de la desviación estándar, S^2

Coficiente de variación: $(DR) = 100 \left(\frac{S}{\bar{x}} \right)$

Variación dentro de muestras: $\sum_i \sum_j x_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$

Variación entre muestras: $\sum_i \frac{(T_i^2 - n)}{(T)^2 / N}$

Donde $N = nh$ = Número total de medidas

T_i = Suma de las medidas en la i -ésima muestra

T = Suma de todas las medidas, gran total.

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

El estadístico del contraste es $F = \text{Cuadrado medio entre muestras} / \text{Cuadrado medio dentro de muestras}$ y el valor crítico es: $F_{h-1, N-h}$.



ANEXO 2

TABLA 1. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 1

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.2079	0.4509	0.6486	0.8489	1.0222	1.2038	1.5664
Abs 2	0.208	0.4509	0.6488	0.8687	1.0221	1.2038	1.5666
Abs 3	0.2079	0.4510	0.649	0.8886	1.0221	1.2037	1.5665
\bar{x}	0.2079	0.4509	0.6488	0.8687	1.0221	1.2038	1.5665

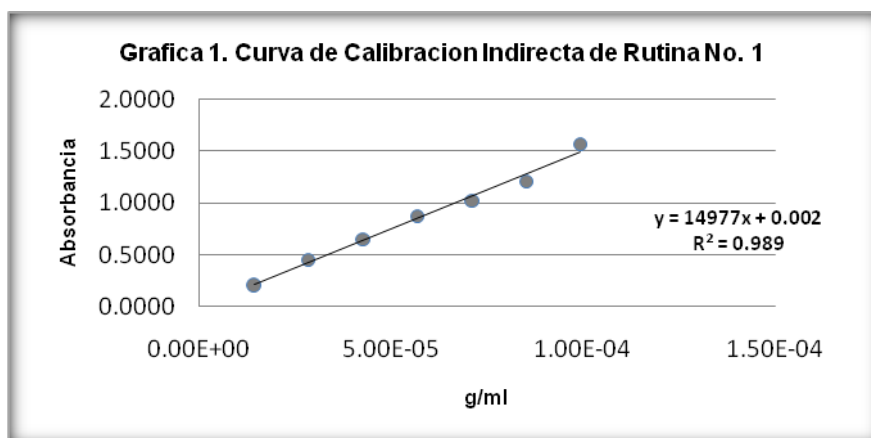


TABLA 2. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 2

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.2368	0.4176	0.6431	0.8648	1.0536	1.2354	1.5186
Abs 2	0.2369	0.4176	0.6430	0.8650	1.0537	1.2355	1.5185
Abs 3	0.2370	0.4179	0.6431	0.8648	1.0534	1.2355	1.5189
\bar{x}	0.2369	0.2369	0.2369	0.2369	0.2369	0.2369	0.2369

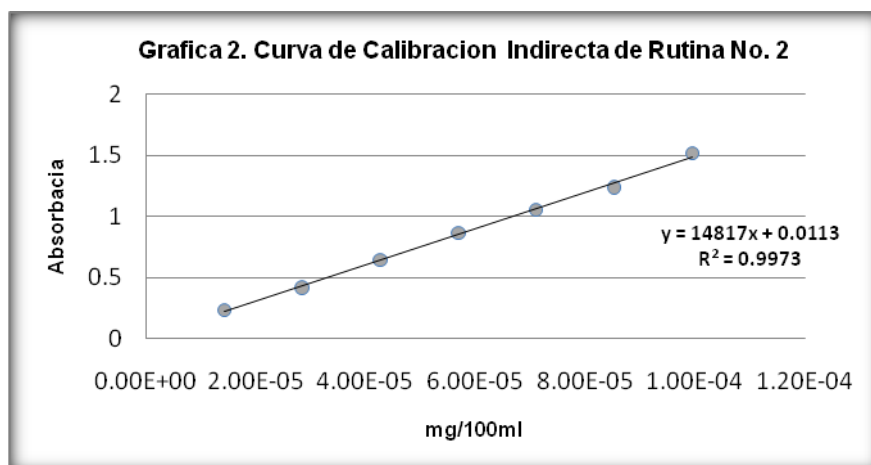




TABLA 3. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 3

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.2038	0.391	0.6192	0.8558	1.0655	1.2905	1.5504
Abs 2	0.2037	0.3909	0.6191	0.8559	1.0655	1.2905	1.5505
Abs 3	0.2037	0.3909	0.6191	0.8559	1.0654	1.2907	1.5505
\bar{x}	0.2037	0.3909	0.6191	0.8559	1.0655	1.2906	1.5505

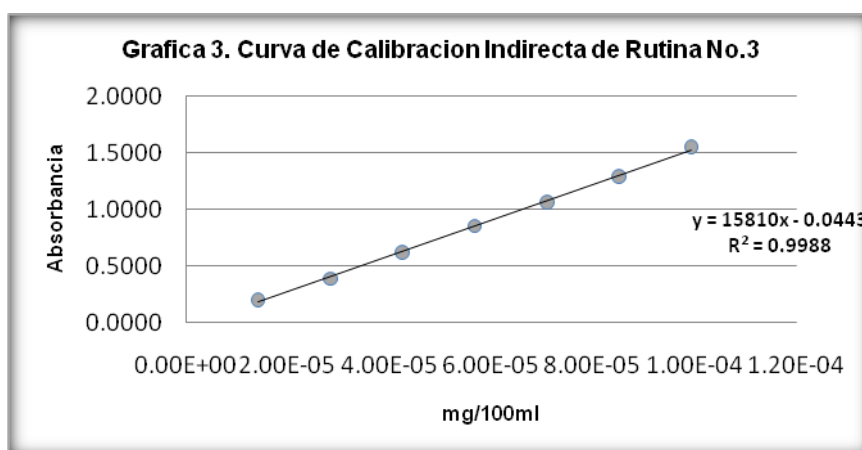


TABLA 4. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 4

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.212	0.4634	0.6111	0.8619	1.0575	1.2806	1.4893
Abs 2	0.2121	0.4633	0.611	0.8619	1.0574	1.2807	1.4892
Abs 3	0.2122	0.4633	0.611	0.8619	1.0577	1.2806	1.4892
\bar{x}	0.2121	0.4633	0.611	0.8619	1.0575	1.2806	1.4892

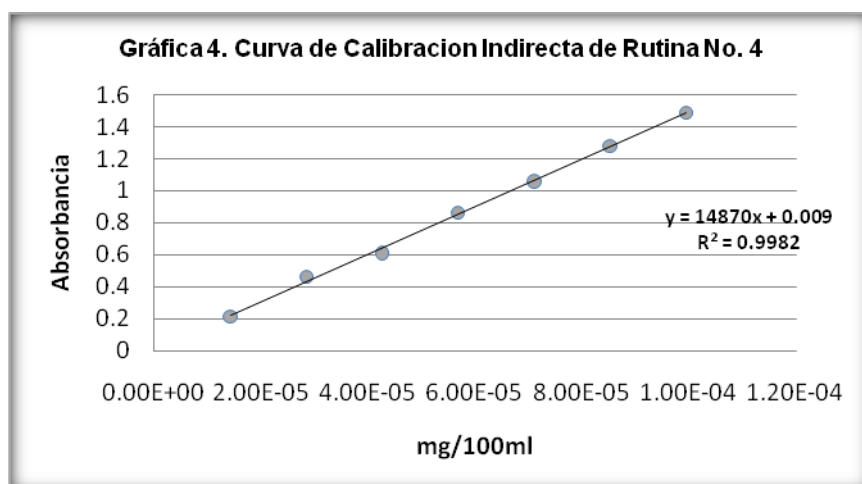




TABLA 5. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 5

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.2151	0.4447	0.6163	0.8979	1.1152	1.2426	1.5221
Abs 2	0.2152	0.4447	0.6162	0.8978	1.115	1.2424	1.5223
Abs 3	0.2151	0.4446	0.6162	0.8979	1.1151	1.2425	1.5222
\bar{x}	0.2151	0.4447	0.6162	0.8979	1.1151	1.2425	1.5222

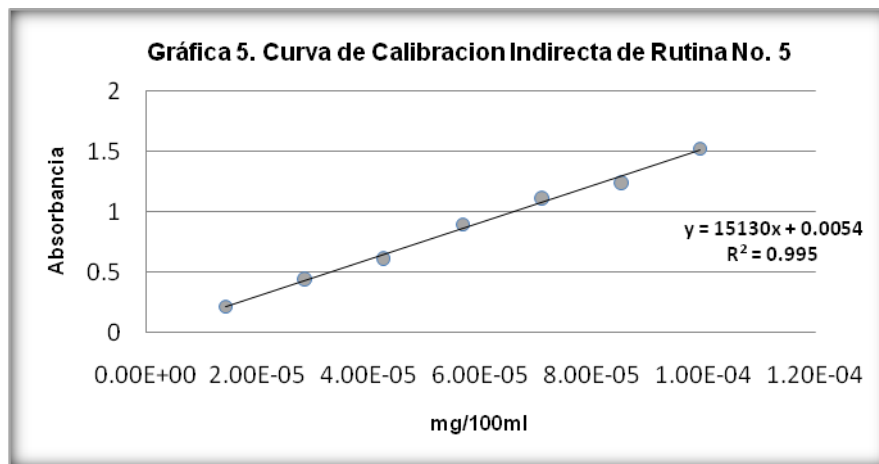
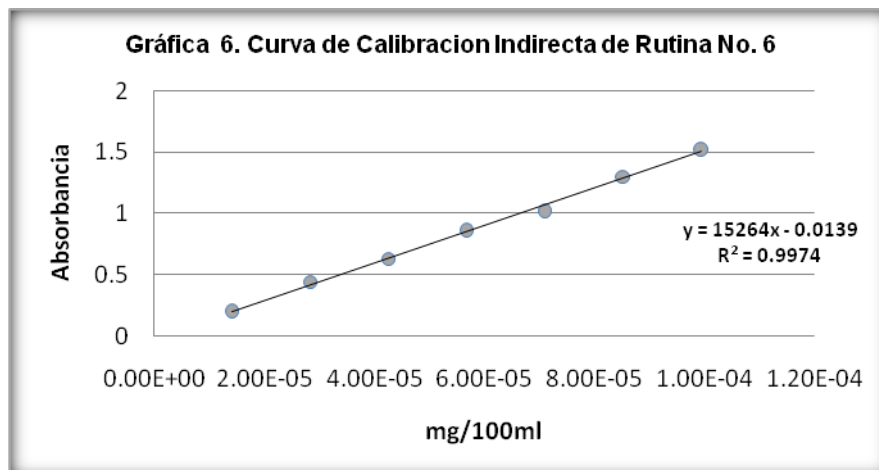


TABLA 6. CURVA DE CALIBRACIÓN INDIRECTA DE RUTINA NO. 6

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Abs 1	0.2019	0.4372	0.6295	0.8645	1.0199	1.2962	1.5223
Abs 2	0.2019	0.4374	0.6296	0.8646	1.02	1.2962	1.5222
Abs 3	0.2019	0.4373	0.6296	0.8645	1.0198	1.2962	1.5221
\bar{x}	0.2019	0.4373	0.6296	0.8645	1.0199	1.2962	1.5222



**TABLA 7. ANOVA DE UN FACTOR PARA LAS ABSORBANCIAS DE LOS SISTEMAS QUE CONFORMAN**

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Curva de Calibración 1	0.2079	0.4509	0.6488	0.8687	1.0221	1.2038	1.5665
Curva de Calibración 2	0.2369	0.4178	0.6431	0.8649	1.0536	1.2355	1.5187
Curva de Calibración 3	0.2037	0.3909	0.6191	0.8559	1.0655	1.2906	1.5505
Curva de Calibración 4	0.2121	0.4633	0.611	0.8619	1.0575	1.2806	1.4892
Curva de Calibración 5	0.2151	0.4447	0.6162	0.8979	1.1151	1.2425	1.5222
Curva de Calibración 6	0.2019	0.4373	0.6296	0.8645	1.0199	1.2962	1.5222

LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS DE RUTINA

TABLA 8. ANOVA DE LAS ABSORBANCIAS DE LOS SISTEMAS QUE CONFORMAN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS DE RUTINA.

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre muestras	0.00079062	6	0.00013177	0.000608035	1	2.3239938
Dentro de muestras	9.10207198	42	0.216716			
Total	9.1028626	48				

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Curva de Calibración 1	7	5.9687	0.85267143	0.213419916
Curva de Calibración 2	7	5.9705	0.85292857	0.207146822
Curva de Calibración 3	7	5.9762	0.85374286	0.235499486
Curva de Calibración 4	7	5.9756	0.85365714	0.208445256
Curva de Calibración 5	7	6.0537	0.86481429	0.216495635
Curva de Calibración 6	7	5.9716	0.85308571	0.219814658
Curva de Calibración 1	7	5.98605	0.85515	0.216190223

Si la hipótesis nula es correcta, la estimación de varianzas (σ_0^2), no debería diferir significativamente. Si es incorrecta la estimación entre muestras de σ_0^2 será mayor que la estimación dentro de las muestras, debido a la variación entre muestras.

Para contrastar si la estimación entre muestras es significativamente más grande se utiliza un contraste F de una cola, en donde el valor crítico de F es mayor que F calculado, se cumple la hipótesis nula, es decir las medias muestrales no difieren significativamente.



TABLA 9. COEFICIENTE DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE LAS DIFERENTES CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS DE RUTINA.

Sistema	1	2	3	4	5	6	7
Curva de Calibración 1	1.46E+04	1.59E+04	1.52E+04	1.53E+04	1.44E+04	1.41E+04	1.58E+04
Curva de Calibración 2	1.67E+04	1.47E+04	1.51E+04	1.52E+04	1.48E+04	1.45E+04	1.53E+04
Curva de Calibración 3	1.43E+04	1.38E+04	1.45E+04	1.51E+04	1.50E+04	1.51E+04	1.56E+04
Curva de Calibración 4	1.49E+04	1.63E+04	1.43E+04	1.52E+04	1.49E+04	1.50E+04	1.50E+04
Curva de Calibración 5	1.51E+04	1.57E+04	1.45E+04	1.58E+04	1.57E+04	1.46E+04	1.53E+04
Curva de Calibración 6	1.42E+04	1.54E+04	1.48E+04	1.52E+04	1.44E+04	1.52E+04	1.53E+04

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Concentración 1	7	105326.107	15046.5867	453723.9254
Concentración 2	7	106337.005	15191.0008	512321.2808
Concentración 3	7	103464.202	14780.6003	370438.1512
Concentración 4	7	105673.793	15096.2561	356489.6496
Concentración 5	7	106682.076	15240.2965	293459.722
Concentración 6	7	104507.897	14929.6996	229921.1474
Concentración 7	7	105326.107	15046.5867	453723.9254

TABLA 10. ANOVA DE LOS COEFICIENTES DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS DE RUTINA.

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	Valor Critico para F
Entre Muestras	1016773.18	5	203354.636	0.550511282	0.73684796	2.47716867
Dentro de Muestras	13298123.3	36	369392.313			
Total	14314896.4	41				



TABLA 11. ANOVA DE LOS COEFICIENTES DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE LOS SISTEMAS QUE CONFORMAN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN INDIRECTAS DE RUTINA.

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	Valor Critico para F
Entre muestras	2607653.11	6	434608.852	1.299307564	0.28320162	2.371781
Dentro de muestras	11707243.3	35	334492.666			
Total	14314896.4	41				

TABLA 12. CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE *Calendula officinalis* L.

Fecha	(g equivalentes de rutina/ 100ml de extracto)
06/04/09	2.9839E-02
13/04/09	2.9419E-02
20/04/09	2.9517E-02
27/04/09	2.9517E-02
18/05/09	2.9645E-02
25/05/09	2.9637E-02
17/06/09	2.9496E-02
22/06/09	2.9703E-02
29/06/09	2.9733E-02
06/08/09	2.9508E-02
18/08/09	2.9752E-02
20/08/09	2.9731E-02
C.V.	0.4407

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Columna 1	12	10.7864	0.8988	0.0008
Columna 2	12	10.8048	0.9004	0.0008
Columna 3	12	10.9069	0.9089	0.0013



TABLA 13. ANOVA DE LAS CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES TOTALES DE *Calendula officinalis L.*

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	Valor Critico para F
Entre muestras	0.000702312	2	0.000351156	0.35473263	0.703492364	3.284917651
Dentro de muestras	0.032599196	33	0.000987854			
Total	0.033301508	35				

TABLA 14. CONCENTRACIONES ESTIMADAS DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE *Hippocratea excelsa K.*

Fecha	(g equivalentes de rutina/ 100ml de extracto)
06/04/09	7.4577E-03
13/04/09	7.4895E-03
20/04/09	7.5118E-03
27/04/09	7.4820E-03
18/05/09	7.5213E-03
25/05/09	7.4964E-03
17/06/09	7.4565E-03
22/06/09	7.4876E-03
29/06/09	7.4911E-03
06/08/09	7.4889E-03
18/08/09	7.5857E-03
20/08/09	7.4892E-03
C.V.	0.4476

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Columna 1	12	9.48327	0.7902725	1.8229E-05
Columna 2	12	9.4658	0.7888166	3.6422E-05
Columna 3	12	9.4779	0.789825	2.7622E-05

TABLA 15. ANOVA DE LAS CONCENTRACIONES DE POLIFENOLES TOTALES DE *Hippocratea excelsa K.*

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	Valor Critico para F
Entre muestras	1.33458E-05	2	6.67289E-06	0.24332098	0.785413984	3.284917651
Dentro de muestras	0.000904999	33	2.74242E-05			
Total	0.000918345	35				



ANEXO 3

TABLA 16. EXTRACTO ETANÓLICO DE *Calendula officinalis L.* (MUESTRA 1).

No. Pico	tm1	tm2	tm3	$\bar{x} \mu_{ef1}$	$\bar{x} \mu_{ef2}$	$\bar{x} \mu_{ef3}$	$\bar{x} \mu_{eo}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	S	C.V.*
1	6.795	6.938	6.702	-9.58E-01	-9.59E-01	-9.58E-01	6.521	-9.584E-01	3.831E-04	-0.040
2	7.304	6.980	7.259	-9.79E-01	-9.78E-01	-9.79E-01		-9.787E-01	5.279E-04	-0.054
3	7.567	7.533	7.596	-9.80E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.798E-01	8.432E-05	-0.009
4	7.625	7.636	7.638	-9.80E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.800E-01	1.839E-05	-0.002
5	7.879	7.779	7.779	-9.81E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.804E-01	1.441E-04	-0.015
6	8.592	8.762	8.667	-9.82E-01	-9.83E-01	-9.82E-01		-9.824E-01	1.731E-04	-0.018
7	8.901	8.688	8.968	-9.83E-01	-9.82E-01	-9.83E-01		-9.827E-01	2.876E-04	-0.029
8	8.928	8.929	9.483	-9.83E-01	-9.83E-01	-9.84E-01		-9.832E-01	5.785E-04	-0.059
9	9.142	9.579	9.967	-9.83E-01	-9.84E-01	-9.85E-01		-9.840E-01	6.939E-04	-0.071
10	9.752	9.938	10.176	-9.84E-01	-9.85E-01	-9.85E-01		-9.846E-01	3.274E-04	-0.033
11	10.342	10.033	10.275	-9.85E-01	-9.85E-01	-9.85E-01		-9.850E-01	2.401E-04	-0.024
12	10.367	10.258	10.633	-9.85E-01	-9.85E-01	-9.86E-01		-9.853E-01	2.701E-04	-0.027
13	10.946	11.633	11.658	-9.86E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.866E-01	4.849E-04	-0.049
14	11.742	11.771	11.875	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.870E-01	7.669E-05	-0.008
15	12.138	12.017	11.958	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.873E-01	9.666E-05	-0.010
16	12.288	12.292	12.321	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.876E-01	1.820E-05	-0.002
17	12.579	12.554	12.592	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.878E-01	1.870E-05	-0.002
18	12.921	12.929	12.971	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.882E-01	2.451E-05	-0.002
19	13.357	13.342	13.396	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.886E-01	2.386E-05	-0.002
20	14.167	14.133	14.196	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.892E-01	2.405E-05	-0.002
21	14.423	14.338	14.396	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.894E-01	3.214E-05	-0.003
22	14.992	14.783	14.850	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.897E-01	7.362E-05	-0.007
23	15.314	15.217	15.192	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.900E-01	4.236E-05	-0.004
24	15.871	15.821	15.854	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.903E-01	1.549E-05	-0.002

*El coeficiente de variación de los tiempos de migración de cada pico del electroferograma

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Columna 1	27	26.5018	0.98155	0.00028
Columna 2	27	26.4991	0.98145	0.00028
Columna 3	27	26.4985	0.98142	0.00028

TABLA 17. ANOVA DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE *Calendula officinalis L.* (MUESTRA 1)

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	V. Critico para F
Entre muestras	2.36-07	2	1.2E-07	0.0043	0.999572876	3.11379226
Dentro de muestras	0.021586	78	0.00028			
Total	0.021586	80				



TABLA 18. EXTRACTO ETANÓLICO DE *Calendula officinalis* L. (MUESTRA 2).

No. Pico	tm1	tm2	tm3	$\bar{x} \mu_{ef1}$	$\bar{x} \mu_{ef2}$	$\bar{x} \mu_{ef3}$	$\bar{x} \mu_{\epsilon 0}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	S	C.V.*
1	7.813	6.854	7.042	-9.80E-01	-9.78E-01	-9.78E-01	6.548	-9.788E-01	1.438E-03	-0.147
2	8.542	7.829	7.671	-9.82E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.809E-01	1.075E-03	-0.110
3	8.596	8.650	7.862	-9.82E-01	-9.82E-01	-9.81E-01		-9.817E-01	9.912E-04	-0.101
4	8.629	8.679	7.929	-9.82E-01	-9.82E-01	-9.81E-01		-9.818E-01	9.329E-04	-0.095
5	8.808	8.904	8.454	-9.83E-01	-9.83E-01	-9.82E-01		-9.825E-01	4.823E-04	-0.049
6	8.842	9.171	8.483	-9.83E-01	-9.83E-01	-9.82E-01		-9.827E-01	6.760E-04	-0.069
7	8.992	9.342	8.583	-9.83E-01	-9.84E-01	-9.82E-01		-9.830E-01	7.245E-04	-0.074
8	9.137	9.842	8.658	-9.83E-01	-9.84E-01	-9.82E-01		-9.834E-01	1.064E-03	-0.108
9	9.775	10.129	8.783	-9.84E-01	-9.85E-01	-9.83E-01		-9.840E-01	1.208E-03	-0.123
10	10.067	10.471	9.671	-9.85E-01	-9.85E-01	-9.84E-01		-9.848E-01	6.033E-04	-0.061
11	10.575	10.754	9.887	-9.86E-01	-9.86E-01	-9.85E-01		-9.853E-01	6.606E-04	-0.067
12	10.717	11.425	10.046	-9.86E-01	-9.87E-01	-9.85E-01		-9.857E-01	9.177E-04	-0.093
13	11.350	11.621	10.409	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.85E-01		-9.862E-01	8.082E-04	-0.082
14	11.596	11.779	10.579	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.86E-01		-9.865E-01	7.966E-04	-0.081
15	11.713	12.179	11.146	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.86E-01		-9.869E-01	5.830E-04	-0.059
16	12.083	12.333	11.475	-9.87E-01	-9.88E-01	-9.87E-01		-9.872E-01	4.781E-04	-0.048
17	12.246	12.679	12.246	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.877E-01	2.459E-04	-0.025
18	12.579	13.075	12.383	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.879E-01	3.354E-04	-0.034
19	12.958	13.829	12.783	-9.88E-01	-9.89E-01	-9.88E-01		-9.884E-01	4.819E-04	-0.049
20	13.700	14.017	13.525	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.889E-01	2.006E-04	-0.020
21	13.887	14.433	13.663	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.891E-01	3.058E-04	-0.031
22	14.301	15.429	14.105	-9.89E-01	-9.90E-01	-9.89E-01		-9.895E-01	4.991E-04	-0.050
23	15.225	16.317	15.063	-9.90E-01	-9.91E-01	-9.90E-01		-9.902E-01	4.222E-04	-0.043
24	15.738	17.454	15.967	-9.90E-01	-9.91E-01	-9.90E-01		-9.907E-01	5.154E-04	-0.052

*El coeficiente de variación de los tiempos de migración de cada pico del electroferograma

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Columna 1	24	23.6580	0.9857	8.3235E-06
Columna 2	24	23.6647	0.9860	1.1463E-05
Columna 3	24	23.6385	0.9849	1.1867E-05

TABLA 19. ANOVA DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE *Calendula officinalis* L. (MUESTRA 2)

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	V. Critico para F
Entre muestras	1.5503E-05	2	7.7513E-07	0.73462792	0.483397595	3.12964398
Dentro de muestras	0.00072805	69	1.0551E-05			
Total	0.00074355	71				



TABLA 20. EXTRACTO ETANÓLICO DE *Calendula officinalis* L. (MUESTRA 3).

No. Pico	tr1	tr2	tr3	$\bar{x} \mu_{ef1}$	$\bar{x} \mu_{ef2}$	$\bar{x} \mu_{ef3}$	$\bar{x} \mu_{\epsilon 0}$	$\bar{x} \mu_{ef}$	S	C.V.*
1	6.795	6.938	6.702	-9.58E-01	-9.59E-01	-9.58E-01	6.521	-9.584E-01	3.831E-04	-0.040
2	7.304	6.980	7.259	-9.79E-01	-9.78E-01	-9.79E-01		-9.787E-01	5.279E-04	-0.054
3	7.567	7.533	7.596	-9.80E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.798E-01	8.432E-05	-0.009
4	7.625	7.636	7.638	-9.80E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.800E-01	1.839E-05	-0.002
5	7.879	7.779	7.779	-9.81E-01	-9.80E-01	-9.80E-01		-9.804E-01	1.441E-04	-0.015
6	8.592	8.762	8.667	-9.82E-01	-9.83E-01	-9.82E-01		-9.824E-01	1.731E-04	-0.018
7	8.901	8.688	8.968	-9.83E-01	-9.82E-01	-9.83E-01		-9.827E-01	2.876E-04	-0.029
8	8.928	8.929	9.483	-9.83E-01	-9.83E-01	-9.84E-01		-9.832E-01	5.785E-04	-0.059
9	9.142	9.579	9.967	-9.83E-01	-9.84E-01	-9.85E-01		-9.840E-01	6.939E-04	-0.071
10	9.752	9.938	10.176	-9.84E-01	-9.85E-01	-9.85E-01		-9.846E-01	3.274E-04	-0.033
11	10.342	10.033	10.275	-9.85E-01	-9.85E-01	-9.85E-01		-9.850E-01	2.401E-04	-0.024
12	10.367	10.258	10.633	-9.85E-01	-9.85E-01	-9.86E-01		-9.853E-01	2.701E-04	-0.027
13	10.946	11.633	11.658	-9.86E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.866E-01	4.849E-04	-0.049
14	11.742	11.771	11.875	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.870E-01	7.669E-05	-0.008
15	12.138	12.017	11.958	-9.87E-01	-9.87E-01	-9.87E-01		-9.873E-01	9.666E-05	-0.010
16	12.288	12.292	12.321	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.876E-01	1.820E-05	-0.002
17	12.579	12.554	12.592	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.878E-01	1.870E-05	-0.002
18	12.921	12.929	12.971	-9.88E-01	-9.88E-01	-9.88E-01		-9.882E-01	2.451E-05	-0.002
19	13.357	13.342	13.396	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.886E-01	2.386E-05	-0.002
20	14.167	14.133	14.196	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.892E-01	2.405E-05	-0.002
21	14.423	14.338	14.396	-9.89E-01	-9.89E-01	-9.89E-01		-9.894E-01	3.214E-05	-0.003
22	14.992	14.783	14.850	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.897E-01	7.362E-05	-0.007
23	15.314	15.217	15.192	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.900E-01	4.236E-05	-0.004
24	15.871	15.821	15.854	-9.90E-01	-9.90E-01	-9.90E-01		-9.903E-01	1.549E-05	-0.002

*El coeficiente de variación de los tiempos de retención de cada pico del electroferograma

Resumen de Grupos				
GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
Columna 1	24	26.6247	0.9843	4.315E-05
Columna 2	24	23.6247	0.9843	4.2616E-05
Columna 3	24	23.6285	0.9845	4.3877E-05

TABLA 21. ANOVA DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE *Calendula officinalis* L. (MUESTRA 3).

Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F Calculada	Probabilidad	V. Critico para F
Entre muestras	4.379E-07	2	2.019E-07	0.004672	0.99533921	3.1296439
Dentro de muestras	0.00298178	69	4.3214E-05			
Total	0.00298218	71				



XI. REFERENCIAS

1. Acosta, L., Rodríguez, C., & Sánchez, E. (2001). *Instructivo técnico de Calendula officinalis*. *Revista Cubana Farm*, pág. 7-23
2. Adamovics John A. (1997). *Chromatographic analysis of pharmaceuticals*, 2 ed. New York, pp. 527
3. Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*, 1 ed. Argentina Ed. Corpus, Buenos aires, pp. 1143
4. Altria K., Kelly M., & Clark B., (1998). *Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis*. *Trends analytical chemistry*, 17 (4), pág. 214-226
5. Angeles Ricaño, M., Cruz Jiménez, G., & et.al. (2010). *Elaboración de una forma farmacéutica sólida (ovulos), con extracto de Calendula officinalis para el tratamiento de ectropión en infecciones vaginales humanas*. UNAM, México.
6. Azdeen H., Gajdosova D., & Havel J., (2006). Analysis of *Salvia officinalis* plant extracts by capillary electrophoresis. *J. Sep, Science Journal* pag.1188-1192.
7. Bernat V., & Cañigueral S., (2003). *Fitoterapia: Vademecum de prescripción*. 1 ed. Ed. Elsevier, España.
8. Boucaud-Maitre Y., Algernon O., & Raynaud J., (1988). *Cytotoxic and antitumoral activity of Calendula officinalis extracts*. *Rev. Pharmazie*, Vol.43 pag. 220-221.
9. Bruneton Jean, (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia (Plantas medicinales)* Ed. Acribia, España p.p. 1099
10. Bye R., Linares E., & Estrada E., (1995). *Phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in phytochemistry*. *Fito chemistry*, pag.65-66
11. Castillo G., & Martínez S., (2007). *Manual de fitoterapia*. 1ª ed. Editorial: Masson. España. pág. 38.
12. Castillo Rodríguez M., et. al (2005). *Fundamentos de electroforesis capilar*, UNAM, FES-Cuautitlán, México pp. 180
13. Chávez Ortiz E., (2009). *Estudio preliminar de Calendula officinalis por electroforesis capilar*, UNAM, México. pág. 77
14. Dastmalchi K., Dorman D., Kosarb M., & Hiltunen R. (2007). *Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble. Moldavian balm (Dracocephalum oldavica L.) extract*. *Fito chemistry*, pag. 239-248.
15. Della L., Turbaro A., Sosa A., Becker H., et.al.(1994). *The role of triterpenoids in the tropical anti-inflammatory activity of Calendula officinalis flowers*. *Medicinal Plants*. pág. 9-15
13. Díaz A., Barcena J.,Fernandez E., & Galvan A. (2003). *Espectroscopía de absorbancia y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Ed. Panamericana, México, pág. 1-8
16. Dodson C. & Robyns A., (1965). *Flora of Panama Hippocrateaceae*. *Ann. Miss. Bot. Garden* Vol. 52(1) Peru, pág: 81-98.
17. Dumenil, G., & Balansard, C. (1980). *Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (Calendula officinalis L.) and mother homeopathic tinctures of C. officinalis L. and C. arvensis L.* *France Annales*. Ed.Pharmaceutiques Francaises, Francia pág: 493-499.



18. Elostá S., & Havel J. (2006). *A new capillary zone electrophoresis method for the analysis of Ginkgo biloba extracts and Ginkgo biloba pharmaceutical products*. J. Sep, Science Journal , pág: 1174 - 1179
19. García A., Cortés M., Rodríguez, R., Herrera, J.L., & Alcantara A., (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C., México, pág: 3-54.
20. Garrido Ferrari D., & Parada Valenzuela R., (2008). Propiedades antioxidantes y funcionales de cinco algas chilenas sobre la calidad de pasta de salmón, Universidad de Chile: *Facultad de ciencias químicas y farmacia*, Chile. pág:25
21. Gómez Caravaca M., Carrasco Pancorbo A., Cañabete Díaz B., & Segura Carretero A. (2003). Extracción, Identificación y cuantificación de la fracción polifenólica del aceite de oliva virgen extra. *Tecnología oleícola y la calidad* . México, pág: 225-229
22. Gutierrez Avella M., Ortiz García A., & Mendoza Cisneros A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de metrología*. México: Universidad Autónoma de Querétaro.
23. Altria K., et.al. (2001). *Validating CE Methods for Pharmaceutical Analysis*. Masson. pp. 187
24. Harris D.C. (2001). *Análisis Químico*. 2ª ed. Editorial Reverté. México. pp. 748-761.
25. Hadison V., (1985). *Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in plant products of cosmetic interest*. Rev. Clujul Med. , Vol.58(4) pág: 378-381.
26. Herrero M., Ibañez E., & Cifuentes A., (2004). *Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods*. Institute of Industrial Fermentation , pág: 883-894.
27. Illescas P., (2007). *Análisis fitoquímico de la corteza de Alnus acuminata subsp. Arguta (Schlecht) Furlow*. Tesis . México: UNAM.
28. Kostennikova A., (1984). *UV Spectrofotometric quantitative determination of flavonoids in Calendula tincture*. Rev. Farmatsiva , Vol.33(6) pág: 33-35
29. Lastra Valdéz H., & Piquet García R., (1999). *Calendula officinalis*. Rev. cubana Farm , Vol. 33(3) pág: 188-194.
30. López M., López de Alba P., García C., & De León R., (2003). *Simultaneous determination of Methylxanthines in coffees and teas by Uv-Vis*. Chemistry Analytica , pág: 83-84.
31. López R., (1989). *Estudio fitoquímico preliminar de Hippocratea excelsa*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp. 89
32. Mennega A., (1972). *A survey of the wood anatomy of the New World Hippocrateaceae*. In: Ghose, A. K. M. y M. Yunus *Research trends in plant anatomy*. Ed. McGraw-Hill, New Delhi. pág. 61-72.
33. Miller N., & C. Miller J., (2008). *Estadística y Quimiometría para Química analítica* 4ta ed. Ed. Pearson Prentice-Hall. Madrid, España pág: 278
34. Muñoz L.F., (1998). *Plantas medicinales y aromáticas*. 4ª ed. Editorial Mundi-prensa. México. pág. 125-126.
35. Palazón J., Cusidó R., & Morales, C. (2006). *Metabolismo y significación de los polifenoles del vino*. *Revista cubana de Enología*, pág: 1-5.



36. Patel R. N., (1965). *A comparison of the anatomy of the secondary xylem in roots and stems*. Vol.19: pag: 72-79.
37. Perez Avedaño Y., Cruz Jiménez G., & Lice, A., (2010). *Determinación del efecto inhibitorio de tres extractos naturales Calendula officinalis, Echinacea purpurea e Hipocratea excelsa (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina*. UNAM, México.
38. Roig J., T. (1974). *Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba*. Rev. Ciencia y Técnica pp. 248
39. Romo V.A., (1985). *Productos naturales de la flora mexicana*. 1ª ed. Ed. Limusa. México. pp. 155
40. Rouessac F., Rouessac A., & Ourisson G. (2003). *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas* 1 ed. Ed. Mc Graw Hill, España pág: 121-134
41. Rudolf C.H., (1997). *Química general* 7º Ed. Editorial Reverté. Barcelona, pp. 188.
42. Sánchez E., & Durand D., (1985). *Algunos parámetros farmacognósticos en plantas medicinales*. (Parte I) Vol. 19(3) pág: 450-453.
43. Skoog D., West D., Holler J., & Crouch S.,(2005). *Fundamentos de química analítica* 8 ed. Ed. Thomson México. pp. 1026
44. Smith A., (1940). *The American species of Hippocrateaceae*. Rev. Brittonia IAWA Bull. n.s. 11(2). pág: 141-166
45. Sogorb S., & Vilanova, G. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos* 1 ed. Ed. Díaz de Santos, España pp.225
46. Stashenko E., Jaramillo E., & Martínez R., (2003). *Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae*. Rev. Académica de Ciencia, Vol.27(105) pág :579-597
47. Valcárcel M., Gómez V., & Gómez H.A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. 1ª ed. Ed. Reverté. España. pág. 118-119.
48. Watson D., (2005). *Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemistry* Vol.2 pág: 145-149.
49. Willard H., Merrit L., & Dean J., A. (1992). *Métodos instrumentales de Análisis*. 4 ed. Ed. Continental, México. pág: 254-263.

Páginas web.

1. <http://external.doyma.es/pdf/4/4v20n06a13015492pdf001.pdf>
2. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>
3. <http://www.gardeninginarizona.com/Plants/Asteraceae>.