



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

## **Facultad de estudios superiores Cuautitlán**

“Perfil electroforético y cuantificación de flavonoides y polifenoles en extractos naturales de algas marinas, centella, castaño, manzanilla y té verde.”

### **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

OBED MORALES LOPEZ

ASESOR:

Q.F.B. VICTOR HUGO ABREGO REYES

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO, 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

Perfil electroforético y cuantificación de flavonoides y polifenoles en extractos naturales de Algas Marina, Centella, Castaño, Manzanilla y Té Verde.

Que presenta el pasante: Obed Morales López

Con número de cuenta: 302331923 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 20 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

|               | NOMBRE                                   | FIRMA                             |
|---------------|--|-----------------------------------|
| PRESIDENTE    | Q. Mario Morales Delgado                 | <i>Mario A Morales</i>            |
| VOCAL         | QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez | <i>Brígida del Carmen Camacho</i> |
| SECRETARIO    | QFB. Víctor Hugo Abrego Reyes            | <i>[Firma]</i>                    |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez  | <i>[Firma]</i>                    |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Berenice Gómez Zaleta               | <i>[Firma]</i>                    |

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

HHA/iac

## **Agradecimientos**

### ***A Dios.***

*Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

### ***A mi madre.***

*A mi madre, por el gran amor y la devoción que tienes a tus hijos, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien y por ser la mujer que me dio la vida y me enseñó a vivirla... no tengo palabras para agradecerte.*

### ***A mi abuela.***

*Gracias abuela por existir y por darme a una familia tan maravillosa.*

### ***A mis hermanos***

*A mis hermanos, Iván y Saúl gracias.*

### ***A mis tías***

*Gracias tía Ángeles, por haberme apoyado en esos momentos difíciles en los que quería darme por vencido antes de tiempo, tía Irene, Chela por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.*

### ***A mis primos y sobrinos***

*Gracias Duy, Chisti, Mauri, Hop, Ruth, Eliezer, Gali y Michi los quiero mucho.*

### ***A mis compañeros***

*Gracias también a mis compañeros, Benjamín Muñoz, Pol Dorantes, Paco Bastida, Rosa Ramos, Daniel Ley, Jorge Duran, María José, Manuel Ascensio, Hugo Godínez, Dany Tenorio, Raúl Ortega y Julio Paredes.*

***A mi asesor***

*Vic, te agradezco por tu paciencia y por los conocimientos que me aportaste así como haberme guiado en este proyecto que es la culminación de años de esfuerzo. Gracias*

***A mis profesores***

*Gracias también a todos mis profesores de la facultad, en especial a los profesores Enrique Angeles, Adriana Ganem, David Quintanar, Elizabeth Piñón.... Gracias por su sabiduría.*

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”*

*Mahatma Gandhi (1869-1948) Político y pensador indio.*

# INDICE

|   |    |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1  |
| II. OBJETIVOS .....   | 3  |
| 1.0 Objetivo general .....  | 3  |
| 2.0 Objetivos particulares .....  | 3  |
| III. GENERALIDADES .....  | 4  |
| 1.0 Métodos fotométricos .....  | 4  |
| 1.1 Transmitancia y absorbancia .....                                       | 6  |
| 1.2 Ley de Lambert-Beer .....   | 7  |
| 1.3 Instrumentación de Uv-Vis .....   | 8  |
| 1.4 Espectro de absorción .....   | 9  |
| 1.5 Aplicaciones .....  | 10 |
| 2.0 Antecedentes de electroforesis capilar .....                            | 11 |
| 2.1 Definición electroforesis capilar .....                                 | 11 |
| 2.2 Fundamentos de la técnica de electroforesis capilar .....               | 11 |
| 2.3 Equipo electroforesis capilar .....                                     | 12 |
| 2.4 Tipos de inyección en electroforesis capilar .....                      | 13 |
| 2.4.1 Inyección hidrodinámica .....   | 14 |
| 2.4.2 Inyección electrocinética .....                                       | 15 |
| 2.5 Solución Buffer .....   | 16 |
| 2.6 Principios de la separación electroforética .....                       | 17 |
| 2.6.1 Movilidad electroforética .....                                       | 17 |
| 2.6.2 Movimiento electroforético .....                                      | 17 |
| 2.7 Flujo electrosmótico .....  | 18 |
| 2.8 Detección .....   | 19 |
| 2.9 Tipos de electroforesis capilar .....                                   | 20 |
| 2.9.1 Electroforesis capilar en zona .....                                  | 20 |
| 2.9.2 Electroforesis capilar electrocinéticamicelar .....                   | 20 |
| 2.10 Principales ventajas y aplicaciones de la electroforesis capilar ..... | 21 |
| 3.0 Polifenoles .....   | 22 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Origen de los polifenoles .....   | 22 |
| 3.2 Metodos de determinación de polifenoles. ....                             | 23 |
| 4.0 Flavonoides generalidades .....   | 24 |
| 5.0 Caracteristicas generales de las plantas .....                            | 26 |
| <br>  |    |
| IV. MATERIAL .....  | 32 |
| <br>  |    |
| V. REACTIVOS .....  | 32 |
| <br>  |    |
| VI. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO .....   | 33 |
| <br>  |    |
| VII. EQUIPOS .....  | 34 |
| <br>  |    |
| VIII. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES .....   | 34 |
| 1.0 Polifenoles.....  | 34 |
| 2.0 Flavonoides .....   | 34 |
| 3.0 Electroforesis capilar .....  | 35 |
| <br>  |    |
| IX. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....  | 36 |
| 1.0 Curva de calibración polifenoles.....                                     | 36 |
| 2.0 Curva de calibración flavonoides.....                                     | 37 |
| 3.0 Perfil electroforético.....   | 38 |
| 4.0 Preparacion de muestras de extractos.....                                 | 39 |
| <br>  |    |
| X. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS .....                                  | 42 |
| 1.0 Barrido espectrofotométrico del complejo Rutina – AlCl <sub>3</sub> ..... | 42 |
| 2.0 Curva de calibración flavonoides.....                                     | 42 |
| 3.0 Muestras .....  | 43 |
| 4.0 Contenido de flavonoides en muestras.....                                 | 43 |
| 4.1 Contenido de flavonoides en algas marinas .....                           | 44 |
| 4.2 Contenido de flavonoides en castaño .....                                 | 45 |
| 4.3 Contenido de flavonoides en centella.....                                 | 46 |
| 4.4 Contenido de flavonoides en manzanilla.....                               | 48 |



|  |    |
|--|----|
| 4.5 Contenido de flavonoides en té verde .....                               | 49 |
| 5.0 Barrido espectrofotométrico del complejo Folín Ciocalteu– Pirogalol..... | 51 |
| 6.0 Curva de calibración polifenoles .....                                   | 51 |
| 7.0 Muestras .....   | 52 |
| 8.0 Contenido de polifenoles muestras.....                                   | 52 |
| 8.1 Contenido de polifenoles en algas marinas .....                          | 52 |
| 8.2 Contenido de polifenoles en castaño .....                                | 54 |
| 8.3 Contenido de polifenoles en centella.....                                | 55 |
| 8.4 Contenido de polifenoles en manzanilla .....                             | 57 |
| 8.5 Contenido de polifenoles en té verde .....                               | 58 |
| <br>   |    |
| XI. CONCLUSIONES .....   | 64 |
| <br>   |    |
| XII. PROSPECTIVAS .....  | 65 |
| <br>   |    |
| ANEXO 1.....   | 66 |
| <br>   |    |
| ANEXO 2.....   | 76 |
| <br>   |    |
| XIII. REFERENCIAS .....  | 81 |

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                       |  |
|-----------------------|--|
| ANOVA                 | Análisis de Varianza                     |
| $\epsilon$            | Coefficiente de absortividad molar       |
| C.V.                  | Coefficiente de variación                |
| CLAR                  | Cromatografía líquida de alta resolución |
| S                     | Desviación estándar                      |
| EC                    | Electroforesis capilar                   |
| FEO                   | Flujo electroosmótico                    |
| g                     | Gramos                                   |
| kV                    | Kilovoltios                              |
| $\lambda$             | Longitud de onda                         |
| $\mu\text{g}$         | Microgramos                              |
| $\mu\text{L}$         | Microlitros                              |
| $\mu\text{m}$         | Micrometros                              |
| mL                    | Mililitros                               |
| mm                    | Milímetros                               |
| $\mu\epsilon\text{f}$ | Movilidad electroforética                |
| $\mu\epsilon\text{O}$ | Movilidad electrosmótica                 |
| nm                    | Nanómetros                               |
| UV-VIS                | Ultravioleta-Visible                     |
| IR                    | Infrarrojo                               |
| $t_m$                 | Tiempo de migración                      |



## I. INTRODUCCIÓN

El uso de extractos naturales ha aumentado en los últimos años por la creencia de que lo natural no es dañino y el interés de sustancias naturales en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica.

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).

Un extracto es una preparación de una planta o un tejido animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular y que se obtiene por la acción de un disolvente. Existen en el mercado varios tipos de extractos utilizados en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica, los extractos acuosos se utilizan en formulaciones tales como champús, geles incluso cremas. Los extractos glicólicos se pueden utilizar en cremas y jabones. También pueden incorporarse a los vehículos emulsionados, pero en este caso, se incluyen en la fase acuosa. Estos extractos también pueden utilizarse en vehículos con elevado contenido acuoso: lociones, hidrogeles, champús y geles de baño. Los extractos oleosos son utilizados en cremas y jabones éstos se utilizan en los vehículos emulsionados, emulsiones O/W y W/O. En este caso, los extractos se incorporan en la fase oleosa. En el caso de los extractos alcohólicos son utilizados en aguas cosméticas, tónicos, lociones capilares. Para los extractos hidroalcohólicos se utilizan en formulaciones tales como lociones capilares y tónicos. Por último los extractos hidroglicólicos se pueden utilizar en cremas y jabones, al igual que los extractos glicólicos en vehículos con elevado contenido acuoso.

Los disolventes de la extracción pueden ser inodoros y estar exentos de trazas de impurezas. Para la extracción de extractos hidrosolubles se utiliza como disolventes agua, glicoles o alcoholes entre otros. Para extractos liposolubles se emplean aceites vegetales o minerales. ¿Por qué utilizar un extracto en vez de un producto sintético? Porque los principios activos presentes en las plantas son los responsables de la acción o acciones farmacológicas, nutricionales y cosmética que justifican el empleo de las plantas en los preparados de la industria. En México ha aumentado el consumo de estos productos en los últimos años. Es por eso que nace la necesidad de tener pruebas confiables para éstos extractos naturales con el fin de tener un control de calidad en estos y ser usados con seguridad.



Los extractos cuentan con 2 tipos de pruebas de control de calidad muy socorridas; una es la cuantificación de flavonoides y la cuantificación de polifenoles.

La creciente aceptación de la dieta como terapia preventiva y de la medicina verde como alternativa, está acompañada de muchas ideas erróneas, una de las más frecuentes es atribuirles a las vitaminas todos los beneficios de los vegetales y el desconocimiento (y en consecuencia la falta de estímulo para su estudio) de otros agentes presentes en los vegetales, que contribuyen con un amplio espectro de propiedades a la prevención de ciertas enfermedades, un ejemplo de éstos son los polifenoles.

Para llevar a cabo la estandarización de los extractos se emplean diferentes técnicas analíticas:

- Espectrofotometría UV-VIS
- Cromatografía de capa fina
- CLAR
- Electroforesis capilar
- Color platino-cobalto

En el presente trabajo se utilizaran dos técnicas importantes la electroforesis capilar y la espectrofotometría UV – VIS, una con mayor difusión en México que es la espectrofotometría la cual será utilizada para llevar acabo la medición de la cantidad presente en los extractos naturales de polifenoles y flavonoides por medio de curvas de calibración. Por otro lado se recurrirá a la electroforesis capilar para obtener los perfiles electroforéticos de los cinco extractos naturales.

Los extractos naturales utilizados fueron obtenidos de una empresa llamada “Extractos Sigma” la cual tenía la necesidad de tener referencias confiables en cuanto al contenido de polifenoles y flavonoides de algunos de extractos que ellos comercializan por lo tanto nos suministró 10 extractos diferentes y el estudio de estas muestras se hizo por dos personas lo cual hubo la necesidad de dividir las muestras, dando como resultado 5 muestras para cada persona. En este trabajo en específico se trabajaron con los extractos de algas marinas, centella, castaño, manzanilla y té verde.

La importancia de este trabajo radica en la necesidad de extractos sigma de tener pruebas confiables, baratas y rápidas con las cuales aseguren la calidad de sus productos, lo cual beneficiara a la empresa a comercializar productos de la calidad requerida.



---

## II. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

- Llevar a cabo el estudio de cinco extractos naturales por medio de técnicas específicas con el propósito de obtener parámetros que puedan ser útiles para la caracterización de estos extractos.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los perfiles electroforéticos de los extractos de algas marinas, centella, castaño, manzanilla y té verde por electroforesis capilar a pH=9.
- Determinar la cantidad de flavonoides totales presentes en los extractos mediante una curva de calibración utilizando espectrofotometría UV –VIS.
- Llevar a cabo la cuantificación de polifenoles de los extractos utilizando la técnica de Folin-Cicalteau haciendo uso de una curva de calibración empleando espectrofotometría UV –VIS.
- Hacer un tratamiento estadístico de los datos obtenidos con la intención de garantizar la confiabilidad de los resultados.



---

### III. GENERALIDADES

#### 1. MÉTODOS FOTOMÉTRICOS

Se conoce por fotometría a la parte de la física que estudia las medidas de las magnitudes que están asociadas a la luz. Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para reconocer las sustancias químicas; al reemplazar el ojo humano por otros detectores de radiación se puede estudiar la absorción de sustancias, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo.

Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda. La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía. La espectrofotometría UV-VIS 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 la cantidad de luz absorbida depende en forma lineal de la concentración.

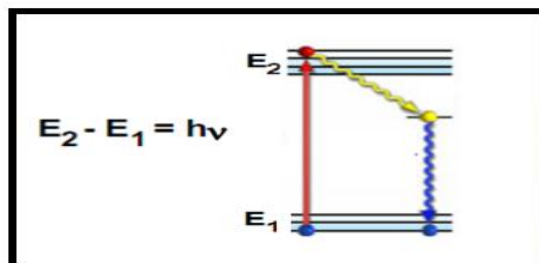
El fundamento de la espectrofotometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las del espectro UV-VIS. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación 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,  $E_1$ , a un estado de mayor energía (estado excitado)  $E_2$  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, esto es 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.



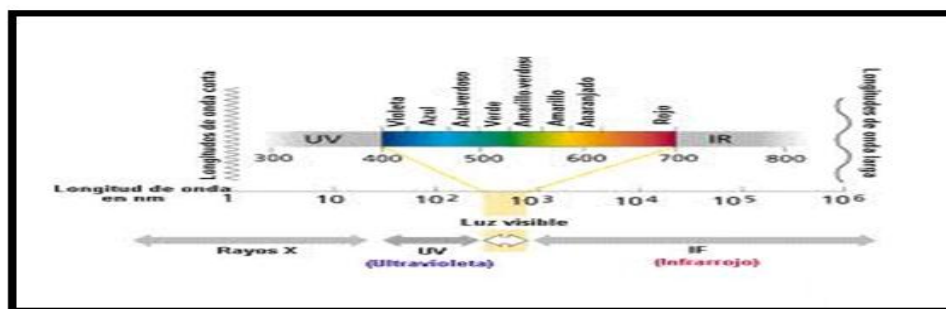
La Figura 1 es un diagrama parcial de los niveles de energía que muestra lo que ocurre cuando una molécula absorbe radiación infrarroja, visible y ultravioleta. Las líneas  $E_1$  y  $E_2$  representan las energías de los distintos niveles electrónicos excitados de una molécula de nivel energético fundamental  $E_0$ . Las líneas de los números 1 a 4 representan energías de niveles vibracionales asociados a cada estado electrónico. Se puede observar que las diferencias entre los diferentes estados vibracionales son menores que las diferencias entre niveles de energía. Aunque no se muestra en la Figura 1 cada estado vibracional está a su vez asociado a varios niveles rotacionales.

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 1.** Diagrama parcial de los niveles de energía

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 es una región de energía muy alta. 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 que alteran la carga de las moléculas, provocan 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 apreciamos el color visible de una solución y 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 energía la solución coloreada. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

### 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:

$$I_0 = I_a + I_t \quad (1)$$

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:

$$\% T = I_t / I_0 \times 100 \quad (2)$$

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:  
 $A = \log 1/T = -\log T = -\log I_t / I_o$ . (3)

Cuando la intensidad incidente y transmitida son iguales ( $I_o = I_t$ ), 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:

$$A = \log I/I_o = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

Donde:

$I_1$  e  $I_2$  son las intensidades saliente y entrante respectivamente.

$C_1$  es la concentración del absorbente en el medio.

$\varepsilon$ , es el coeficiente de absorción.

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  $\varepsilon$ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de  $\varepsilon$  dependen de las de C y l.

La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\varepsilon$  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 ( $\varepsilon M$ ).



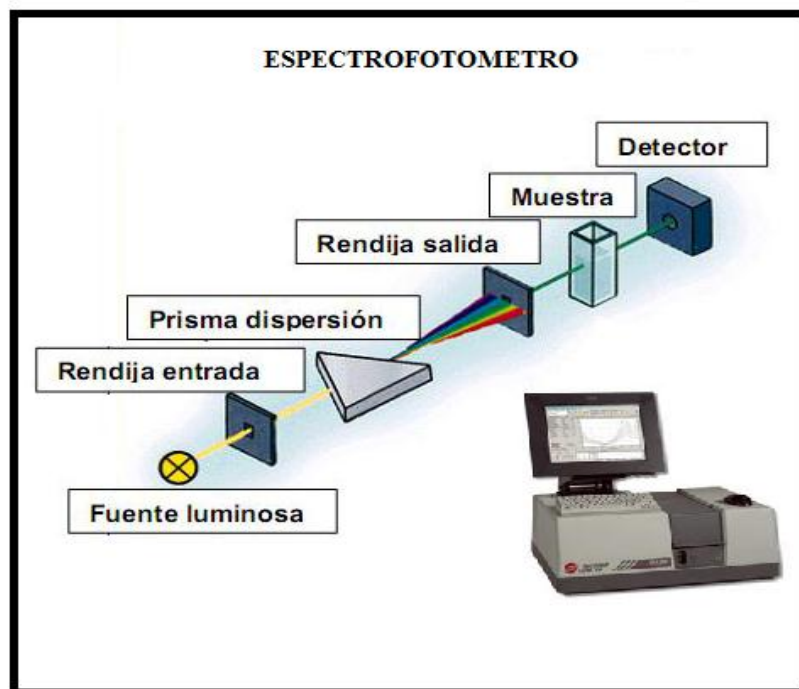
Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $\text{g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ , y al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

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de concentración altos,  $\epsilon$  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.

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en espectrofotómetros. Aunque 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 figura 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 (celdas) 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 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  $\lambda$ .

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  $\lambda$  óptima, al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ( $\lambda_{\max}$ ). Dicha  $\lambda$  se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula.

No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de  $\lambda_{\max}$  y la cantidad de luz absorbida, entre los que se incluye el pH, la polaridad del disolvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos 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). En este trabajo en específico se decidió trabajar con esta técnica ya que esta es confiable, rápida y los métodos planteados requerían el uso de esta técnica.



## 2. ELECTROFORESIS CAPILAR

El comentario más cercano sobre la electroforesis capilar de zona (ECZ) fue introducido por Hjerten; el primer experimento utilizó un capilar de cuarzo de 1 a 3 mm en su diámetro interno, otro paso importante en la electroforesis capilar (EC) fue la reducción del diámetro del capilar de 0.2 – 0.5 mm. Sin embargo el avance más importante en la tecnología de la EC hace referencia al trabajo de Jorgenson y Lukacs el cual se publicó en 1981; en donde utilizaron un capilar de vidrio de 75  $\mu\text{m}$  y un campo eléctrico de  $30 \text{ kV m}^{-1}$  esto fue la llave para el uso de esta nueva tecnología.

En este caso la necesidad de contar con elementos de identificación rápidos y confiables para los extractos a nivel industrial hace que se deba tener nuevas herramientas analíticas y una de ellas es la electroforesis capilar aunque no necesariamente se puede usar para obtener un perfil electroforético que además de servir como un mecanismo de caracterización de los extractos al mismo tiempo puede utilizarse inclusive para hacer las mismas determinaciones de polifenoles y flavonoides con ayuda de un buen diseño experimental.

En los últimos años ha tenido un repunte el uso de la electroforesis capilar que es una técnica analítica de gran importancia, con gran auge en el mercado internacional, utilizada en diversas áreas de investigación para la separación y cuantificación de moléculas pequeñas incluyendo iones metálicos, biomoléculas como aminoácidos, proteínas, péptidos, carbohidratos y macromoléculas.

### 2.1 Definición de electroforesis capilar.

“La Electroforesis Capilar es una técnica de separación que se basa en la diferente velocidad de migración de las especies cargadas, en el seno de una disolución amortiguadora a través de la cual se aplica un campo eléctrico constante”

### 2.2 Fundamento de la técnica.

La electroforesis capilar es una adaptación de una técnica llamada electroforesis, la cual es una técnica separativa que se basa en hacer migrar las especies que componen la muestra en disolución, las cuales pueden tener carga eléctrica global bajo efecto de un campo eléctrico y se encuentra a la vez en contacto con un soporte adecuado.

En otras palabras la velocidad de migración de un ion ( $U$ )  $\text{cm/seg}$ , en el seno de un campo eléctrico, es igual al producto de la intensidad del campo eléctrico  $E$  ( $\text{V cm}^{-1}$ ) por la movilidad electroforética  $\mu_e$  ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) es decir:

$$U = \mu_e E \quad (5)$$



En donde la movilidad electroforética será inversamente proporcional a la carga eléctrica del analito e inversamente proporcional a los factores de retardo. Es importante recordar que el campo eléctrico solamente tiene efecto sobre iones, y si dos especies difieren y sea en la carga o bien en la fuerza de rozamiento; estas se mueven y por consiguiente se separan, sin embargo, todas aquellas especies neutras no se separan.

En cuanto a la fuerza de retardo provocado por el rozamiento entre las moléculas se determinó con un analito cargado, en donde a partir de tamaño y forma del ion; así como la viscosidad del medio en el cual se dio la separación. Es importante mencionar que para aquellos iones que sean del mismo tamaño la fuerza impulsora es mayor en aquel que tenga una mayor carga, y tiene una velocidad de migración mayor. En aquellos iones que presenten la misma carga la fuerza de retardo provocado por el rozamiento de las moléculas es más pequeña en el ion más pequeño y tiene una velocidad de migración más rápida. En la EC es muy importante la relación carga tamaño de los iones ya que ayuda a combinar estos dos efectos mencionados ya que en las moléculas de origen biológico poseen grupos ionizables, los cuales se tiene en disolución al colocar la muestra en buffer. La muestra tiene carga eléctrica ya sea con cationes o aniones y si las moléculas identificadas contienen cargas equivalentes; entonces poseen una relación carga/masa diferente al peso molecular de estas, logrando una migración diferente, y si se coloca a los iones en el buffer entonces, se somete a un campo eléctrico imponiendo a la vez una diferencia de potencial eléctrico entre los electrodos de la EC.

### **2.3 Equipo de electroforesis capilar.**

Una de las ventajas de la EC es la simplicidad del equipo y el poder de separación de esta técnica; para la detección de los analitos se necesita trabajar con un alto voltaje y esta es otra de las propiedades del trabajo de la EC.

Con el avance de las técnicas electroforéticas y la introducción de los tubos capilares con un diámetro que va desde los 2 hasta los 200  $\mu\text{m}$  han acortado los tiempos de separación por lo que esto tiene grandes ventajas:

- a) La superficie en cuanto al volumen que se obtiene con los capilares es la más efectiva en cuanto a la dispersión de los iones.
- b) La aplicación de altos voltajes para la lectura de las muestras provoca una buena dispersión de los iones, lo que disminuye el tiempo de análisis y sustancialmente aumenta la separación de los analitos haciendo más fácil y efectiva la identificación.



- c) Un diámetro pequeño en los capilares provoca una mayor sensibilidad en la detección; desafortunadamente el tamaño tan pequeño de estos es una razón para tener una baja concentración en cuanto a la sensibilidad de la detección.
- d) Los capilares son fáciles de fabricar y son de precio económico.
- e) Al utilizar capilares con sílice fundida permite tener una excelente transparencia hacia la región UV-VIS.
- f) Tienen una mecánica estable.

Dentro de las características básicas de la EC es que la separación de los analitos se desarrolla dentro de los capilares de sílice fundida, utiliza campos eléctricos de 500 kv/cm o más, la cantidad de muestra es muy poca al igual que los reactivos fig. 4 (Castillo M.,2005).



**Figura 4.** Equipo de electroforesis capilar.

#### **2.4 Tipos de inyección en electroforesis capilar.**

Cabe mencionar en cuanto al sistema de inyección se refiere, las muestras utilizadas en la EC son cantidades muy pequeñas, en el orden de los nanolitros, esto se debe a las dimensiones del capilar pero para introducir los microlitros de la muestra no se debe pasar del 1 % de la longitud del capilar para no producir una menor resolución; si lo vemos de forma positiva esta es una gran ventaja ya que si contamos con una pequeña cantidad de muestra no se tiene ningún problema en analizarla, además de que el microanálisis hace que los procesos sean amigables con el medio ambiente ya que disminuyen los residuos y el consumo de reactivos.



Sin embargo dentro de las desventajas de utilizar volúmenes tan pequeños de muestra inyectada provoca que se necesite un sistema de inyección diferente en comparación con otros métodos. Existen diferentes sistemas de inyección en la electroforesis capilar, se basan en aplicar un gradiente de voltaje (electrocinética) o en un gradiente de presión (hidrodinámica o hidrostática), entre los dos extremos del capilar.

#### **2.4.1 Inyección Hidrodinámica.**

En todos los casos, para introducir la muestra dentro del capilar, se cambia el vial de entrada por un vial con muestra y se aplica la inyección de la misma durante 10-30 segundos. Introduciéndose en el capilar un volumen de muestra del orden de los nanolitros.

En la inyección hidrodinámica, la introducción de la muestra en el capilar se efectúa mediante una diferencia de presión entre los dos extremos de la columna (es el método convencional de inyección). Existen diferentes formas de producir una presión superior al extremo del capilar en contacto con la disolución de la muestra: por flujo gravitatorio de la disolución electrolítica mediante la elevación del vial con la muestra y la aplicación de presión sobre la misma, luego por succión de la muestra aplicando vacío al vial de salida. Este tipo de inyección no depende de la movilidad electroforética, ni de la composición de la muestra. El volumen de muestra inyectada se define por las dimensiones del capilar, la viscosidad del electrolito, la presión aplicada y el tiempo. Se debe controlar con precisión la temperatura capilar porque puede verse afectada la viscosidad y variar la cantidad de muestra que se inyecta.

En gran parte de los instrumentos de EC la diferencia de presión se utiliza, además de para introducir la muestra, para renovar el buffer del capilar, ya que normalmente debe cambiarse luego de un número determinado de análisis para conseguir repetibilidad en el tiempo de migración en las muestras a determinar.

La presión y el tiempo que se aplica son los dos parámetros que el analista controla para variar el volumen de la inyección. Esto se puede calcular con la ecuación de Hagen- Poseuille en donde dice que el volumen inyectado es función de la presión aplicada ( $\Delta P$ ), el tiempo de inyección ( $t$ ), la viscosidad ( $\eta$ ) y la longitud del capilar ( $L$ ) o el diámetro interno ( $d$ ). Aquellos valores de inyección próximos a 250 mbar/s son habituales en la EC. Con este sistema de inyección, la presión del área del pico tiene un orden de 2 % medido como coeficiente de variación.

$$\text{Vol} = \Delta P d^4 \eta t / 128 \eta L \quad (6)$$





### 2.4.2 Inyección electrocinética.

La inyección electrocinética se basa en que el voltaje puede causar movimientos electroforéticos y electroosmóticos. Se introduce un extremo del capilar en el vial que contiene la muestra y el otro extremo en el vial que contiene el buffer, se aplica un voltaje elevado durante un breve período de tiempo. Los compuestos se introducen en el capilar por la acción conjunta de la migración y del efecto de la movilidad electroosmótica. Si el voltaje se aplica durante un período de tiempo corto, la muestra se introducirá por el movimiento electroforético. Diversos investigadores demostraron que por una serie de fenómenos que produce la inyección electrocinética es menos reproducible que la inyección hidrodinámica. Los límites de detección de los compuestos estudiados mediante la inyección electrocinética son aproximadamente cinco veces más bajos que los conseguidos con la hidrodinámica.

Este tipo de inyección se utiliza más en la electroforesis en gel ya que se sumerge durante mucho tiempo un extremo del capilar en la muestra que a su vez esta se somete a cierto potencial en donde la polaridad se elige con respecto al otro extremo del capilar. Los diferentes solutos se introducen en el capilar por efecto de la migración electrocinética en donde cada analito será inyectado en distinta cantidad en función de la movilidad electrocinética; esto se puede calcular con la siguiente formula:

$$Q = \frac{(\mu_e - \mu_{ef}) V r^2 \eta C t}{L} \quad (7)$$

Donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética de la analito,  $\mu_{ef}$  es la movilidad del FEO, V es el voltaje aplicado, t es el tiempo de inyección, C es la concentración del analito, r y L es el radio y la longitud del capilar respectivamente.

Una desventaja de la inyección electrocinética es que la concentración del analito depende de la movilidad electroforética, si se desea determinar un analito que tenga una baja movilidad, no así para los analitos que tengan una alta movilidad constituye un método muy efectivo de pre concentración. Otra desventaja es que se ve afectada la conductividad de la muestra; es decir que si dos muestras tienen la misma concentración de iones, pero tienen diferentes conductividades, la cantidad del ion inyectado será diferente para cada muestra. Este método se utiliza más cuando los capilares están rellenos de gel o un medio muy viscoso donde la inyección hidrodinámica no es tan efectiva.



Es importante que los capilares se acondicionen antes de hacer el análisis de muestra, es decir se necesita cargar la superficie del capilar uniformemente, así como lavar los capilares tras la lectura de cada muestra con agua, con ácidos o con bases para una efectiva lectura. El capilar tiene un sistema de refrigeración que se utiliza durante la separación de la muestra; debido a que se aplican grandes cantidades de corriente. El calor es generado por el movimiento de fricción de las cargas de los analitos, el cual debe ser dispersado para evitar que el capilar se derrita. También se administra un potencial en los extremos del capilar que va desde 10 – 30 kV con una intensidad de 10 – 250  $\mu$ A dependiendo de la fuerza iónica. El equipo también tiene dos electrodos de platino conectados a una fuente de poder que es la responsable de aplicar el campo eléctrico.

El equipo de EC cuenta también con un detector que se encuentra en uno de los extremos del capilar el cual registra alguna propiedad determinada del analito. Dentro de los detectores más comúnmente usados está el llamado detector de Absorción de radiación UV-VIS que tiene una longitud de onda variable y una baja sensibilidad; aunque cabe mencionar que también existen otros tipos de detectores como el de fluorescencia, electroquímico o espectro de masas.

### **2.5 Solución buffer.**

Este punto es el más importante en la EC; ya que la sensibilidad en la movilidad electroforética en cuanto a las cargas de las especies depende del pH, el cual debe mantenerse constante. Para un intervalo efectivo en cuanto al pH son máximo dos unidades entre el valor del pka.

De los buffers más utilizados en EC se pueden encontrar al buffer de fosfatos, citratos, acetatos, tris, boratos; entre otros. El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte o con lo que la muestra se correrá dentro del equipo de EC; si bien el buffer se utiliza como el disolvente de la muestra, además la velocidad de migración de las partículas puede variar por la presencia de aquellas especies químicas que procedan de los analitos que componen al buffer, es por ello la importancia de la elección del buffer adecuada según las características de la muestra.

El buffer que se emplea en la EC debe reunir una serie de requerimientos para poder ser utilizado.

- Buena capacidad de amortiguamiento en el rango encontrado
- Baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección
- Baja movilidad



## 2.6 Principios de la separación electroforética.

### 2.6.1 Movilidad electroforética.

La separación de los analitos por electroforesis convencional está determinada por las diferencias en sus velocidades dentro de un campo eléctrico. La velocidad del analito cuando no hay un flujo electroosmótico está dada por la fórmula:

$$U = \mu E \quad (8)$$

Donde el  $U$  es la velocidad del ion,  $\mu$  es la movilidad electroforética y  $E$  es el campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico está 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. En lo que respecta a la movilidad aparente se refiere a la suma de la movilidad electroforética y la movilidad del flujo electroosmótico de la disolución. La  $\mu_{ap}$  de una especie dada es la velocidad neta ( $U_{neta}$ ) de la especie dividida por el campo eléctrico ( $E$ ).

$$\mu_{ap} = \frac{U_{neta}}{E} = \frac{L_d / t}{V / Lt} \quad (9)$$

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

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

### 2.6.2 Movimiento electroforético.

Las partículas que se encuentran en una suspensión líquida o que estén disueltas pueden llevar una carga eléctrica; en donde la intensidad y el signo dependerán del tamaño, la naturaleza y del propio electrolito, así como del pH. Esta carga proviene de la fijación que ocurre en la superficie de los iones contenidos en el buffer. La temperatura, viscosidad y la diferencia en el potencial hacen que las partículas tengan velocidades de migración mayores.

Existen factores que pueden afectar la migración de la muestra problema o bien en otras palabras el analito; dichos factores pueden ser:



- a) El tipo de muestra debido a su naturaleza en cuanto a las moléculas que contenga ya que estas al tener carga eléctrica afectan la velocidad con la que migran.
- b) El material del que este hecho el capilar aunque se utilicen materiales inertes ejerce un efecto sobre la velocidad de migración del analito.
- c) La electroósmosis se produce por la carga que hay entre las moléculas de agua que compone al buffer y la superficie del capilar.
- d) La adsorción se da cuando la muestra se adhiere al capilar formándose una fila o una cola y con esto la lectura se torna con una baja resolución para separarla.
- e) El tipo de buffer a utilizar, ya que este estabiliza las cargas del capilar al comportarse como un medio conductor y depende también del tipo de muestra que se desee analizar.
- f) Conforme la fuerza iónica del buffer va aumentando, la corriente lo hace de la misma manera y se logra que la velocidad de migración de la muestra disminuya, si tenemos una fuerza iónica alta la corriente global aumenta también y se provoca el efecto Joule produciendo un aumento del calor.

Todo compuesto que tenga una carga eléctrica se puede desplazar con una velocidad y depende de las condiciones experimentales y de su movilidad electroforética.

### **2.7 Flujo electroosmótico.**

La electroósmosis también conocida como electroendoósmosis es uno de los efectos electrocinéticos que se conocen desde el inicio de la EC en 1937, el resultado de este fenómeno es el FEO, el cual lo podemos describir como el movimiento relativo de un líquido con respecto a una superficie cargada bajo la acción de un campo eléctrico, es decir en otras palabras 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 esta con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 7) y conjuntamente son sus contrapones 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 disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado flujo electroosmótico (Castillo M.,2005).

Cuando nos referimos a la formación de una doble capa eléctrica hablamos de que ésta se puede formar en la interface entre un sólido y un líquido.



El origen de esta doble capa es por la adsorción específica de iones sobre una superficie sólida o por la naturaleza de la superficie del capilar cuando esta se encuentra en contacto con la disolución del electrolito, esta se ioniza.

Manejando la fuerza del flujo uniformemente distribuida a lo largo del capilar no hay presión dentro del capilar y el flujo es uniforme. El perfil plano del flujo es benéfico porque no contribuye directamente a la dispersión de zonas del analito. Es importante señalar que el FEO puede modificar la migración de los iones, ya que los cationes son impulsados por éste a una mayor velocidad. Si por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye. Cuando aplicamos un potencial elevado en un capilar el cual tiene un tampón se origina un flujo electroosmótico, con el que el disolvente migra hacia el cátodo o el ánodo. La causa del flujo electroosmótico es la doble capa eléctrica que se forma en la interface sílice / disolución.

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 es significativamente más grande que a pH bajo.

Se sabe que si se trabaja a un pH por arriba de 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 muy pequeña.

El potencial zeta 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 zeta y una reducción de la movilidad del FEO.

## **2.8 Detección.**

Una amplia variedad de detectores han sido desarrollados para la EC (incluyendo fluorescencia, electroquímica y conductividad) pero los detectores más usados comercialmente son los que emplean el ultravioleta y UV-VIS aunque como ya se había comentado tiene la desventaja de ser poco sensible, la mayor parte del capilar está cubierta por una capa de poliimida sin embargo hay una pequeña parte del capilar que se encuentra expuesta y es a través de la cual la lámpara deja pasar la radiación UV. Los detectores son similares a los de la cromatografía líquida de alta resolución, usando fuentes de deuterio con filtros o detección con longitudes de onda seleccionadas. Las fuentes de luz generalmente provienen de un haz de luz entre un fotodiodo de referencia y un micro enfocado óptico en el estuche del capilar.



El scanning es a través de un detector que ilumina el capilar con luz blanca luego dispersada y analizada a través de un policromador por arreglo de fotodiodos (detector PDA para óptica reversa). Alternativamente, el sistema óptico convencional (forward optic) puede ser empleado por una banda espectral aislada por un monocromador colocado entre la fuente de luz y el capilar. El scaneo puede ser controlado rápidamente por un sistema computarizado que controla el movimiento del monocromador en el rango espectral en el tiempo de milisegundos. Este sistema de detección produce menos ruido de fondo, y mucha más sensibilidad que el detector con arreglo de diodos PDA.

## **2.9 Tipos de electroforesis capilar.**

### ***2.9.1 Electroforesis capilar en zona.***

Electroforesis capilar en zona o en disolución libre (ECZ) es el procedimiento de electroforesis más habitual, en el cual el capilar es recorrido por el electrolito a través de un medio buffer que puede ser ácido (fosfato o citrato), básico (borato), o anfótero (carácter ácido y básico).

El flujo electroosmótico crece con el pH del medio electroforético. La ECZ tiene la característica que la composición del buffer es constante en toda la zona de separación; aquí el potencial que se aplica hace que los diferentes iones de la mezcla migren cada uno según su propia movilidad y se separen en zonas parcialmente solapadas; estas partes del buffer serían las regiones de la fase móvil entre las cuales están las zonas donde encontramos los analito separados, si lo comparamos con una cromatografía de elución.

En la ECZ se utilizan aditivos en el buffer de separación ya que modifican la movilidad electroforética de los analitos, si se tienen dos compuestos con movilidad electroforética iguales en un buffer o solución simple se pueden separar con un aditivo apropiado.

### ***2.9.2 Electroforesis capilar electrocinética micelar.***

En esta variante del procedimiento anterior se añade a la fase móvil un compuesto catiónico o aniónico para formar micelas cargadas. Estas pequeñísimas gotitas inmiscibles con la disolución retienen a los compuestos neutros de un modo más o menos eficaz, por afinidad hidrófila-hidrófoba. Se puede utilizar este tipo de electroforesis para moléculas que tienen tendencia a migrar sin separación, como es el caso de algunos enantiómeros.

Se sabe que las micelas son agregados de moléculas conocidas como surfactantes caracterizados por poseer una larga cadena hidrocarbonada y una cabeza hidrofílica que normalmente la encontramos cargada.



Los surfactantes más utilizados en la EC capilar son los aniónicos ya que estos producen micelas cargadas negativamente, y surfactantes catiónicos por producir micelas cargadas positivamente. Dentro de los surfactantes más utilizados están el SDS (Dodecil Sulfato Sódico) y algunas sales biliares como Colato de Sodio.

### **2.10 Principales ventajas y aplicaciones 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).

- a. La disipación de calor en el tubo capilar es buena y, por lo tanto, los cambios de temperatura son muy pequeños presentando los resultados mayor reproducibilidad.
- b. 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 de los picos.
- c. El gasto de disolventes, aditivos y demás reactivos es mínimo, de ahí sus bajos costos y los casi nulos daños al medio ambiente.
- d. La cantidad de muestra necesaria se reduce a unos cuantos microlitros.
- e. El valor de cada capilar es insignificante en comparación con el de una columna cromatográfica u otra columna en general.
- f. Se puede utilizar una gran variedad de detectores tanto en línea o fuera de línea o bien varios a la vez.
- g. Se cuenta con equipos completamente automatizados que permiten analizar más de 100 muestras sin necesidad de atención en el equipo.
- h. Es posible acoplar los equipos de electroforesis capilar a otros equipos analíticos.

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.,2005).

Dentro de los avances de la EC podemos decir que este método ha alcanzado áreas como la Biomédica hablando para las separaciones de las proteínas, los péptidos, el ADN, para el monitoreo de drogas, algunos marcadores genéticos tumorales entre otros; en el área biofarmacéutica la EC se ha utilizado en lo que se refiere al control de calidad de productos farmacéuticos, biotecnológicos y quimioterapéuticos.



En el área de alimentos la EC se ha utilizado para la cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes. En el área de control ambiental la EC se usa para la identificación de metabolitos tóxicos como pesticidas, metales pesados e hidrocarburos. La EC cada vez tiene más aplicaciones en nuestros tiempos lo cual nos lleva a un gran avance científico con lo cual podemos mejorar nuestra calidad de vida.

En conclusión, la EC es una técnica sensible y altamente versátil, aunque en esta ocasión se utilizó para darle un plus a este trabajo, ya que la parte medular de este último es la cuantificación de los polifenoles y los flavonoides por medio de curvas de calibración utilizando espectrofotometría UV – VIS.

### **3.0 POLIFENOLES**

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención. Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidróxidos. Las principales propiedades de estas moléculas son antirradicales, antimutagénicas, anticarcinogénicas, retardan la senescencia, antiaterogénicas, antimicrobianas.

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando las peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero.

#### **3.1 Origen de los polifenoles.**

Las estructuras fenolicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikimico o de la ruta del acetato.

1. Proceden de la ruta del ácido shikimico: fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.) cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos.
2. Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalonico, las antraquinonas y heterosidos antracenicos.





Los fenoles sencillos son poco frecuentes y están en la planta en forma de heterosidos, los fenoles sencillos son el arbutosido, vainiloso y salicosido.

Entre los ácidos fenólicos se pueden agrupar en: derivados del ácido benzoico y derivados de ácido cinámico, estos ácidos se pueden encontrar libres, formando ésteres con el ácido quinico o cualquier otro ácido fenólico y por último unidos a azúcares.

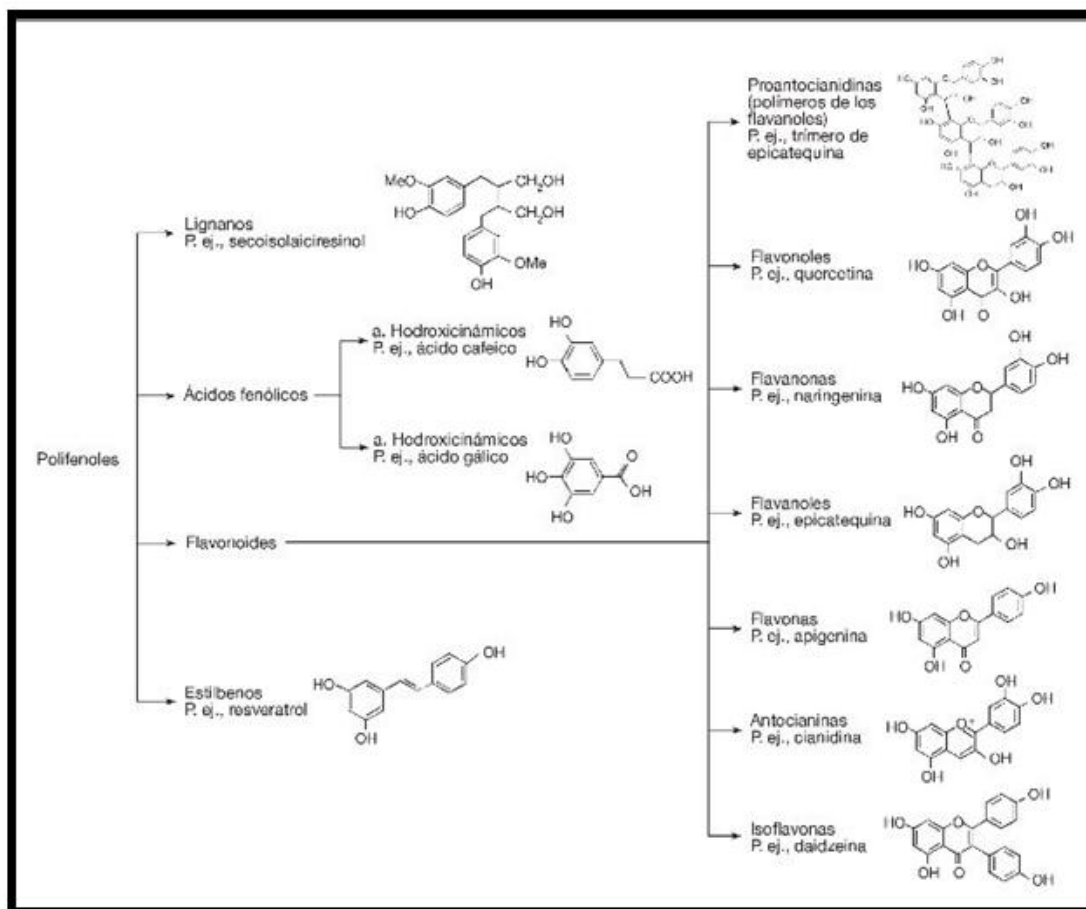


Figura 5. Principales polifenoles.

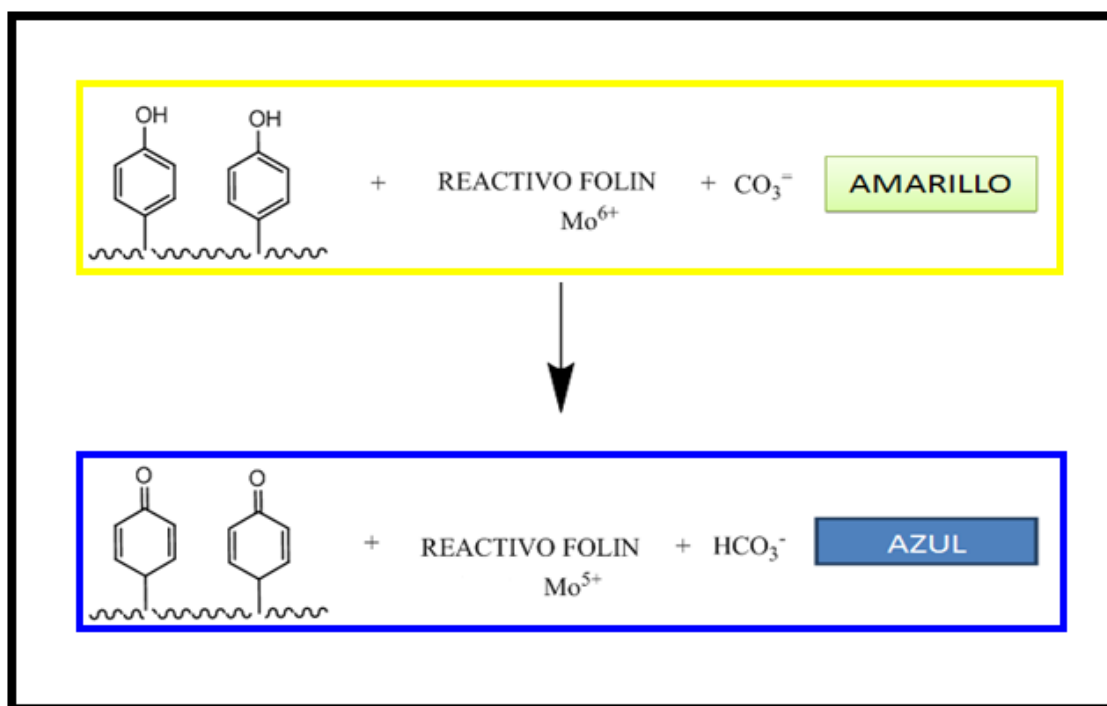
### 3.2 Métodos de determinación de polifenoles.

Existen varios métodos para la determinación de polifenoles totales, los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu.



El método de Singleton y Rossi, es el método más utilizado para determinar los fenoles totales. Se fundamenta en una reacción de oxidación reducción que es el mecanismo básico; gracias al carácter reductor del reactivo de Folin Ciocalteu (Barceló., 1990).

El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.



**Figura 6.** Reacción entre polifenoles y el reactivo de Folin Ciocalteu. En el cual el Mo (VI) es reducido a Mo (V) con un e- donado por un antioxidante (Cervantes, R. V., 2011).

#### 4.0 FLAVONOIDES GENERALIDADES

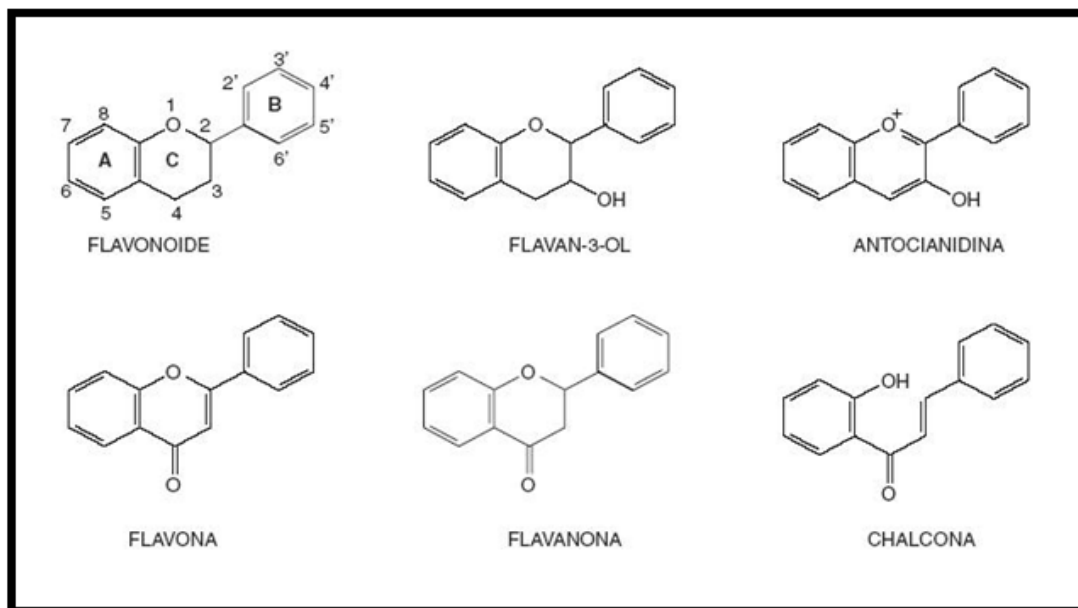
Entre los compuestos fenólicos más importantes se encuentran los flavonoides los cuales, además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, etc.



De aquí la importancia del estudio de las propiedades antioxidantes de los extractos utilizados en la alimentación humana y animal.

La mayoría de los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (Heterocíclico).



**Figura 7.** Flavonoides estructura básica y tipos.

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales.

Los flavonoides son compuestos químicos de origen botánico con marcada actividad biológica y han sido usados como marcadores de la calidad de varios extractos. En este trabajo se presenta la metodología necesaria en la determinación cuantitativa de flavonoides totales usando un método espectrofotométrico con  $AlCl_3$ .



Los flavonoides totales se determinan de acuerdo al método descrito por Zhishen. Las muestras son mezcladas con  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{NaNO}_2$ , formándose un complejo flavonoide-aluminio de color rojo en medio alcalino (Julián, 2009), (Chuquimia, 2008), (Marinova, 2005).

Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. El anillo pirano puede ser abierto (chalconas) y reciclado en un anillo furano (auronas).

En su relación con el hombre, se utilizan para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desordenes cardiovasculares debido a la actividad que ejercen sobre el sistema circulatorio mejorando la circulación periférica, la movilización del colesterol y disminuyendo la fragilidad capilar. Algunos flavonoides pueden presentar actividad hepática protectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, e incluso pueden ejercer efectos inhibidores sobre algunas enzimas.

Otra de las propiedades de los flavonoides es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura. Utilizados en la industria de los cosméticos por su actividad desodorante y reductora de la hiperpigmentación causada por la vejez.

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas, gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas.

También hay informes de los flavonoides inhiben la actividad de una serie de enzimas, incluyendo la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, entre otras. Aunque en contraste con los efectos beneficiosos, algunos flavonoides también se han encontrado e estudios in vitro ser muta génicos.

## 5.0 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PLANTAS

A continuación se hace una descripción básica ya que al no contar con la información de las plantas que realmente se utilizaron (género y especie) por parte de “extractos sigma”, por lo tanto se puntualizarán los géneros más utilizados.



### 5.1 Algas Marinas.

Las algas son un grupo muy heterogéneo de organismos eucariotas que carecen de un sistema vascular bien desarrollado y de estructuras reproductoras complejas, pero que poseen clorofila y otros pigmentos para realizar una fotosíntesis productora de oxígeno (o están estrechamente emparentadas con especies fotosintéticas).

Las algas se encuentran en casi cualquier nicho ambiental: agua dulce, marina y salobre, en la que pueden estar suspendidas o ancladas y viviendo en el fondo, en ciertos ambientes terrestres, y sobre objetos inanimados húmedos. Pueden ser endosimbiontes (en diversos protozoos, moluscos, gusanos), parásitas o, asociadas a hongos, formar líquenes, y constituyen gran parte del fitoplancton de la tierra.

Las clasificaciones clásicas de las algas se basan fundamentalmente en propiedades celulares. Son ejemplos de ello la estructura y composición química de la pared celular, las formas de almacenamiento de nutrientes, los tipos de moléculas de clorofila y pigmentos accesorios, flagelos, morfología del talo, hábitat, estructuras reproductoras y patrones del ciclo vital. Por esto se dice que las algas son polifiléticas.

La estructura vegetativa de las algas varía desde la relativa simplicidad de una sola célula a la llamativa complejidad de organismos como los quelpos gigantes. Pueden ser unicelulares, coloniales, filamentosas, membranosas o tubulares.

En las algas existe tanto reproducción sexual como asexual. La reproducción asexual incluye la fragmentación, la producción de esporas y la fisión binaria, en tanto que en la sexual, los gametos se fusionan para formar un cigoto.

Las algas verdes, son un grupo muy diverso de organismos que abundan en el mar, agua dulce y hábitats terrestres húmedos.

Las algas pétreas son abundantes en aguas dulces y saladas, y son fósiles frecuentes.

Los euglenoides poseen cloroplastos similares bioquímicamente a los de las algas verdes. Poseen una película proteínica flexible, el periplasto, por debajo de la membrana plasmática.

Las algas pardas-doradas, algas amarillo-verdosas, y diatomeas, varían mucho en cuanto a la composición de sus pigmentos, la estructura de su pared celular y el tipo de células flageladas.

Las algas pardas son algas marinas multicelulares, algunas de las cuales alcanzan longitudes de 75 m. Los quelpos (algas pardas de mayor tamaño) contribuyen mucho a la productividad del mar y así satisfacen muchas necesidades humanas.



## 5.2 Castaño.

Nombre científico: *Aesculus hippocastanum*.

Familia: Fagaceae / Cupuliferae.

Distribución: Originario de Asia menor, aunque se ha extendido por zonas montañosas de Europa, África y Asia, los mejores ejemplares se encuentran en los laderos del Etna, en Sicilia, donde algunos troncos llegan a tener hasta 15 m de circunferencia.

Descripción: árbol de hasta 30 m de altura, con hojas de unos 15 a 25 cm de longitud, alternas, oblongas, o lanceoladas, pecioladas y brillantes, con el margen groseramente dentado y nerviaciones rígidos y paralelos. Las flores son apétalas, monoicas y pequeñas, de colores amarillentos, numerosos y agrupados en amentos rígidos, erectos, de color blanquecino o blanco. Los castaños se encuentran dentro de un involucre espinoso con 3 a 7 castaños. Castanea Dentada es la especie más habitual en América del Norte.

Composición:

Semillas

Pericarpio: saponinas, taninos catéquicos, d-catecol, pectina, leucoantocianina, potasio, aceite volátil, calcio y fosforo.

Cotiledones: en estado seco presentan 5% de agua, 3-4% de materia mineral, 8-10% de azúcar, 40-50% de almidón y 6-8% de aceite. Entre sus principios activos más importantes destacan derivados flavónicos (glucósidos del quercetol y kampferol), un 10% de saponinas triterpénicas (escina, proescigenina, escigenina) y aminoácidos: adenina, adenosina, guanina, L (+) lisina, L (-) triptófano.

Corteza

Heterósidos cumarínicos (2-3%): esculina (esculósido), fraxina (fraxósido) y escopolina, con sus correspondientes aglicones esculetina, fraxetina y escopoletina.

Otros: taninos catéquicos (proantocianidina A2), ácido esculitánico, escina, alantoína, quercetina, quercitrina y esteroleos.

Hojas

Heterósidos cumarínicos: esculina, escopolina y fraxina.

Otros: quercetina, rutina, quercitrina, taninos, trazas de escina, aminoácidos, polifenoles ácidos grasos, esteroleos y leucoantocianos. En las hojas frescas se ha aislado vit. C (163mg%) y vit. K (800 U. Dam en 1g de droga seca).



Acciones farmacológicas: La principal actividad del castaño de indias radica en su potencial antiedematoso y flebotónicos sobre la circulación periférica. Para una mejor comprensión se dividirán los ensayos biológicos realizados de acuerdo con la actividad terapéutica propuesta (Alonso, J. 2004).

### 5.3 Centella.

Nombre científico: *Centella asiática*.

Descripción botánica: se trata de una hierba trepadora perenne, perteneciente a la familia de las Apiáceas (Umbelíferas), no mayor a un palmo de altura, caracterizada por presentar largos estolones, tallos postrados rojizos, de cuyos nudos parten 1-3 pecíolos que pueden alcanzar hasta 15 cm de alto. Las hojas son glabras, enteras o crenadas, con forma de riñón, pudiendo alcanzar entre 7 y 15 cm de largo. Presenta inflorescencias con 3 ó 6 flores rojizas sésiles y ocasionalmente blanquecinas. El fruto es un diaquenio discoide muy comprimido y sin estrías.

Parte utilizada: planta entera, aunque frecuentemente suele emplearse la parte aérea seca. La disminución de peso durante el desecado es casi 5 veces el peso de la planta fresca. La droga es de sabor amargo al paladar.

Composición química:

Saponósido triterpénico: asiaticoside (asiaticósido) el cual por hidrolisis da una genina derivada de la  $\alpha$ -amirina llamada ácido asiático, más dos moléculas de ramnosa y 1 de glucosa unidas al grupo COOH.

Ácidos triterpénicos ácido indocentoico y ácido madecásico.

Flavonoides: kampfrol, quercetina, 3-glucosil-quercetina, 3-glucosil-kampfrol.

Ácidos grasos: ácidos linoleico, lignocérico, linolénico, oleico, palmítico, elaídico y esteárico.

Acciones farmacológicas: las mismas se centran en su actividad anticelulítica y estimulante circulatoria. El efecto benéfico de la centella asiática en los casos de celulitis estaría relacionado con su capacidad para potenciar la estructura del tejido conectivo con reducción de la esclerosis, mientras que su acción en la insuficiencia venosa está determinada por una combinación de sus efectos sobre el tejido conectivo y su capacidad para mejorar el flujo sanguíneo en los miembros afectados (Alonso, J. 2004).

### 5.4 Manzanilla.

Nombre científico: *Matricaria recutita*.

La manzanilla o camomila común o romana es una hierba perenne de la familia de las asteráceas, nativa de Europa.



Descripción: Las flores son principalmente dobles y consisten solamente en inflorescencias liguladas, con un receptáculo cónico cubierto de escamas lanceoladas y membranosas. Las hojas están divididas pinadamente en hojillas cortas y pilosas. Las Manzanillas silvestres, que solo tienen una franja de inflorescencias liguladas, se llaman manzanillas escocesas.

Partes utilizadas: Toda la planta

Composición química:

Aceite esencial (0.3-1.5%): es el componente más importante que se obtiene de las cabezuelas de la planta y constituyen con el grupo lipofílico de la droga.

Azulenos (26-46%): principalmente camazuleno (6-15%) y en menor proporción guajazuleno. Se trata de un aceite volátil.

Sesquiterpenos:  $\alpha$ -bisabolol (10-25%) y derivados (bisabólidos A, B y C, bisabonlonóxido A).

Lactonas sesquiterpénicas: matricina, matricarina y desacetilmatricarina. La matricina sería precursora también del camazuleno.

Carburos terpénicos: farneseno, cadineno, cis-espiroéter y trans-espiroéter.

Flavonoides (1-3%): constituyen junto a los mucilagos constituyen el grupo hidrofílico de la droga. Fueron identificadas numerosas flavonas y flavonoles metoxilados como la apigenina y quercetina con sus correspondientes glucósidos. Otros: luteolina, patuletina, lisorhamnetol, apiína, rutina, etc. (Alonso, J. 2004).

Ácidos fenólicos: Los ácidos trans-cafeico y ferúlico y sus glucósidos.

Uso terapéutico: Digestivo, antiemético, antiespasmódico y sedante leve cuando se toma internamente con la manzanilla se prepara una loción que se usa como calmante y analgésico en dolores de muela, oído y neuralgia. Como crema o ungüento se utiliza para heridas dolor de pezones y salpullido. Las lactonas sesquiterpénicas tienen actividad antitumoral in vitro. La manzanilla es un ingrediente de champús y enjuagues para cabello rubio.

### 5.5 Té Verde.

Nombre científico: *thea sinensis*.

La planta de té (*Camellia sinensis*) es la especie cuyas hojas y brotes se utilizan para elaborar té.

Familia: Teáceas

Hábitat: Se cultiva en China, la India, Sri Lanka, Kenia, Indonesia y otros lugares.

Descripción: El Té es bien conocido. El té verde es la variedad que se produce en China y Japón y difiere del té negro (que se produce en la India, Sri Lanka y Kenia), en que la fermentación, que originan compuestos que dan distintos sabores, se previene calentándolo para desactivar las enzimas.





---

Parte utilizada: Los brotes de hojas.

Composición química:

Metilxantinas (1-4%): compuestas básicamente por cafeína (teína) y pequeñas cantidades de teobromina, teofilina, xantina y adenina. Las metilxantinas están parcialmente unidas a los taninos.

Taninos: el principal en el té verde es (-)- epigallocatequina. Los del té negro están oxidados y son más complejos.

Polifenoles (22% en té verde, 12.9% en té negro): taninos catéquicos (ácido galotánico 0.75%), epicatequina, epigallocatequina y sus ésteres gálicos. Ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico y gálico) y proantocianidinas (Alonso, J. 2004).

Principios activos: cafeína con cantidades menores de otras xantinas tales como teofilina y teobromina.

Flavonoides: Quercetina, Kaempferol, entre otras.

Usos terapéuticos: Estimulante, diurético y astringente. Sus propiedades estimulante y diurética se deben al contenido de cafeína y la astringencia a los taninos. El té es efectivo contra la diarrea y en china se utiliza contra varios tipos de disentería a pesar de que en exceso puede causar problemas gastrointestinales e irritabilidad nerviosa debido a la cafeína. Recientemente se demostró que los taninos en el té verde tienen cierta acción antitumoral.



#### IV. MATERIAL

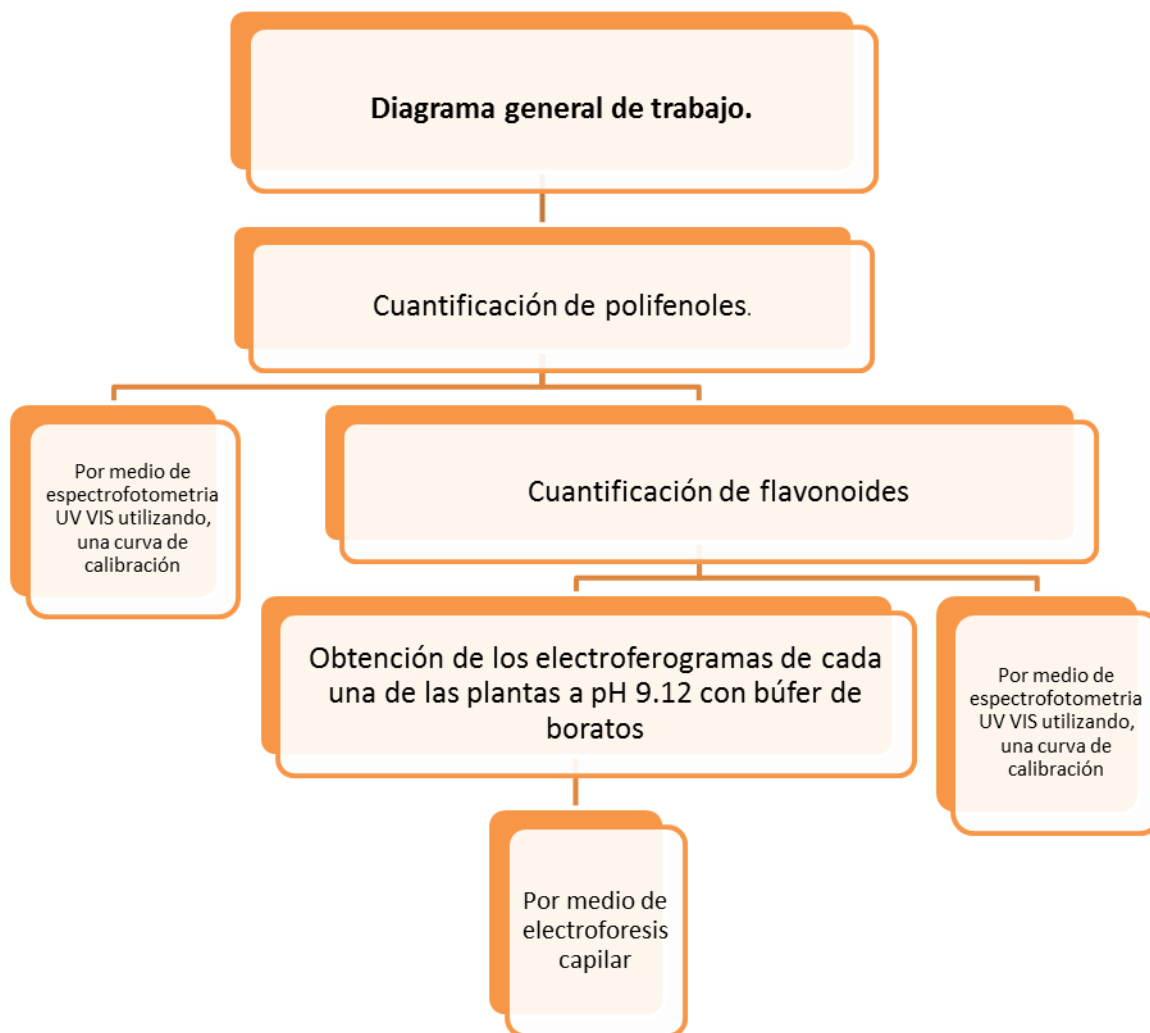
- Vasos de precipitados de 25, 50, 100 mL.
- Matraces volumétricos de 5, 10, 50, 100 mL.
- Embudo de vidrio.
- Micro pipeta de 10 – 100  $\mu$ l y 100 – 10000  $\mu$ l.
- Viales para electroforesis capilar.
- Celda de cuarzo para espectrofotómetro.
- Espátula.

#### V. REACTIVOS

- Ácido Pirogálico
- Agua desionizada
- Borato de Sodio
- Carbonato de Sodio
- Cloruro de Aluminio
- Estándar de Rutina
- Hidróxido de Sodio
- Metanol grado HPLC
- Nitrito de Sodio
- Reactivo de Folin Ciocalteu



## VI. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



**Figura 8.** Diagrama general de trabajo.



## VII. EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-VIS (Beckman DU 800).
- Equipo de electroforesis (BeckmanCoulter P/ACE System MDQ CapillaryElectrophoresis, Fullerton, CA).
- Balanza analítica (Mettler AT200 Fact) precisión 0.1mg.
- pH – metro (Beckman Q 310).
- Sonicador (Ultrasonic LC 304 Elma).

## VIII. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

### 1.0 POLIFENOLES

- **Estándar de Pirogalol:** Pesar en un vaso de precipitados de 50 mL en balanza analítica con exactitud, 15 mg de estándar de pirogalol agregar la mínima cantidad de agua desionizada y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.
- **Carbonato de Sodio al 5 % p/v:** Pesar en balanza analítica aproximadamente 5 g, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a la marca de aforo.

### 2.0 FLAVONOIDES

- **Estándar de Rutina:** Pesar en un vaso de precipitados de 50 ml en la balanza analítica, con exactitud 14 mg de estándar de rutina anhidra agregar la mínima cantidad de metanol grado HPLC hasta disolución y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con metanol grado HPLC.
- **Nitrito sódico al 5 % p/v:** Pesar en balanza analítica con exactitud 5 g agregar la mínima cantidad de agua desionizada y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a la marca de aforo agua desionizada.
- **Cloruro de Aluminio al 10 % p/v:** Pesar en balanza analítica con exactitud, 5 g agregar la mínima cantidad de agua desionizada y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.
- **Hidróxido de sodio 1N:** Pesar en balanza analítica con exactitud, 4 g agregar la mínima cantidad de agua desionizada y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.



---

### 3.0 ELECTROFORESIS CAPILAR

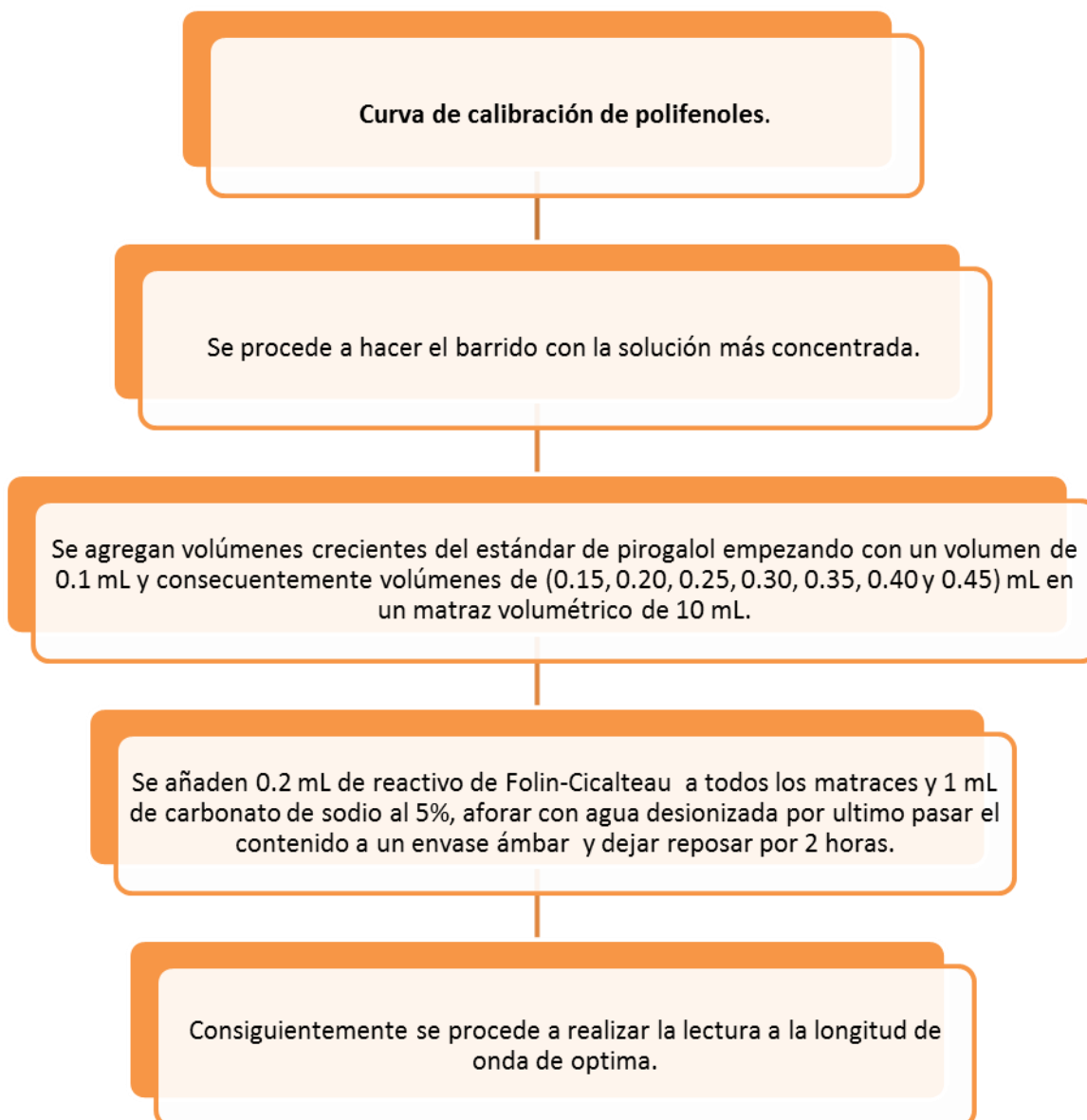
- **Buffer de Boratos pH= 9:** Se pesan en un vaso de precipitados de 25 mL 0.3814 g aproximadamente de borato de sodio y disolverlo en la menor cantidad posible de agua desionizada y ajustar a pH=9 con NaOH 1N o en su defecto HCl 1N. Se transfiere a un matraz aforado de 50 mL y se lleva a la marca de aforo. A continuación se filtra el buffer con membrana 0.45  $\mu\text{m}$  y se coloca el sonicador por 5 minutos.
- **Hidróxido de sodio 1 N:** Pesar en balanza analítica aproximadamente 4 g, agregar la mínima cantidad de agua desionizada y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada. A continuación se filtra la solución con membrana 0.45  $\mu\text{m}$  y se sitúa en el sonicador por 5 minutos.



## IX. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 1.0 CURVA DE CALIBRACIÓN DE POLIFENOLES

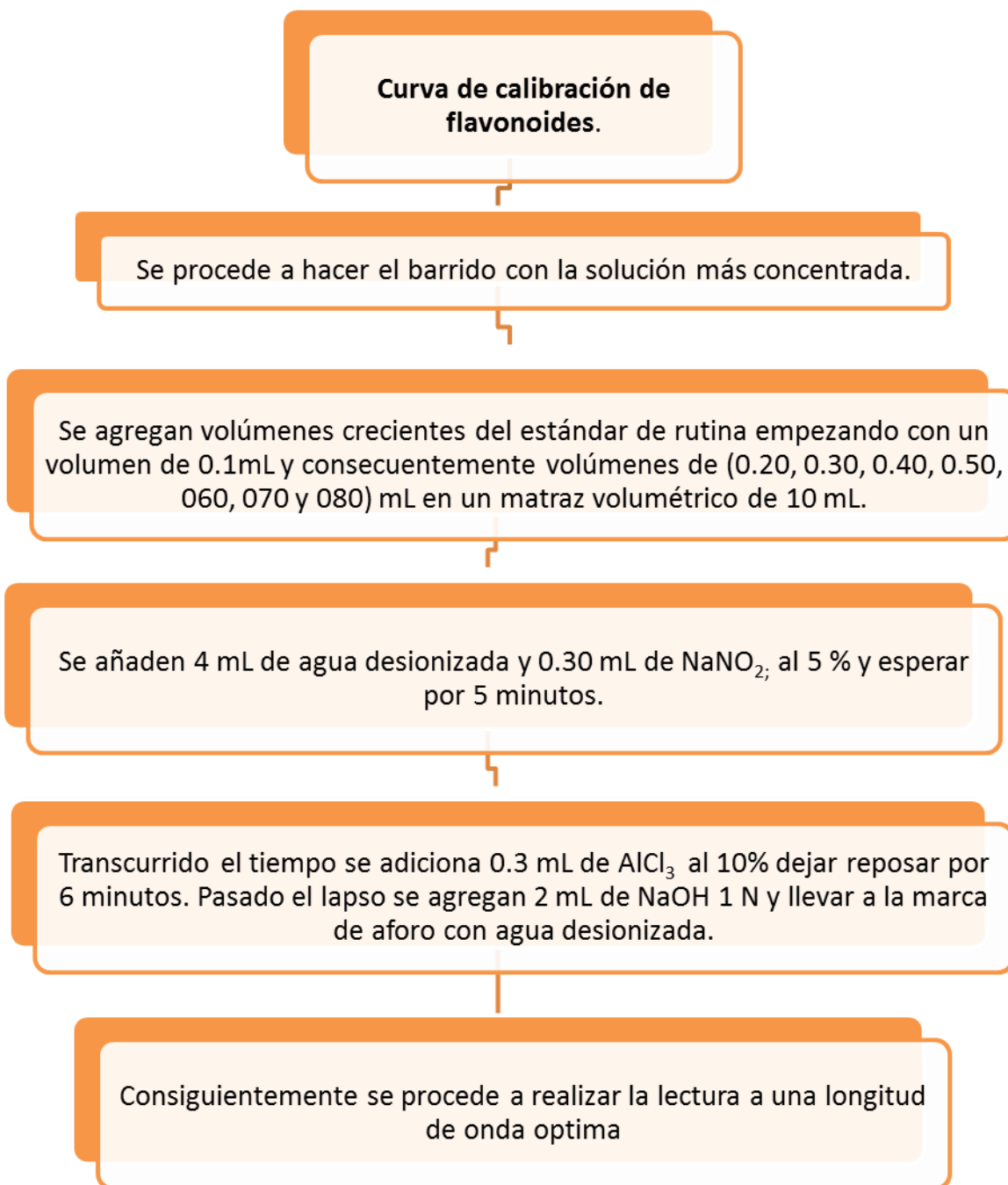
En primera instancia se preparara una curva de calibración de pirogalol-Folin-Cicalteau utilizando diversos compuestos como un estándar de pirogalol a una concentración de 0.294 mg/mL, así mismo se utilizó reactivo de Folin-Cicalteau y carbonato de sodio al 5%.



**Figura 9.** Diagrama curva de calibración para determinar polifenoles por espectrofotometría UV-VIS.



## 2.0 CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLAVONOIDES



**Figura 10.** Diagrama curva de calibración para determinar flavonoides por medio de espectrofotometría UV-VIS.

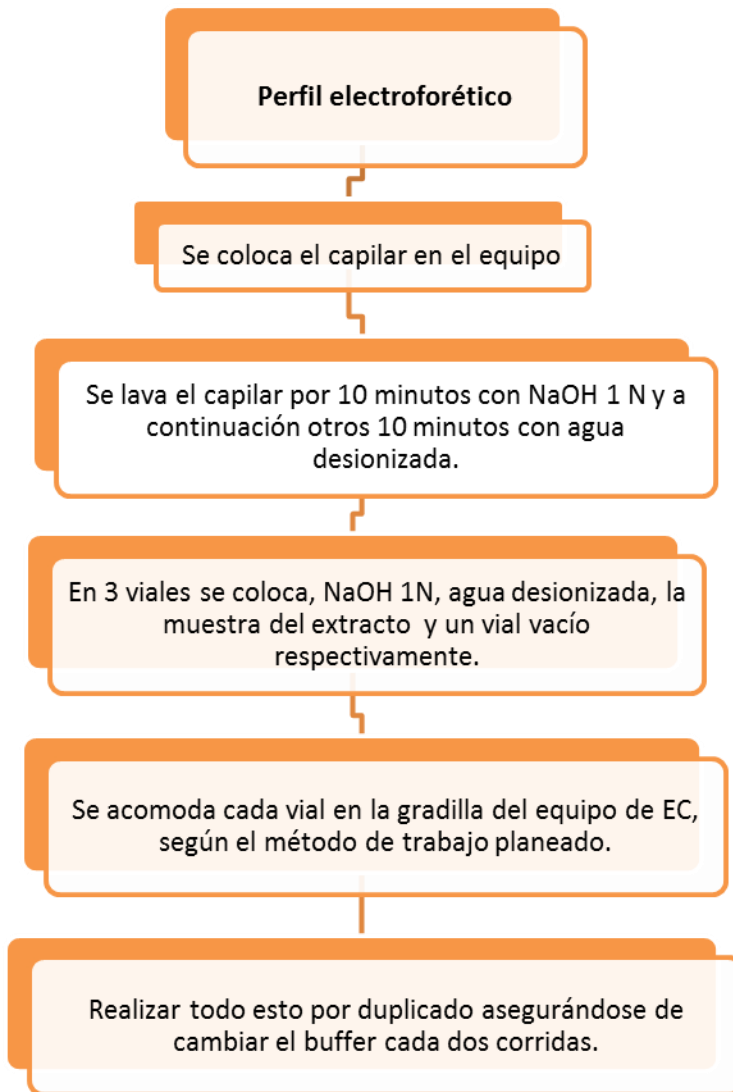


### 3.0 PERFIL ELECTROFORÉTICO

Se realiza en un equipo de electroforesis Beckman Coulter que consta de 3 minutos de lavado con hidróxido de sodio 1 N, enseguida con agua desionizada y por ultimo con buffer por 5 minutos.

Condiciones de análisis. Inyección hidrodinámica (presión: 1.0 Psi, duración: 10,0s), separación (Voltaje: 30.0kV, duración: 30 minutos polaridad: normal, detector: arreglo de diodos UV-VIS).

Las muestras se leen a una longitud de onda de 248 y 254 nm.



**Figura 11.** Diagrama perfil electroforético





---

#### **4.0 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE EXTRACTOS**

Los extractos naturales utilizados de algas marinas, centella, castaño, manzanilla y té verde fueron obtenidos de una empresa llamada “Extractos Sigma”, es una empresa mexicana dedicada a elaborar, desarrollar y comercializar extractos de origen natural para su uso o aplicación en la industria cosmética, farmacéutica, medicina alternativa y alimenticia, entre otras y por motivos de secreto industrial no podemos saber la forma en que fueron extraídos éstos por ende no se sabe de qué tipo de extractos naturales son (alcohólicos, acuosos etc.).

Las muestras de los extractos presentaron algunos inconvenientes a la hora de hacer el estudio a cada uno de ellas, el primero fue que como cada uno tenía tres lotes diferentes se tenía que saber si tenían la misma cantidad de flavonoides entre ellos así que se procedió a hacer las pruebas concernientes a cada muestra.

El segundo problema fue la cantidad de extracto que procedía de la empresa era muy pequeña es por eso que se optó por hacer todo el estudio en bajas cantidades (5 y 10 mL) para que alcanzara para todo el estudio.

De los cinco extractos utilizados se trabajo con 3 lotes diferentes de cada uno por lo tanto el numero total de muestras analizadas fue de 15.

Los volúmenes utilizados para el analisis de polifenoles, flavonoides asi como los perfiles electroforeticos se muestran en la tabla 1.



**Tabla 1.** Lotes y volúmenes utilizados para el análisis de los extractos.

| <b>Extracto</b>      | <b>Lote de fabrica</b> | <b>Flavonoides vol. utilizado (mL)</b> | <b>Polifenoles vol. Utilizado (mL)</b> | <b>Perfil electroforético vol. Utilizado (mL)</b> |
|----------------------|------------------------|--|--|---|
| <b>Algas Marinas</b> | S41J10                 | 2                                      | 4                                      | 1   |
| <b>Algas Marinas</b> | S26J25                 | 2                                      | 4                                      | 1   |
| <b>Algas Marinas</b> | S08K77                 | 2                                      | 4                                      | 1   |
| <b>Castaño</b>       | S44J45                 | 1.75                                   | 3.5                                    | 1   |
| <b>Castaño</b>       | S49J47                 | 1.5                                    | 3                                      | 1   |
| <b>Castaño</b>       | S02K15                 | 1.5                                    | 3                                      | 1   |
| <b>Centella</b>      | 15022010               | 1                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Centella</b>      | S51J5(1)               | 1                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Centella</b>      | S51J5(2)               | 1                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Manzanilla</b>    | S36J20(2)              | 2                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Manzanilla</b>    | S49J19                 | 2                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Manzanilla</b>    | S36J20(1)              | 2                                      | 2                                      | 1   |
| <b>Té Verde</b>      | S26J33                 | 0.5                                    | 1                                      | 1   |
| <b>Té Verde</b>      | S48J51                 | 0.5                                    | 1                                      | 1   |
| <b>Té Verde</b>      | S06K13                 | 0.5                                    | 1                                      | 1   |



**Figura 12.** Diagrama preparación de muestras



## X. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 1. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL COMPLEJO RUTINA - $AlCl_3$

El barrido se realizó en un intervalo de longitud de onda de 200 a 800 nm con esto se observa en que la longitud de onda optima es 510 nm con esto se justifica la longitud de onda utilizada durante la experimentación.

### 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE FLAVONOIDES

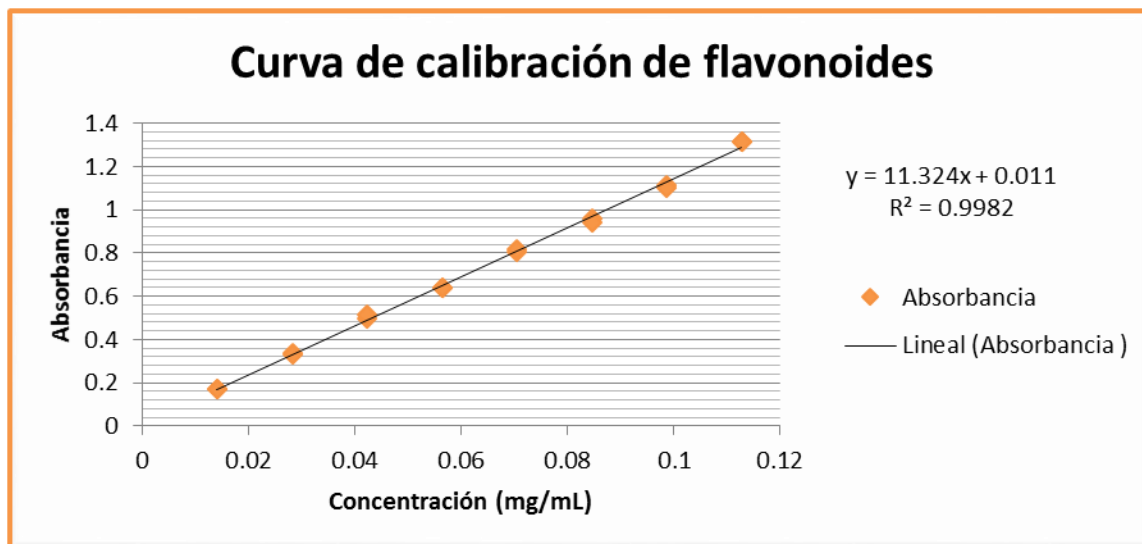


Gráfico 1. Curva de calibración de flavonoides

Las soluciones de la curva de calibración se trataron de la misma manera originándose una solución roja que iba aumentando su coloración conforme aumentaba la concentración es por eso que se trabajó con este método, pues es más específico del que exhibe la farmacopea herbolaria; ya que la coloración de las soluciones es de color amarillo y esto puede resultar en errores a la hora de trabajar con las muestras ya que los extractos son algunos de color amarillo. La curva de calibración para la cuantificación de flavonoides presento buenos resultados, esta se realizó por triplicado y por duplicado cada punto. El coeficiente de correlación más alto obtenido fue de 0.9982 mostrado en el gráfico 1, lo que nos dice que presentan un buen grado de asociación lineal entre las dos variables, no obstante las demás curvas presentaron un coeficiente de correlación mayor al 99% lo que nos dice que hay una relación muy estrecha entre la absorbancia y el cambio de concentración de cada solución del sistema.



#### 4. MUESTRAS

Los resultados con respecto a las muestras de los extractos, en primera instancia se calcularon mediante la curva de calibración previamente indicada, interpolando las absorbancias generadas en la misma, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon bc. \quad (10)$$

Exclusivamente para la parte de flavonoides, la mayoría de las soluciones presentaban un color rojo muy tenue que se asemejaba mucho a los extractos solos es por eso que se procedió a hacer una solución que constaba únicamente de extracto y se leyó a la misma longitud de onda para conocer la influencia del color del extracto, al hacer esto se observó que había una pequeña diferencia en las absorbancias lo cual nos indica que hay una pequeña presencia de flavonoides en la mayoría de las muestras.

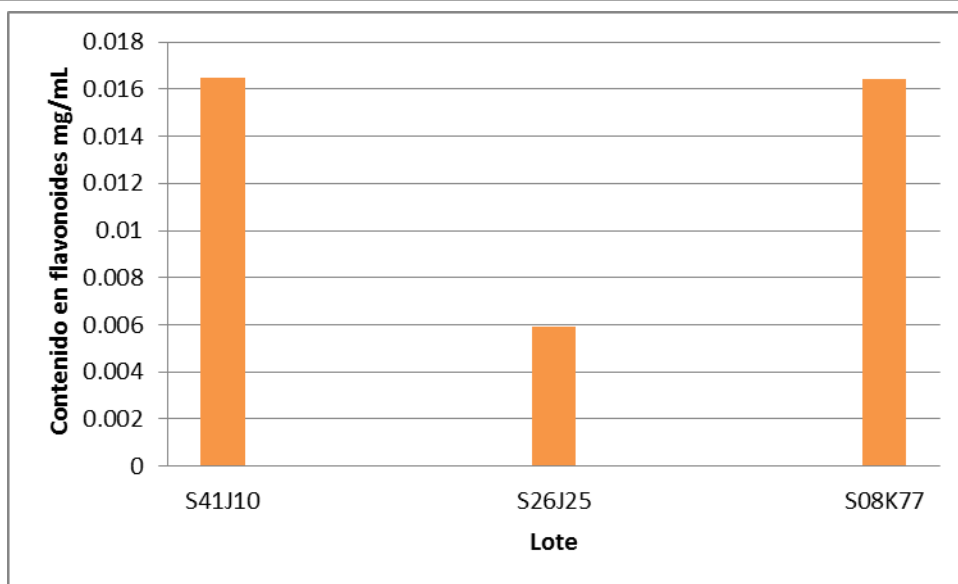
#### 4. CONTENIDO DE FLAVONOIDES EN MUESTRAS

##### 4.1 Contenido de flavonoides en algas marinas por espectrofotometría UV-VIS.

En la estimación de la curva de calibración para flavonoides se observó un coeficiente de correlación apropiado ( $r^2 = 0.998$ . ( $\pm$ ) rutina).

**Tabla 2.** Contenido de flavonoides en algas marinas.

| Lote   | Extracto | Absorbancia real | Contenido en flavonoides (mg/mL) |
|--------|----------|------------------|----------------------------------|
| S41J10 | algas    | 0.0916           | 0.0178                           |
| S41J10 | algas    | 0.0837           | 0.0160                           |
| S41J10 | algas    | 0.0816           | 0.0156                           |
| S26J25 | algas    | 0.0401           | 0.0064                           |
| S26J25 | algas    | 0.0368           | 0.0057                           |
| S26J25 | algas    | 0.0368           | 0.0057                           |
| S08K77 | algas    | 0.0905           | 0.0175                           |
| S08K77 | algas    | 0.0816           | 0.0156                           |
| S08K77 | algas    | 0.0843           | 0.0162                           |



**Gráfico 2.** Comparación de lotes de algas marinas.

Como se puede observar en el grafico comparativo 2, las cantidades de flavonoides son pequeñas en las muestras de algas marinas y de estas la más baja en cuanto al contenido de flavonoides es el lote S26J25. Los lotes S41J10 y S08K77 son los que presentaron una mayor cantidad de flavonoides.

Al efectuar el análisis de varianza de un solo factor para el contenido de flavonoides nos corrobora que hay diferencias significativas lote a lote, esto se debe principalmente al lote S26J25 ya que al hacer el mismo análisis solo a los dos lotes restantes, no hubo diferencias.



## 4.2 Contenido de flavonoides en castaño por espectrofotometría UV-VIS.

Tabla 3. Contenido de flavonoides en castaño.

| Lote   | Extracto | Absorbancia real | Contenido en flavonoides (mg/mL) |
|--------|----------|------------------|----------------------------------|
| S02K15 | castaño  | 0.0939           | 0.0243                           |
| S02K15 | castaño  | 0.0973           | 0.0253                           |
| S02K15 | castaño  | 0.0934           | 0.0243                           |
| S49J47 | castaño  | 0.1227           | 0.0330                           |
| S49J47 | castaño  | 0.0978           | 0.0257                           |
| S49J47 | castaño  | 0.1021           | 0.0267                           |
| S44J45 | castaño  | 0.0851           | 0.0187                           |
| S44J45 | castaño  | 0.0570           | 0.0116                           |
| S44J45 | castaño  | 0.0577           | 0.0118                           |

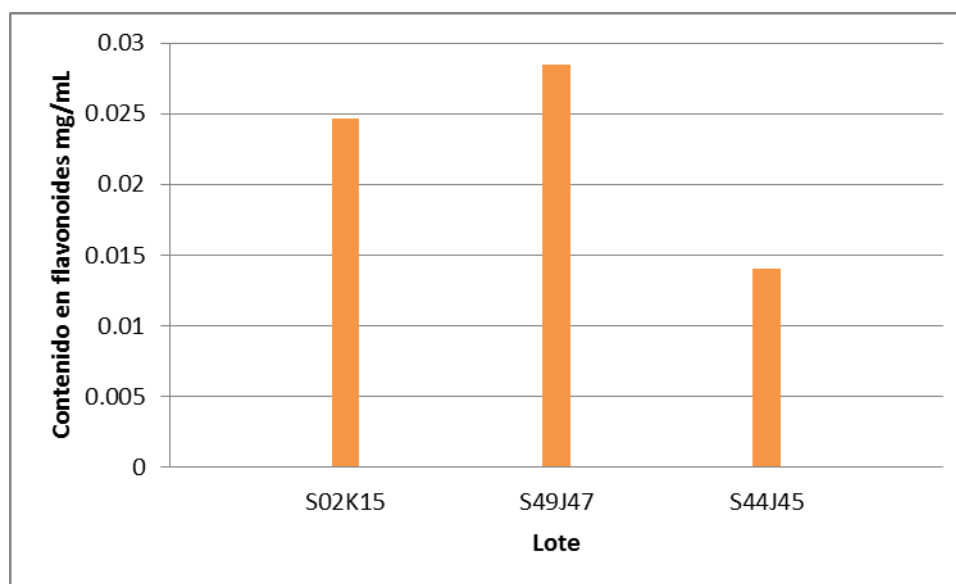


Gráfico 3. Comparación de lotes de castaño.



Las muestras de castaño con respecto a las muestras de algas marinas presentaron una absorbancia menor en relación a las de algas marinas aunque menor absorbancia igualmente de la solución de extracto solo.

En el caso del contenido de flavonoides en el extracto natural de castaño como se observa en gráfico comparativo 3, el lote que presenta la mayor cantidad de flavonoides es el S49J47 el cual contiene entre 0.0257 y 0.0330 mg/mL y el contenido más bajo es el lote S44J45 en el cual la cantidad de flavonoides oscila entre 0.0116 y 0.0187 mg/mL.

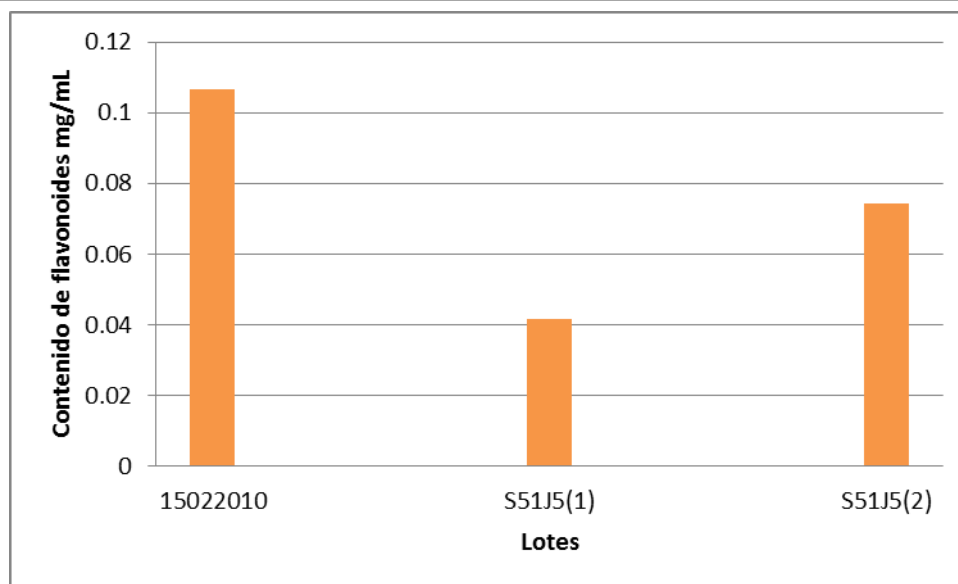
Como se podrá apreciar, al igual que el análisis estadístico hecho a los resultados de algas marinas, hay una diferencia significativa entre el contenido de flavonoides de castaño, y el lote S44J45 es el causal de esta discrepancia.

### 4.3 Contenido de flavonoides en centella por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 4.** Contenido de flavonoides en centella.

| Lote     | Extracto | Absorbancia real | Contenido en flavonoides (mg / mL) |
|----------|----------|------------------|------------------------------------|
| 15022010 | centella | 0.2569           | 0.1085                             |
| 15022010 | centella | 0.2537           | 0.1070                             |
| 15022010 | centella | 0.2477           | 0.1045                             |
| S51J5(1) | centella | 0.1027           | 0.0405                             |
| S51J5(1) | centella | 0.1011           | 0.0405                             |
| S51J5(1) | centella | 0.1112           | 0.0440                             |
| S51J5(2) | centella | 0.1736           | 0.0718                             |
| S51J5(2) | centella | 0.1791           | 0.0742                             |
| S51J5(2) | centella | 0.1848           | 0.0767                             |





**Gráfico 4.** Comparación de lotes de centella.

Los resultados para el caso de las muestras de centella, en relación a la cuantía total de flavonoides, presentaron poca fluctuación en los resultantes para cada lote.

Como se observa en el gráfico comparativo 4 para muestras de centella se muestra que el lote 15022010 es donde se encuentra la proporción más grande en lo que flavonoides respecta, en contraste la proporción más baja se encuentra en el lote S51J5 (1) con cifras que se encuentran entre 0.0405 y 0.0440 mg/mL.

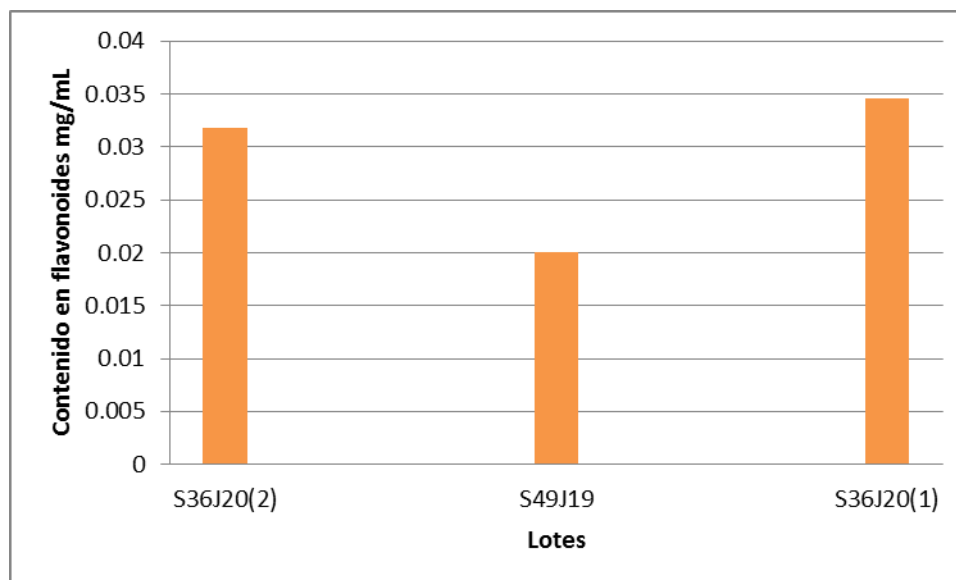
En relación al análisis estadístico realizado, como en los dos anteriores hubo diferencias significativas, aunque se analizaron diferentes alternativas, en todas éstas hubo diferencias marcadas, lo que nos dice que entre los tres lotes ninguno tiene relación a los otros dos.



#### 4.4 Contenido de flavonoides en manzanilla por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 5.** Contenido de flavonoides en manzanilla.

| Lote      | Extracto   | Absorbancia real | Contenido en flavonoides (mg/mL) |
|-----------|------------|------------------|----------------------------------|
| S36J20(2) | manzanilla | 0.1514           | 0.0310                           |
| S36J20(2) | manzanilla | 0.1509           | 0.0310                           |
| S36J20(2) | manzanilla | 0.1578           | 0.0335                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.121            | 0.0243                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.1077           | 0.0213                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.0764           | 0.0145                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.1659           | 0.0343                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.1717           | 0.0355                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.165            | 0.0340                           |



**Grafico 5.** Comparación de lotes de manzanilla.



El contenido de flavonoides totales presentes en las muestras de manzanilla se muestran en la tabla 5, donde igualmente se han incluido las absorbancias reales obtenidos.

Como se había notado anteriormente en la parte de método las dos muestras que utilizaron un volumen más alto, en esta sección fueron las de algas marinas y las de algas marinas debido a que no presentaban una absorbancia adecuada es decir era muy baja como para ser estimada en la curva de calibración. Es de notarse que los extractos de manzanilla asimismo de los de algas marinas fueron en los que se usaron los volúmenes más altos de extracto siendo este de 2 mL.

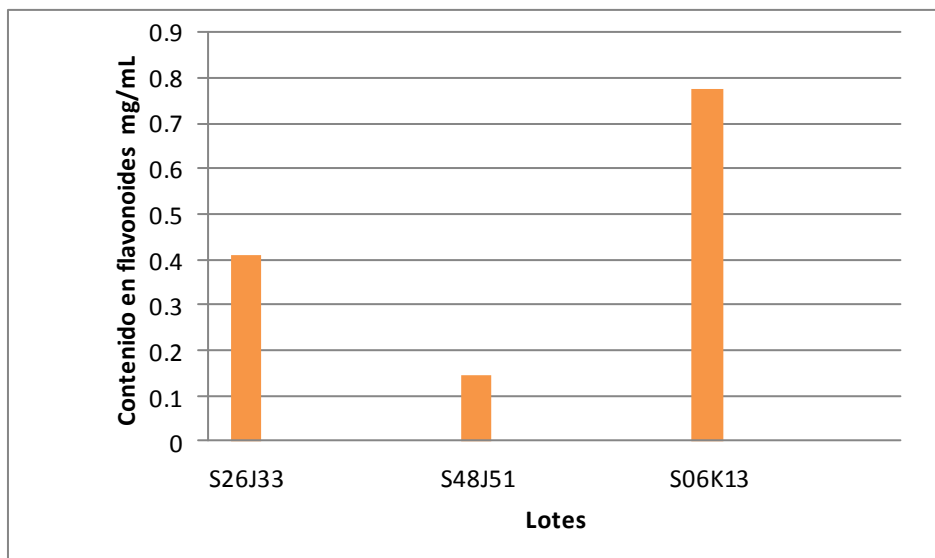
Con relación a los resultados conseguidos en función a la concentración de flavonoides del extracto de manzanilla como se puede percibir en el gráfico comparativo 5, los valores máximos obtenidos fueron cerca de 0.0343 mg/mL referente al lote S36J20. Por otro lado los valores mínimos observados fueron los del lote S49J19 que fluctuaron entre 0.0145 así como 0.0243 mg/mL.

El análisis estadístico nos muestra que hay diferencia significativa entre los tres lotes evaluados, adicional a lo anterior, se muestra de forma estadística que sigue habiendo diferencia significativa aun suprimiendo el lote S49J19 que es el que más se aleja en cuanto a concentración se refiere.

#### 4.5 Contenido de flavonoides en té verde por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 6.** Contenido de flavonoides en té verde.

| Lote   | Extracto | Absorbancia real | Contenido en flavonoides (mg/mL) |
|--------|----------|------------------|----------------------------------|
| S26J33 | té verde | 0.4764           | 0.4110                           |
| S26J33 | té verde | 0.4778           | 0.4120                           |
| S26J33 | té verde | 0.4736           | 0.4080                           |
| S48J51 | té verde | 0.1764           | 0.1460                           |
| S48J51 | té verde | 0.1699           | 0.1380                           |
| S48J51 | té verde | 0.1762           | 0.1460                           |
| S06K13 | té verde | 0.857            | 0.7470                           |
| S06K13 | té verde | 0.8826           | 0.7700                           |
| S06K13 | té verde | 0.9229           | 0.8050                           |



**Grafico 6.** Comparación de lotes de té verde.

En lo que concierne a las muestras analizadas de los lotes S26J33, S48J51 además de S06K13 pertenecientes al extracto de té verde se utilizaron las alícuotas más bajas ya que éstas presentaban una coloración alta al momento de llevar a cabo la reacción es por eso que se utilizó un volumen de 0.5 mL que fue suficiente para generar un coloración bastante alta esto se nota con las absorbancias obtenidas.

Como se observa en la tabla 6 las cantidades mínimas de flavonoides de té verde así como en el gráfico comparativo 6, fueron alrededor de 0.1460 mg/mL siendo del lote S48J51 en contraste las cantidades máximas se encontraron en el lote S06K13 estando estas entre 0.7470 y 0.8050 mg/mL.

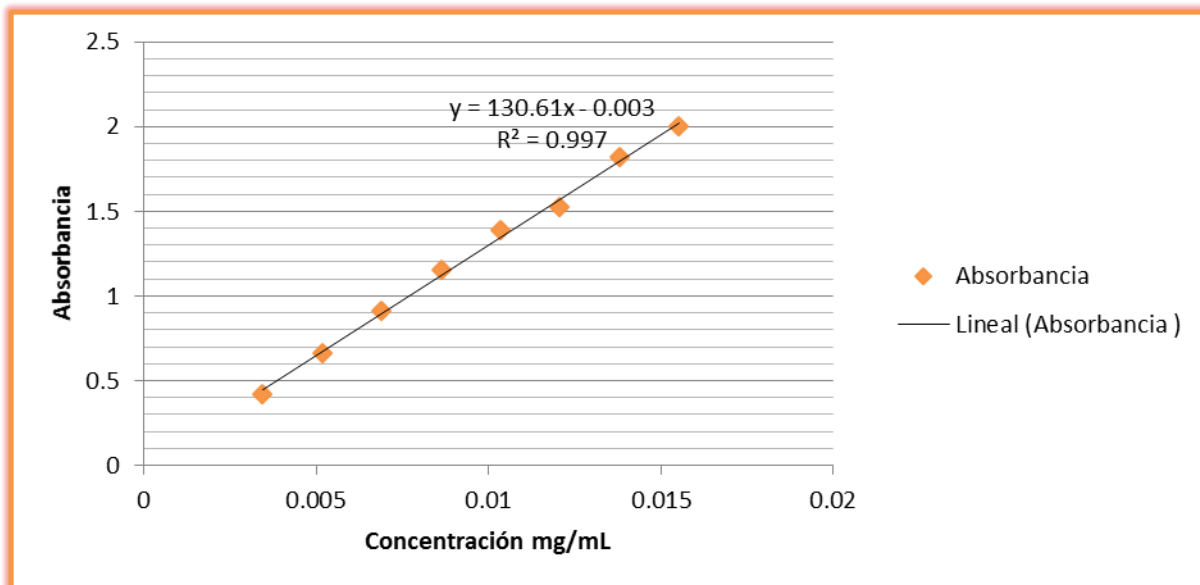
El análisis estadístico nos muestra que hay diferencia significativa entre los tres lotes evaluados, adicional a lo anterior, se muestra de forma estadística que sigue habiendo diferencia significativa aun suprimiendo el lote S48J51 que es el que más se aleja en cuanto a concentración se refiere.



## 5. BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL COMPLEJO FOLÍN CIOCALTEU-PIROGALOL

El barrido se hizo con la solución más concentrada, con esto se observa en que la longitud de onda optima es 710–730 nm con esto se justifica la longitud de onda utilizada durante la experimentación.

## 6. CURVA DE CALIBRACIÓN POLIFENOLES



**Gráfico 7.** Curva de calibración de pirogalol.

La curva de calibración de polifenoles se llevó a cabo mediante la técnica de Folin – Cicalteu la cual emplea el reactivo de Folin (FCR) o reactivo de Folin-Denis es una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos.

La curva de calibración para la cuantificación de polifenoles como se observa en el gráfico 7 se obtuvieron buenos resultados, en cuanto a los polifenoles se refiere. Se utilizó para cuantificar polifenoles totales de las muestras de extractos naturales. Esta se realizó por triplicado.

El coeficiente de correlación más alto conseguido fue de 0.997 como se puede observar en el gráfico 7, no obstante una de las demás curvas presenta un coeficiente de correlación menor al 99% específicamente de 0.9888 y la última curva presento un  $r^2$  de 0.9929 lo que nos dice que hay una buena correlación entre ambas variables la absorbancia y el cambio de concentración de cada solución del sistema.



En este caso las soluciones se leyeron a una longitud de onda de 710 y 730 nm y esta presentaba un color verde azulado muy intenso, conforme aumentaba la concentración aumentaba el color.

## **7. MUESTRAS**

Las muestras analizadas en cuanto a polifenoles difieren del análisis hecho a estos para el caso de flavonoides, principalmente en el volumen de aforo final utilizado, que en esta sección fue de 10 mL ya que se contaba con un volumen total de extracto mayor ya que el análisis se hizo primero.

Las muestras de extractos naturales se trataron con la misma técnica empleada para la curva de calibración de pirogalol solo se modificó el volumen para cada extracto ya que al igual que en flavonoides, algunos presentaban menor coloración, lo que nos producía una lectura muy baja en cuanto a absorbancias, es por esto que se usaron diferentes volúmenes de muestra.

## **8. CONTENIDO DE POLIFENOLES EN MUESTRAS.**

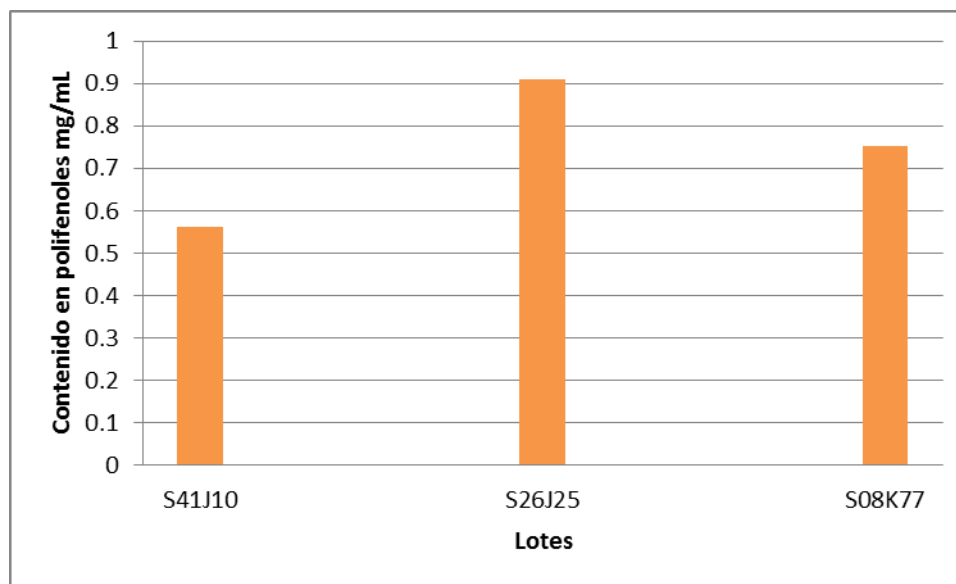
### **8.1 Contenido de polifenoles en algas marinas por espectrofotometría UV-VIS.**

Se utilizó la curva de calibración de pirogalol para llevar acabo la evaluación de polifenoles en las muestras. En la estimación de la curva de calibración para polifenoles se observó un coeficiente de correlación apropiado ( $r^2 = 0.997$ . ( $\pm$ ) pirogalol).



**Tabla 7.** Contenido de polifenoles en algas marinas.

| Lote   | Extracto      | Absorbancia real | Contenido en polifenoles (mg/mL) |
|--------|---------------|------------------|----------------------------------|
| S41J10 | algas marinas | 0.2897           | 0.5603                           |
| S41J10 | algas marinas | 0.2784           | 0.5386                           |
| S41J10 | algas marinas | 0.3026           | 0.5850                           |
| S26J25 | algas marinas | 0.4735           | 0.9121                           |
| S26J25 | algas marinas | 0.446            | 0.8594                           |
| S26J25 | algas marinas | 0.4972           | 0.9575                           |
| S08K77 | algas marinas | 0.3929           | 0.7578                           |
| S08K77 | algas marinas | 0.3682           | 0.7450                           |
| S08K77 | algas marinas | 0.3914           | 0.7549                           |



**Grafico 8.** Comparación del contenido de polifenoles de algas marinas

Como se puede apreciar en el grafico comparativo 8, las cantidades de polifenoles presentes en las muestras de algas marinas oscilan entre 0.5603 y 0.9575 de estas la más alta en cuanto al contenido de polifenoles es el lote S26J25. Los lotes S41J10 y S08K77 son los que exhibieron una menor cantidad de polifenoles.



Con base en los resultados obtenidos del análisis de varianza, se observó que la F calculada es mayor que su valor de F crítica, en base a estos resultados se determina que si hay diferencias significativas de lote a lote en cuanto a concentraciones del mismo extracto.

## 8.2 Contenido de polifenoles en castaño por espectrofotometría UV-VIS.

Tabla 8. Contenido de polifenoles en castaño.

| Lote   | Extracto | Absorbancia real | Contenido en polifenoles (mg/mL) |
|--------|----------|------------------|----------------------------------|
| S02K15 | castaño  | 0.4084           | 1.0500                           |
| S02K15 | castaño  | 0.4228           | 1.0867                           |
| S02K15 | castaño  | 0.4091           | 1.0518                           |
| S49J47 | castaño  | 0.4141           | 1.0645                           |
| S49J47 | castaño  | 0.411            | 1.0566                           |
| S49J47 | castaño  | 0.4191           | 1.0773                           |
| S44J45 | castaño  | 0.3061           | 0.6762                           |
| S44J45 | castaño  | 0.3275           | 0.7230                           |
| S44J45 | castaño  | 0.3175           | 0.7011                           |

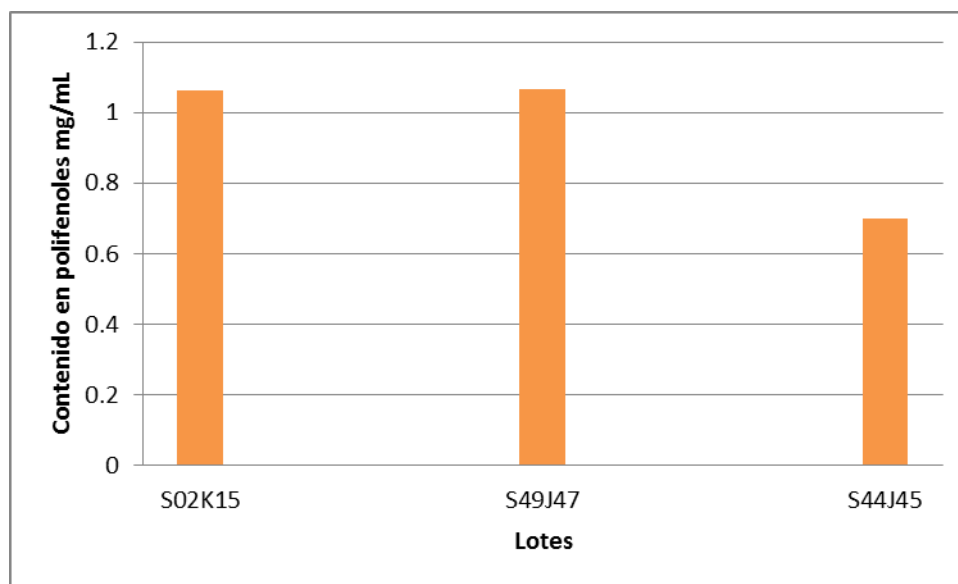


Gráfico 9. Comparación del contenido de polifenoles de castaño.





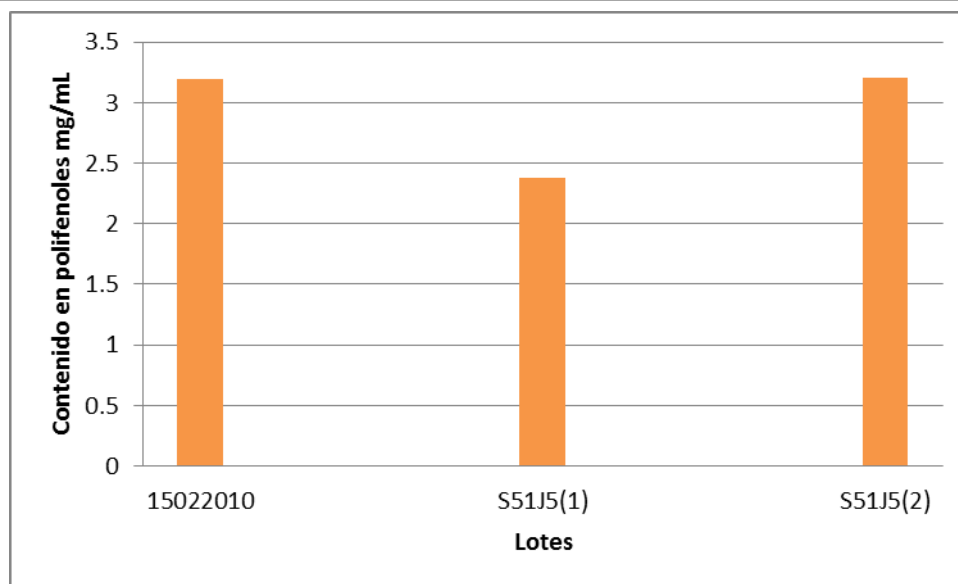
En el caso del contenido de polifenoles en el extracto natural de castaño el lote que presenta la mayor cantidad de polifenoles es el S49J47 el cual contiene entre 1.0566 y 1.0773 mg/mL aunque el lote presento una muestra con una cantidad más alta que fue de 1.0867 mg/mL por otro lado el contenido más bajo es el lote S44J45 en el cual se concentran cantidades de polifenoles oscilantes entre 0.6762 y 0.7530 mg/mL.

El análisis de varianza realizado a las concentraciones obtenidas del extracto de castaño, nos demuestra que hay diferencias significativas.

### 8.3 Contenido de polifenoles en centella por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 9.** Contenido de polifenoles en centella.

| lote     | Extracto | Absorbancia real | Contenido en polifenoles (mg/mL) |
|----------|----------|------------------|----------------------------------|
| 15022010 | Centella | 0.8202           | 3.1515                           |
| 15022010 | Centella | 0.8022           | 3.0826                           |
| 15022010 | Centella | 0.8756           | 3.3636                           |
| S51J5(1) | Centella | 0.6209           | 2.3885                           |
| S51J5(1) | Centella | 0.6257           | 2.4069                           |
| S51J5(1) | Centella | 0.6125           | 2.3563                           |
| S51J5(2) | Centella | 0.858            | 3.2962                           |
| S51J5(2) | Centella | 0.8194           | 3.1484                           |
| S51J5(2) | Centella | 0.8246           | 3.1683                           |



**Grafico 10.** Comparación del contenido de polifenoles de centella.

El contenido de polifenoles totales presentes en las muestras de centella se muestran en la tabla 9, donde igualmente se han incluido las absorbancias reales obtenidos.

Los resultados para el caso de las muestras de centella se observan en la tabla de resultados así como en el gráfico comparativo 10, se puede apreciar que el lote 15022010 es donde se encuentra la mayor proporción en lo que polifenoles concierne aunque el lote S51J5 (2), presenta cantidades muy similares, en disparidad la proporción más baja se encuentra en el lote S51J5 (1) con cifras que se encuentran entre 2.3563 y 2.4069 mg/mL.

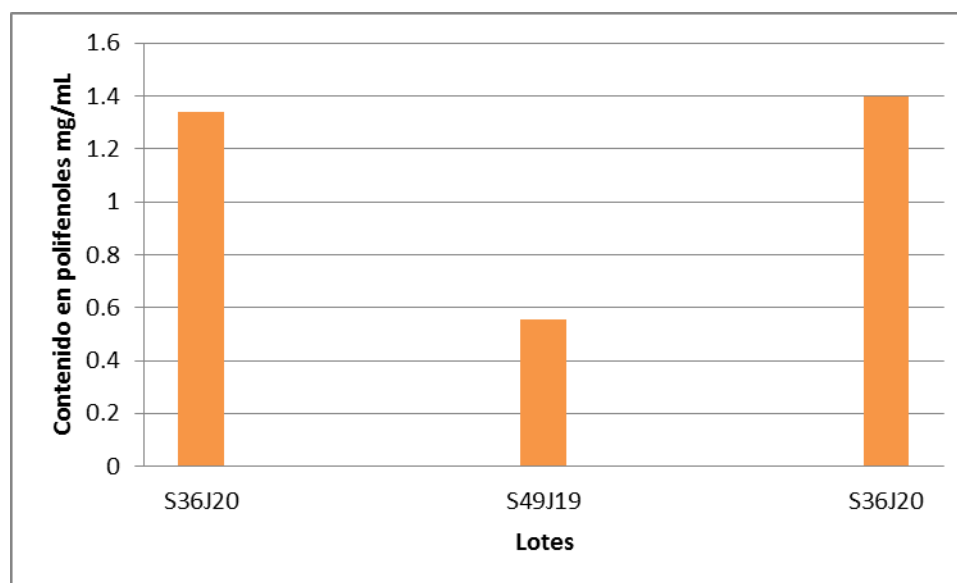
Como se puede apreciar en la tabla de resultados 17 en el anexo 2, los resultados obtenidos del análisis estadístico, el F calculada es mucho mayor al F crítica lo que nos muestra una diferencia significativa entre lote a lote en cuanto a concentración de polifenoles de castaño.



### 8.4 Contenido de polifenoles en manzanilla por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 10.** Contenido de polifenoles en manzanilla.

| Lote      | Extracto   | Absorbancia real | Contenido en polifenoles (mg/mL) |
|-----------|------------|------------------|----------------------------------|
| S36J20(2) | manzanilla | 0.3455           | 1.3342                           |
| S36J20(2) | manzanilla | 0.3511           | 1.3556                           |
| S36J20(2) | manzanilla | 0.3429           | 1.3243                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.1358           | 0.5314                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.1359           | 0.5318                           |
| S49J19    | manzanilla | 0.1552           | 0.6057                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.3608           | 1.3928                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.35             | 1.3514                           |
| S36J20(1) | manzanilla | 0.3752           | 1.4479                           |



**Gráfico 11.** Comparación del contenido de polifenoles de manzanilla.



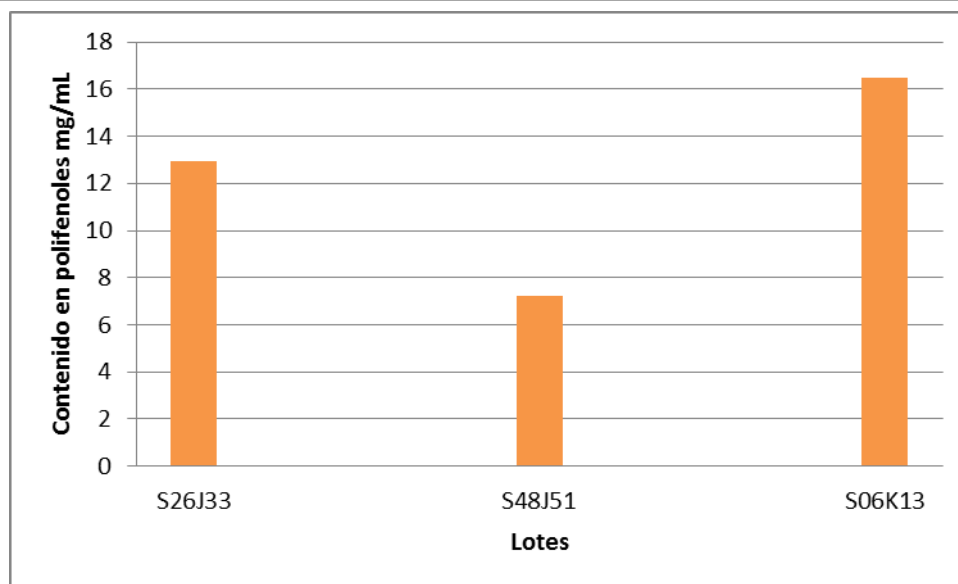
Como se estima en el gráfico comparativo 11 que los valores máximos obtenidos fueron cercanos a 1.4479 mg/mL referente al lote S36J20. Por otra parte los valores mínimos alcanzados fueron del lote S49J19 que fluctuaron entre 0.5314 así como 0.6057 mg/mL.

Como se puede observar en la tabla de resultados 19 en el anexo 2, se obtuvo una F calculada mucho mayor que la F crítica lo que nos indica diferencias significativas lote a lote en cuanto al contenido de polifenoles.

### 8.5 Contenido de polifenoles en té verde por espectrofotometría UV-VIS.

**Tabla 11.** Contenido de polifenoles en té verde.

| Lote   | Extracto | Absorbancia real | Contenido en polifenoles (mg/mL) |
|--------|----------|------------------|----------------------------------|
| S26J33 | té verde | 1.648            | 12.64                            |
| S26J33 | té verde | 1.7103           | 13.11                            |
| S26J33 | té verde | 1.7055           | 13.08                            |
| S48J51 | té verde | 0.9135           | 7.017                            |
| S48J51 | té verde | 0.9423           | 7.237                            |
| S48J51 | té verde | 0.9692           | 7.443                            |
| S06K13 | té verde | 2.1514           | 16.49                            |
| S06K13 | té verde | 2.175            | 16.67                            |
| S06K13 | té verde | 2.1317           | 16.34                            |



**Grafico 12.** Comparación del contenido de polifenoles de té verde.

En lo que atañe a las muestras analizadas de los lotes S26J33, S48J51 además de S06K13 pertenecientes al extracto de té verde se utilizaron las alícuotas más bajas ya que estas presentaban una coloración alta al momento de llevar a cabo la reacción al igual que en flavonoides es por eso que se utilizó un volumen de 1 mL que fue suficiente para generar un coloración verde oscuro notándose con las absorbancias obtenidas.

Como se observa en la tabla 11 las cantidades de polifenoles en el extracto de té verde pequeñas fueron alrededor de 7.017 mg/mL siendo del lote S48J51 en oposición las cantidades máximas se encontraron en el lote S06K13 estando alrededor de los 16.49 mg/mL.

Con los resultados obtenidos del análisis de varianza, se determinó que hay diferencias significativas.

En los resultados conseguidos de las muestras, se puede notar que la cantidad total de flavonoides, era menor a la de polifenoles en todos los casos, como se sabía con anterioridad los flavonoides son un tipo de polifenoles, por lo tanto estos últimos tendrán siempre una mayor cantidad en los extractos y en la planta en general.



Se puede apreciar que en todos los casos las cantidades tanto de flavonoides así como de polifenoles se tienen en las mismas unidades de concentración (mg/mL), con el propósito de hacer una comparación más satisfactoria.

Con respecto a los flavonoides, los extractos que presentaron mayor proporción fueron los de té verde siendo 0.8050 mg/mL la mayor cuantía en cuanto a este metabolito se refiere por otro lado este mismo extracto exhibió la mayor cantidad de polifenoles siendo del mismo lote (S06K13) lo que nos dice que hay una relación muy estrecha en las cantidades de estos metabolitos.

El siguiente en proporción es el extracto de centella que fue el segundo más alto en cuanto a cantidad de ambos metabolitos aunque ésta es mucho menor ya que hay una gran diferencia de hasta 0.7645 mg/mL. Sucesivamente el extracto de manzanilla, castaño y por último el de algas marinas que posee la menor proporción para el caso de ambos metabolitos.

Los lotes que presentaron menor cantidad de flavonoides fueron S26J25, S41J10 y S08K77 del extracto de algas marinas ya que estos no rebasaron los 0.0178 mg/mL.

Así mismo los lotes S44J45 y S49J19 pertenecientes a castaño y manzanilla respectivamente presentaron cantidades muy bajas de este metabolito que fluctuaron entre 0.0116 y 0.0243 mg/mL.

Por otra parte los lotes que presentaron la mayor cantidad fueron los de té verde S26J33, S48J51, S06K13 siendo este último el más alto de todos los analizados.

En relación a los polifenoles como en el caso de la prueba de flavonoides, los tres lotes pertenecientes al té verde fueron los más altos siendo el lote S06K13 el cual contiene el total más alto que fue de 16.67 mg/mL el que fue el que presentó mayor cantidad de este metabolito, en contraparte el lote S49J19 y S41J10 correspondientes a manzanilla y algas marinas respectivamente fueron los que tuvieron las cantidades más bajas ya que estas no excedieron los 0.6 mg/mL ninguna de las muestras.

La diferencia en las cantidades se debe principalmente a que no era la misma planta ya que se trataban de lotes diferentes por ende no habrá una homogeneidad en el contenido de estos metabolitos en plantas diferentes, ya que no están sujetos a las mismas condiciones además no podemos saber si todos los lotes fueron extraídos la misma fecha es decir no se sabe en realidad la fecha de caducidad de estos productos aun en la industria que los maneja.



La diferencia se basa principalmente en el conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en cada planta. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios. Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios.

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales.

La cantidad de metabolitos de una planta viene regido en primera instancia por el tipo de planta (Genero y especie), edad de la planta en la cual se cosecho, el tipo de tierra, la temperatura, la energía luminosa que recibe ya que estos afecta directamente a su metabolismo, la cantidad de agua suministrada, si se le agrega algún fertilizante etc. es por esta razón la diferencia de cantidades de estos dos metabolitos planta a planta y lote a lote. Además la cantidad de extracto obtenida, viene regido por el solvente utilizado así como la técnica manejada.

En el presente trabajo no se cuenta con parámetros establecidos en cuanto al contenido de flavonoides y polifenoles por lo menos no para los estudiados en este trabajo, es por eso que la empresa utilizara estos datos como una base para el estudio de estos extractos.

Por otra parte se determinó el perfil electroforético de los extractos ya mencionados, mediante la técnica de electroforesis capilar, con el propósito de obtener su huella digital con el fin de tener una identificación rápida y confiable y para que esto sea posible hay que controlar tres parámetros a como son el voltaje, el pH y la concentración del buffer, este último el más importante el cual debe controlarse adecuadamente para proporcionar una buena medida de separación con un alto número de picos con diferencias significativas en sus tiempos de migración de todos los picos.



Para el propósito de este trabajo no fue necesario hacer un análisis estadístico de los electroferogramas, es decir solo nos enfocaremos al número, las formas de los picos y el tiempo.

De este análisis se obtuvieron una serie de electroferogramas en los cuales se detectaron compuestos aniónicos.

Las Figuras 13, 14 y 15 del anexo 1 anterior muestran cada uno de los electroferogramas obtenidos para las muestras de Centella, lo que enseña una similitud bastante marcada, ya que las tres muestras presentan un pico característico alrededor del minuto 8.

En base a la movilidad electroforética de cada pico se deduce que los picos de la muestra 1 son muy semejantes entre sí.

Siguiendo con la comparación de los electroferogramas de la muestra de castaño, en esta parte también hubo una similitud en estos ya que se encontró un pico muy similar entre los minutos 8-10 en las tres muestras, aunque no eluyeron al mismo tiempo la forma es muy semejante entre sí.

Se puede observar los gráficos 19, 20 y 21 que los electroferogramas obtenidos para las muestras de manzanilla nos exhiben una similitud bastante marcada, ya que estos presentan los 4 picos prácticamente al mismo tiempo de elución, además que estos son muy parecidos en cuanto a su forma en general.

Continuando con la comparación de los electroferogramas de algas marinas en esta parte ocurrió un problema, el cual nos hizo recurrir a recortar el capilar ya que no se contaba con un repuesto en un tiempo inmediato, lo cual hizo que los tiempos de elución se vieran disminuidos notoriamente a partir de estas muestras.

Se observa para la muestra de algas marinas un perfil semejante para los 3 lotes manejados, se puede observar que hay un pico muy similar al minuto 4 aprox.

Por último en el caso de los electroferogramas para Té Verde el análisis se hizo al igual que para Algas Marinas con el capilar recortado, para este caso los resultados obtenidos son muy satisfactorios ya que las tres muestras analizadas presentan un gráfico muy similar entre sí, con un pico principal muy marcado al minuto 4 presente en los tres lotes.

Ahora bien, no existe una relación entre la cantidad de polifenoles estimados y los electroferogramas obtenidos para cada extracto. Ya que por ejemplo la muestra de algas marinas contiene una cantidad alrededor de 25 veces mayor de polifenoles que algas marinas, en el





---

electroferograma de cada una de las muestras presentan una absorbancia muy similar, esto se pudo deber a que primero se hizo el análisis de polifenoles y flavonoides, y ya que se concluyeron estos trabajos, es por eso que este estudio (electroferogramas) se realizó en alrededor de 6 meses después de entregadas las muestras y los polifenoles son compuestos muy lábiles, los cuales se descomponen fácilmente.



---

## XI. CONCLUSIONES:

Se llevó a cabo el estudio de cinco extractos naturales por medio de dos técnicas importantes, como lo son espectrofotometría UV-VIS y la electroforesis capilar obteniéndose resultados muy satisfactorios que nos fueron útiles para la caracterización de estos extractos.

Se utilizó el método analítico de Folin-Cicalteau, lo que permitió la cuantificación de polifenoles en los cinco extractos empleados.

Se determinó la cantidad de flavonoides totales presentes en los extractos mediante una curva de calibración utilizando espectrofotometría UV -VIS.

Se demostró mediante un ANOVA que hay diferencias significativas de lote a lote, en cuanto al contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos.

Se determinaron los perfiles electroforéticos de los 5 extractos usados, mediante la técnica de electroforesis capilar, empleada como método de identificación de especies vegetales.



## **XII. PROSPECTIVAS:**

En el presente trabajo se han dejado varias interrogantes que sería motivo de una investigación más a fondo, por ejemplo ¿Cuáles son las estabilidades de estos extractos y cuál es su vida útil en cuanto a la concentración de polifenoles y flavonoides? Estas cuestiones dejan abierta esta investigación.

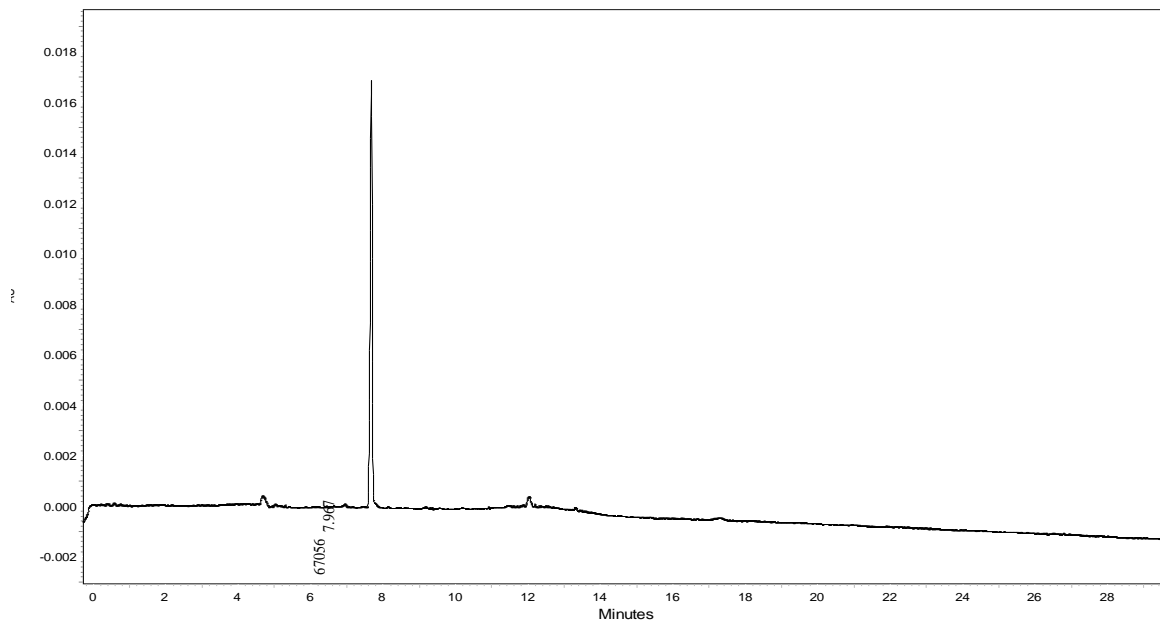
Por otro lado en cuanto a los perfiles electroforéticos, ya no se pudo contar con más muestra de los extractos a un tiempo razonable lo que nos pudo ayudar a buscar otras condiciones de trabajo para obtener mejores resultados.

Por último se recomienda trabajar, con el método de electroforesis capilar para inclusive hacer la cuantificación de estos dos metabolitos de manera confiable y rápida.



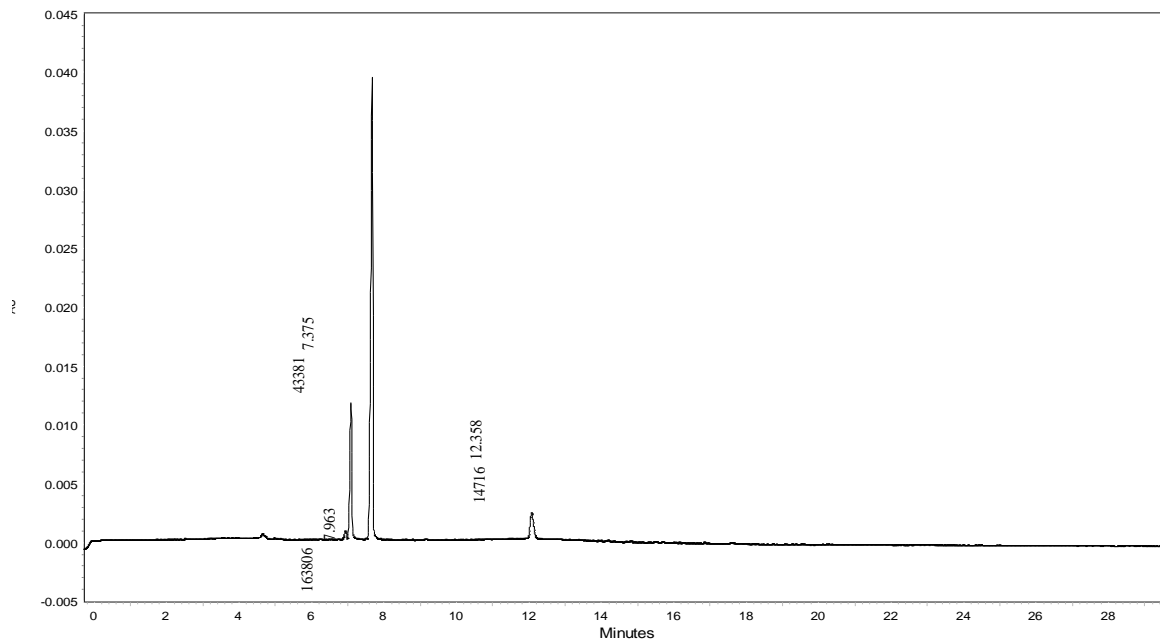
**ANEXO1 ELECTROFEROGRAMAS EXTRACTOS NATURALES.**

**Centella muestra "a"**



**Gráfico 13.** Electroferograma centella lote 15022010

**Centella muestra "b"**



**Gráfico 14.** Electroferograma centella lote S51J5 (1)



Centella muestra "c"

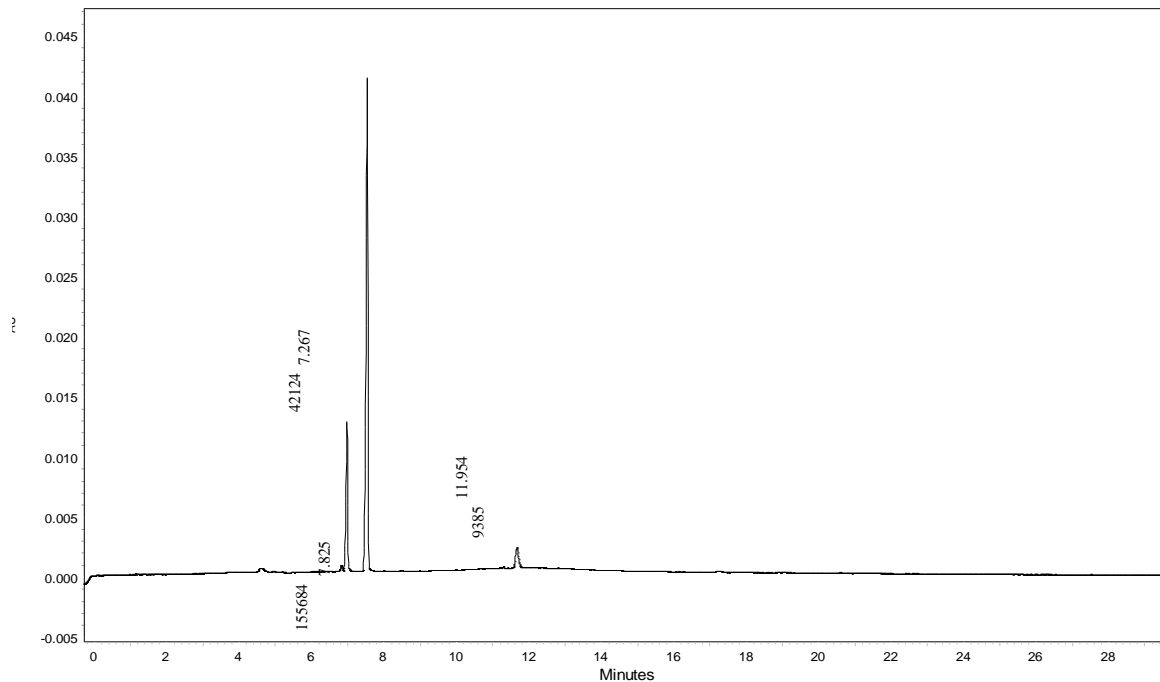
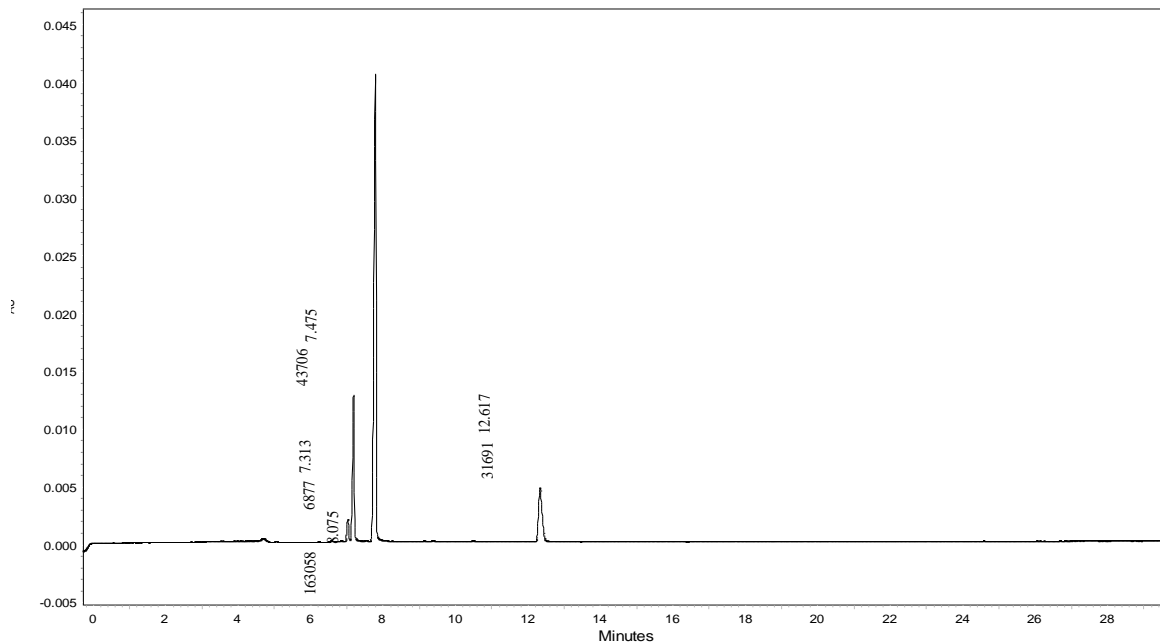


Grafico 15. Electroferograma centella lote S51J5 (2)

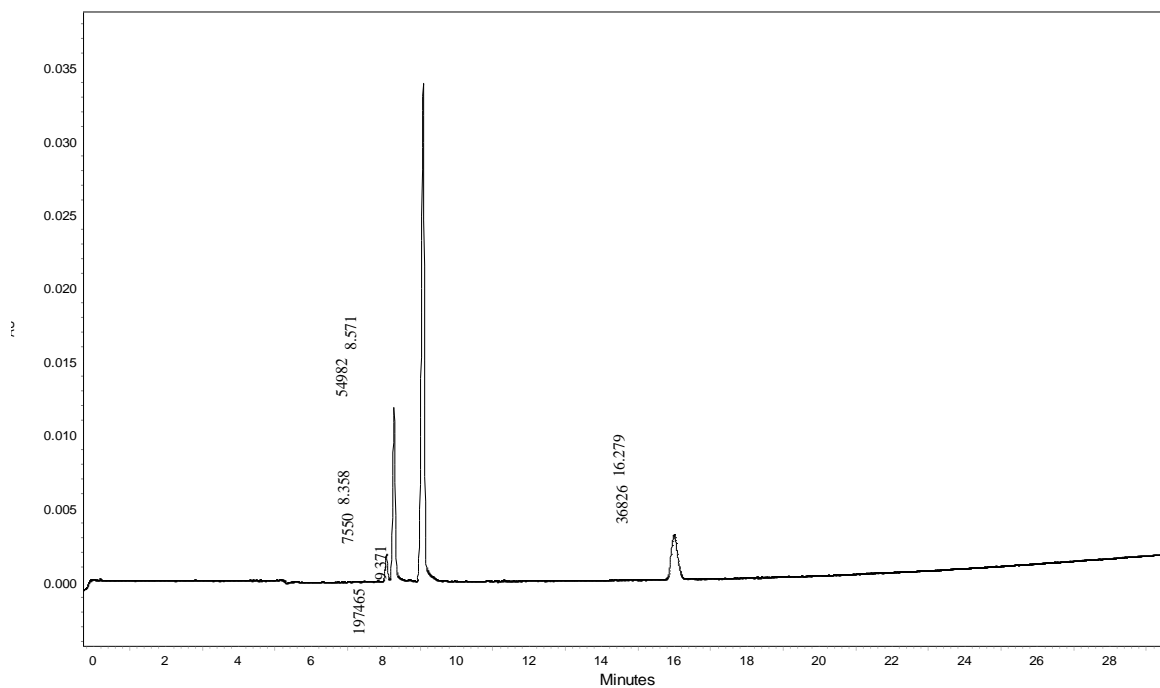


**Castaño muestra "a"**



**Gráfico 16.** Electroferograma castaño lote S02K15

**Castaño muestra "b"**



**Gráfico 17.** Electroferograma castaño lote S49J47



Castaño muestra "c"

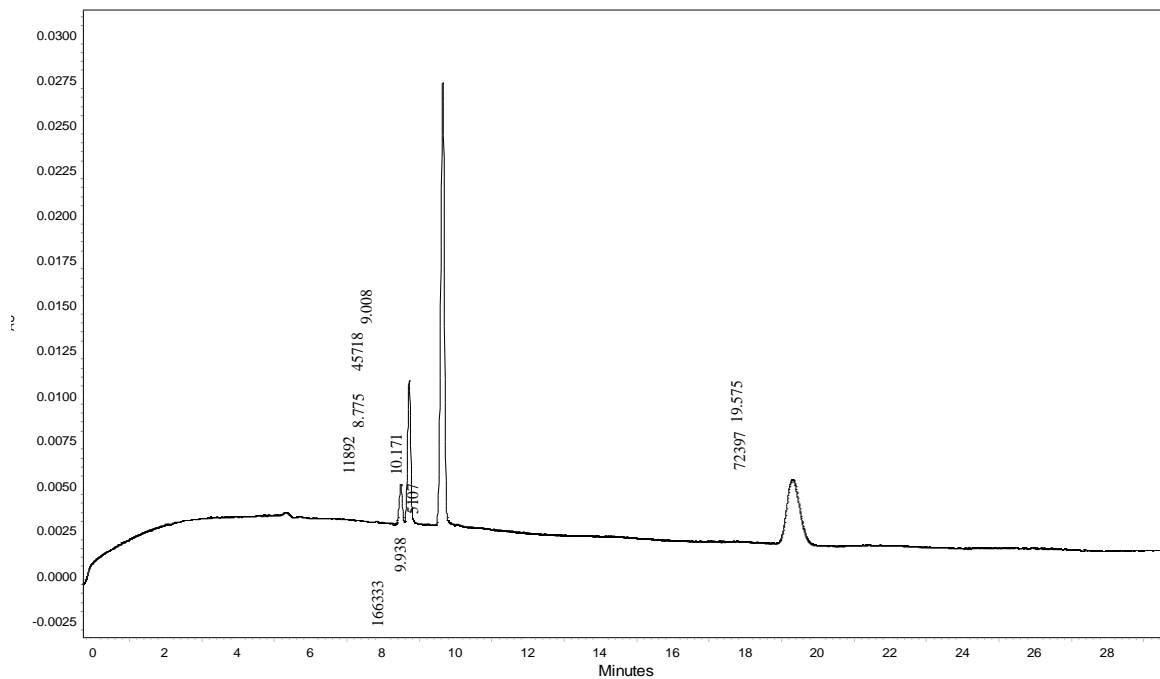
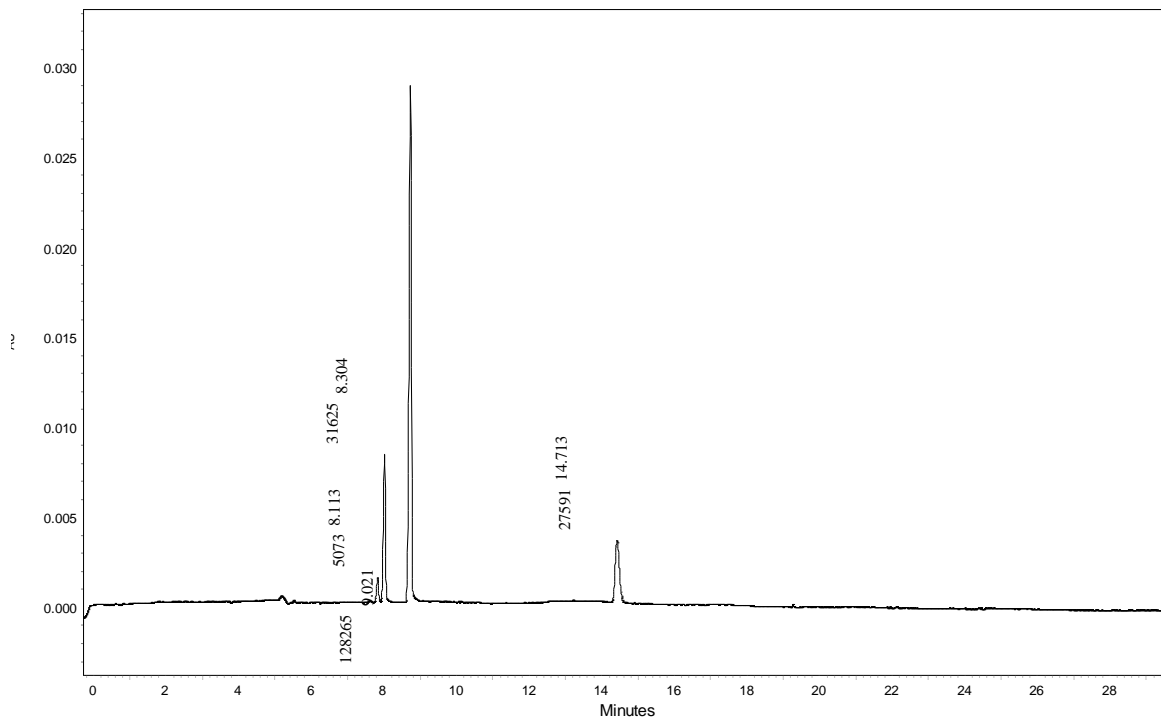


Gráfico 18. Electroferograma castaño lote S44J45

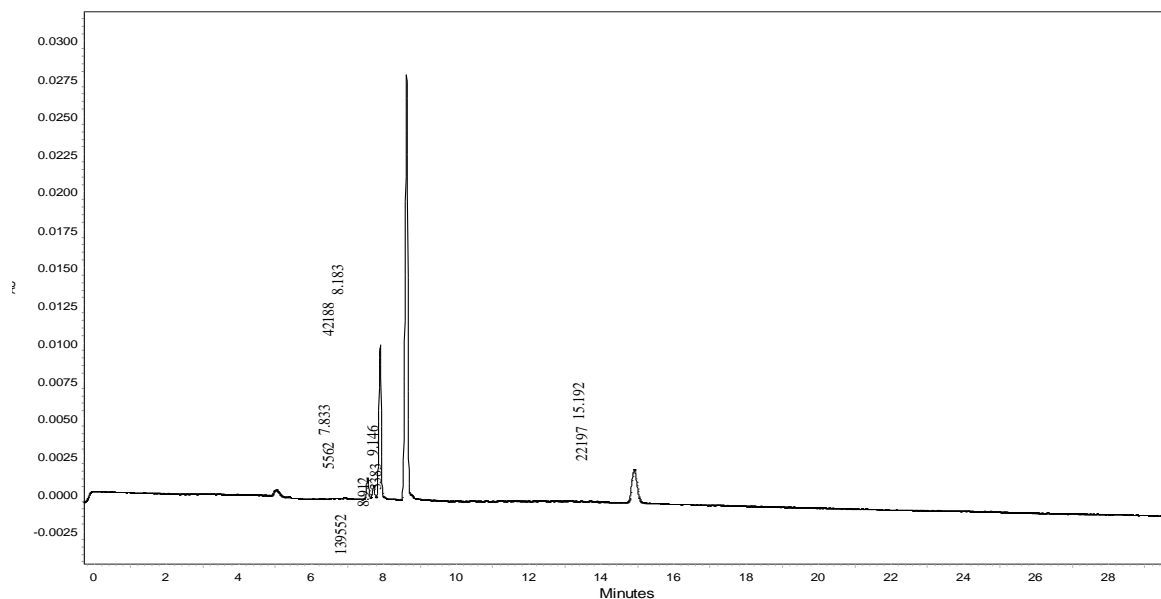


**Manzanilla muestra "a"**



**Gráfico 19.** Electroferograma manzanilla lote S36J20 (2)

**Manzanilla muestra "b"**



**Gráfico 20.** Electroferograma manzanilla lote S49J19





Manzanilla muestra "c"

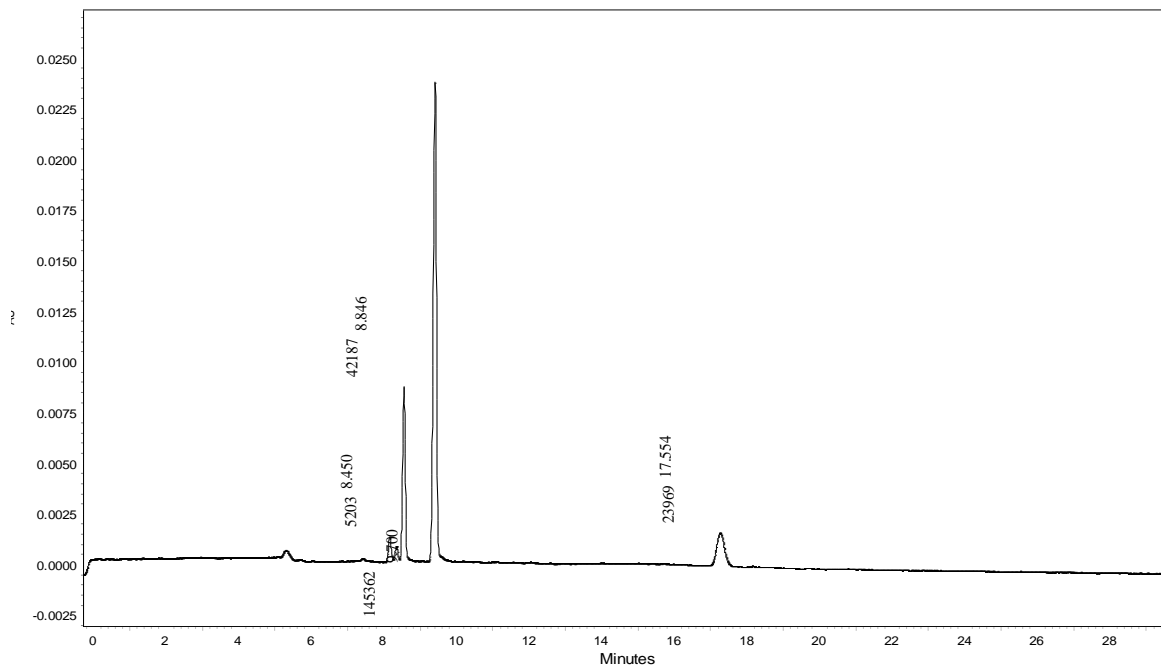
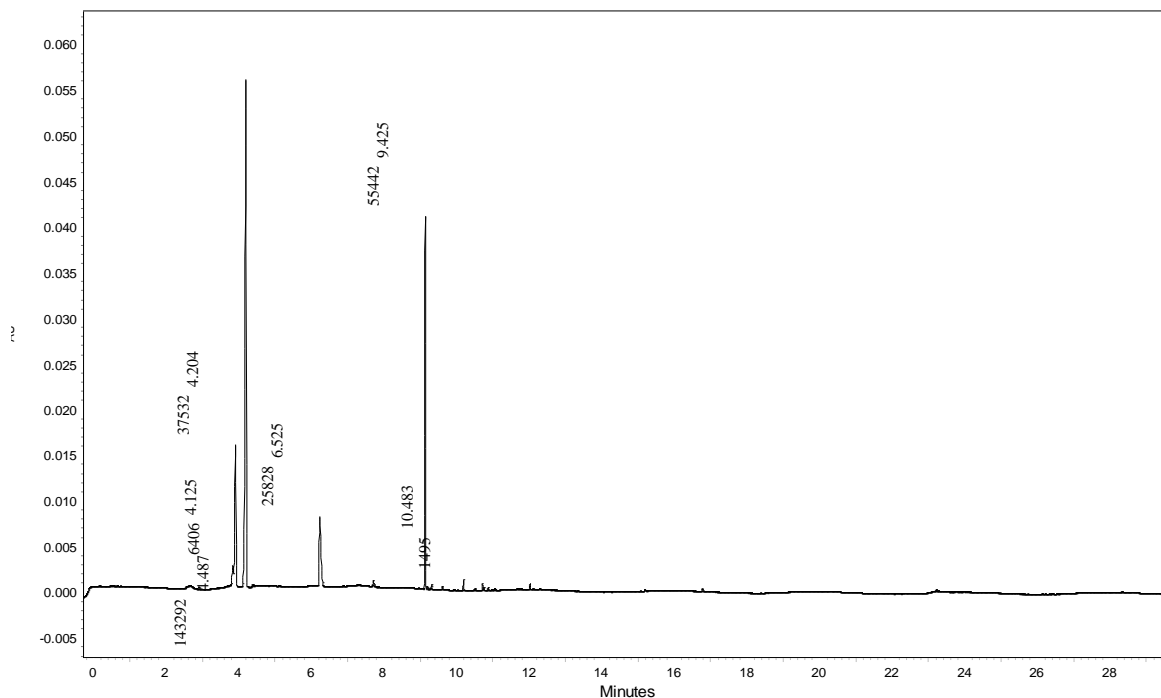


Gráfico 21. Electroferograma manzanilla lote S36J20 (1)

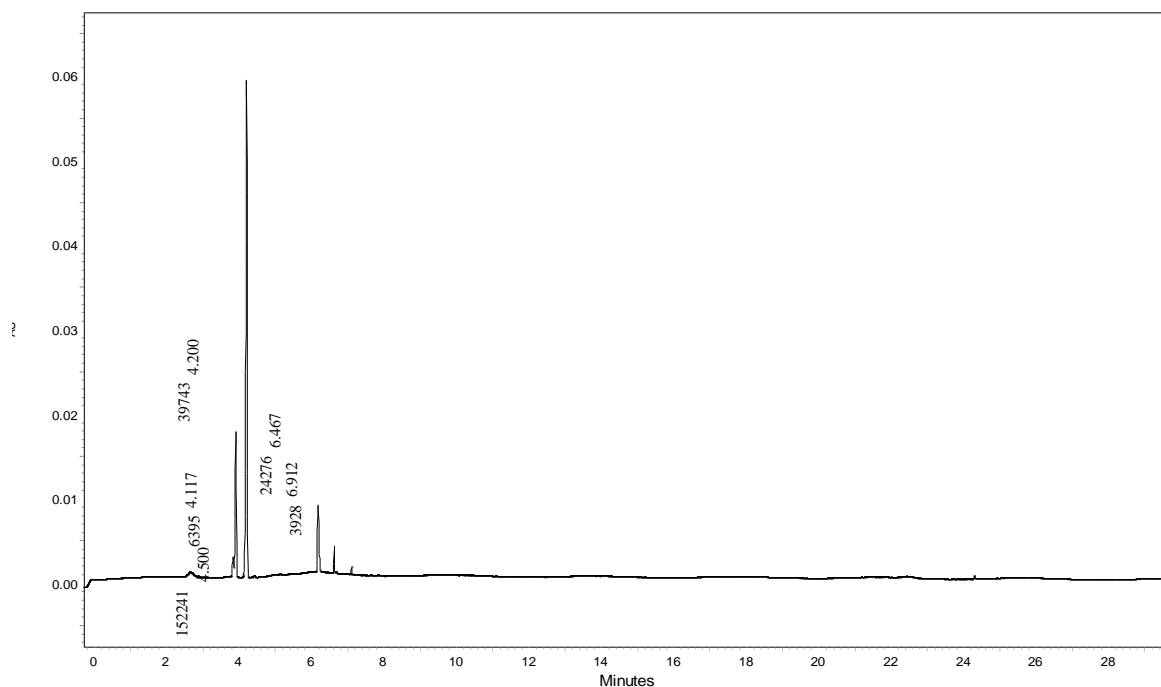


**Algas marinas muestra "a"**



**Gráfico 22.** Electroferograma algas marinas lote S41J10

**Algas marinas muestra "b"**



**Gráfico 23.** Electroferograma algas marinas lote S26J25



### Algas marinas muestra "c"

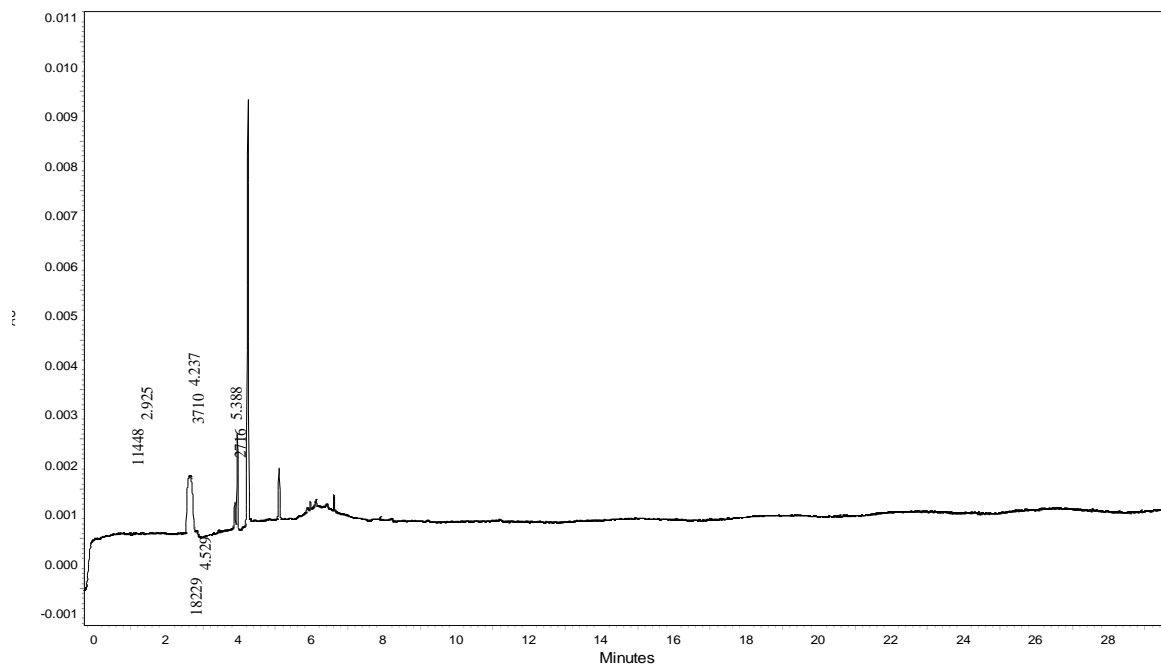


Gráfico 24. Electroferograma algas marinas lote S08K77



Té verde muestra "a"

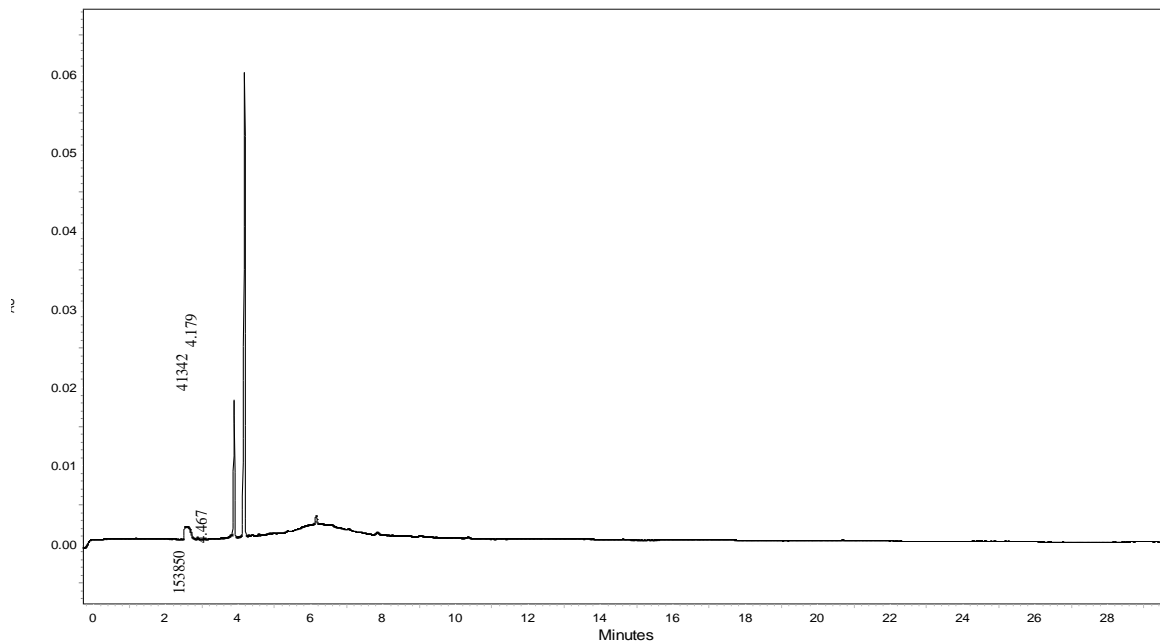


Gráfico 25. Electroferograma té verde lote S26J33

Té verde muestra "b"

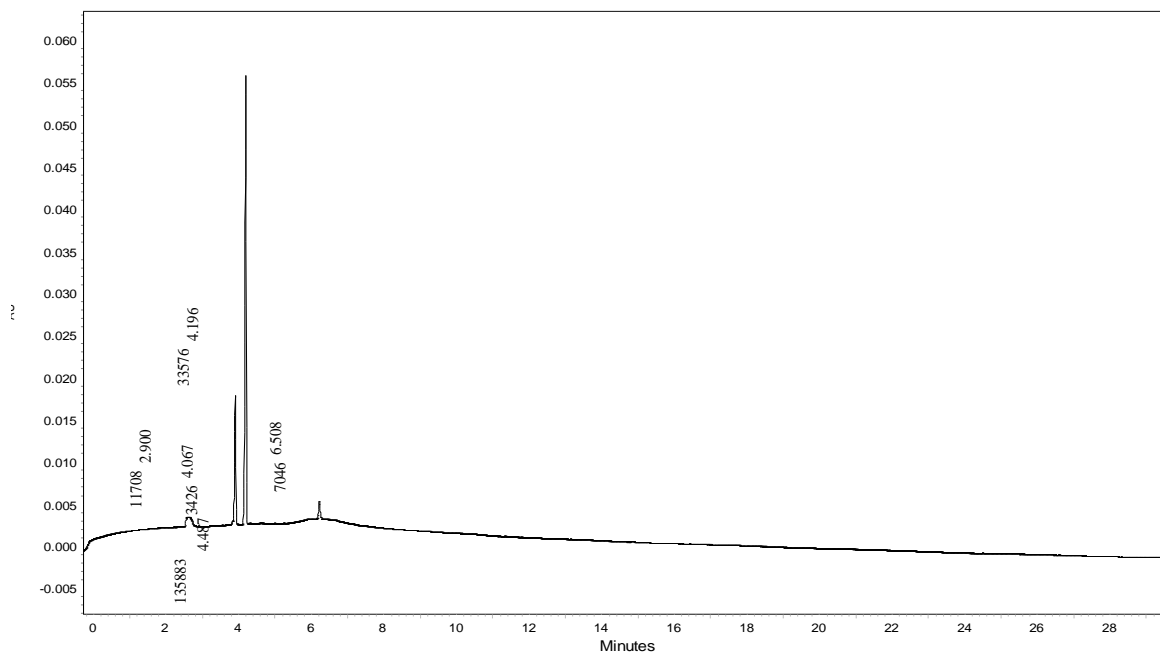


Gráfico 26. Electroferograma té verde lote S48J51



Té verde muestra "c"

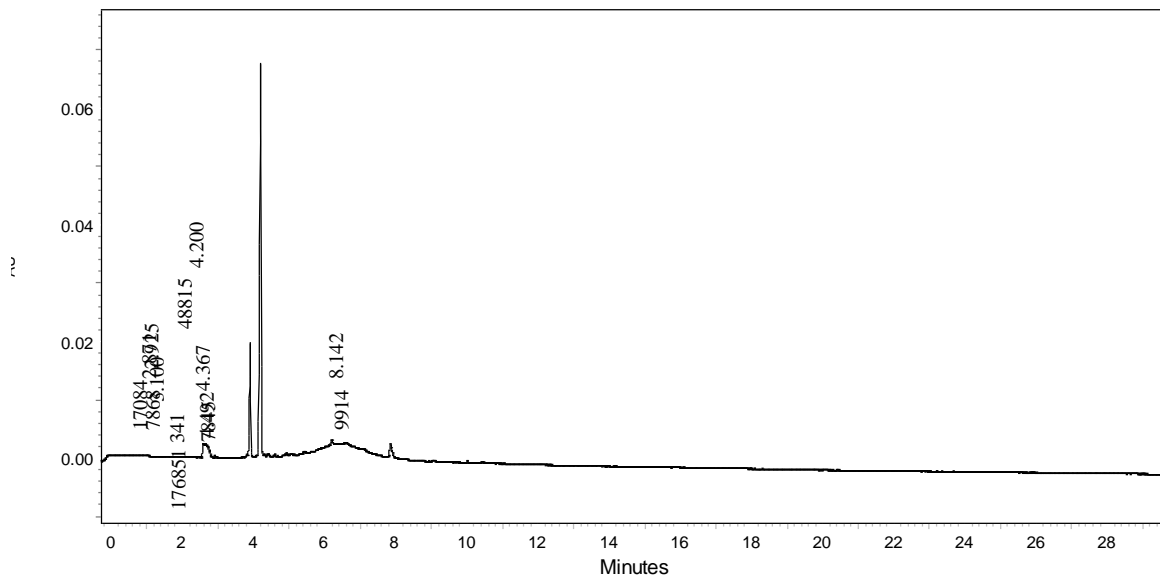


Gráfico 27. Electroferograma té verde lote S06K13



## ANEXO 2 RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

### Algas marinas

**Tabla 12.** Anova de las concentraciones de flavonoides totales de Algas Marinas

| ANÁLISIS DE VARIANZA             |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.0002212                | 2                         | 0.0001106                        | 133.791667 | 1.0548E-05          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 4.96E-06                 | 6                         | 8.2667E-07                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.00022616               | 8                         |                                  |            |                     |                             |

**Tabla 13.** Anova de las concentraciones de polifenoles totales de algas marinas

| ANÁLISIS DE VARIANZA             |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.18262268               | 2                         | 0.09131134                       | 91.4828206 | 3.2011E-05          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00598875               | 6                         | 0.00099813                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.18861144               | 8                         |                                  |            |                     |                             |



## Castaño

**Tabla 14.** Anova de las concentraciones de flavonoides totales de castaño.

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.00033538               | 2                         | 0.00016769                       | 15.5554525 | 0.00422619          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00006468               | 6                         | 0.00001078                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.00040006               | 8                         |                                  |            |                     |                             |

**Tabla 15.** Anova de las concentraciones de polifenoles totales de castaño

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.26556676               | 2                         | 0.13278338                       | 366.988527 | 5.3309E-07          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00217091               | 6                         | 0.00036182                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.26773768               | 8                         |                                  |            |                     |                             |



## Centella

**Tabla 16.** Anova de las concentraciones de flavonoides totales de centella

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.00633751               | 2                         | 0.00316875                       | 670.872501 | 8.8233E-08          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00002834               | 6                         | 4.7233E-06                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.00636585               | 8                         |                                  |            |                     |                             |

**Tabla 17.** Anova de las concentraciones de polifenoles totales de centella

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 1.33785028               | 2                         | 0.66892514                       | 70.3187397 | 6.8504E-05          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.05707655               | 6                         | 0.00951276                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 1.39492682               | 8                         |                                  |            |                     |                             |





## Manzanilla

**Tabla 18.** Anova de las concentraciones de flavonoides totales de manzanilla

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.00035908               | 2                         | 0.00017954                       | 19.2870614 | 0.00243896          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 5.5853E-05               | 6                         | 9.3089E-06                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.00041494               | 8                         |                                  |            |                     |                             |

**Tabla 19.** Anova de las concentraciones de polifenoles totales de manzanilla

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 1.32202059               | 2                         | 0.66101029                       | 447.641146 | 2.9503E-07          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00885991               | 6                         | 0.00147665                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 1.3308805                | 8                         |                                  |            |                     |                             |



## Té verde

**Tabla 20.** Anova de las concentraciones de flavonoides totales de té verde

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |            |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|------------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>   | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 0.60128289               | 2                         | 0.30064144                       | 1026.46927 | 2.4747E-08          | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.00175733               | 6                         | 0.00029289                       |            |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 0.60304022               | 8                         |                                  |            |                     |                             |

**Tabla 21.** Anova de las concentraciones de polifenoles totales de té verde

| <b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>      |                          |                           |                                  |           |                     |                             |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------|
| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i>  | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
| <b>Entre grupos</b>              | 131.155044               | 2                         | 65.5775221                       | 1386.2346 | 1.007E-08           | 5.14325285                  |
| <b>Dentro de los grupos</b>      | 0.28383733               | 6                         | 0.04730622                       |           |                     |                             |
| <b>Total</b>                     | 131.438882               | 8                         |                                  |           |                     |                             |



---

### XIII REFERENCIAS

1. Aguilar, A. y Camacho, J.R. (1984). *Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas*. Archivos de investigación Médica. México suplemento. 6: 13-14.
2. Arenas, S.I. (2004). *Espectrofotometría de Absorción*. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria\\_de\\_absorcion.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf)
3. 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
4. Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*, 1 ed. Argentina Ed. Corpus, Buenos aires.
5. Barnes, J., Anderson, Anderson, y Phillipson D. (2004). *Plantas medicinales*. Pharma Editores. Barcelona, España. Pp 568
6. Bernat V., & Cañigüeral S., (2003). *Fitoterapia: Vademecum de prescripción*. 1 ed. Ed. Elsevier, España.
7. Bruneton, J. (1991). *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Zaragoza: Acribia.
8. Barberán, T. (2003). *Food Polyphenols and Health* primera edición, INIA, España.
9. Bye R., Linares E., & Estrada E., (1995). *Phytochemistry of medicinal plants. Recent advances in phytochemistry*. Fito chemistry , Pp.65-66
10. Berdonces J.L. (2010) *Gran enciclopedia de las plantas medicinales de la A ala Z*. Ed Oceano, Barcelona España.
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*. Mexico D.F.: UNAM FESC.



13. Catherine, A. R.-E. (2003). *Flavonoids in Health and disease*. New York: Marcel Dekker.
14. Cervantes, R. V. (2011). *Perfil electroforético y cuantificación de polifenoles de extractos etanólicos de Calendula officinalis L. E Hippocratea excelsa K.*. Tesis Q.F.B. Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex: UNAM.
15. Croteau, R., Kutchan, T.M. Lewis, N.G. Natural Products (Secondary Metabolitos). En Buchanan. B., Gruissem, W., Jones, R Eds 2002. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plants physiology USA. 1250-1318.
16. D. A. Skoog, (1996)*Fundamentos de Química Analítica*, Cuarta edición, Ed Reverte.
17. Dewick, P. (2008). *Medicinal Natural Products, A biosynthetic Approach*. J. Willey. Inglaterra. Pp 507.
18. Díaz A., Barcena J.,Fernandez E., & Galvan A. (2003). *Espectroscopía de absorbancia y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Ed. Panamericana, México, pág. 1-8
19. D. Gary, (1981). *Química Analítica*, segunda edición, Ed Limusa.
20. Gonzales, M., Soto, M., Kite, G. y Martínez, M. (2007). *Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (Limpia graveolens HBK Var. Berlandia Schauer)*. Revista Fitotecnia Mexicana Vol. 30 (1): 43-49
21. Harborne, J. (1999). *The Flavonoids*. Chapman: Hall/CRC.
22. Harris Daniel,(2001). *Análisis Químico Cuantitativo*, Segunda Edición, Ed Reverte.
23. Illescas P., (2007). *Análisis fitoquímico de la corteza de Alnus acuminata subsp. Arguta (Schlecht) Furlow*. Tesis. México: UNAM.
24. Kuklinski, C. (1981). *Farmacognosia*. Barcelona: Ediciones Omega.
25. Long - Ze Lin, S. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano. *Journal of Food Composition and Analysis*, 361-369.
26. Miller N., & C. Miller J., (2008). *Estadística y Quimiometría para Química analítica* 4ta ed. Ed. Pearson Prentice-Hall. Madrid, España pág: 278



- 
27. Quideau, S. (2009). *Chemistry and biology of ellagitannins an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. Singapore: World Scientific.
  28. Wren, R.C. (1994) *Nueva enciclopedia de medicina herbolaria y preparados Botánicos*. Ed Grijalbo, México DF.
  29. Santos, B. W. (2003). *Methods in Poliphenol Analisis*. Cambridge: The royal Society of Chemistry.
  30. Secretaria de salud. (2001). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Comision permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
  31. Trease, G. E. (1991). *Tratado de Farmacognosia*. Madrid: Interamericana.
  32. Willard H., Merrit L., & Dean J., A. (1992). *Métodos instrumentales de Análisis*. 4 ed. Ed. Continental, México. pág: 254-263.