



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES
TOTALES Y CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE EN GUALUMBOS
(FLOR DE MAGUEY *Agave spp.*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
YUNUEN FERNANDA MORENO RUÍZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Cañizares Macías María del Pilar
VOCAL	Prof. Miranda Martínez Inés
SECRETARIO	Prof. Ceniceros Gómez Águeda Elena
1er. SUPLENTE	Prof. Selena Gutiérrez Flores
2° SUPLENTE	Prof. Morán Ramos Sofía

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 228 “Métodos de Flujo Continuo” del edificio F perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

ASESORA DEL TEMA:

Dra. María del Pilar Cañizares Macías

SUSTENTANTE:

Yunuen Fernanda Moreno Ruíz

ÍNDICE.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 Generalidades del maguey.....	4
3.1.1 Morfología y fisiología del maguey.....	4
3.1.2 Taxonomía del maguey.....	5
3.1.3 Importancia del maguey en México.....	7
3.1.4 Maguey: Producción en México.....	7
3.1.5 Aprovechamiento del maguey (<i>Agave spp.</i>).....	9
3.1.6 Flor de maguey o gualumbo.....	11
3.2 Aspectos generales de los polifenoles.....	12
3.2.1 Clasificación de polifenoles.....	12
3.2.2 Biosíntesis de los polifenoles.....	13
3.2.3 Beneficios de los polifenoles en la salud humana.....	15
3.2.4 Actividad antioxidante de los polifenoles.....	15
3.3 Métodos de extracción de compuestos fenólicos.....	17
3.3.1 Métodos convencionales de extracción.....	18
3.3.1.1 Extracción por maceración.....	18
3.3.2 Métodos no convencionales de extracción.....	18
3.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	19
3.4 Cuantificación de polifenoles totales: Método de Folin – Ciocalteu.....	22
3.5 Espectrofotometría UV-Vis.....	24
3.6 Métodos para determinar la capacidad antioxidante.....	26
3.6.1 Mecanismo de la autooxidación.....	28
3.6.2 Método de ORAC.....	30
3.7 Análisis por Inyección en Flujo (FIA).....	32
3.7.1 Fundamento del FIA.....	33

5.3.3 Concentración de polifenoles totales en gualumbos de <i>Agave spp.</i> y <i>Agave salmiana</i> por el método de agitación magnética.....	71
5.4 Evaluación del método de extracción por ultrasonido.....	72
5.4.1 <i>Agave spp.</i>	72
5.4.1.1 Optimización de las condiciones de extracción por ultrasonido con un diseño factorial completo 2 ³	73
5.4.2 <i>Agave salmiana</i>	78
5.4.3 Concentración de polifenoles totales en gualumbos de <i>Agave spp.</i> y <i>Agave salmiana</i> por el método de ultrasonido.....	79
5.5 Determinación de interferencias en la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA.....	80
5.5.1 Hidrólisis ácida.....	80
5.5.1.1 Estudio cromatográfico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de gualumbos <i>Agave spp.</i> y <i>Agave salmiana</i> adicionados con los reactivos de Carrez.....	85
5.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	90
5.6 Curvas de calibración: Capacidad antioxidante.....	93
5.7 Capacidad antioxidante.....	95
5.8 Comparación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales en las muestras de gualumbos <i>Agave spp.</i> y <i>Agave salmiana</i>	95
6. CONCLUSIONES.....	98
7. REFERENCIAS.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS.

α	Nivel de significancia.
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados.
ϵ	Coefficiente de absortividad molar.
λ	Longitud de onda.
A	Absorbancia.
AAPH	2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro.
Ác. Gal	Ácido gálico.
Ác. Tan	Ácido tánico.
AcOEt	Acetato de etilo.
ANOVA	Análisis de varianza.
Antiox.	Antioxidante.
APS	Persulfato de amonio.
Exp.	Experimento.
F.C.	Reactivo de Folin-Ciocalteu.
FIA	Análisis por Inyección en Flujo, por sus siglas en inglés: Flow Injection Analysis.
g	Gramos.
G.L.	Grados de libertad.
H_0	Hipótesis nula.
H_1	Hipótesis alterna.
HCl	Ácido clorhídrico.
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography.
kDa	Kilodaltons.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
mM	Milimolar.
MetOH	Metanol.
MetOH-AcONH ₄	Metanol con acetato de amonio (100 μM).
MetOH-H ₂ O (50%)	Metanol-Agua (50:50 Volumen/Volumen).

LISTA DE ABREVIATURAS

MetOH-H ₂ O (60%)	Metanol-Agua (60:40 Volumen/Volumen).
mg	Miligramos.
min	Minutos.
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	Nanómetros.
ORAC	Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno, por sus siglas en inglés: Oxygen Radical Absorbance Capacity
SAF	Solución amortiguadora de fosfatos.
T	Transmitancia.
TE	Transferencia de electrones.
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil etilendiamina.
THA	Transferencia de un átomo de hidrógeno.
Ton/Ha	Toneladas/Hectárea.
Trolox	Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.
ONPG	4-nitrofenil β-D-glucopiranosido.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfafo de sodio, por sus siglas en inglés: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.
S _{y/x}	Error de la regresión lineal.
ppm	Partes por millón.
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Segundos.
URF	Intensidad fluorescente.
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria.
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
V.I.	Válvula de inyección.

1. INTRODUCCIÓN.

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana. Dentro de su clasificación se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos y fenoles, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y propiedades. Existe un gran interés en su estudio debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus aplicaciones benéficas para la salud humana, tales como la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Porrás et al, 2009). En los últimos años, los antioxidantes se han convertido en compuestos indispensables del mundo nutricional debido a que representan un papel importante en las vías metabólicas y protegen a las células en términos de su capacidad antioxidantes contra daño celular oxidante. (Jiménez, 2019)

El interés en los compuestos que forman el grupo de polifenoles está en continuo incremento debido a las propiedades antioxidantes. En este caso, la obtención del índice de polifenoles totales es una primera aproximación para estimar un índice de antioxidantes totales, por lo que es importante contar con un método que nos permita hacer una cuantificación de polifenoles totales en una muestra. (Escutia, 2011)

El estudio de la capacidad antioxidante de los gualumbos abre puertas a nuevas investigaciones sobre los posibles beneficios de esta verdura en la salud humana. Hasta ahora se conocen aproximadamente 5000 estructuras diferentes de flavonoides, lo cual habla de la complejidad química de estos compuestos y por esta razón, no es posible realizar una identificación completa del grupo de polifenoles ya que, sería un estudio excesivamente largo y costoso, además de que no todos los estándares comerciales se encuentran disponibles. Se debe hacer énfasis en que debido a la complejidad química, las dificultades de extracción de los compuestos de la matriz y la presencia de interferentes, la

determinación de polifenoles totales debe ser interpretada como un índice del contenido total de estos compuestos. (Escutia, 2011)

Los magueyes, también conocidos como agaves o mezcales, han sido aprovechados por el hombre americano durante al menos siete mil años, por lo tanto, el maguey ha ocupado un lugar primordial en la cultura mexicana. Desde épocas muy antiguas el maguey es usado de diversas maneras, entre ellas: aguamiel, pulque, miel, forraje, alimento, jarabe fructosado, calzado, etc., (Aguilar et al, 2014) aprovechando sus fibras, savia, flores y tallo. Las flores de maguey son conocidas como gualumbos, tienen un color amarillo verdoso y miden hasta 10 cm de largo. Es importante mencionar que sólo florece una vez, cuando la planta tiene aproximadamente 15 años, y una vez que florece, comienza su muerte. Esta flor pertenece a la familia de las agaváceas y crece en la punta del quiote, un tallo grueso y recto que brota del centro del maguey y puede alcanzar alturas promedio de hasta 10 metros. La preparación de esta flor es uno de los ritos gastronómicos más antiguos y emblemáticos de México y existen diversas formas para su elaboración. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018)

La importancia de estudiar la cantidad de polifenoles totales y su capacidad antioxidante en los gualumbos radica en que éstos son utilizados como alimento en varias regiones del país, tales como Hidalgo, Puebla, Estado de México, Nayarit, Morelos, Tlaxcala, entre otros, por lo que se determinará la mejor forma de extracción de estos compuestos fenólicos para la posterior cuantificación tanto de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu por Análisis de Inyección en Flujo (FIA), así como la relación con la capacidad antioxidante determinada por el método de ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno por sus siglas en inglés) por FIA.

2. OBJETIVOS.**Objetivo General:**

Desarrollar un método para la extracción de polifenoles en gualumbos y su cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu y la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC utilizando un análisis por inyección en flujo (FIA).

Objetivos específicos:

- Emplear distintos extractantes para así poder determinar cuál de ellos es mejor para la extracción de polifenoles en gualumbos.
- Utilizar diseños factoriales para la optimización de las condiciones de extracción de polifenoles en gualumbos utilizando el método de agitación magnética con calentamiento (tiempo de extracción y temperatura); y ultrasonido (tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y número de ciclos).
- Determinar cuál método es mejor para la extracción de polifenoles en gualumbos.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de gualumbos utilizando el método de ORAC por FIA .
- Determinar si existe una correlación entre los valores de capacidad antioxidante y polifenoles totales.
- Realizar un análisis de HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución) para la determinación de algunos de los compuestos fenólicos responsables de la capacidad antioxidante en los gualumbos.
- Determinar si existe una interferencia importante por parte de glucósidos unidos a los polifenoles, así como la cantidad de proteína en los gualumbos en la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Generalidades del maguey.

Los magueyes son plantas endémicas de América de distribución tropical y subtropical, frecuentemente presentes en zonas de clima árido, de las que el mayor número de especies son originarias de México (Verduzco et al, 2009). El maguey o agave es un recurso natural de suma importancia en México, especialmente en la región del Altiplano comprendida por estados de Tlaxcala, Hidalgo, Puebla y Estado de México, su cultivo y aprovechamiento data desde la época precolombina y de él dependen económicamente un gran número de familias campesinas. Los agaves florecen sólo una vez y mueren al poco tiempo. La edad de maduración depende de muchos factores, en particular de la especie. En el centro de la planta crece un tallo que puede llegar a 10 m de altura en un lapso de dos o cuatro meses, en la cúspide surgen racimos de flores verde-amarillentas; que en muchas especies, contienen néctares que atraen aves e insectos, que contribuyen a la polinización e hibridación de las especies. (Mendoza et al, 2016)

La mayoría de las especies de *Agaves* son un recurso natural que hasta la fecha se sigue aprovechando. La dificultad en la identificación taxonómica de las especies y subespecies también es importante, ya que es común el fenómeno de hibridación en condiciones naturales. Adicionalmente hay una gran diversidad en el número cromosómico entre sus especies, se ha reportado que puede ser de 60 a 180 según la variedad de que se trate. (Verduzco et al, 2009)

A pesar de la gran importancia que implican los agaves en México son pocos los grupos de investigación que apoyan con la generación y búsqueda de información. Es importante juntar esfuerzos para el estudio y comprensión de las preguntas que se tienen, que hacen que estas especies sean muy interesantes. (Espinosa, 2015)

3.1.1 Morfología y fisiología del maguey.

Los agaves son plantas xerófitas y presentan modificaciones o especializaciones morfológicas como una estrategia para sobrevivir en ambientes desérticos. Son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el

ápice de un tallo, esta estructura permite que el agua en forma de lluvia o de rocío sea captada y dirigida hacia el suelo y las raíces; el tallo es el principal órgano de almacenamiento de agua y carbohidratos de reserva. Las hojas por lo general son suculentas, fibrosas y carnosas, su forma varía de linear a lanceolada u ovalada, y los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica pero casi siempre tienen una espina al final del ápice. Las hojas les permiten el almacenamiento de agua y están asociadas a otras adaptaciones como una cutícula gruesa, la acumulación de cera y la presencia de estomas complejos que las protegen y evitan la pérdida de agua. Además presentan sistemas de raíces superficiales que permiten la captación eficiente de pequeñas cantidades de agua y presentan el metabolismo ácido de las crasuláceas, en el que el CO₂ se almacena en forma de ácidos orgánicos en la vacuola y, durante el día, éste se incorpora a la fotosíntesis, por lo tanto, la transpiración es menor y da como resultado ganancias en carbono perdiendo lo mínimo en agua. (Espinosa, 2015)

3.1.2 Taxonomía del maguey.

La clasificación taxonómica del género *Agave* ha sido objeto de controversias debido a su gran variación fenotípica y genotípica incluso dentro de la misma especie y de una misma población. La información que está disponible en la clasificación del Sistema Integrado de Información Taxonómica (SIIT) de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), con relación al orden botánico para la familia en cuestión y género *Agave*, es muy similar a la clasificación propuesta por el sistema Cronquist, en que en la Familia se divide sólo en siete Géneros: *Agave*, *Furcraea*, *Hesperaloë*, *Manfreda*, *Phormium*, *Polianthes* y *Yucca*. (Verduzco et al, 2009)

Hasta el momento no se cuenta con una clasificación para todas las especies del género *Agave*. El único trabajo reportado en el que se clasificaron las especies de Norteamérica es el realizado por Gentry en 1982, en donde propuso una clasificación a partir de las características morfológicas de la inflorescencia; clasificó dos subgéneros que denominó *Littaea* y *Agave*. A su vez, estos subgéneros se encuentran divididos en secciones, el subgénero *Littaea* tiene ocho secciones con aproximadamente 54 especies y el subgénero *Agave* cuenta con

doce secciones con aproximadamente 136 especies, sin embargo, es importante el actualizar esta clasificación. (Espinosa, 2015)

En la Figura 1 se representan algunas de las especies del género *Agave*, mostrando que existe una gran variedad de especies y que dependiendo de ésta, hay cambios en su morfología.



Figura 1. Representación de algunos de las especies del género *Agave*.

Fuente: Espinosa, 2015

3.1.3 Importancia del maguey en México.

Entre las plantas más notables del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México, están los agaves o magueyes, considerados especies clave en esas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos. En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, abono, elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos. El empleo como alimento y fibras pervive en México desde por lo menos siete mil años. (García, 2007)

Existen más de 200 especies de maguey y dentro de éstas, destaca el maguey pulquero (*Agave spp.*), el cual se adapta a condiciones de baja precipitación, heladas frecuentes y suelos infértiles que se presentan en amplias zonas del altiplano mexicano. (Narváez et al, 2015)

Como ya se mencionó, el maguey representa uno de los recursos naturales de mayor importancia desde el punto de vista económico, social y agroecológico en México. La importancia del uso del maguey se remonta a la época prehispánica, cuando los pueblos indígenas del centro y norte del país encontraron en esta planta una fuente de materia prima para elaborar una gran cantidad de productos. Los principales usos de importancia económica y agroecológica se muestran en la Tabla 1. (García et al, 2010)

México es el centro de diversidad biológica y cultural de los agaves a escala mundial. El género *Agave* cuenta con alrededor de 211 especies, de las cuales 159 tienen presencia en nuestro territorio, es decir, 75 por ciento del total. (García, 2018).

3.1.4 Maguey: Producción en México.

La producción de maguey en México es de más de 1.8 millones de toneladas, los principales estados productores son: Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca y Nayarit. A nivel nacional el rendimiento del maguey se ha mantenido constante en un promedio de 85 Ton/Ha. Si se hace un análisis por estados, Jalisco es el estado con un mayor rendimiento promedio arriba de la media nacional de 96

Ton/Ha en 2016, seguido por Michoacán con 85 Ton/Ha, el tercer lugar lo tiene Guanajuato con 71 Ton/Ha, Oaxaca con 61 Ton/Ha y el quinto Nayarit con 42 Ton/Ha (García, 2017). Lo mencionado anteriormente se ve representado en el Gráfico 1.

Tabla 1. Principales usos de importancia económica del *Agave spp.*

Usos	Producto	Parte de la planta
Alimentación	Azúcar Guisos Dulce Envolver barbacoa Mixiotes Gusanos blancos y rojos (chinicuiles) Pan de pulque Tortillas	Tallo (piña) Flores y frutos Escapo floral (quiote) Hojas Cutícula del cogollo Hojas
		Tallo (piña) Perianto de flores + nixtamal
Bebidas	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre, jarabe	Tallo (piña)
Agrícola	Cerca viva Evitar erosión como formadora de suelo	Planta completa Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante) Planta líder de ecosistemas	Composta de hojas Planta completa
Forraje	Bovinos, caprinos, porcinos	Hojas, escapos florales, flores y parte de la inflorescencia, bagazo.

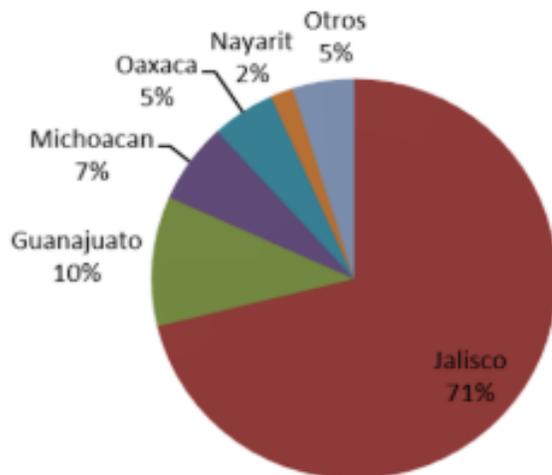


Gráfico 1. Principales estados productores de maguey en México (2016). Fuente: García, 2017.

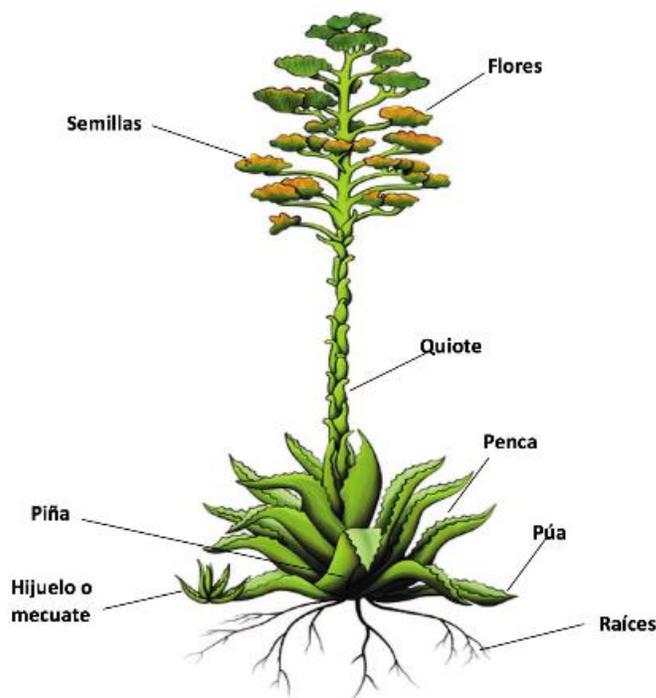
El maguey ha brindado innumerables beneficios al hombre como ninguna otra planta. Muchos productos que de él se obtienen están posicionados a nivel mundial. Por lo tanto, el maguey es una planta de gran importancia económica en México. Aproximadamente 558 municipios se dedican a la producción de maguey la cual representa una fuente importante de desarrollo regional para los productores (pequeños y grandes), además que comparten aspectos étnicos, culturales, sociales, económicos, ambientales y productivos. Por lo que, se vislumbra como opción prometedora y con un alto potencial para transformar la economía rural y la creación de empleos para los productores de subsistencia y productores emprendedores, ya que presenta incrementos significativos en la producción, pero se requiere más asesoría técnica para mejorar los rendimientos, ya que desde el 2000 se mantienen constantes, y mejorar los procesos de industrialización principalmente en los pequeños productores, para aprovechar el mercado que se ha ganado en el mundo. (García, 2017)

3.1.5 Aprovechamiento del maguey (*Agave spp.*).

El maguey pulquero es una planta de la cual se pueden aprovechar todas sus partes, incluso sus plagas. Los productos de mayor valor comercial, que se pueden obtener en primera instancia sin el uso de tecnología moderna son: aguamiel, pulque, gusano rojo, blanco y las pencas que se utilizan en la elaboración de barbacoa. Para una familia campesina, el maguey tiene una amplia variedad de usos como son los siguientes (Narváez et al, 2015):

- **Pencas:** Son utilizadas como recipientes para servir los alimentos en el campo durante el almuerzo y comida, también se utilizan para beber el pulque. Los mezotes o pencas secas se utilizan como combustible para calentar los alimentos en los hogares. Se pueden obtener gran cantidad de remedios para aliviar enfermedades, se extrae fibra para la elaboración de telas, cepillos, artesanías, estropajos y papel. Las pencas son fundamentales para la elaboración de barbacoa y extracción de gusano blanco. En algunos lugares se utilizan como decoración en las ofrendas de Día de Muertos.

- Púas: Se utilizan como agujas para cerrar los costales, como clavos y para atrapar animales ponzoñosos.
- Piña: Se obtiene el aguamiel, fructosa, sal de gusano, pienso para los animales, dulces y fertilizantes. Una vez seca puede utilizarse como combustible, maceta y para elaborar instrumentos musicales.
- Raíces: De éstas se extrae el gusano rojo o chinicuil, se usan además para elaborar cepillos, escobas, canastos y jabón para ropa.
- El quiote, huevo y flores de maguey son base de varios platillos nutritivos y deliciosos que forman parte de la dieta de las familias campesinas como los guisos de gualumbos, jugo y dulce de quiote.
- El aguamiel y el pulque poseen propiedades alimenticias y curativas, con ellas se pueden preparar atoles, tamales, vinagre, pan y dulces. Del pulque se puede obtener un destilado que hace las veces de aguardiente.
- El aguamiel deshidratado produce una miel de alto valor nutritivo, se puede utilizar para preparar mermeladas, galletas, atole, agua de sabor y artículos para el cuidado de la piel.
- La planta completa es útil como cerca viva para proteger los cultivos de los animales, para delimitar terrenos y formar terrazas para evitar la erosión.



En la Figura 2 se muestra de una forma clara al maguey y las partes que lo componen para una mejor visualización de lo anteriormente mencionado.

Figura 2. El maguey y sus partes.
Fuente: Narváez et al, 2015

3.1.6 Flor de maguey o gualumbo.

Maguey es el nombre con el que son conocidos diversos tipos de plantas del género *Agave*. A lo largo de la historia, los magueyes han sido utilizados para la elaboración de diversos productos aprovechando sus fibras, savia, flores y tallo como se ha mencionado anteriormente. Las flores de maguey son conocidas como gualumbos son de color amarillo verdoso, de la familia de las agaváceas y mide hasta 10 cm de largo. Nace del qurote, un tallo grueso y recto que brota del centro del maguey y puede alcanzar alturas promedio de hasta 10 metros. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018)

Se consume en el Estado de México, Hidalgo, Nayarit, Morelos, Puebla, Tlaxcala, entre otros, donde se pueden comprar por montoncitos o manojos. Se deben consumir cuando están en botón porque ya maduras presentan un sabor amargo (Diccionario enciclopédico de la Gastronomía Mexicana, s.a.). Es importante mencionar que sólo florece una vez, cuando la planta tiene aproximadamente 15 años, una vez que florece comienza su muerte. La preparación de esta flor es uno de los ritos gastronómicos más antiguos y emblemáticos de México y existen diversas formas para su elaboración. (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2018)

En la Figura 3 se muestra una imagen de los gualumbos que se emplean para la elaboración de diversos platillos en diferentes estados del país, provenientes del maguey (*Agave salmiana*).



Figura 3. Gualumbos comestibles de maguey *Agave salmiana*.

3.2 Aspectos generales de los polifenoles.

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta encontrándose de manera generalizada en una gran diversidad de alimentos como frutas, verduras, cereales, aceites, chocolate, bebidas como café, té, vino, entre otros. Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos, y otros, como la quercetina, se pueden encontrar en un gran número de plantas. Generalmente los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles. Además, numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles. Estas moléculas son metabolitos secundarios de plantas, y por lo general están involucrados en el mecanismo de defensa dadas sus características antibióticas y antifúngicas, aunque algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales. Con más de 8000 variantes estructurales, su característica estructural general es la presencia de anillos aromáticos, con uno o más restos hidroxilo (Alcaide, 2015). Además suelen ser, en parte, los responsables del color, el aroma y el sabor de los alimentos que los contienen. Entre ellos, hay pigmentos que aportan los tonos rojos, azules y violáceos propios de frutas y verduras. Asimismo, otorgan el sabor amargo y astringente a algunos cítricos. (Gil, 2010)

En los últimos años numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular (Quiñones et al, 2012). Desde el punto de vista de su actividad biológica muchos polifenoles tienen propiedades captadoras de radicales libres, lo que les confiere actividad antioxidante, que podría estar relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y de algunos tipos de cáncer. (Barberán, 2003)

3.2.1 Clasificación de polifenoles.

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones et al, 2012) (Figura 4).

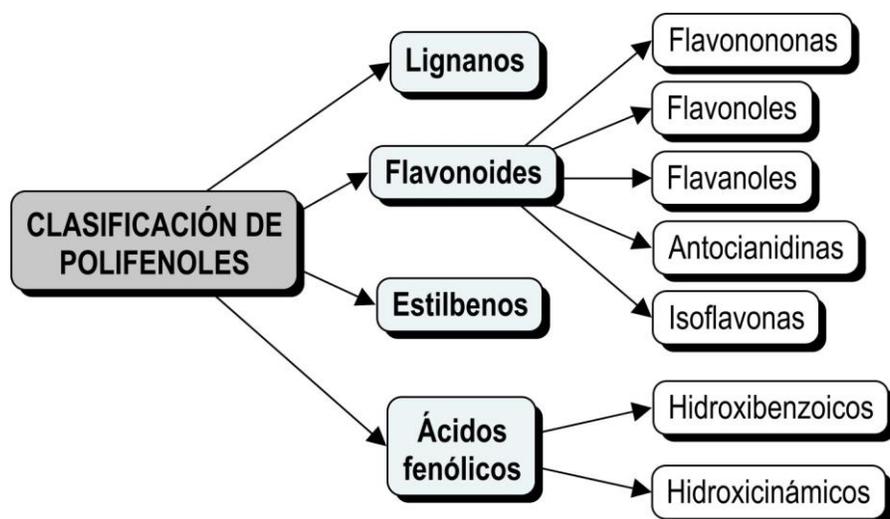


Figura 4. Clasificación de los polifenoles con base en el número de anillos fenólicos que poseen.

La estructura básica de los polifenoles consiste en dos grupos fenilo ligados al puente de tres carbonos comúnmente ciclados con el oxígeno. Varias moléculas de azúcar pueden unirse a la estructura del flavonoide por los grupos hidroxilo, lo cual genera que la estructura de estas moléculas sea más compleja. Debido a la gran diversidad en su estructura, presentan diferentes propiedades, como solubilidad y polaridad, que les permiten tener diferentes interacciones con otras moléculas alrededor de ellas. (Castro et al, 2015)

Los compuestos fenólicos forman parte de un grupo muy heterogéneo; comprenden desde moléculas simples, como el ácido fenólico, hasta compuestos altamente polimerizados como son los taninos. Estos compuestos se pueden dividir en varios grupos, de acuerdo con su estructura química básica. (Gil, 2010)

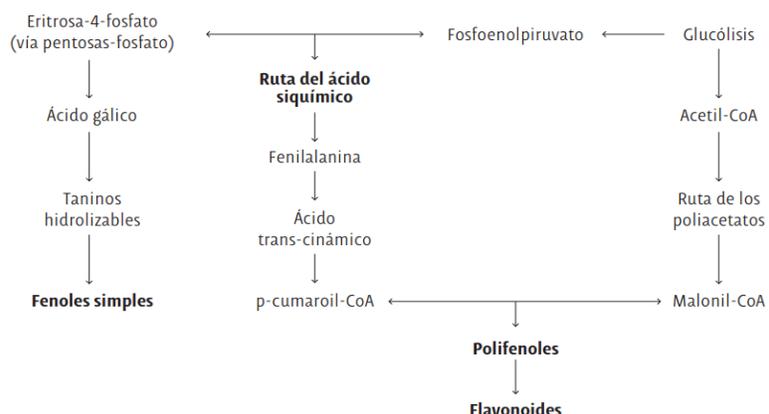
3.2.2 Biosíntesis de los polifenoles.

Los polifenoles, como su nombre lo indica, contienen al menos un grupo fenol y un anillo aromático unido a un grupo funcional. Se diferencian de otros compuestos, que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético. La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas, tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico o shiquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y la síntesis de los ácidos cinámicos y sus

derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). (Castro et al, 2015)

La ruta del ácido shiquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fosfato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. La vía del ácido shiquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido r-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa, transforma el ácido p-cumárico en p-cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal. La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido shiquímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides (Quiñones et al, 2012) (Figura 5).

Figura 5. Ruta biosintética de los polifenoles. Fuente: Castro et al, 2015).



3.2.3 Beneficios de los polifenoles en la salud humana.

La dieta humana incluye gran variedad de componentes no nutritivos cuyo papel sobre la salud no está bien establecido. Muchos de ellos no ejercen seguramente ningún efecto en el organismo en las cantidades en que son ingeridos, pero otros, incluso en baja cantidad, podrían tener acciones benéficas. Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en alimentos de origen vegetal como frutas, hortalizas y sus productos derivados. En los últimos años se han acumulado evidencias de que algunos compuestos fenólicos ingeridos con la dieta habitual pueden tener implicaciones sobre la salud humana, al haber sido asociados en distintos estudios epidemiológicos con variaciones en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. (Santos, 2002)

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, según datos publicados en septiembre del 2009 por la Organización Mundial de la Salud. Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal, y una dieta rica en polifenoles vegetales puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. Sus propiedades antioxidantes justifican muchos de sus efectos benéficos. (Quiñones et al, 2012)

3.2.4 Actividad antioxidante de los polifenoles.

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. (Porrás et al, 2009) En otras palabras, un antioxidante

es una sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo a una molécula blanco (Jiménez, 2019). La oxidación es una reacción química donde un elemento se “oxida” por la presencia del oxígeno, entregando electrones e hidrógenos a un elemento reductor. Estas reacciones de oxidación son promovidas en cadena por los llamados radicales libres, éstos son cualquier especie que contenga un electrón desapareado en su último orbital de energía y que puede subsistir de forma independiente siendo hábiles para reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los antioxidantes también inhiben algunas reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos, por lo que se pueden definir como agentes reductores. (Cofré, 2015)

La importancia de los antioxidantes radica en su desempeño en las vías metabólicas ya que protegen a las células de sufrir oxidaciones y formar especies reactivas que pueden interaccionar con procesos bioquímicos, dando como resultado una descomposición en el equilibrio homeostático de los seres vivos, lo que lleva a plantear la implicación de este desequilibrio en patologías humanas, tales como trastornos neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares (Rajendran et al, 2014). Las especies reactivas son productos del metabolismo normal (fuentes endógenas) y de la exposición a xenobióticos (fuentes exógenas), juegan un papel esencial “in vivo” pues participan en la “regulación redox” de los procesos celulares, no obstante un exceso de éstas induce modificaciones oxidativas de las macromoléculas celulares, induciendo un daño potencial que se conoce como daño oxidativo (Rojas, 2010). Los oxidantes se producen en reacciones químicas especialmente en forma de radicales libres, dando lugar a reacciones en cadena que pueden dañar las células. Se ha denominado “estrés oxidativo” a la rotura del equilibrio entre la producción de especies oxidantes y las defensas antioxidantes. (Azzi, 2017)

En el organismo existen sistemas biológicamente activos conocidos como antioxidantes que actúan para proteger y contribuir al equilibrio fisiológico garantizando la vida. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida a sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres y en la descomposición de

peróxidos. Los antioxidantes deben estar presentes en el organismo en una concentración suficiente que permita prevenir la acumulación de elementos prooxidantes, estado conocido como estrés oxidativo (Porrás et al, 2009). Se cree que la función antioxidante de los polifenoles radica en la amplia gama de actividades biológicas como secuestradores de radicales libres, quelación metálica y su capacidad para la modulación de enzimas, así como sus efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes. (Delgado, 2016)

3.3 Métodos de extracción de compuestos fenólicos.

La extracción es el proceso de separación de uno o más componentes de una mezcla compleja, su principal objetivo es obtener un componente específico (Naranjo, 2016). En el análisis de productos naturales o alimentos, la extracción es un paso importante en el proceso de preparación de la muestra ya que permite aislar y purificar el componente químico que se desea cuantificar. Además, no sólo permite separar el compuesto de interés de la matriz, sino también eliminar sustancias que puedan interferir en pasos posteriores (Escutia, 2011). El proceso de separación puede ser clasificado de acuerdo con la naturaleza del material extraído o clasificado, por el tipo de fases en contacto, como sólido – líquido, líquido – líquido, entre otros. La separación de sustancias a partir de matrices vegetales se clasifica como extracción sólido – líquido y puede llevarse a cabo a través de métodos convencionales o no convencionales. (Naranjo, 2016)

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso – orgánicos. La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en el análisis. En general, cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, acetato de etilo, etc.) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos. Además de los disolventes, también el tiempo de extracción es

determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento, se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto a 24 horas, sin embargo, se debe considerar que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones. (Barroso et al, 2016)

3.3.1 Métodos convencionales de extracción.

Este tipo de extracción incluye técnicas clásicas basadas en la capacidad de extracción con diferentes disolventes y/o aplicación de calor y agitación. Las técnicas clásicas para la extracción de compuestos a partir de alimentos vegetales son Soxhlet y maceración. Estos métodos de extracción tienen como ventaja el bajo costo del montaje de la unidad extractora y como desventajas los altos tiempos de extracción, el uso de grandes cantidades de disolventes, su baja selectividad y la posible descomposición de los compuestos lábiles. (Naranjo, 2016)

3.3.1.1 Extracción por maceración.

La maceración es un proceso de extracción sólido – líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que se pueden emplear dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción. Existen dos métodos de maceración con base a la temperatura: caliente y frío. (López, s.a.)

Esta extracción consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un disolvente (agua, etano, metanol o una mezcla) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente, en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y se deja en reposo por un determinado tiempo con agitación. Posteriormente se filtra el líquido y se obtiene el extracto. (González, 2004)

3.3.2 Métodos no convencionales de extracción.

En la búsqueda de nuevas técnicas de extracción, que sean más amigables con el medio ambiente y que no representen riesgos para la salud, mientras faciliten la

extracción de compuestos de alta calidad, se han estudiado diferentes tecnologías como: fluidos a alta presión, tecnología de ultrasonido, tratamientos enzimáticos, tecnología de microondas y de pulso eléctrico. (Naranjo, 2016)

La gran importancia de los polifenoles ha dado lugar a un gran número de estudios enfocados en su extracción a partir de diversas fuentes vegetales. Entre las técnicas convencionales de extracción se tiene, como se mencionó anteriormente, la maceración y ésta se asocia a un alto consumo de disolventes orgánicos, cuyos remanentes limitan la aplicación de los extractos debido a la toxicidad del solvente, además de requerir largos tiempos de extracción implicando un alto consumo energético. Por lo tanto, el principal objetivo de las técnicas no convencionales es la reducción de energías y tiempo, que es reflejado en la disminución del costo, por lo que han sido denominadas como sustentables, debido a que protegen tanto al medio ambiente como a la salud de los consumidores, potenciando la competitividad económica e innovadora de las industrias. (Medina, 2017)

3.3.2.1 Extracción asistida por ultrasonido.

El ultrasonido comprende la región de frecuencias acústicas que van de 18 kHz a 100 MHz, fuera del intervalo normal del oído humano. (Escutia, 2011)

El ultrasonido se basa en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente. Las principales características de la onda de ultrasonidos son: (Medina, 2017)

- Longitud: Distancia entre dos puntos de compresión o rarefacción.
- Amplitud: Altura máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): Número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): Producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): Cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad (W/cm²): Cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área.

La extracción asistida por ultrasonido tiene como principal fuerza impulsora a la cavitación acústica (Figura 6), capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente presente, provocando la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión.

El proceso en el que las burbujas se forman, crecen y posteriormente colapsan se conoce como cavitación acústica. La importancia del proceso de cavitación no radica tanto en cómo se forman las burbujas, sino en lo que sucede cuando colapsan. En algún punto, la burbuja llega a un tamaño crítico en el que ya no puede absorber eficientemente la energía del ultrasonido por lo que implosionan violentamente generando temperaturas y presiones extremadamente altas en puntos definidos dentro del líquido. (Escutia, 2011)

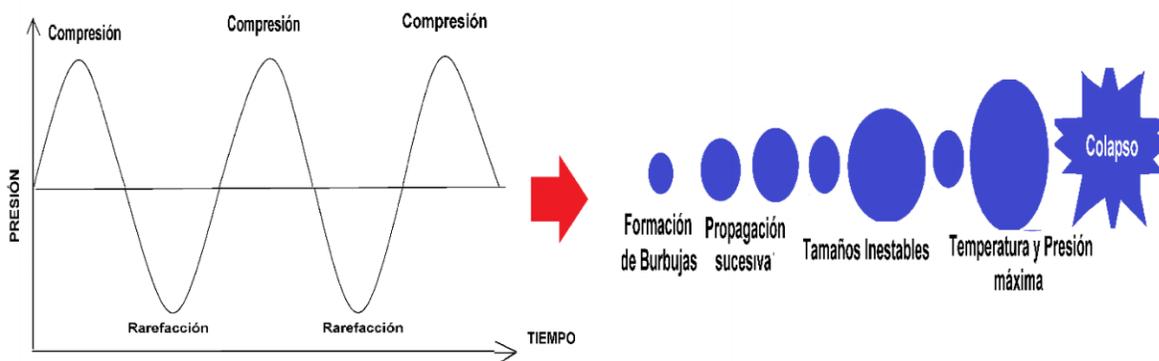


Figura 6. Principio de cavitación acústica. Fuente: Medina, 2017.

Por lo tanto, en otras palabras, el ultrasonido se basa en el fenómeno de la cavitación dado por la formación, crecimiento y colapso de burbujas de vapor o gas debido a la acción del campo ultrasonoro dentro de un líquido. El tiempo de vida de las burbujas es del orden de microsegundos, su implosión violenta genera, de manera localizada y transitoria, elevadas temperaturas (5000 °C) en el interior de la burbuja, presiones (100 MPa) y la formación de especies muy reactivas tales como los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), hidroperóxido ($\bullet\text{OOH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La extracción asistida por ultrasonido utiliza ondas de una frecuencia determinada que facilitan la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas del medio vibran y se

aceleran ante la acción ultrasónica y como resultado, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. La cavitación erosiona la superficie del material vegetal y provoca la ruptura de las partículas en la superficie erosionada, la ruptura de la pared celular provocada por la cavitación ultrasónica incrementa la permeabilidad del tejido de las plantas y facilita la entrada del disolvente a las áreas inertes del material vegetal y el lavado de los extractos con el consecuente incremento del rendimiento del material que es extraído en un menor tiempo (Rodríguez et al, 2014) que con un método convencional (Figura 7).

El tamaño de las burbujas es muy pequeño con relación al volumen del líquido (del orden de micras) lo que provoca que el calor producido se disipe rápidamente sin producir cambios súbitos en el medio. (Escutia, 2011)

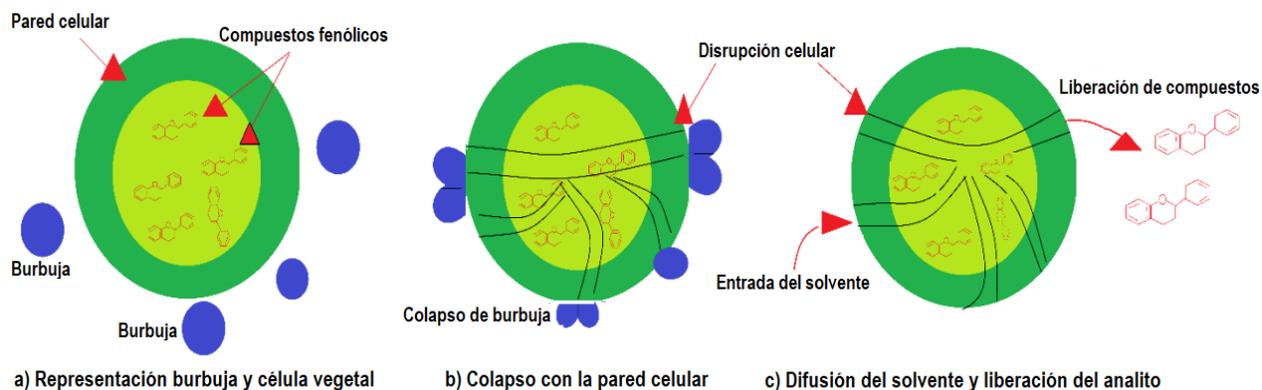


Figura 7. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. Fuente: Medina, 2017.

La irradiación ultrasónica puede ser aplicada de dos maneras: por contacto directo con la muestra, o a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra, es decir, de forma indirecta como los sistemas de baño de ultrasonido. La principal desventaja de esta última es que generalmente funcionan a una sola frecuencia (20 o 40 kHz). Sin embargo, existen sistemas de extracción más eficientes, como los sistemas de extracción por ultrasonido acoplado a una sonda, en donde el contacto directo con la muestra le permite desarrollar una potencia de hasta 100 veces más que la proporcionada por el baño de ultrasonido (Picó,

2013). La forma directa de aplicar la irradiación ultrasónica se ve representada en la Figura 8.

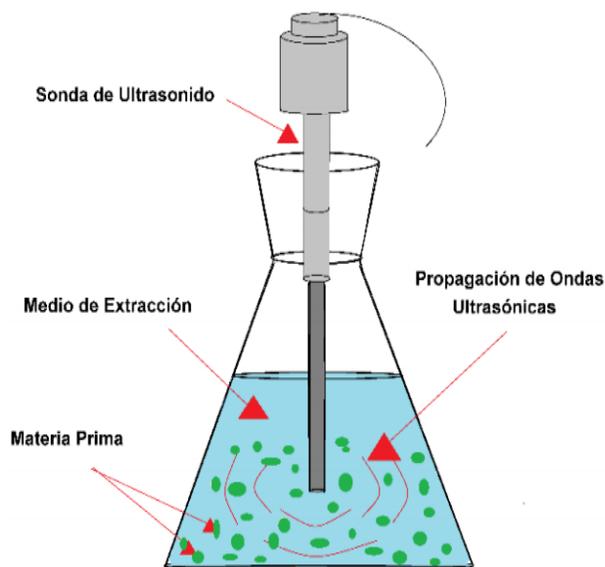


Figura 8. Representación del equipo ultrasónico acoplado a una sonda.

Fuente: Medina, 2017

3.4 Cuantificación de polifenoles totales: Método de Folin – Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8,000 compuestos distintos. Uno de los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales es el ensayo de Folin – Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin – Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico solubilizados en medio ácido, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico – fosfotúngstico (Gutiérrez et al, 2008), en donde el tungsteno y molibdeno presentan estado de oxidación 6+, siendo incoloro y amarillo respectivamente.

La adición de polifenoles a pH básico (≈ 10) proporciona la presencia de iones fenolato que, al entrar en contacto con el reactivo de Folin – Ciocalteu, inician una secuencia de reacciones de transferencia de electrones llevando a la reducción del mismo a un estado de oxidación 5+, y generando especies color azul que son detectables espectrofotométricamente a una $\lambda=730$ nm (Chávez, 2018).

Los constituyentes metálicos de estos iones complejos son reducidos por el grupo hidroxilo de los polifenoles formando un producto de color azul. La

absorbancia de este producto se mide a 730 nm, mediante la ley de Lambert – Beer, es posible relacionarla con la concentración de polifenoles totales frecuentemente referida como equivalentes de ácido gálico o ácido tánico. (Escutia, 2011)

El mecanismo de reacción es una reacción redox, en donde la oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta el máximo de absorción a 730 nm (Figura 9), y que se logra cuantificar por espectrofotometría con base en una curva patrón de ácido gálico o ácido tánico (García et al, 2015)

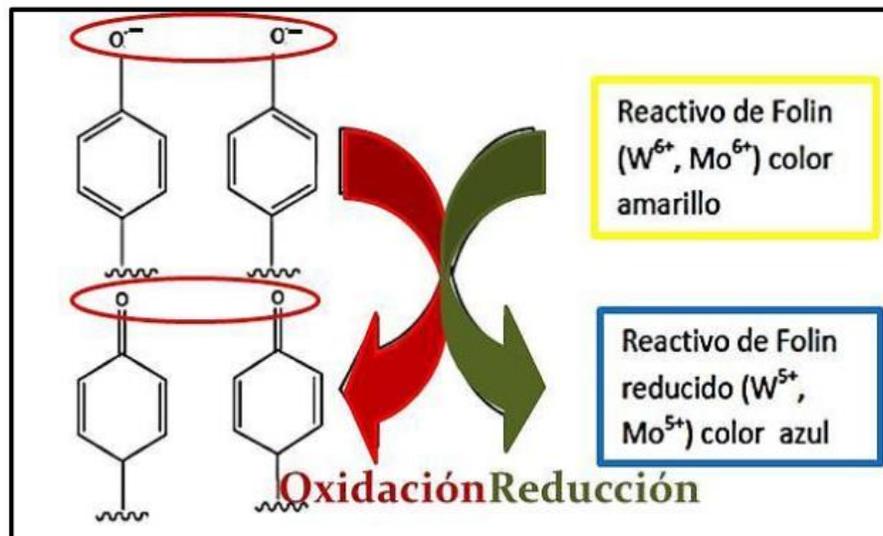


Figura 9. Mecanismo de acción del reactivo de Folin – Ciocalteu. Fuente: Chávez, 2017.

La aplicación del ensayo de Folin-Ciocalteu suele ser simple y conveniente para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, sin embargo, presenta la desventaja de carecer de especificidad ya que el reactivo de Folin-Ciocalteu es susceptible a ser reducido no sólo por todos los polifenoles, sino también por otros reductores como son el ácido ascórbico, azúcares (glucosa y fructosa), aminas aromáticas, sales de hierro (II), ciertos aminoácidos, dióxido de azufre, entre otros.

Por lo que, al realizar este método es importante tener presente los posibles interferentes no-polifenólicos que pudiera contener la muestra, ya que no dar el

tratamiento adecuado provocaría una subestimación en el valor real de compuestos fenólicos totales. (Chávez, 2017)

3.5 Espectrofotometría UV-Vis.

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica que permite determinar la concentración de analitos en solución. Se fundamenta en la absorción selectiva de la radiación electromagnética (UV cercano a $\lambda = 200 - 400$ nm y Vis $\lambda = 400 - 800$ nm) de las moléculas, lo que ocasiona un salto desde un estado energético basal a un estado de mayor energía (estado excitado), de esta manera, sólo es absorbida la energía que permite la transición al estado excitado. Así, cuando un rayo de luz a una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución, se absorberá una parte de la radiación incidente y dejará pasar el resto (I) (Chávez, 2018). Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la disolución es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utiliza la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia, por estar relacionada directamente con la concentración de la especie absorbente según la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 2).

Ecuación 1:
$$A^\lambda = \log \frac{I_0^\lambda}{I^\lambda}$$

A= Absorbancia

I_0 = Intensidad de radiación incidente

I = Intensidad de radiación emergente

λ = Longitud de onda

La base de la espectroscopía UV-Vis consiste en medir la intensidad del color (o de la radiación absorbida en UV) a una longitud de onda específica comparándola con otras sustancias de concentración conocida (soluciones estándar) que contengan la misma especie absorbente. Para tener esta relación se emplea la Ley de Lambert-Beer. La coloración de la solución se debe a la especie absorbente y esta coloración puede ser natural o inducida. La coloración natural puede ser la base de la cuantificación de una especie, como por ejemplo:

la clorofila, complejos metálicos, entre otros. Más frecuentemente, se induce a la formación de un complejo colorido que se absorba en la región visible, y que sea específico para el elemento o un compuesto que se desea cuantificar colorimétricamente. Para esto se requiere un control de ciertas condiciones, que inhiben o favorecen la formación de compuestos coloridos tales como: pH, temperatura y tiempo. (Universidad Autónoma de Chihuahua, s.a.)

La absorbancia se define como la relación logarítmica entre la intensidad de la radiación que incide en la muestra y la intensidad emergente a una longitud de onda específica, es decir: $A = -\log T$. La ley de Lambert-Beer es el resumen de dos leyes que nos permiten relacionar la fracción de radiación absorbida con la concentración del analito y el espesor del medio. Se cumple para cualquier proceso de absorción en cualquier zona del espectro y se basa en que cada unidad de longitud a través de la cual pasa la radiación absorbe la misma fracción de radiación.

Ecuación 2. $A = l C \epsilon$

A= Absorbancia

l= Longitud del paso óptico (cm)

C= Concentración de la disolución (mol/L)

ϵ = Coeficiente de absortividad molar (cm L/mol)

Cuando se trabaja en flujo continuo es común el uso de una celda de flujo para realizar la detección espectrofotométrica, éstas pueden ser de diversos materiales como teflón, plexiglás, poliéter étercetona (PEEK), etc. Su volumen puede ir desde 2 hasta 260 μ L con una longitud de paso óptico de 2.5 a 100 mm. La celda de flujo es conectada con fibras ópticas, las cuales son capaces de transportar la radiación electromagnética a grandes distancias con pérdidas muy pequeñas en su intensidad. La radiación procedente de la fuente debe acoplarse ópticamente a la fibra óptica, así como la radiación emitida por la muestra debe acoplarse ópticamente a la fibra óptica y la radiación emitida por la muestra debe acoplarse al detector. La representación del funcionamiento de un sistema de detección de espectrometría UV-Vis en una celda de flujo se ejemplifica en la Figura 10.

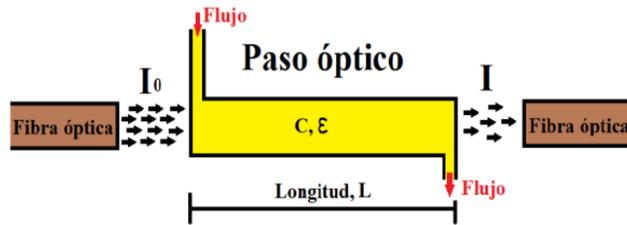


Figura 10. Esquema de una detección espectrofotométrica UV-Vis en una celda de flujo. Fuente: Chávez, 2017.

3.6 Métodos para determinar la capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de un compuesto se puede evaluar in vitro por medio de experimentos sencillos que examinan directamente dicha habilidad y que a la vez evalúan el posible efecto prooxidante sobre diferentes moléculas. Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos. La mayoría de los métodos para determinar actividad antioxidante consisten en acelerar la oxidación en un sistema lipídico, usualmente por calentamiento y monitoreando a continuación el consumo de oxígeno, la pérdida de sustrato o bien, la formación del producto. Debido a que muchos factores pueden afectar la oxidación, incluyendo la temperatura, la presión de oxígeno y catalizadores metálicos, los resultados pueden variar dependiendo de las condiciones de oxidación empleadas. Los ensayos que miden sustratos o productos también pueden dar resultados variables dependiendo de su especificidad. (Barroso, 2016)

La capacidad antioxidante se ha evaluado por numerosos métodos analíticos para diferentes muestras de alimentos y matrices biológicas de interés, sin embargo, estos generalmente son multifuncionales, por lo cual la capacidad y los mecanismos antioxidantes se afectan por varios factores como las condiciones de oxidación, la cinética y la composición del sistema, las propiedades de reparto de los antioxidantes entre diferentes fases y su interfase y el estado físico del sustrato. Dada la complejidad que conlleva tomar en cuenta todos estos factores utilizando un solo ensayo, es necesario que cada protocolo antioxidante se realice con varias condiciones de oxidación y con diferentes métodos de medición. (Jiménez, 2019)

Con base en las reacciones químicas involucradas, los principales ensayos de capacidad antioxidante pueden dividirse a groso modo en dos categorías: (Rojas, 2010)

- a) Ensayos basados en la reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH): Este tipo de ensayos monitorean la reacción competitiva y la cuantificación se deriva de las curvas cinéticas. Generalmente se componen de: un generador sintético de radicales libres, una sonda molecular oxidable y un antioxidante. (Figura 11).
- b) Ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones (TE): Involucran una reacción redox con el oxidante el cual también actúa como indicador del punto final de la reacción. (Figura 11).

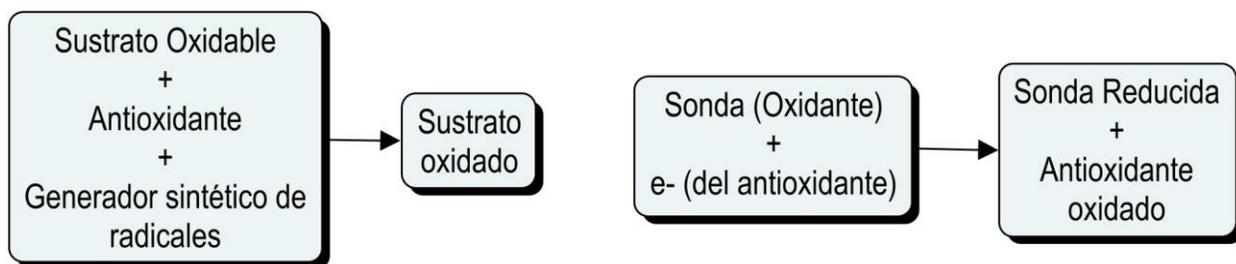


Figura 11. Fundamentos de distintas metodologías para la determinación de la capacidad antioxidante. Lado izquierdo: TAH; Lado derecho: TE.

Ambos tipos de ensayo (TAH y TE) están diseñados para medir la capacidad secuestradora de radicales (oxidante) de una muestra dada. Por lo anterior resulta importante comprender el mecanismo y la cinética de la autooxidación y de su inhibición para tener una mejor comprensión de las metodologías aplicadas en este estudio. (Rojas, 2010).

En la Tabla 2 se resumen algunos de los métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante en distintas muestras, usando como fundamento la espectroscopía.

3.6.1 Mecanismo de la autooxidación.

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción. Esta oxidación es fundamental para la vida pues participa en los procesos de obtención de energía celular. Sin

embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo. Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres.

Por esto, terapias antioxidantes y dietas ricas o enriquecidas con antioxidantes parecen prevenir o al menos disminuir el deterioro funcional orgánico originado por un exceso de estrés oxidativo. (Elejalde, 2001)

Tabla 2. Distintas metodologías empleadas para la determinación de la capacidad antioxidante en distintas muestras, teniendo como fundamento la espectroscopía.

(Pisoschi et al, 2011)

Ensayo	Principio del método	Determinación del producto final
DPPH	Reacción del antioxidante con un radical orgánico	Colorimetría
ABTS	Reacción del antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimetría
FRAP	Reacción del antioxidante con un complejo de Fe (III)	Colorimetría
PFRAP	Reducción del ferricianuro de potasio por los antioxidantes y una reacción subsecuente de ferrocianuro de potasio con Fe 3+	Colorimetría
CUPRAC	Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes	Colorimetría
ORAC	Reacción del antioxidante con radicales peroxilo, inducida por AAPH (2,2'-azobis-2-aminido-propano)	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína
HORAC	Capacidad antioxidante para quelar radicales OH generados por un Co (II) basado en un sistema parecido al de Fenton	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína
TRAP	Capacidad antioxidante para recoger radicales derivados del luminol. Generados por la descomposición del AAPH	Quimiluminiscencia
Fluorimetría	Emisión de luz por un sustrato que absorbe luz u otra radiación electromagnética de una diferente longitud de onda	Registro de excitación fluorescente / espectro emisión

Estas reacciones de autooxidación generalmente involucran un iniciador, es decir, una molécula que por descomposición genera radicales libres (reacción 1), los cuales reaccionan con el oxígeno para producir un radical peroxilo ROO• (reacción 2) que establece el proceso en cadena al atacar un sustrato orgánico (LH) y producir un radical L• (reacción 3). (Ver Figura 12).

En los alimentos y sistemas biológicos el mecanismo de autooxidación más ampliamente estudiado es la peroxidación lipídica que sufren los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) ya sea que estén presentes en forma de ácidos grasos libres o en ésteres de colesterol, triacilgliceroles y fosfolípidos. (Rojas, 2010)

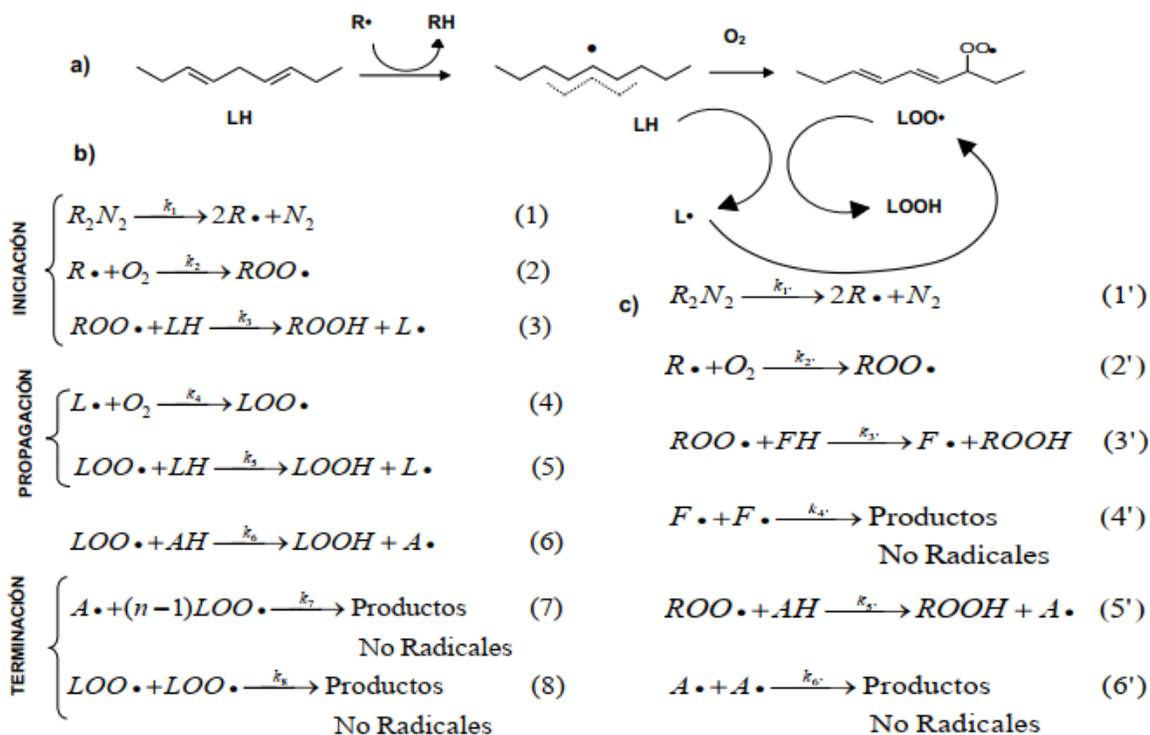


Figura 12. a) Iniciación y propagación de la peroxidación lipídica de un AGPI. R• puede ser HO•, LOO•, LO•, L•, etc. b) Principales reacciones de la autooxidación y la acción de un inhibidor (reacción 6). R₂N₂= compuesto azo, LH=antioxidante. c) Reacciones principales involucradas en el ensayo ORAC. R₂N₂= 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), FH= Fluoresceína y AH= Antioxidante. Fuente: Rojas, 2010.

Existen numerosos mecanismos de acción antioxidante, entre ellos se tienen los antioxidantes inhibidores de la cadena, estos siguen un mecanismo de TAH, la fuerza conductora para la transferencia de un átomo de hidrógeno es la formación de un radical estable (A•) que no continua la reacción en cadena o continua con la eficiencia muy baja. (Ou et al, 2001)

La complejidad experimental y las limitaciones de monitorear directamente la cinética de reacción de la inhibición de la autooxidación de lípidos han conducido al desarrollo de métodos más convenientes para determinar la capacidad antioxidante de una muestra. Uno de estos métodos es precisamente el

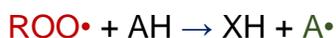
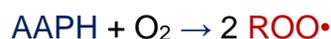
ensayo de ORAC, en este se utiliza una reacción de formación de radicales pero sin el paso de propagación de la cadena, el cual es un paso esencial en la autooxidación lipídica. (Rojas, 2010)

3.6.2 Método de ORAC.

El método de Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés: Oxygen Radical Absorbance Capacity) es un ensayo que mide la capacidad de un compuesto para atrapar el radical peroxilo, mediante un mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). En este ensayo, los radicales peroxilo (ROO•) generados por iniciadores de radicales libres, reaccionan con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente; es decir, a medida que avanza la reacción la sonda fluorescente, se consume y disminuye la fluorescencia. El antioxidante adicionado al medio compite con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia. (Zapata et al, 2014)

En el método ORAC el iniciador azo que generalmente se utiliza es el 2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH), por termólisis este genera un radical centrado en carbono, el cual reacciona con el oxígeno para dar un radical peroxilo reactivo (ROO•). La fluoresceína reacciona con el radical ROO• generado y da lugar a tres productos minoritarios fluorescentes (FL 1, FL2 y FL 3) y un producto no fluorescente (FL4) (Rojas, 2010) (Ver Figura 13).

Por lo tanto, el método de ORAC consiste en evaluar la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína) en presencia de iniciadores de radicales libres como son los azocompuestos (AAPH). El AAPH se utiliza como radical iniciador, que por descomposición térmica origina radicales peroxilo que causan daño a las moléculas fluorescentes. Las especies antioxidantes son capaces de bloquear estos radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno: (López, 2015)



(AH= Especies antioxidantes)

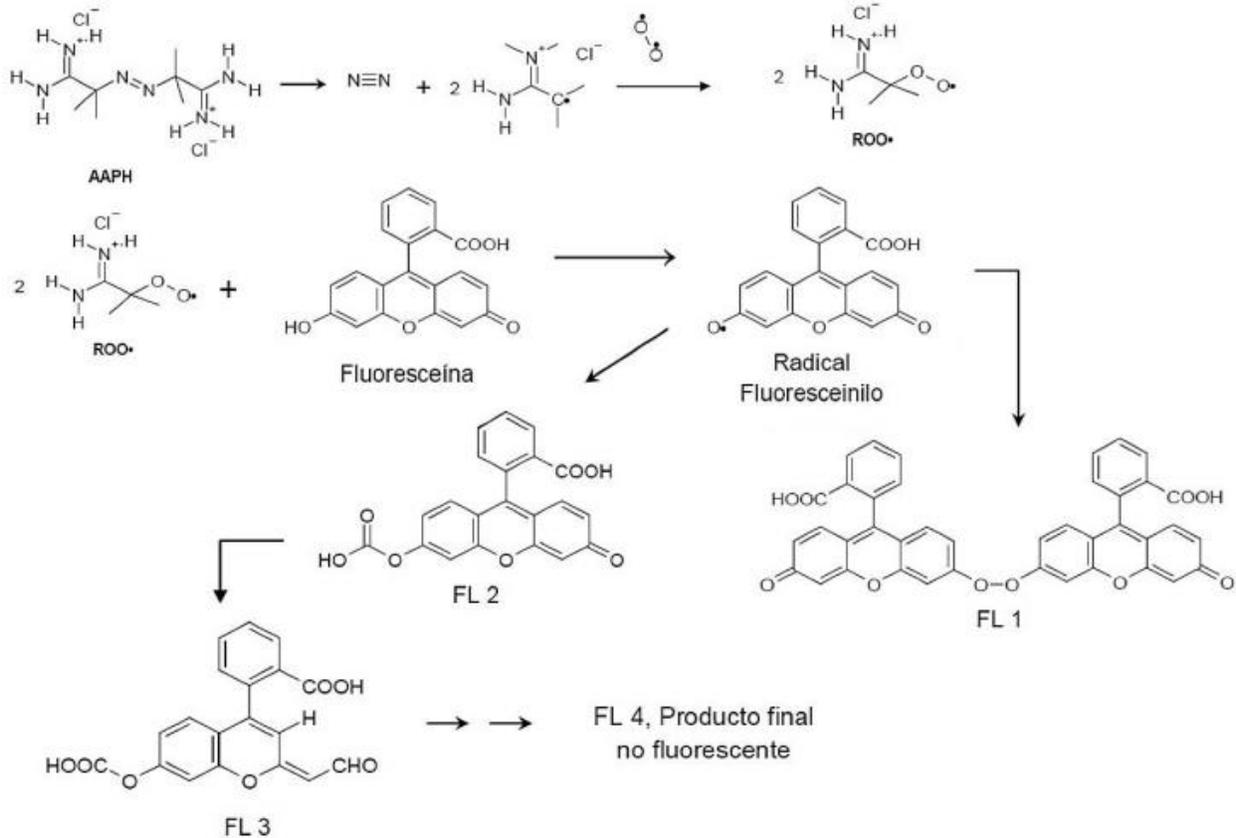


Figura 13. Secuencia de reacción del ensayo ORAC. Fuente: Jiménez, 2019.

En este método, los radicales peroxilo oxidan a la fluoresceína de forma que esta pierde su fluorescencia. En presencia de un antioxidante, los ROO^\bullet captan preferentemente un átomo de hidrógeno de este, de forma que se disminuye dicha pérdida de fluorescencia. El método ORAC mide por lo tanto, el retraso en presencia de compuestos antioxidantes, de la disminución de la fluorescencia debida a la acción de radicales peroxilo. La actividad antioxidante de las muestras se mide en relación con la sustancia de referencia, Trolox (análogo de la vitamina E hidrosoluble). La medición combina tanto tiempo de inhibición como porcentaje de inhibición de la acción de radicales libres por los antioxidantes usando un área bajo la curva para la cuantificación. (López, 2015)

La pérdida de fluorescencia se puede evaluar midiendo el área bajo la curva a cada concentración. Cuanto mayor es la pérdida de fluorescencia, menor es el valor del área bajo la curva. La capacidad antioxidante se determina por la disminución en la velocidad y la cantidad del producto no fluorescente formado a

lo largo del tiempo (Jiménez, 2019), por lo tanto, se sigue la intensidad de fluorescencia a través del tiempo para poder realizar la cuantificación mediante la medición del área bajo la curva.

3.7 Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

El análisis por inyección en flujo (FIA por sus siglas en inglés: Flow Injection Analysis), es una de las formas más avanzada para manipular disoluciones acuosas o mezclar reactivos y así, sin intervención humana, finalmente transportar al lugar de medida los componentes de una o más reacciones químicas (Cañizares, 2002). El análisis por inyección en flujo está basado en la inyección de una muestra líquida llevada desde un acarreador de flujo continuo. La muestra inyectada forma un bolo que es transportado hacia el detector el cual continuamente registra cambios en parámetros físicos (tales como absorbancia o potencial electrodo) cuando la muestra pasa a través de la celda. La curva respuesta es el resultado de dos procesos cinéticos: el proceso físico de dispersión del bolo de muestra dentro del acarreador y el proceso químico de la formación de la especie química. (Flores, 2018)

Desde que el concepto de análisis por inyección en flujo fue introducido por Ruzicka y Hansen en 1975, ha impactado enormemente la manera en como los procedimientos analíticos modernos son implementados (Rojas, 2010). En la década de los sesenta el método automático continuo de análisis más utilizado fue sin duda el análisis por flujo segmentado (SFA: Segmented Flow Analysis). En esta técnica las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se sitúan burbujas de aire que separan (segmentan) el flujo establecido, incluido un ciclo de lavado para evitar contaminación entre muestras; las burbujas de aire se eliminan antes de que alcancen la celda de flujo localizada en el detector. El análisis por inyección en flujo tiene su antecedente en el SFA; pero en FIA, a diferencia del SFA, el flujo no está segmentado y la muestra es inyectada en lugar de aspirada, en el momento de la detección no se alcanza ni el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). En la Figura 14 se muestran las configuraciones generales tanto para FIA como para SFA.

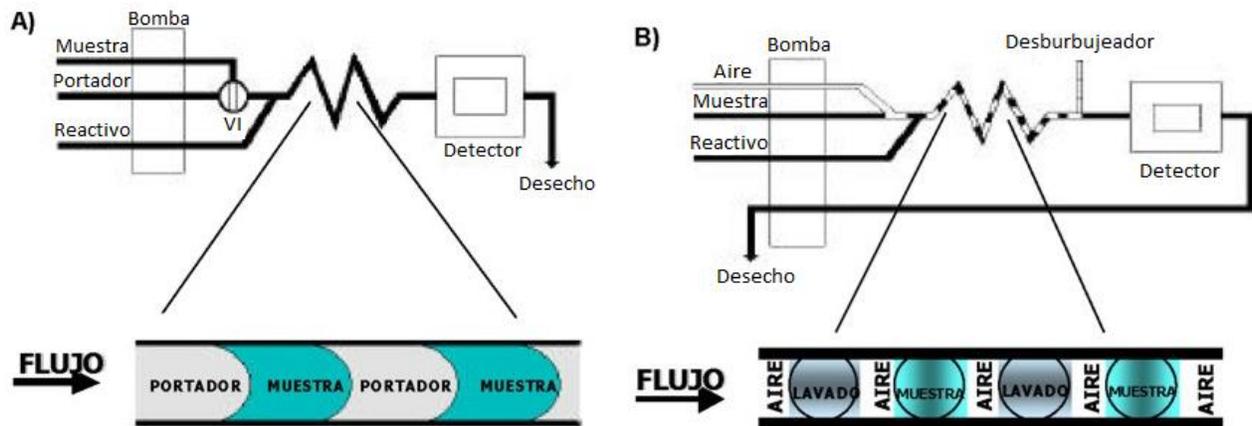


Figura 14. A) Configuración básica para Análisis por Inyección en Flujo (FIA);
 B) Configuración básica para Análisis por Flujo Segmentado (SFA).

Fuente: Cañizares, 2002).

3.7.1 Fundamento del FIA.

El fundamento físico del análisis por inyección en flujo está basado en la dispersión controlada de una zona de muestra inyectada en una corriente continua de un fluido portador. (Escutia, 2011)

Al desplazarse por el tubo, la muestra comienza a dispersarse formando un gradiente de concentración con perfil parabólico que se explica por dos fenómenos (Cañizares, 2002): 1) el transporte por convección asociado al flujo laminar que hace que las moléculas que se encuentran en el interior del tubo avancen más rápidamente que las que se encuentran en las paredes del mismo y 2) el transporte por difusión, originado por el gradiente de concentración, que puede ser axial (paralelo a la dirección del flujo) o radial (perpendicular a la dirección del flujo). La contribución de la difusión radial es mayoritaria porque tiende a igualar la concentración en todos los puntos de la muestra desplazando las moléculas de las paredes del tubo al centro y las del centro en dirección opuesta; este mecanismo retrasa la dilución longitudinal manteniendo así la identidad de la muestra inyectada. (Escutia, 2011) (Ver Figura 15).

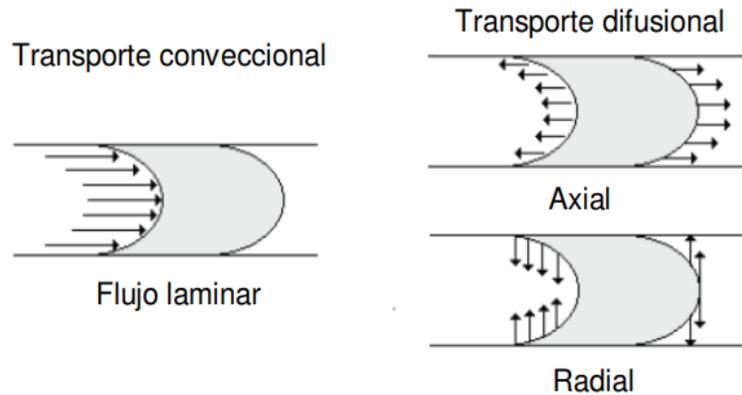


Figura 15. Mecanismos que contribuyen a la dispersión del bolo de muestra inyectado.

Fuente: Escutia, 2011.

El régimen laminar produce una zona bien definida del bolo de muestra inyectado produciéndose un gradiente de concentración a lo largo del bolo. En la Figura 17 (A) se muestra la dispersión que sufre la muestra a lo largo de una configuración FIA, al ser un sistema continuo se obtiene una señal temporal cuyo máximo corresponde a la parte del bolo menos diluida. (Cañizares, 2002)

Por lo tanto, la forma de una señal FIA (pico) dependerá del tiempo en el que el bolo de muestra se encuentra dentro del sistema. A tiempos demasiado cortos la dispersión es prácticamente cero y no se genera un gradiente de concentración en el bolo inyectado; por otra parte, tiempos de estancia largos ocasionan una dispersión muy acusada originando picos muy anchos (Cañizares, 2002). Debido a esto es necesario establecer cuál es el tiempo de residencia más adecuado, siendo un parámetro difícil de decidir. Generalmente, la señal óptica es aquella en el que el transporte por convección y difusión influye de la misma manera, aunque evidentemente esta decisión dependerá de la reacción que se va a llevar a cabo. La representación esquemática de la señal analítica en función del tiempo se conoce como Diagrama (Figura 16 (B)) cuyas características esenciales son: (Rojas, 2010)

- a) La altura o área de pico (h), que se relaciona con la concentración del componente de la muestra inyectada.
- b) El tiempo de residencia (T), que se define como el tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se alcanza la máxima señal.

- c) El tiempo de arranque (t_a), es el tiempo que pasa desde la inyección hasta que se inicia la “salida” de la línea de base de la señal.
- d) El tiempo de retorno (T'), que es el tiempo comprendido entre el momento en que se alcanza la máxima señal y el instante en que la señal vuelve a la línea base.
- e) Ancho de la banda (Δt), se define como el período en el cual la señal sale y vuelve de nuevo a la línea base.

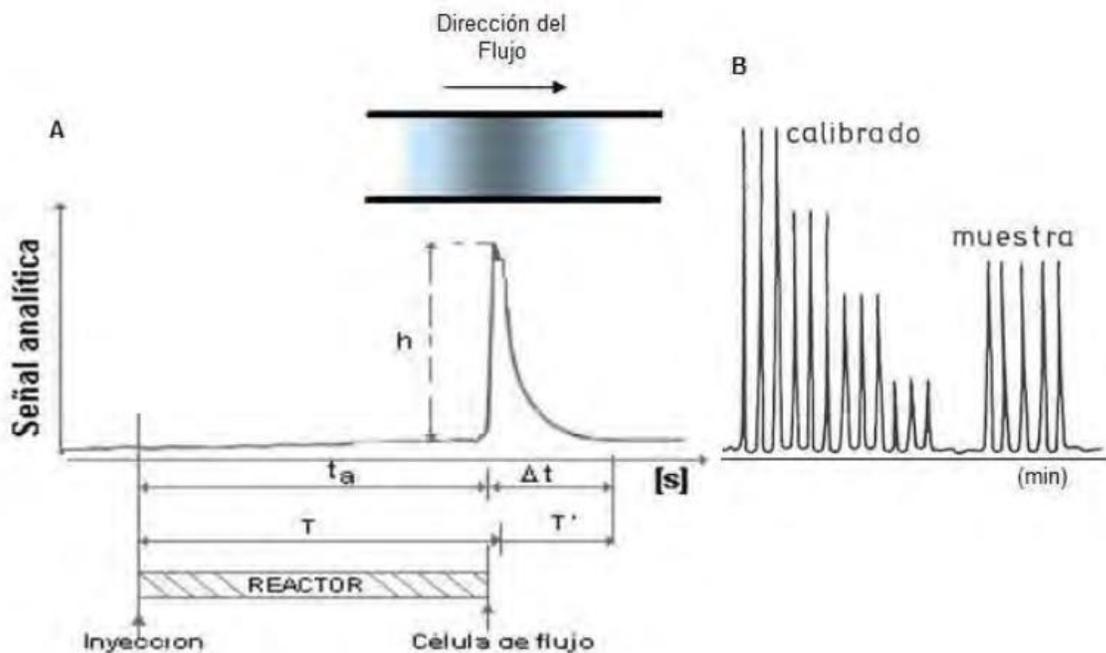


Figura 16. A) Señal obtenida en una configuración FIA y parámetros que la definen. En la parte superior se muestra la dispersión que sufre el bolo de muestra en el tubo al pasar a lo largo de la configuración. B) Señal analítica en la que la escala de tiempo se encuentra en minutos (registro normal): Inyección de cuatro estándares por triplicado y de una muestra desconocida por quintuplicado.

Fuente: Rojas, 2010.

Al llegar la muestra a la celda de flujo, se obtiene una señal analítica en forma de pico, cuya altura se relaciona con la concentración del analito a determinar. Los parámetros geométricos e hidrodinámicos del sistema FIA como son: caudal, volumen de inyección, longitud del reactor, etc., influyen en la forma del pico ya que mientras más tiempo permanezca la muestra dentro del sistema,

mayor será la dilución de la muestra lo que hará que se obtengan picos más anchos (Escutia, 2011), como ya se ha mencionado anteriormente.

3.7.2 Instrumentación de FIA.

Un esquema básico de Análisis por Inyección en Flujo consta de cuatro unidades básicas a los cuales se le pueden hacer modificaciones para adaptar el sistema al problema que se quiera resolver (Rojas, 2010). Las unidades básicas que componen a un sistema de análisis por inyección en flujo son:

- a) Unidad de propulsión: Establece un flujo de caudal constante y regular en el sistema, además de perfectamente reproducible. Su función es la de permitir la propulsión de las diferentes mecanismos: bombas, sistemas de presión o sistemas de gravedad. El sistema más utilizado son las bombas peristálticas. La propulsión de las disoluciones por medio de estas bombas se basa en la presión que ejerce una serie de cilindros rotatorios, ubicados en la cabeza de un tambor rotatorio, sobre unos tubos de plástico flexible (Figura 17). El caudal que proporcionan estas bombas viene determinado, entre otros factores, por la velocidad de giro de los cilindros y el diámetro interno de los tubos. (Molina, 2012)

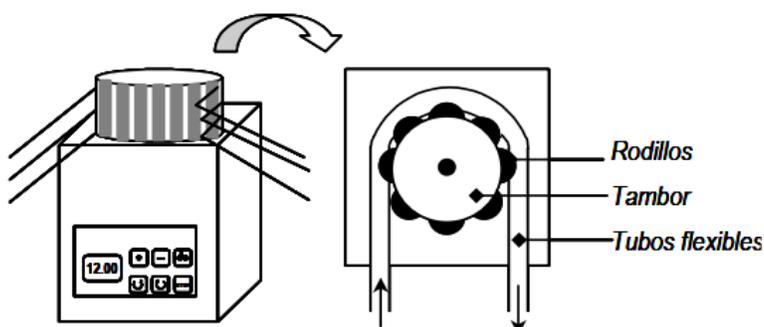


Figura 17. Bomba peristáltica y vista esquemática de su parte superior. Fuente: Molina, 2012.

- b) Sistema de inyección: Debe permitir la introducción o inserción de un volumen de muestra exactamente medido en la corriente portadora de forma completamente reproducible, sin crear perturbaciones en el flujo del portador (Molina, 2012). El volumen de muestra que normalmente se inyecta es de 25 a 100 μL . El sistema de inyección utilizado con mayor

frecuencia actualmente es una válvula rotatoria de seis puertos ya que es muy reproducible al inyectar el volumen de la muestra, lo hace de manera rápida y es fácilmente automatizable. Además, estas válvulas son altamente versátiles porque se pueden acoplar entre ellas de diferentes maneras, permitiendo armar una gran variedad de configuraciones de acuerdo con las necesidades del método que se requiera adaptar al sistema de análisis por inyección en flujo. (Escutia, 2011) (Figura 18).

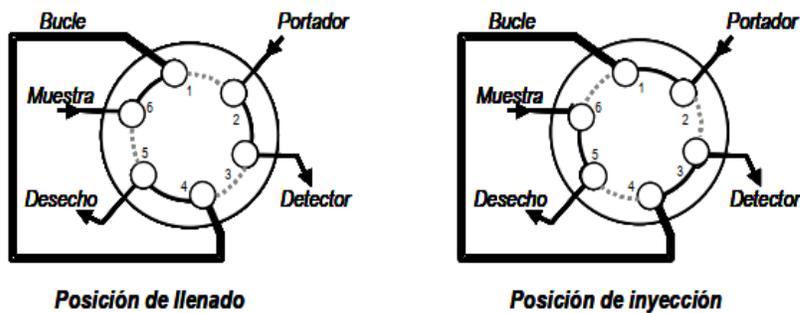


Figura 18. Esquema de una válvula rotatoria de seis vías. Fuente: Molina, 2012.

Con estas válvulas de seis puertos los procesos de carga e inyección de muestra se efectúan por desplazamiento de un elemento móvil entre dos posiciones fijas, quedando definido el volumen de muestra a inyectar por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria. (Molina, 2012)

- c) Sistema de transporte y reacción: El sistema de transporte tiene como fundamento conectar entre sí los diferentes elementos del sistema y conseguir en el transporte de los fluidos, un adecuado grado de dispersión de la muestra con la corriente portadora. La trayectoria del flujo debe ser fácilmente programable para realizar una amplia variedad de ensayos; además, el flujo debe ser totalmente reproducible (Molina, 2012). Se usan tubos de pequeño diámetro interno que va de 0.1 a 1.0 mm y están hechos con diversos materiales dependiendo de las disoluciones que se vayan a usar, deben ser de un material químicamente inerte y termoestable, siendo los más usados el teflón, polietileno y propileno. Los conectores que permiten unir los tubos están hechos normalmente de politetrafluoroetileno

o polimetilmetacrilato y pueden ser de diversas formas, T, Y, W, entre otros. (Escutia, 2011)

Dentro del sistema FIA se suelen incorporar reactores, que permiten que se den procesos adicionales (reacciones) simultáneamente con el transporte. Se suelen emplear los mismos tubos que en el sistema de transporte, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal. Este sistema de reacción puede estar calentado por baños termostatzados o mantas eléctricas. Estos tubos a su vez pueden tener confluencias, cámaras de mezcla o reactores en fase sólida (capilar relleno de un soporte sólido activo químicamente). (Molina, 2012)

- d) Sistema de detección: Debe permitir la medida continua de una propiedad del analito o de un producto de reacción de éste, proporcionando información cualitativa y cuantitativa. Para que un detector sea adecuado como sistema de medida FIA, éste debe poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: pequeño volumen, bajo ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones y alta sensibilidad. Los sistemas de detección FIA pueden medir directamente una propiedad nativa de la especie disuelta en la muestra inyectada, o bien necesitar una reacción adicional que origina un producto de reacción detectable. De esta manera el FIA puede aplicarse a especies activas o inactivas según su comportamiento en relación con el sistema de detección. Los sistemas de detección más usados en FIA son los detectores ópticos y electroanalíticos. (Molina, 2012).

En la Figura 19 se muestran los componentes básicos de un sistema FIA descritos anteriormente.

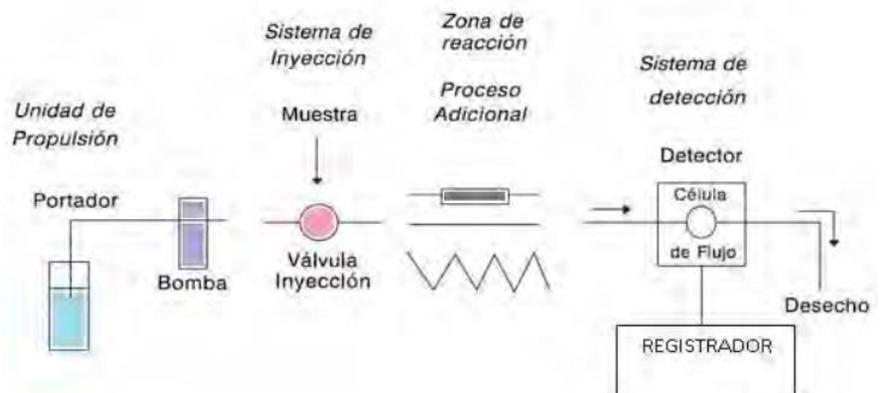


Figura 19. Componentes básicos en un sistema FIA.

Fuente: Rojas, 2010.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Metodología general empleada:

En la Figura 20 se muestra el diagrama de flujo para la determinación de polifenoles totales en gualumbos utilizada, mientras que, en la Figura 21 se muestra el diagrama de flujo para la determinación de la capacidad antioxidante.

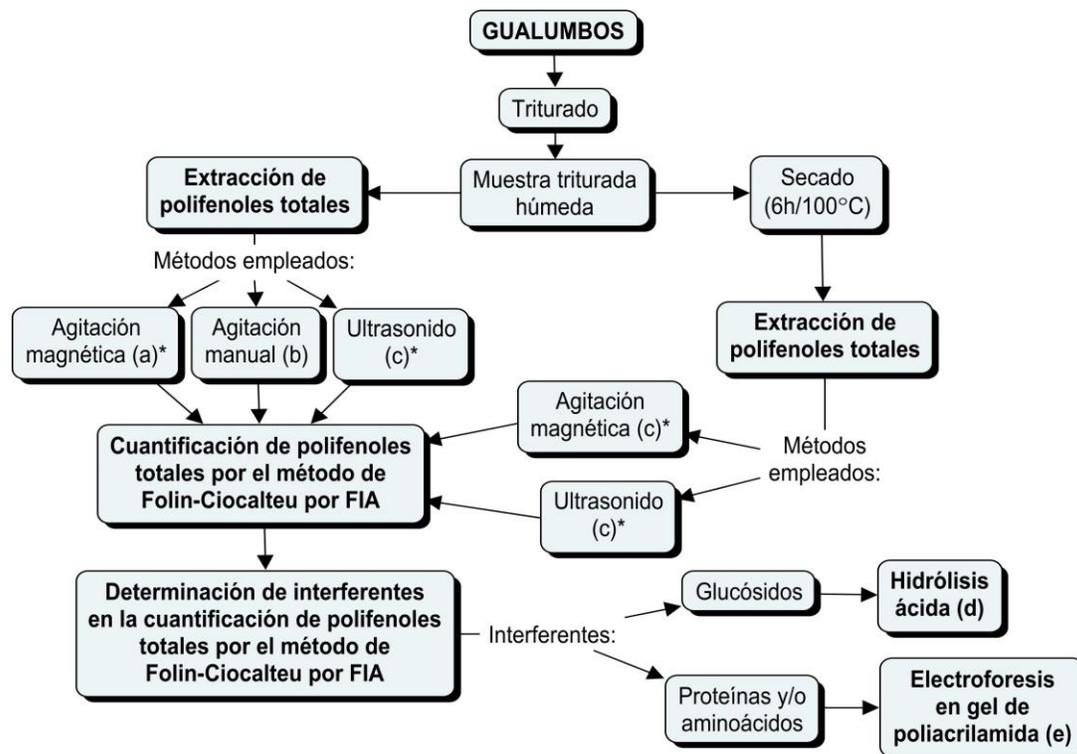


Figura 20. Metodología general empleada para la cuantificación de polifenoles totales en gualumbos. Donde en a) se utilizó la muestra de gualumbos de *Agave spp.* empleando como extractantes agua destilada, buffer de carbonatos 0.1M pH 10 y MetOH-H₂O (50%), la muestra de gualumbos de *Agave salmiana* se realizó con y sin la adición de los reactivos de Carrez utilizando MetOH-H₂O (50%); b) se utilizó la muestra de gualumbos de *Agave spp.* usando como extractante MetOH-H₂O (60%); c) se utilizaron ambas muestras de gualumbos empleando como extractante MetOH-H₂O (50%) con y sin la adición de los reactivos de Carrez; d) se mandó a un análisis de HPLC antes y después de la hidrólisis ácida en los extractos adicionados con los reactivos de Carrez tanto en la muestra seca de gualumbos *Agave spp.* como de *Agave salmiana*; e) se realizó utilizando la muestra seca de gualumbos de *Agave salmiana* con muestra húmeda y seca y de esta última, con y sin la adición de los reactivos de Carrez.

*Se realizó un diseño de experimentos para optimizar las condiciones de extracción.

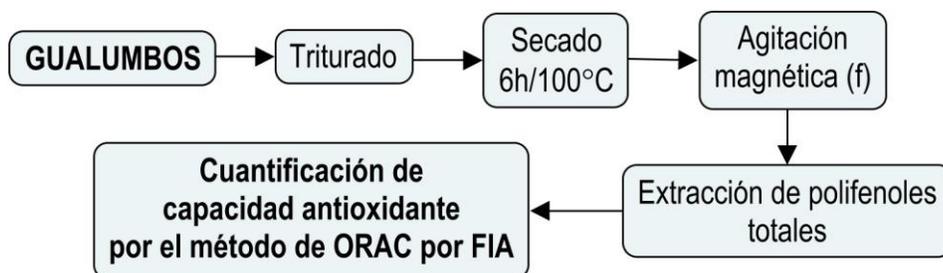


Figura 21. Metodología general empleada para la cuantificación de la capacidad antioxidante en gualumbos. Donde en f) se utilizó la muestra de gualumbos de *Agave salmiana* y *Agave spp.* con la adición de los reactivos de Carrez y empleando como extractante MetOH-H₂O (50%).

4.2 Equipo e instrumentación.

- Parrilla con agitación: Marca CIMAREC Modelo SP131325.
- Balanza analítica: Marca Ohaus Modelo E12140 con precisión de ± 0.1 mg.
- Potenciómetro: Marca OAKTON Modelo 105762.
- Baño de ultrasonido: Marca Branson Modelo 2510R-MT.
- Sonda de ultrasonido: Marca Branson Modelo 250 con punta cilíndrica de titanio de 13 mm de diámetro, 20 kHz y 400 W de potencia total.
- Centrífuga: Marca Hettich-Zentrifugen Modelo EBA-20.
- Estufa: Marca RIOSSA Modelo E-41.
- Trituradora (ProPep Chopper Grinder): Marca Waring Commercial Modelo WCG75.
- Rotavapor: Marca Heidolph Modelo VV-Micro.
- Baño María Digital: Marca Thermo Scientific Modelo 2825.
- Bomba peristáltica (para la determinación de polifenoles totales): Marca ISMATEC Modelo 070535-08i-ND-SC0056T.
- Detector UV-Vis para la determinación de polifenoles totales: Marca Ocean Optics Modelo USB4000.
- Celda de flujo SMA-Z paso óptico 1 cm.
- Fibras ópticas 400 μm : Marca Ocean Optics
- Fuente de luz UV-Vis NIR: Marca Ocean Optics Modelo DT-MINI-2-GS

- Bomba peristáltica (para la determinación de la capacidad antioxidante): Marca ISMATEC Modelo Reglo ICC.
- Celda de cuarzo paso óptico: Marca Daigger & Company.
- Fluorímetro fotomultiplicador de tubo con detección en Flujo: Marca FIALab Modelo PMT-FL.
- Válvulas de inyección Rheodyne de 6 vías.
- Celda de extracción en flujo con filtro de membrana de polipropileno Whatman (tamaño de poro de 0.45 μm , 47 mm de diámetro).
- Tuberías tygon y teflón (diámetro interno de 0.76 mm) y conectores de politetrafluoroetileno.
- Sistema de electroforesis para proteínas/vertical: Marca BIO-RAD modelo Mini-Protean tetra cell.
- Politrón Marca IKA Modelo T10 Basic ULTRA-TURRAX
- Centrífuga concentradora Marca Genevac Modelo MiVac.

4.3 Reactivos.

- Reactivo de Folin-Ciocalteu: Marca Merck.
- Hidróxido de sodio 98% de pureza: Marca Fermont.
- Ácido tánico: Marca Sigma-Aldrich.
- Ácido gálico: Marca Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 100% de pureza: Marca J.T. Baker.
- Metanol con 99.8% de pureza: Marca J.T. Baker.
- Etanol con 99.8% de pureza: Marca J.T. Bakar.
- Ácido clorhídrico con 36.8% de pureza: Marca J.T. Baker.
- AAPH (2,2'-Azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro) 98% de pureza: Marca Acros Organics.
- Trolox (Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) 97% de pureza: Marca Sigma-Aldrich.
- Fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 98% de pureza: Marca Sigma-Aldrich.

- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) pureza \geq a 99%: Marca Sigma-Aldrich.
- Fluoresceína: Marca Fluka analitical.
- Acetato de zinc: Marca J.T. Baker.
- Ácido acético glacial: Marca Sigma-Aldrich.
- Hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado: Marca J.T. Baker.
- Acetato de etilo con pureza del 99%: Marca J.T. Baker.
- Lisozima Marca Sigma #L6876-1G.
- Estándar de marcador molecular Precisión Plus de BIO-RAD.
- Solución I (Solución concentrada de acrilamida y bis-acrilamida en agua bidestilada).
- Solución II (Solución de Tris-HCl y SDS en agua bidestilada).
- Solución III (Solución de Tris-HCl, pH 6.8 y SDS en agua bidestilada).
- APS Marca Sigma-Aldrich A3678.
- TEMED 1610800 de BIO-RAD.
- Buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM Sacarosa y 0.4% de 2-betamercaptoetanol).
- Buffer desnaturalizante IEF (8 M urea, 2 M Tiourea , 4% CHAPS, 2% tritón X 100 y 50 mM DTT).
- Solución de tinción (8% p/v sulfato amónico, 2% ácido fosfórico y 20% etanol y 0.1% de Azul de Coomassie G-250).

4.4 Preparación de disoluciones:

- a) Reactivo de Folin-Ciocalteu: Se utilizó una disolución de 1:10 ocupando una alícuota de 10.0 mL y llevándola a un aforo de 100.0 mL en un matraz volumétrico y almacenándolo en un frasco de vidrio ámbar previamente etiquetado.
- b) Disolución de NaOH 0.5 M: Se pesó 2.04 g de perlas de hidróxido de sodio en un vaso de precipitado y se disolvieron con aproximadamente 40 mL de agua destilada. Se transfirió a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se llevó

al aforo con agua destilada para su posterior almacenamiento en un frasco previamente etiquetado.

- c) Disolución estándar de ácido tánico y ácido gálico: En ambos casos se preparó una disolución madre pesando 25.0 mg de ácido gálico o tánico, disolviéndolos en aproximadamente 80 mL de agua destilada y llevando a un volumen de 100.0 mL en un matraz volumétrico, completando el volumen hasta la marca de aforo con agua destilada.

A partir de estas disoluciones se prepararon estándares de diferentes concentraciones tomando alícuotas del volumen adecuado y aforando con agua destilada en matraces volumétricos de 10.0 mL.

- d) Disolución de MetOH-H₂O (50%): Se utilizaron 50 mL de MetOH y 50 mL de agua destilada, los cuales se midieron en una probeta y se mezclaron para obtener la disolución 50:50 volumen/volumen. La disolución se almacenó en un frasco previamente etiquetado.
- e) Disolución de MetOH-H₂O (60%): Se midieron 60 mL de MetOH en una probeta y se mezclaron con 40 mL de agua destilada medidos también en una probeta para posteriormente mezclarse y almacenarse en un frasco previamente etiquetado.
- f) Disolución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 10: Se pesó 0.84 g de bicarbonato de sodio y se disolvieron en aproximadamente 50 mL de agua destilada, se introdujo el potenciómetro en la disolución y se ajustó el pH a 10 agregando NaOH 0.5 M gota a gota con agitación magnética constante. La disolución se transfirió a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se agregó suficiente agua destilada para llegar a la marca de aforo.
- g) Disolución HCl 1.2 M en MetOH-H₂O (50%): Para su elaboración se realizó por partes: Se hizo una primera disolución de 5.0 mL de HCl 12 M agregando cerca de 1 mL de MetOH-H₂O (50%) y 3.5 mL de HCl concentrado y llevando al aforo de 5 mL con la disolución de MetOH-H₂O (50%). La segunda disolución y final se realizó diluyendo la primera disolución, para ello se agregó cerca de 20 mL de MetOH-H₂O (50%) en un matraz volumétrico de 25.0 mL y tomando una alícuota de 2.5 mL de la

primera disolución (HCl 12 M) para finalmente llevar a la marca de aforo con la disolución de MetOH-H₂O (50%).

- h) Reactivo de Carrez: El reactivo de Carrez consta de dos reactivos y se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo Carrez I: Se preparó disolviendo aproximadamente 24 g de acetato de zinc en 50 mL de agua destilada, se adicionó 3 mL de ácido acético glacial y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 100.0 mL con agua destilada.

Reactivo Carrez II: Se pesó 15 g de Hexacianoferrato de potasio (II) trihidratado, los cuales se disolvieron perfectamente en aproximadamente 50 mL de agua destilada para posteriormente transferirlo a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevarlo a la marca de aforo con agua destilada.

- i) Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7: Se pesó aproximadamente 2.0638 g de fosfato de potasio monobásico y 2.605 g de fosfato dibásico de sodio en un mismo vaso de precipitados, y se disolvió con aproximadamente 70 mL de agua destilada, se ajustó a un pH de 7 con NaOH 0.5 M y se transfirió a un matraz volumétrico de 100.0 mL llevando a la marca de aforo con ayuda destilada.
- j) Disolución de fluoresceína: Para su elaboración se realizaron tres diferentes disoluciones: una disolución madre a partir de la cual se hace otra más diluida para lograr hacer la disolución de trabajo que se utiliza para la medición de la capacidad antioxidante por el método de ORAC. La disolución madre 6×10^{-4} M, se pesó 9.97 mg de fluoresceína y se disolvió con 5 mL de etanol y una vez disuelto se transfirió a un matraz volumétrico de 50.0 mL llevándolo a la marca de aforo con SAF. De esta disolución madre, se hizo otra disolución a 6×10^{-5} M para preparar la disolución de trabajo, para esto se tomó una alícuota de 1.0 mL en un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con SAF.

Finalmente, para la disolución de trabajo se utilizó fluoresceína en una concentración de 1.5×10^{-7} M tomando 250 μ L de la disolución 6×10^{-5} M y se aforó con SAF a 100.0 mL.

- k) Disolución de AAPH: La disolución de AAPH se preparó cada día de trabajo en la cuantificación de la capacidad antioxidante y cuidando de que no se utilizara por más de 2 horas, ya que después de este tiempo, el AAPH comenzaba a degradarse y disminuía la capacidad antioxidante. Para su elaboración se pesó 0.5 g de AAPH disolviéndolo con aproximadamente 10 a 15 mL de SAF, una vez disuelto completamente, se transfirió a un matraz volumétrico de 25.0 mL y se llevó a la marca de aforo con SAF.
- l) Disolución estándar de Trolox: Para la elaboración de la disolución madre de Trolox se pesó 6.5 mg y se disolvió con aproximadamente 50 mL de agua destilada, transfiriéndose a un matraz volumétrico de 100.0 mL y se llevó a la marca de aforo con agua destilada. A partir de esta disolución, se tomaron distintas alícuotas para la preparación de los diferentes estándares para la elaboración de la curva de calibración.

4.5 Muestras de gualumbos analizadas.

Las muestras de gualumbos analizadas fueron tres: Gualumbo de *Agave spp.* (ya que se desconoce la especie del maguey del que proviene), gualumbo de *Agave salmiana*, este último es el gualumbo más común ya que proviene del maguey pulquero y es un gualumbo comestible, este tipo de flor de maguey se analizó en dos estados de maduración; maduro y verde.

Las muestras analizadas se pueden apreciar en la Figura 22.



Figura 22. Gualumbos analizados: 1) Gualumbo de *Agave spp.* 2) Gualumbo de *Agave salmiana* (estado de maduración verde) 3) Gualumbo de *Agave salmiana* (estado de maduración maduro).

4.5.1 Tratamiento de muestras.

A los gualumbos de *Agave spp.* se les retiró las semillas para poder cortarlo en pequeños pedazos, los gualumbos de *Agave salmiana* no tenían semillas. Todas las muestras, tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana* se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 0.5 cm para poder moler las muestras utilizando una trituradora. La muestra ya triturada, se secó a una temperatura de 100°C utilizando una estufa durante 6 horas en vasos de precipitados previamente llevados a peso constante y pesados.

4.5.2 Métodos de extracción.

Se emplearon tres métodos de extracción para poder evaluar cuál de éstos era más efectivo en cuanto a la extracción de polifenoles y de esta forma poder optimizar las condiciones de extracción. Los métodos utilizados fueron: agitación magnética, extracción por ultrasonido y agitación manual, para éste último método no se optimizaron las condiciones de extracción.

Para todas las muestras (*Agave spp.* y *Agave salmiana* en sus dos estados de maduración) en un vaso de precipitados se colocó un gramo de muestra triturada húmeda y 25 mL de extractante. En el caso de la muestra seca se colocó 0.2 g de muestra con 25 mL de extractante.

- a) Agitación magnética: Se evaluaron como extractantes agua destilada, una disolución amortiguadora de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 0.1 M pH 10 y una disolución de MetOH-H₂O (50%). Las extracciones se hicieron por 30 y 60 minutos empleando temperatura ambiente y 50°C. En el caso de las extracciones con calentamiento, se reguló la temperatura de la parrilla hasta observar que la temperatura del líquido se mantuviera entre 45 y 50°C, y en este momento se comenzó a tomar el tiempo de la extracción. Pasado este tiempo, se filtró el extractante y se llevó a un aforo de 25.0 mL con agua destilada para posteriormente medir la cantidad de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, para determinar cuál de éstos es el mejor extractante y hacer una optimización de las condiciones de extracción.

- b) Agitación manual: Se pesó aproximadamente 1 g de muestra triturada húmeda en un tubo de centrífuga y se adicionó 3.0 mL de MetOH-H₂O (60%).

La mezcla se agitó manualmente durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, para que de esta forma se facilitara el filtrado. Transcurrido este tiempo, se decantó el extractante y se adicionaron 3.0 mL más de MetOH-H₂O (60%) en un nuevo tubo de centrífuga y repitiendo la extracción dos veces más. Posteriormente se combinaron y filtraron los extractantes por medio de un acrodisco de 0.45 µm, llevando a un aforo de 10.0 mL con agua destilada. De esta última, se tomó el volumen necesario para preparar una nueva solución cuya absorbancia estuviera dentro del intervalo de concentraciones de la curva de calibración de ácido tánico y ácido gálico para la cuantificación de polifenoles totales.

- c) Ultrasonido: La extracción con ultrasonido se realizó de forma directa con una sonda de ultrasonido con punta cilíndrica de titanio de 13 mm de diámetro y 400W de potencia total. Los parámetros evaluados fueron: tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación, número de ciclos y potencia total de la sonda.

En el caso de la muestra húmeda se empleó 45% (180W) de potencia total de la sonda, mientras que, para la muestra seca se utilizó 50% (200W) de potencia total. Se pesó aproximadamente 1 g de muestra triturada húmeda y se le adicionó 25.0 mL de extractante MetOH-H₂O (50%) y se introdujo la punta aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del extractante. Terminando el tiempo total de irradiación, se filtró la muestra y se llevó a 25.0 mL de aforo realizando las diluciones necesarias para que la absorbancia quedara dentro de la curva de calibración de ácido gálico y ácido tánico. En el caso de la muestra seca, se empleó 0.2 g de muestra y 25.0 mL de extractante de MetOH-H₂O (50%).

4.5.3 Método de Carrez.

Al realizar los extractos con la muestra de gualumbos, algunos presentaron turbidez, la cual presentaría una interferencia en la cuantificación de polifenoles debido a que se trata de una cuantificación espectrofotométrica, por lo que el paso de la luz sería distinto si se dejara el extracto turbio. Por ende, para la eliminación de la turbidez, se realizó el método de Carrez empleando la siguiente metodología:

El extracto filtrado obtenido (utilizando los métodos de extracción descritos previamente) se llevó a un aforo de 25.0 mL con agua destilada, y de ésta se tomó una alícuota de 10.0 mL en un tubo de centrífuga + 1.0 mL de la disolución de reactivo de Carrez I y + 1.0 mL del reactivo de Carrez II. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y terminado esto, se filtró el extracto y se llevó a un aforo de 10.0 mL con agua destilada, y se realizaron las diluciones necesarias para que entraran dentro de la curva patrón de ácido gálico y ácido tánico.

4.6 Optimización de los métodos de extracción.

Para optimizar las mejores condiciones de extracción, se realizó un diseño de experimentos con ayuda del Software Statgraphics.

Para poder establecer los intervalos para los diferentes factores considerados en el diseño de experimentos, se llevaron a cabo previamente una serie de extracciones modificando dichos factores, y con base en los resultados obtenidos se prosiguió a realizar el diseño, estableciendo un valor mínimo y un valor máximo para cada uno de los factores. Las extracciones se hicieron siguiendo la metodología descrita en el punto 4.4.2 de agitación magnética y extracción por ultrasonido utilizando como extractante MetOH-H₂O (50%) en ambos casos.

4.6.1 Optimización: Agitación magnética.

Se consideró un diseño factorial completo 2² utilizando tres puntos centrales con la finalidad de determinar qué factores son estadísticamente significativos al momento de realizar la extracción. Para la extracción por agitación magnética se tomaron en cuenta dos factores para el diseño de experimentos: tiempo de

extracción (min) y temperatura (°C). Los datos del diseño de experimentos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño factorial completo 2² para la extracción por agitación magnética para muestra húmeda y seca de gualumbos *Agave spp.*

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (min)
1	50	30
2	25	60
3	37.5	45
4	37.5	45
5	37.5	45
6	25	30
7	50	60

4.6.2 Optimización: Ultrasonido.

Del mismo modo que la optimización por agitación magnética, en el método de extracción por ultrasonido se utilizó un diseño factorial completo 2³ con tres puntos centrales. Se consideraron tres factores para el desarrollo del diseño de experimentos: tiempo de irradiación (s), tiempo de no irradiación (s) y número de ciclos. Las condiciones empleadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño factorial completo 2³ para la extracción con ultrasonido utilizando la muestra seca y húmeda de gualumbos *Agave spp.*

Exp.	Irradiación		No irradiación		#Ciclos		Tiempo total de irradiación	
	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca
1	20 s	30 s	8 s	10 s	4	2	80 s	60 s
2	10 s	30 s	10 s	20 s	5	4	50 s	120 s
3	30 s	30 s	10 s	10 s	5	4	150 s	120 s
4	10 s	10 s	5 s	10 s	2	4	20 s	40 s
5	30 s	30 s	5 s	20 s	5	2	150 s	60 s
6	30 s	10 s	5 s	10 s	2	2	60 s	20 s
7	20 s	10 s	8 s	20 s	4	4	80 s	40 s
8	10 s	20 s	10 s	15 s	2	3	20 s	60 s
9	30 s	10 s	10 s	20 s	2	2	60 s	20 s
10	10 s	20 s	5 s	15 s	5	3	50 s	60 s
11	20 s	20 s	8 s	15 s	4	3	80 s	60 s

4.6 Configuración FIA para la cuantificación de polifenoles.

La configuración FIA utilizada para la determinación de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu se muestra en la Figura 23.

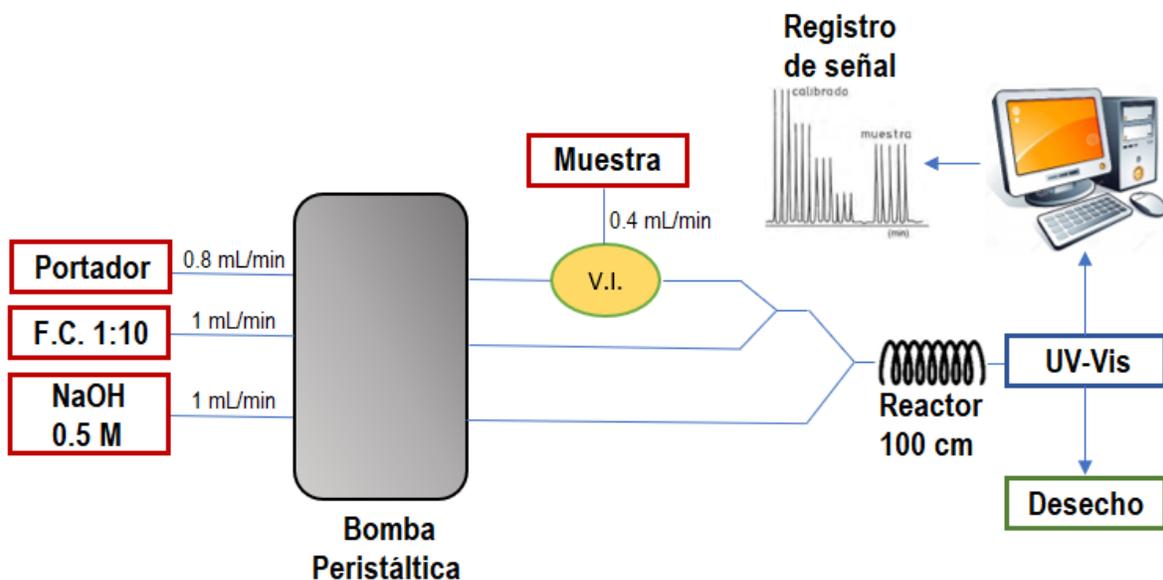


Figura 23. Configuración de Análisis por Inyección en Flujo para la cuantificación de polifenoles totales en gualumbos utilizando el método de Folin-Ciocalteu. V.I.: Válvula de inyección; F.C.: Reactivo de Folin-Ciocalteu.

Para hacer el análisis, la válvula de inyección se colocó en posición de llenado (Ver Figura 24) para poder llenar el bucle con la muestra.

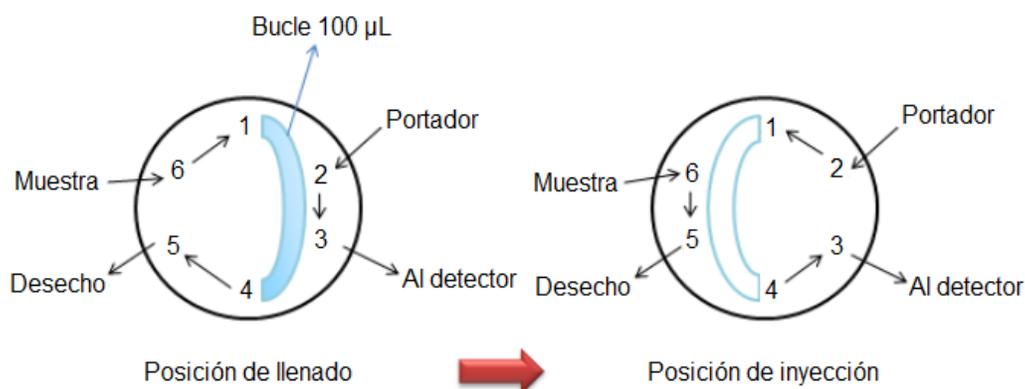


Figura 24. Diagrama de funcionamiento de la válvula de inyección para FIA.

Se inyectaron 100 μL del extracto (muestra) en un portador que en este caso fue agua destilada, para así poder confluir con el reactivo de Folin-Ciocalteu y después con una disolución de NaOH 0.5 M quien se encarga de establecer el pH básico necesario para que se lleve a cabo la reacción. Los tres fluidos (portador con la muestra, reactivo de Folin-Ciocalteu y NaOH 0.5 M) se acarrearán hasta el reactor, que consta de un tubo de politetrafluoroetileno de 100 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno enrollado a manera de serpentín, en donde el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los polifenoles dando como producto un complejo de color azul cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 730 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.8 Configuración FIA para la cuantificación de capacidad antioxidante

La configuración FIA para la cuantificación de la capacidad antioxidante en gualumbos se muestra en la Figura 25. Por medio de una bomba peristáltica y tuberías de teflón es como se impulsaron los reactivos (fluoresceína y AAPH), la muestra (antioxidantes) y SAF. En la configuración utilizada se tienen dos puntos de confluencia (A y B), en el primer punto (A), se mezcla la solución amortiguadora de fosfatos (SAF) con el antioxidante analizado (muestra), y en el segundo punto (B) confluye la mezcla anterior y fluoresceína con el reactivo inyectado, que en este caso se utiliza AAPH.

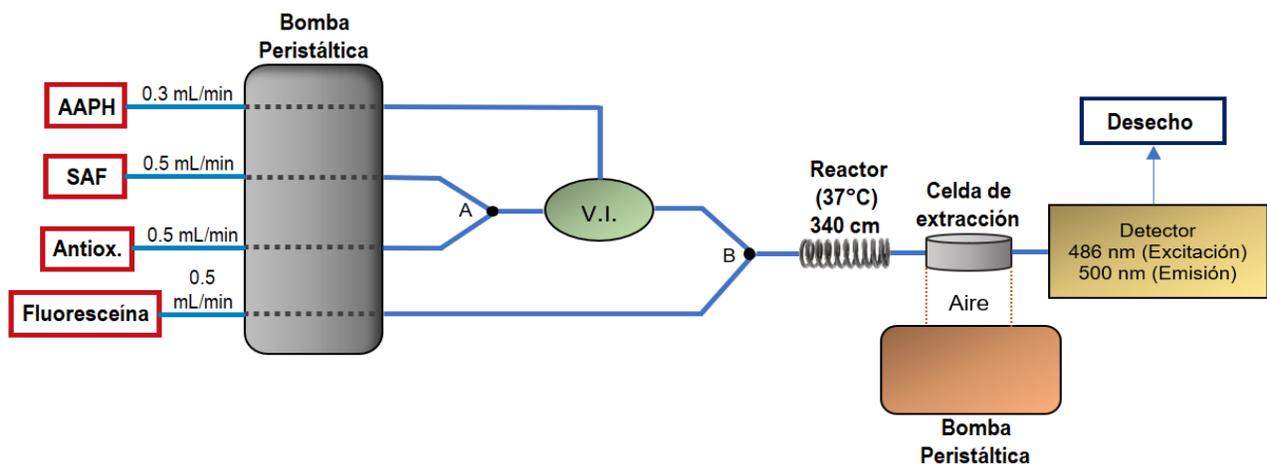


Figura 25. Configuración FIA utilizada para la cuantificación de la actividad antioxidante en gualumbos por el método de ORAC. V.I.: Válvula de inyección, A: Primer punto de confluencia, B: Segundo punto de confluencia.

La reacción se lleva a cabo en un reactor de 340 cm a 37°C, cuya temperatura se controla utilizando un baño de agua. La reacción pasa a través de una celda de extracción que se encuentra conectada a una segunda bomba peristáltica, en donde se tiene únicamente conectada una manguera que recircula aire (como se puede observar en la Figura 25), esto con la finalidad de evitar que entren microburbujas de nitrógeno gaseoso (desprendidas por la solución de AAPH al momento de formar el radical peróxido) en el detector y de esta forma se modifique la señal. La celda de extracción tiene una membrana de polietileno no permeable a las soluciones empleadas, pero sí a gases, y cuyo objetivo fue dividir la celda en dos partes: una parte superior y una inferior. En la parte superior se llevó a cabo la reacción entre la solución portadora y el bolo de inyección, y debido a que las microburbujas fueron permeables a la membrana, se eliminaron acarreándolas por una corriente de aire a un caudal de 0.25 mL/min por la parte inferior, para que de esta forma fueran expulsadas del sistema (Jiménez, 2019). Por último, el producto de reacción es medido con un detector de fluorescencia a 486 y 500 nm (longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente).

La señal obtenida es un pico que consta de una parte negativa. La señal negativa fue la parte central del análisis, ya que es en esta zona donde es posible cuantificar la capacidad antioxidante. Al introducir el antioxidante al sistema, la parte negativa del pico va disminuyendo a medida que se va aumentando la concentración del antioxidante.

4.9 Curvas de calibración.

Un procedimiento analítico muy utilizado en análisis cuantitativo es el llamado de calibración que implica la construcción de una “curva de calibración”, la cual es una representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. En la práctica para construir la curva de calibración se utilizan disoluciones que contienen concentraciones conocidas de analito, llamadas disoluciones patrón o estándar. Los estándares para construir la recta de calibrado deben ser preparadas en forma independiente, a partir de una o varias soluciones madre. En el procedimiento se compara una propiedad del analito con la de estándares de concentración conocida del mismo analito (o de algún otro con

propiedades muy similares a éste) (Dosal et al, 2008). Para la determinación de las curvas de calibración para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, se utilizó una disolución madre de ácido tánico y otra de ácido gálico, ambas con una concentración de 250 ppm, y a partir de estas disoluciones se prepararon estándares a diferentes concentraciones, desde 12.5 hasta 150 ppm. Los estándares se inyectaron por triplicado en el sistema FIA donde reaccionaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu y registrando las absorbancias por el detector a una longitud de onda de 730 nm.

En el caso de la curva para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC se preparó una disolución madre de Trolox con una concentración de 250 μM y a partir de ésta se prepararon estándares desde 1 a 7 μM para la determinación del intervalo lineal de la curva. Los estándares se inyectaron por triplicado en el sistema FIA para que se llevara a cabo la reacción y medir la capacidad antioxidante. La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó midiendo el área bajo la curva de los picos obtenidos en la fase negativa de la reacción, los cuales se transformaron en porcentajes de protección. El área bajo la curva correspondiente del blanco de reacción entre la fluoresceína y el AAPH sin utilizar el estándar Trolox indica que se tiene un 100% de reacción y 0% de protección, pero si se introduce al sistema el estándar de Trolox con concentraciones que van en aumento, dicho porcentaje de reacción va disminuyendo, mientras que el porcentaje de protección aumenta.

4.10 Determinación de interferentes en la cuantificación de polifenoles.

La reacción de Folin-Ciocalteu como ya se ha mencionado con anterioridad, presenta cierta desventaja en el momento de la cuantificación de polifenoles totales, ya que no es completamente específico con éstos debido a que se trata de una reacción de óxido reducción, por lo tanto, cualquier especie que se pueda oxidar tendrá reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, por ende especies como azúcares o aminoácidos pueden llegar a interferir en la reacción y cuantificarse como si se tratara de polifenoles. Por lo tanto, para determinar si los glucósidos unidos a los polifenoles; y las proteínas o aminoácidos presentes en las muestras de gualumbos interfieren de una manera representativa en la cuantificación de

polifenoles totales, se realizó una hidrólisis ácida y una electroforesis en gel de poliacrilamida.

4.10.1 Hidrólisis ácida.

Para poder separar el glucósido que se puede encontrar unido a los polifenoles, se realizó una hidrólisis ácida. En primer lugar, se preparó un extracto de la muestra utilizando 0.1 g de muestra seca con 10 mL de extractante MetOH-H₂O (50%), con esto se asegura que efectivamente se encuentran polifenoles en el extracto, ya que si se utiliza directamente la muestra con HCl, quizá no se extraigan polifenoles. La metodología empleada se basó en Vila, 1987. Se tomó una alícuota de 5.0 mL del extracto y se adicionó 5.0 mL de HCl 1.2 M y se colocó en reflujo durante 120 min a 80°C. Al finalizar se dejó enfriar para colocar el extracto después del reflujo en un embudo de separación con 5 mL de acetato de etilo (se hacen dos lavados ambos con 5 mL), donde la fase acuosa son los azúcares los cuales se neutralizaron hasta un pH de 6 – 7 con bicarbonato de sodio, mientras que, la fase orgánica contiene a los polifenoles, y finalmente éstos se colocan en otro embudo de separación para realizar un lavado por duplicado con 5 mL de agua destilada. Los extractos se enviaron a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) para un análisis de HPLC y determinar algunos de los polifenoles presentes antes y después de la hidrólisis ácida para así poder comparar si los glucósidos unidos a los polifenoles mediante un enlace O-glucosídico presentan una interferencia en su cuantificación. En la Figura 26 se muestra la metodología empleada resumida para la hidrólisis ácida.

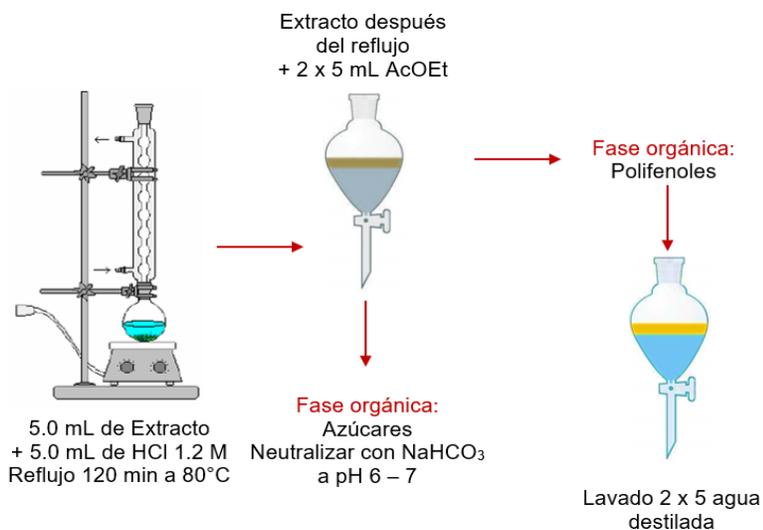


Figura 26. Metodología de hidrólisis ácida realizada para la separación de glucósidos unidos a los polifenoles en las muestras de gualumbos.

Para el análisis de HPLC se empleó un cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity con una columna Pursuit C18 (150 x 4.6 mm), con flujo de 1 mL/min. Utilizando como fase móvil CH₃COOH (0.2%) y acoplado con un detector de arreglo de diodos (DAD). Los análisis se realizaron en la USAII por el Dr. Víctor Zaldívar.

4.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La técnica de electroforesis en gel es un método para separar, identificar y purificar DNA, RNA o proteínas, entre las matrices más utilizadas se encuentra la de azarosa (para ácidos nucleicos) y la de poliacrilamida (para proteínas y ácidos nucleicos pequeños). El fenómeno denominado electroforesis sucede cuando una molécula con una carga neta en solución se desplaza por acción de un campo eléctrico; de esta manera la molécula migra hacia uno u otro electrodo según su carga: los aniones (-) irán hacia el ánodo (+), mientras que los cationes (+) van hacia el cátodo (-). En estas condiciones las moléculas disueltas migran a una velocidad proporcional a la relación carga-masa. Por lo tanto, la velocidad de migración en estas condiciones a través del campo eléctrico dependerá de: carga neta, tamaño y forma de la molécula, fuerza del campo eléctrico, fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio (Universidad Nacional de Quilmes, 2010). La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó en la USAII bajo la supervisión del Dr. Jorge Herrera y utilizando la metodología descrita en Herrera et al, 2018.

- a) Preparación de la muestra: Se hizo el análisis utilizando únicamente la muestra de gualumbos provenientes de *Agave salmiana*: cruda o húmeda (sin ningún tratamiento), muestra seca (a 100°C por 6 horas) y el extracto concentrado a 2 mL (con y sin la adición de los reactivos de Carrez). Se pesó 1 gramo de la muestra húmeda y 0.5 gramos de la muestra seca. Para todos los análisis en el gel (muestra cruda, seca y extractos) se siguió el mismo procedimiento: se agregó 6 mL de fenol pH 8.8 y 5 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-mercaptoetanol) en un tubo de centrifuga, se aplicaron 5 pulsos de 1 minuto en el Politrón alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos se mantuvo en hielo 10 minutos más y se centrifugó a 4000

rpm durante 30 min, se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo de centrífuga de 50 mL nuevo y se agregaron 25 mL de MetOH-AcONH₄, se agitó y se dejó reposar durante 16 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 400 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 5 mL de MetOH-AcONH₄ dos veces y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min después de cada lavado, posteriormente se lavó de igual manera la pastilla con acetona al 80% dos veces y un último lavado con etanol al 70%, la pastilla se resuspendió en 500 µL de buffer desnaturizante IEF (8 M urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 2% tritón X 100 y 50 mM DTT). Posteriormente se analizó la integridad de la proteína en un gel de SDS-PAGE 1D.

- b) Preparación de geles: Existen dos sistemas de electroforesis en gel de poliacrilamida con base a los buffers que se utilizan: sistema continuo y discontinuo. En este caso se utilizó un sistema discontinuo, es decir, consta de dos tipos de geles, un gel concentrador con un tamaño de poro no restrictivo (grande) que se forma sobre un segundo gel llamado separador. En este sistema cada uno de los geles se prepara con soluciones buffer de diferente pH y fuerza iónica, mientras que, el buffer de la electroforesis es un tercer tipo de tampón. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles. Para la elaboración de los geles se siguió la formulación de la Tabla 5.

Tabla 5. Formulación de geles: concentrador y separador para la elaboración de la electroforesis. Solución I y II (Ver texto).

GEL CONCENTRADOR		GEL SEPARADOR	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
H ₂ O destilada	1.6 mL	H ₂ O destilada	0.9 mL
Solución I	0.83 mL	Solución II	5.4 mL
Solución III	2.5 mL	Solución I	4.6 mL
TEMED	10 µL	TEMED	10 µL
APS	100 µL	APS	100 µL

Para elaborar el gel de acrilamida se prepararon tres soluciones: la solución I es una solución concentrada de acrilamida al 30% (p/v) y bis-acrilamida al 0.8% (p/v) en agua bidestilada. La solución II es una solución

de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la solución I para obtener la concentración del gel separador, cuya función es separar las proteínas por peso molecular. La solución III es una solución de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10% (p/v) en agua bidestilada, que se le agrega a la solución I para obtener el gel concentrador cuya función es concentrar rápidamente las proteínas que vienen de la muestra. Se añaden también 0.05% de APS y 0.005% de TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización (en presencia de radicales libres, que son proporcionados por el persulfato de amonio (APS) y estabilizados por el TEMED, se genera una reacción en cadena que se inicia con monómeros de acrilamida que polimeriza en largas cadenas que son entrecruzadas con la bis-acrilamida para formar la matriz del gel). Las soluciones se transfieren a la cámara de polimerización con un estándar de marcador de peso molecular como referencia y 1 µg de lisozima como referencia de cantidad de proteína. Se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% a 70V por 2.5 horas. Posteriormente se desmontó el gel y con mucho cuidado se colocó en una solución de Coomassie coloidal.

NOTA: La acrilamida y bis-acrilamida son agentes neurotóxicos que se absorben a través de la piel. Es necesario llevar guantes durante todo el proceso, incluso después de polimerizar el gel, ya que puede contener cantidades de material no polimerizado. La polimerización comienza en el momento en que se añade el TEMED, por lo tanto, se debe trabajar con rapidez a partir de este momento.

- c) Tinción con Coomassie coloidal: Finalizada la electroforesis, se realizó un primer paso de fijación, incubando el gel en una solución de MetOH-H₂O 50% durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Después, se retiró la solución de fijación y se incubó el gel en solución de tinción (8% p/v sulfato amónico, 2% ácido fosfórico y 20% etanol y 0.1% de azul de coomassie G-250) durante al menos 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente se destiñó el gel con agua bidestilada hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de manchas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Curvas de calibración: Cuantificación de polifenoles.

Las curvas de calibración y las mediciones de la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu se realizaron a 730 nm debido a que esta es la longitud de onda donde se obtiene una absorbancia máxima. El espectro de absorción UV-Vis del producto de reacción entre los analitos (ácido gálico y ácido tánico) y el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico (NaOH 0.5 M) se realizó previamente en nuestro grupo de trabajo en Escutia, 2011.

El registro de las absorbancias para cada estándar de ácido gálico y ácido tánico en la elaboración de las curvas de calibración se muestran en los diagramas de los Gráficos 2 y 3, mientras que, las curvas de calibración de ácido gálico y ácido tánico se muestran en el Gráfico 4. En la Tabla 6 se presentan los parámetros estadísticos obtenidos en las curvas de calibración tanto de ácido tánico como de ácido gálico.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se estimaron considerando el error de la regresión lineal ($S_{y/x}$), y la pendiente de la curva de calibración. Para el caso del LD se multiplicó 3.3 veces $S_{y/x}$ y se dividió entre la pendiente, mientras que, para el LC se multiplicó 10 veces $S_{y/x}$ y se dividió también entre la pendiente. (García et al, 2002).

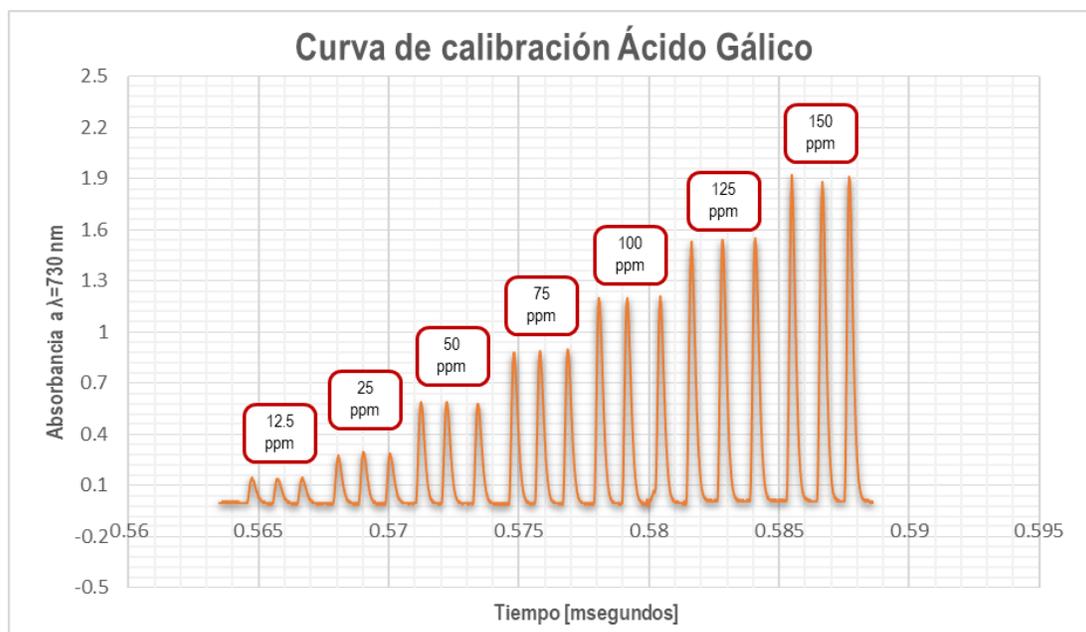


Gráfico 2. Diagrama de estándares de ácido gálico.

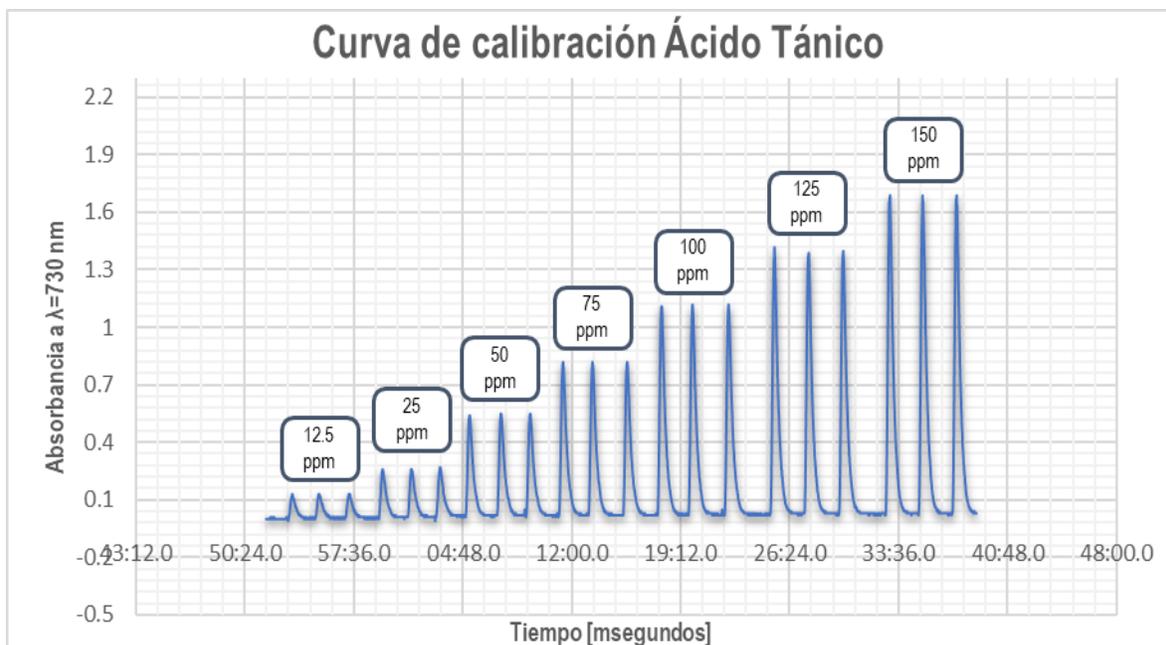


Gráfico 3. Diagrama de estándares de ácido tánico.

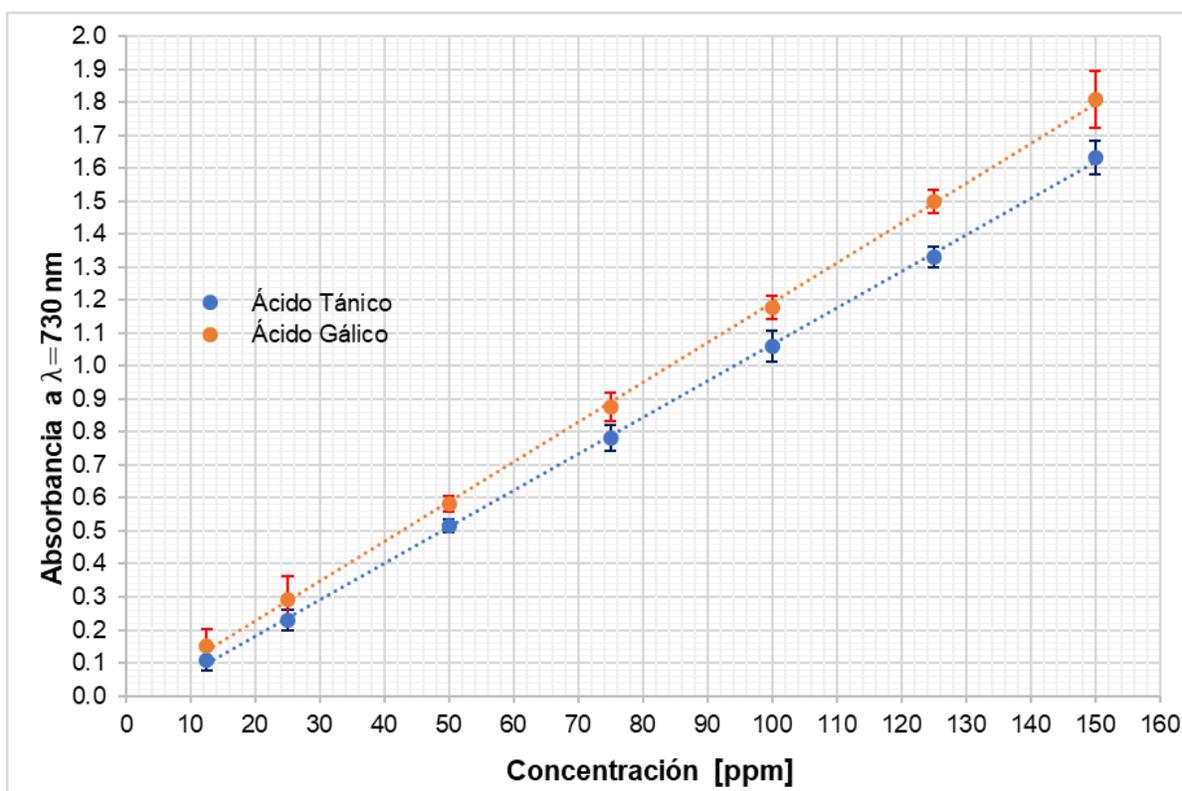


Gráfico 4. Curva de calibración: Ácido tánico y Ácido gálico.

Tabla 6. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración para la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA.

Estándar	Pendiente	Ordenada al origen	R ²	LD	LC	Intervalo lineal
Ácido Tánico	0.0109 ± 0.0001	-0.0408 ± 0.0084	0.9997	3.53 ppm	10.69 ppm	12.5 – 150 ppm
Ácido Gálico	0.0121 ± 0.0001	-0.0130 ± 0.7190	0.9996	3.77 ppm	11.42 ppm	12.5 – 150 ppm

5.2 Evaluación del método de extracción por agitación manual.

La extracción por agitación manual se realizó utilizando como extractante MetOH-H₂O (60%) utilizando muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.* Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados obtenidos de extracción por agitación manual con MetOH-H₂O (60%) en muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.*

Muestra de gualumbos	[Polifenoles Totales]	
	mg ácido tánico/g muestra	mg ácido gálico/g muestra
<i>Agave spp.</i>	0.8280 ± 0.0247	0.7024 ± 0.0217

Para el caso de la extracción con agitación manual, al ser un menor tiempo de extracción (6 minutos en total, considerando la metodología descrita en el inciso b del punto 4.4.2) se decidió emplear como extractante al MetOH-H₂O (60%) para lograr una mejor extracción, aumentando 10% la cantidad de metanol, además esta metodología se emplea comúnmente para la extracción de polifenoles en aceites añadiendo hexano para poder disolver la muestra, pero en el caso de la extracción en gualumbos, no fue necesario el adicionar dicho disolvente, ya que la cantidad de aceite en la muestra no se encuentra en gran proporción. Sin embargo, a pesar de aumentar la cantidad de metanol, no se logró una mejoría en el rendimiento de extracción de los compuestos polifenólicos.

Es por esta razón, que para este método de extracción no se desarrolló un diseño de experimentos, ya que la cantidad de polifenoles totales extraídos son menores, siendo éste un proceso de extracción con poca eficiencia en comparación con los otros dos métodos de extracción utilizados en las muestras,

por esta misma razón, ya no se continuó utilizando este método de extracción, ya que se redujo la cantidad de polifenoles totales.

5.3 Evaluación del método de extracción por agitación magnética.

5.3.1 Estudios preliminares para la muestra de *Agave spp.*

Los resultados obtenidos en la extracción por agitación magnética a temperatura ambiente y con calentamiento (50°C) empleando la muestra húmeda y muestra seca de los gualumbos *Agave spp.* se presentan en la Tabla 8 expresados como mg de ácido tánico o ácido gálico por gramo de muestra.

Tabla 8. Resultados de extracción de polifenoles por agitación magnética empleando distintos extractantes y utilizando muestra húmeda y seca de gualumbos *Agave spp.*

Extractante	Temperatura	Tiempo [min]	mg ácido tánico/g muestra	mg ácido gálico/g muestra
MUESTRA HÚMEDA <i>Agave spp.</i>				
Agua destilada	Ambiente	60	1.13 ± 0.06	0.96 ± 0.09
	Ambiente	30	1.09 ± 0.07	0.93 ± 0.12
	50°C	60	1.14 ± 0.09	0.97 ± 0.16
	50°C	30	1.14 ± 0.08	0.97 ± 0.13
Amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 10	Ambiente	60	1.25 ± 0.06	1.07 ± 0.09
	Ambiente	30	1.20 ± 0.08	1.03 ± 0.13
	50°C	60	1.18 ± 0.10	1.01 ± 0.17
	50°C	30	1.13 ± 0.11	0.97 ± 0.18
MetOH-H₂O (50%)	Ambiente	60	1.22 ± 0.08	1.04 ± 0.14
	Ambiente	30	1.09 ± 0.09	0.94 ± 0.15
	50°C	60	1.29 ± 0.07	1.12 ± 0.12
	50°C	30	1.23 ± 0.09	1.06 ± 0.14
MUESTRA SECA <i>Agave spp.</i>				
MetOH-H₂O (50%)	Ambiente	60	17.04 ± 0.42	13.90 ± 0.58
	Ambiente	30	20.20 ± 0.23	16.69 ± 0.29
	50°C	60	14.25 ± 0.43	11.38 ± 0.64
	50°C	30	22.56 ± 0.13	18.71 ± 0.21

El método de extracción se considera uno de los pasos más importantes para el tratamiento de la muestra, pues influye directamente en la determinación cuantitativa del extracto. Mientras que, el objetivo de la extracción es el poder remover los compuestos de interés, en este caso, los compuestos fenólicos

presentes en el material vegetal (gualumbos) y así poder obtener una solución rica en dichos metabolitos.

Como se puede observar en la tabla anterior, en la muestra húmeda la cantidad de polifenoles totales no varía demasiado, es decir, no existe una diferencia significativa con los distintos extractantes empleados, sin embargo, se decidió emplear como extractante al MetOH-H₂O (50%) debido a que, con éste fue con quien se logró una mejor extracción de compuestos fenólicos en los gualumbos provenientes de *Agave spp.*

Por otro lado, la humedad es efectivamente un factor que interviene en la extracción de polifenoles. La humedad de la muestra de gualumbo *Agave spp.* fue de $96.65 \pm 0.58\%$, al ser una flor es evidente que presenta en su composición mayormente agua, por lo tanto, ésta influye directamente con la cuantificación. Esto se debe evidentemente a que al secar la muestra, se obtiene una mayor cantidad de materia seca y a pesar de que para la extracción con la muestra húmeda se ocupa una mayor cantidad de muestra (≈ 1 g) en comparación con la que se ocupa para extracción con la muestra seca (≈ 0.2 g) en ésta se tiene una mayor cantidad de analito, y el agua ya no interfiere en la cuantificación.

Por otra parte, se puede notar que los valores también varían dependiendo del estándar que se use, en este caso, la cantidad de polifenoles totales cuando se expresan como ácido tánico/g de muestra es mayor en comparación con las concentraciones expresadas como ácido gálico/g de muestra, sin embargo, no significa que tengan una mayor cantidad de polifenoles con ácido tánico, ya que sólo varía la forma en la que se expresa pero la absorbancia en el extracto es la misma en ambos casos. No obstante, la curva de calibración con ácido gálico presentó una pendiente mayor (como se puede observar en la Tabla 6 y Figura 27) en comparación con la curva de calibración de ácido tánico, lo que significa que tiene una mayor sensibilidad la curva con ácido gálico y por esta razón es que se decidió realizar la optimización del método de extracción con las concentraciones de polifenoles totales expresados como ácido gálico/g de muestra, además de que en la literatura se encuentran mayormente expresados las concentraciones de polifenoles totales de esta manera.

La cantidad de polifenoles totales en la muestra de gualumbos es mayor en comparación a la cantidad de polifenoles en otras verduras tales como tomate (3.988 ± 1.3 mg ácido gálico/g muestra seca), coliflor (4.408 ± 1.8 mg ácido gálico/g muestra seca), betabel (3.076 ± 1.5 mg ácido gálico/ g muestra seca), entre otros que se han reportado en la literatura (Zapata et al, 2014), sin embargo, su concentración depende del método de extracción y extractante utilizado, por lo que no es posible realizar una comparación exacta, pero sí una relación entre las muestras.

5.3.1.1 Optimización de las condiciones de extracción por agitación magnética con un diseño factorial completo 2^2 .

La optimización de extracción del método por agitación magnética se realiza para determinar las mejores condiciones para extraer una mayor cantidad de polifenoles totales en los gualumbos. Con base en los resultados obtenidos en la Tabla 8, se desarrolló un diseño de experimentos tanto para la muestra húmeda como la muestra seca con ayuda del programa estadístico Statgraphics y utilizando el diseño factorial mencionado en la Tabla 3, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 9. El diseño se realizó utilizando MetOH-H₂O (50%) y expresando los resultados en mg de ácido gálico/g de muestra.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA) generado por el diseño de experimentos utilizando la muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.* se presentan en la Tabla 10. Además en los Gráficos 5 y 6 se muestran el diagrama de Pareto y los efectos de los parámetros de extracción respectivamente.

Por otro lado, los resultados del análisis de varianza para la muestra seca se muestra en la Tabla 11, y en los Gráficos 7 y 8 se presentan el diagrama de Pareto y los efectos de los parámetros de extracción, respectivamente.

Las condiciones óptimas obtenidas en los diseños de experimentos se utilizaron para la extracción de polifenoles en las demás muestras de gualumbos (*Agave salmiana.*).

Tabla 9. Resultados obtenidos en el diseño factorial completo 2^2 por agitación magnética utilizando muestra húmeda y muestra seca de gualumbos *Agave spp.*

Experimento	mg ácido gálico/g muestra	
	Muestra Húmeda	Muestra Seca
1	1.06	18.71
2	1.04	13.90
3	1.05	16.96
4	1.03	17.01
5	1.05	16.95
6	0.94	16.69
7	1.12	11.38

Tabla 10. ANOVA obtenido en el diseño factorial completo 2^2 empleando la extracción por agitación magnética con muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.*

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0.01	1	0.01	105.00	0.0020
B: Tiempo	0.0064	1	0.0064	67.20	0.0038
AB	0.0004	1	0.0004	4.20	0.1328
Error total	0.000285714	3	0.0000952381		
Total	0.0170857	6			

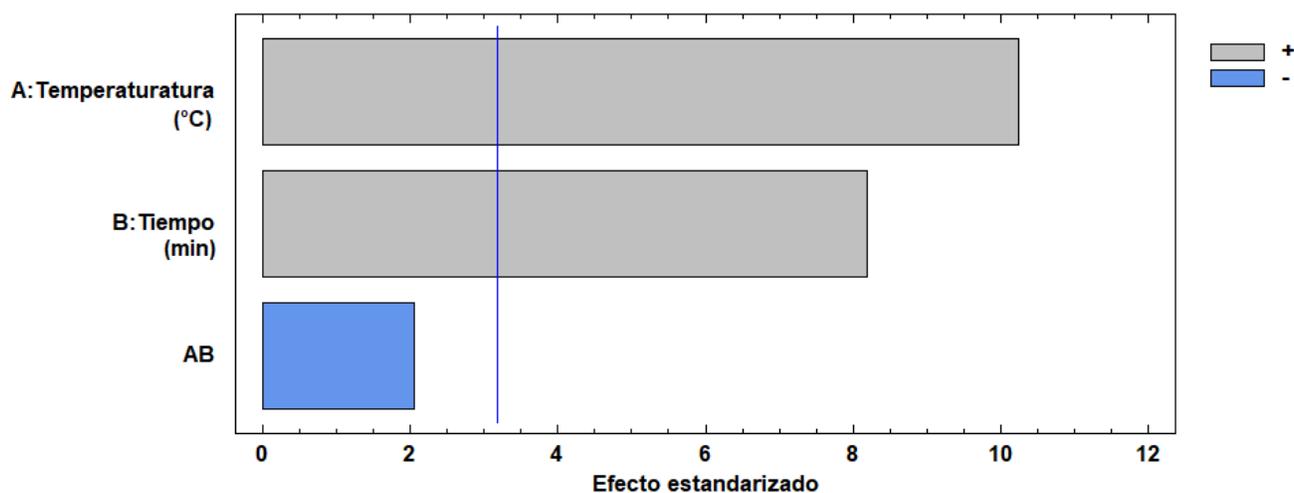
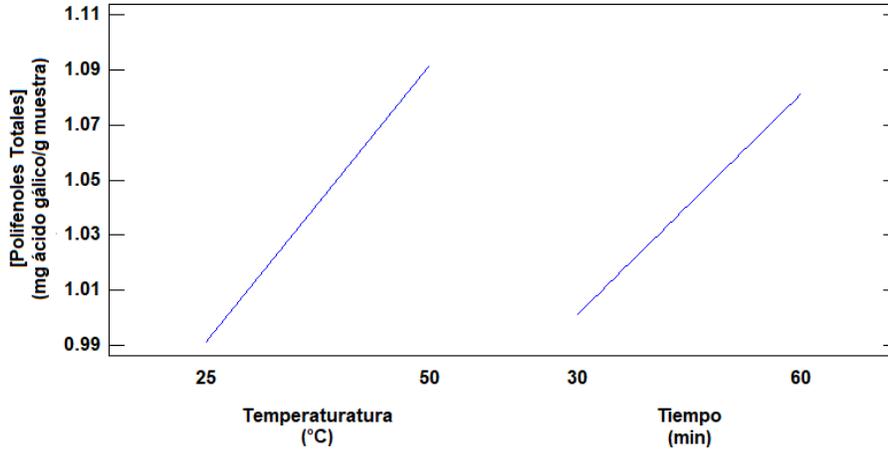


Gráfico 5. Diagrama de Pareto obtenido en el diseño de experimentos empleando la extracción por agitación magnética y calentamiento con muestra húmeda de gualumbos.



Factor	Valor Bajo	Valor Alto	Valor óptimo
Temperatura (°C)	25.0	50.0	50.0
Tiempo (min)	30.0	60.0	60.0

Gráfico 6. Efecto de los factores en la extracción de polifenoles totales por el método de agitación magnética y valores óptimos de extracción utilizando muestra húmeda de gualumbos.

Las pruebas de significación estadística sirven para comparar variables entre distintas muestras. Es muy importante tener en cuenta que en estas pruebas siempre se plantea la hipótesis nula “H₀” (no hay diferencias significativas entre los estadísticos de las muestras comparadas), y la hipótesis alterna “H₁” (hay diferencias significativas). Se obtiene mucha información cuando se puede rechazar la hipótesis nula, ya que ésto significa que los estadísticos de las muestras que se comparan son diferentes entre sí con una probabilidad mayor del 95%. Si no se puede rechazar la hipótesis nula (Valor-P > 0.05) se pierde mucha información, ya que no se puede decir que sean iguales, ni que sean diferentes porque la probabilidad es menor del 95%. (Gómez et al, 2001)

Por lo tanto, como se puede observar en la Tabla 10, el Valor-P (nivel de significancia más bajo en el que el valor observado de la estadística de prueba es significativo, es decir, el mínimo nivel de significancia en el cual H₀ es rechazada) es menor a 0.05, lo que implica que la hipótesis nula se rechaza significando entonces, que sí existe una diferencia significativa entre los factores considerados durante la extracción, en este caso temperatura y tiempo.

Además en los Gráficos 5 y 6 se puede apreciar el efecto de dichos factores sobre la extracción utilizada en la muestra húmeda, teniendo ambas un efecto positivo en la extracción de polifenoles totales en la muestra de gualumbos: A una mayor temperatura (que en este caso se consideró hasta 50°C ya que si se incrementa más la temperatura podría ocasionar la descomposición de los polifenoles y afectar la extracción de éstos en la muestra); y a un mayor tiempo de extracción, se logra obtener una mayor cantidad de los compuestos de interés en el extracto para así poder ser cuantificados utilizando el método de Folin-Ciocalteu por FIA.

Lo que nos lleva a considerar que las condiciones óptimas de extracción de polifenoles totales en la muestra húmeda de gualumbos empleando el método de agitación magnética y calentamiento es **a temperaturas altas y tiempos largos (50°C durante 60 minutos)** (Ver Gráfico 6).

Para la muestra seca, como se puede observar en la Tabla 11, el Valor-P del factor tiempo, es menor a 0.05 lo que significa que se rechaza la hipótesis y existe diferencia significativa en este factor, mientras que, la temperatura sigue sin presentar diferencias significativas en la extracción. En los Gráficos 7 y 8 se presentan los efectos de los factores tiempo y temperatura en la extracción, en donde éstos presentan un efecto negativo a un mayor valor (60 min y 50°C respectivamente). Sin embargo, en la temperatura no se observa una diferencia significativa pero sí se logra extraer mayor cantidad de polifenoles totales a una mayor temperatura por lo que se considera como el valor óptimo. Mientras que, el tiempo si presenta diferencia, en donde a un menor tiempo se logra extraer una mayor cantidad de polifenoles totales en la muestra seca de gualumbos.

Tabla 11. ANOVA obtenido en el diseño factorial completo 2² empleando la extracción por agitación magnética con muestra seca de gualumbos *Agave spp.*

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	0.0625	1	0.0625	0.03	0.8664
B: Tiempo	25.6036	1	25.6036	13.72	0.0342
AB	5.1529	1	5.1529	2.76	0.1951
Error total	5.59717	3	1.86572		
Total	36.4162	6			

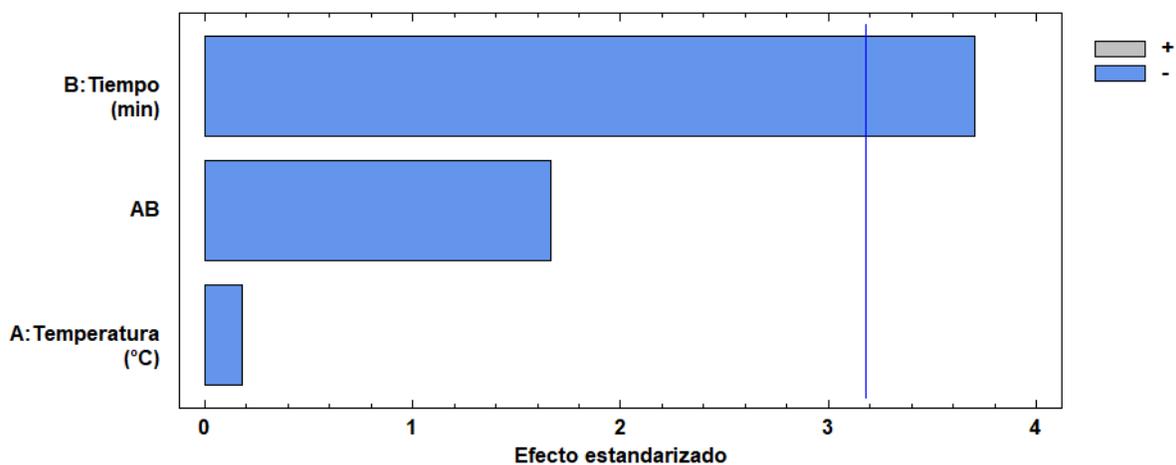
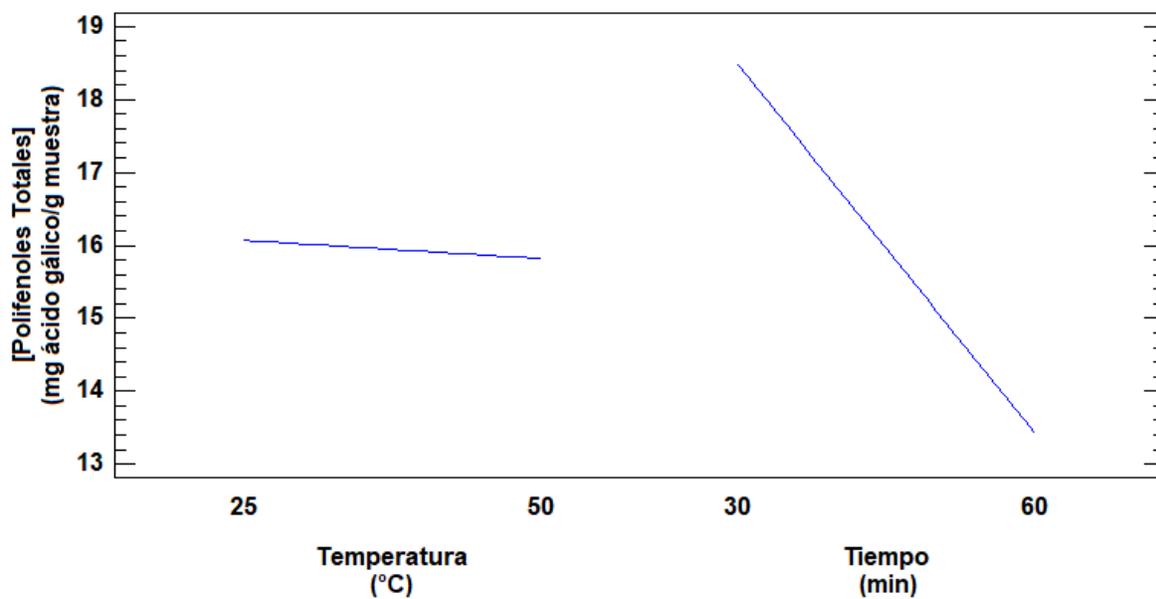


Gráfico 7. Diagrama de Pareto obtenido en el diseño de experimentos empleando la extracción por agitación magnética con muestra seca de gualumbos.



Factor	Valor Bajo	Valor Alto	Valor óptimo
Temperatura (°C)	25.0	50.0	50.0
Tiempo (min)	30.0	60.0	30.0

Gráfico 8. Efecto de los factores en la extracción de polifenoles totales por el método de agitación magnética y calentamiento y valores óptimos de extracción utilizando muestra seca de gualumbos.

Con base en lo anterior, se considera que las condiciones óptimas de extracción de polifenoles totales para la muestra seca de gualumbos empleando el método de agitación magnética es: **temperatura de 50°C durante 30 minutos.**

Por ende, en ambos casos (utilizando muestra húmeda y muestra seca), el calentamiento presenta un efecto positivo para la extracción, sin embargo, el tiempo sólo influye con la muestra seca, ya que en la muestra húmeda no presentó diferencia significativa.

En la muestra húmeda se tiene una mejor extracción cuando se deja por mayor tiempo (60 minutos) y esto se debe a que la muestra húmeda presenta una mayor cantidad de agua, la cual influye en la extracción, por lo que al tener una mayor temperatura por un mayor tiempo, se logra perder alguna parte del agua presente en la muestra, lo que genera que haya un mejor contacto entre la muestra y el extractante aumentando entonces la eficiencia en la extracción, mientras que, en la muestra seca, ya no es necesaria la eliminación de agua, por lo tanto, un menor tiempo de extracción es suficiente para lograr extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra de gualumbos.

5.3.2 Extracción de polifenoles de *Agave salmiana* por agitación magnética.

Esta variedad de gualumbos es la que generalmente se cocina en distintos estados del país, ya que proviene justamente del maguey pulquero, por lo tanto, se estudió esta muestra encontrándose en un estado de maduración verde (como comúnmente se cocina) y maduro, tal como se muestran en la Figura 22 mencionada anteriormente.

Al realizar la extracción utilizando el método de agitación magnética con esta muestra de gualumbos, el extracto presentó turbidez, lo cual no sucedió con la muestra de gualumbos *Agave spp.* y al ser una determinación espectrofotométrica, éste es un factor que se debe de considerar, ya que presenta interferencias en el momento de la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA, por lo que fue necesario realizar un procedimiento extra.

En este caso, se empleó el método de Carrez para la clarificación del extracto, el uso de los reactivos de Carrez permite la precipitación de proteínas, polisacáridos y otros compuestos coloidales que se encuentren en el extracto y de esta manera permite la clarificación del mismo. En la Figura 27 se muestra el extracto antes y después de aplicar el método de Carrez.

Del mismo modo que en la muestra de gualumbos *Agave spp.* se determinó la humedad presente en la muestra y se determinó la cantidad de polifenoles tanto con muestra húmeda como con la muestra seca, en ambos estados de maduración. La humedad obtenida en la muestra verde de gualumbos *Agave salmiana* fue de $90.59 \pm 0.65\%$ mientras que, en la muestra madura fue de $92.10 \pm 0.65\%$.

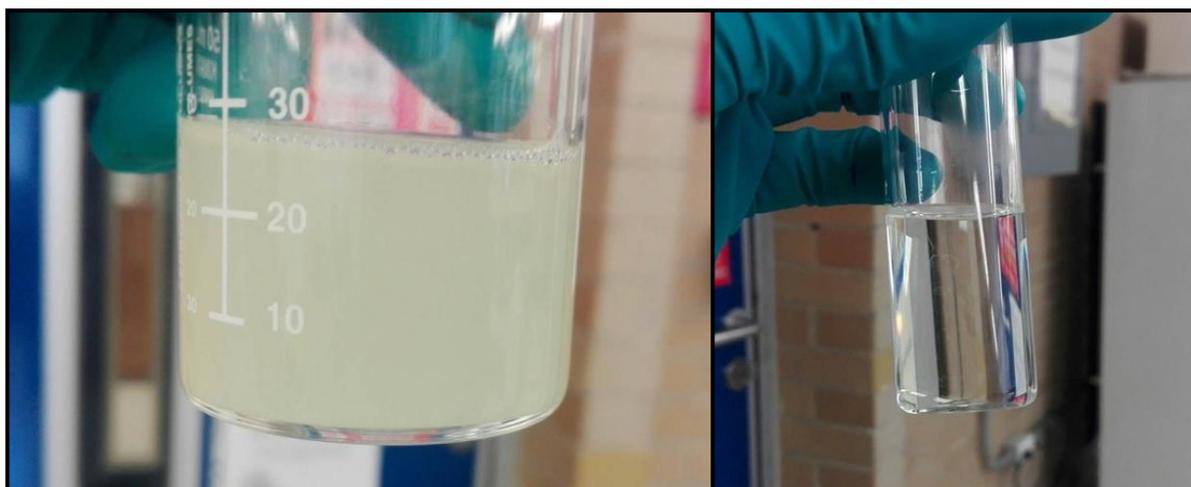


Figura 27. Extracto de gualumbos *Agave salmiana* por agitación magnética. Lado izquierdo: extracto antes de la adición de los reactivos de Carrez. Lado derecho: extracto después de la adición de los reactivos de Carrez.

5.3.2.1 Cuantificación de polifenoles totales antes y después de utilizar los reactivos de Carrez.

Se determinó la cantidad de polifenoles totales en la muestra de gualumbos *Agave salmiana* con y sin la adición de los reactivos de Carrez para así poder comprobar qué tanto influye la turbidez del extracto en la cuantificación.

Los resultados obtenidos y comparación de resultados se pueden observar en el Gráfico 9.

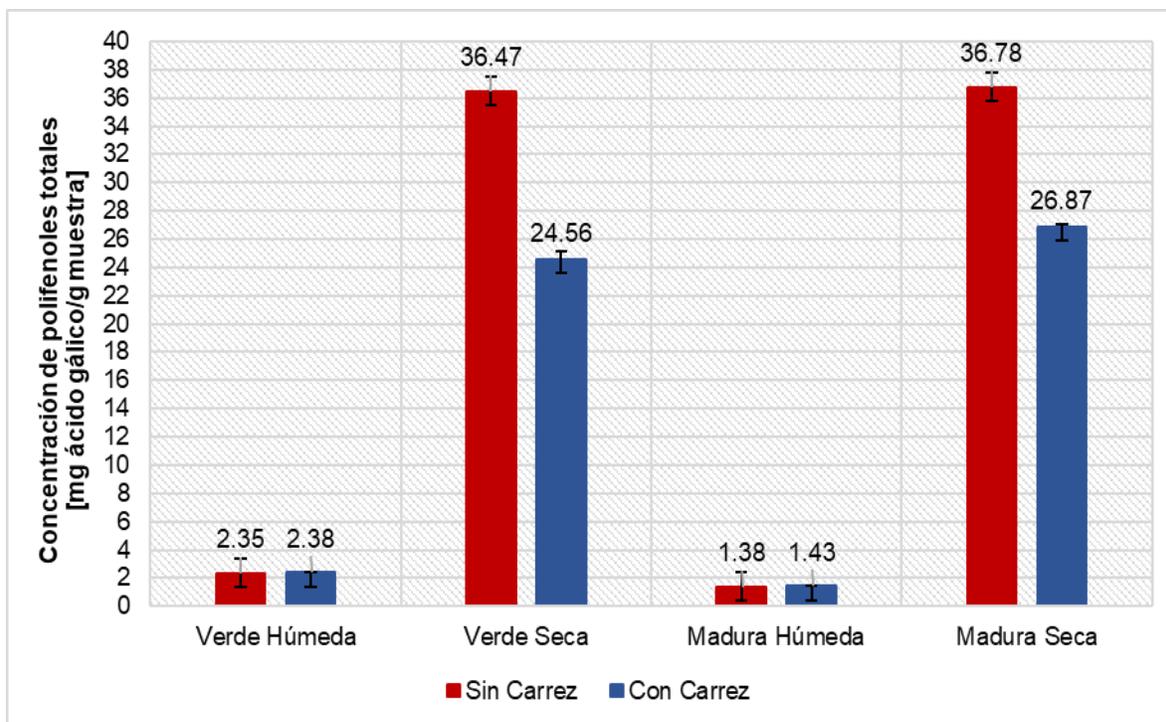


Gráfico 9. Comparación de resultados obtenidos tras la adición de los reactivos de Carrez en la determinación de polifenoles totales en gualumbos *Agave salmiana*.

La turbidez es básicamente una medida del grado en el cual una sustancia pierde su transparencia debido a la presencia de partículas en suspensión. En el caso de las muestras de gualumbos *Agave salmiana*, se presentó esta turbidez debido a que son más pequeñas en tamaño y más blandas en comparación con la muestra de gualumbos *Agave spp.*, por lo que al momento de su trituración, quedaron pequeñas partículas en suspensión a pesar de llevarse a cabo una filtración del extracto, generando entonces la turbidez.

Como se logra observar en el Gráfico 9, la adición de los reactivos de Carrez sí genera un cambio en la cuantificación de polifenoles totales en las muestras, ya que logra eliminar la turbidez del extracto. Sin embargo, en la muestra húmeda, tanto en el estado verde como en el maduro, no existe una diferencia significativa al adicionar los reactivos de Carrez, lo cual se puede comprobar observando el Gráfico 9, en donde los extractos con Carrez entran dentro de los valores obtenidos (considerando las desviaciones estándar) en los extractos sin la adición de los reactivos de Carrez. Esto se debe posiblemente a la

cantidad de agua que presenta la muestra, ya que como se ha mencionado anteriormente, ésta genera cierta interferencia impidiendo extraer mayor cantidad de polifenoles dentro de la muestra, así como otras interferencias.

Por otro lado en las muestras secas, tanto verdes como maduras, a diferencia de las muestras húmedas, sí se tiene una diferencia significativa al adicionar los reactivos de Carrez en el extracto, ya que se disminuye la cuantificación en un 30% aproximadamente en ambas muestras (32.66% y 26.94% en muestra verde y madura respectivamente). Este porcentaje de disminución en la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA, representa la interferencia de la turbidez en el extracto.

Con base en los resultados obtenidos, es importante considerar esta turbidez en la cuantificación para no obtener resultados erróneos.

5.3.3 Concentración de polifenoles totales en gualumbos de *Agave spp.* y *Agave salmiana* por el método de agitación magnética.

Los resultados obtenidos de polifenoles totales empleando una extracción por agitación magnética y calentamiento se muestran en la Tabla 12.

Para hacer comparable los resultados, en la muestra de gualumbos *Agave spp.* también se le aplicó el método de Carrez, esta muestra no presentó turbidez al momento de obtener el extracto, pero es importante recordar que la adición de los reactivos de Carrez además pueden precipitar las proteínas y polisacáridos presentes en la muestra, los cuales pueden interferir durante la cuantificación, ya que son agentes reductores que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu y cuantificarse como si se tratara de polifenoles totales, cuando no es así.

Los resultados son de la extracción con MetOH-H₂O (50%) utilizando la muestra seca (ya que con ésta se logra extraer mejor los compuestos fenólicos) y empleando las condiciones óptimas de extracción mencionadas anteriormente.

Tabla 12. Resultados obtenidos de polifenoles totales en las muestras secas de gualumbos mediante la extracción de agitación magnética.

Muestra seca de gualumbos	Polifenoles Totales [mg ácido gálico/g muestra]
<i>Agave spp.</i>	18.71 ± 0.21
<i>Agave salmiana</i> (Verde)	24.56 ± 0.59
<i>Agave salmiana</i> (Madura)	26.87 ± 0.14

Como se puede observar en la Tabla 12, sí existe una diferencia significativa de polifenoles totales entre las muestras de gualumbos, ya que los gualumbos provenientes de *Agave spp.* presentan una menor cantidad de éstos en comparación con los gualumbos provenientes de *Agave salmiana.*, sin embargo, entre esta misma muestra, se tiene de igual forma una diferencia entre el estado de maduración, ya que en el estado verde presenta una menor cantidad de compuestos fenólicos en comparación con la muestra madura. A pesar de que no se cuenta con información sobre la composición de los gualumbos, algo que sí se sabe es que se recomienda más comerlos cuando se tiene un estado de maduración más verde, ya que si se preparan con la muestra madura, el guiso presenta un sabor más amargo. Esto se puede atribuir a que la muestra madura presenta una mayor cantidad de polifenoles totales y entre estos compuestos polifenólicos se encuentran los taninos, lo cual se puede ver reflejado en el sabor de éstos. Los compuestos fenólicos son los principales responsables de la astringencia y del sabor amargo en la mayor parte de alimentos y bebidas, (Zamora et al, 2014) y como claro ejemplo de esto se tiene al vino.

5.4 Evaluación del método de extracción por ultrasonido.

5.4.1 *Agave spp.*

Otro método de extracción utilizado fue el de ultrasonido. Se realizó de igual manera empleando como extractante MetOH-H₂O (50%) y la muestra húmeda y seca. Para la extracción con ultrasonido se realizó una serie de determinaciones (tanto con la muestra húmeda como la muestra seca) modificando la potencia total de la sonda de ultrasonido para realizar el diseño con la potencia óptima.

5.4.1.1 Optimización de las condiciones de extracción por ultrasonido con un diseño factorial completo 2³.

Se realizó un diseño de experimentos empleando como variables el tiempo de irradiación, tiempo de no irradiación y el número de ciclos para conocer cómo era que estos influían en la extracción de polifenoles totales en las muestras, para ello se utilizó el diseño de experimentos descrito en la Tabla 4. Los resultados obtenidos en el diseño de experimentos para la muestra húmeda y la muestra seca se muestran en la Tabla 13. Para éstos se consideró de igual manera como factor de respuesta la concentración de polifenoles totales expresados como mg de ácido gálico por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos en el diseño de experimentos empleando la muestra húmeda y seca de gualumbos *Agave spp.* se muestran en el Grafico 10, además en el Gráfico 11 se muestra el diagrama de Pareto y en el Gráfico 12 las condiciones óptimas de extracción. Estos mismos resultados de la muestra seca se presentan en los Gráficos 13, 14 y 15 respectivamente.

Tabla 13. Resultados obtenidos en el diseño factorial completo 2³ por ultrasonido utilizando muestra húmeda y muestra seca de gualumbos *Agave spp.*

Experimento	[Polifenoles totales]	
	mg ácido gálico/g muestra	
	Muestra Húmeda	Muestra Seca
1	1.11	13.83
2	1.03	12.96
3	1.08	12.51
4	1.04	9.90
5	1.09	14.76
6	1.08	12.09
7	1.10	11.17
8	1.08	12.36
9	1.13	11.91
10	1.11	11.89
11	1.12	12.88

Con el método de ultrasonido la extracción de polifenoles totales en la muestra tanto húmeda como seca, disminuye en comparación con el método por agitación magnética como se puede observar en la Tabla 13. El hecho de que utilizando el método de extracción por ultrasonido se obtenga una menor cantidad

de polifenoles totales con respecto a los obtenidos utilizando el método de agitación magnética, se puede deber a que el ultrasonido genera un proceso oxidativo que además, provoca un calentamiento en la muestra, generando un cambio drástico en la temperatura, por lo que, los compuestos polifenólicos se ven afectados, ya que son inestables bajo estas condiciones. Sin embargo, de la misma manera que en la extracción por agitación magnética, se tiene una mejor extracción utilizando la muestra seca debido a las razones ya mencionadas.

Tabla 14. ANOVA obtenido en el diseño factorial completo 2^3 empleando la extracción por ultrasonido con muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.*

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Irradiación	0.0018	1	0.0018	2.75	0.1723
B: No irradiación	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
C: # Ciclos	0.00005	1	0.00005	1.22	0.7958
AB	0.0008	1	0.0008	0.69	0.3306
AC	0.00045	1	0.00045	6.20	0.4533
BC	0.00405	1	0.00405	6.29	0.0675
Error total	0.00261364	4	0.000653409		
Total (corr.)	0.00976364	10			

Como se puede observar en la Tabla 14, el valor-P es mayor a 0.05 por lo tanto, la hipótesis nula se acepta indicando entonces que no existe una diferencia significativa entre los parámetros utilizados para la extracción de polifenoles totales en la muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.* utilizando el método de extracción por ultrasonido, lo cual también se puede observar en el diagrama de Pareto (Ver Gráfico 10), en donde se logra observar que la irradiación, no irradiación y la combinación de ambas presentan un efecto positivo en la extracción, es decir, a un mayor tiempo de éstos factores se logra extraer una mayor cantidad de polifenoles totales en la muestra húmeda de gualumbos. Mientras que, el número de ciclos y las combinaciones de éste con los demás factores (irradiación y no irradiación) presentaron un efecto negativo en la extracción, es decir, se obtuvo una menor cantidad de polifenoles totales a un valor mayor de estas condiciones de extracción.

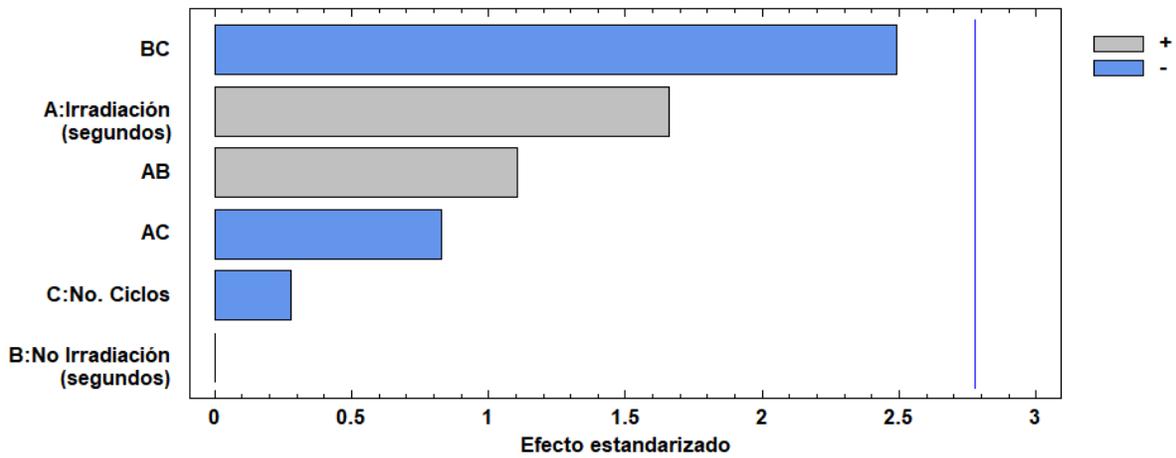
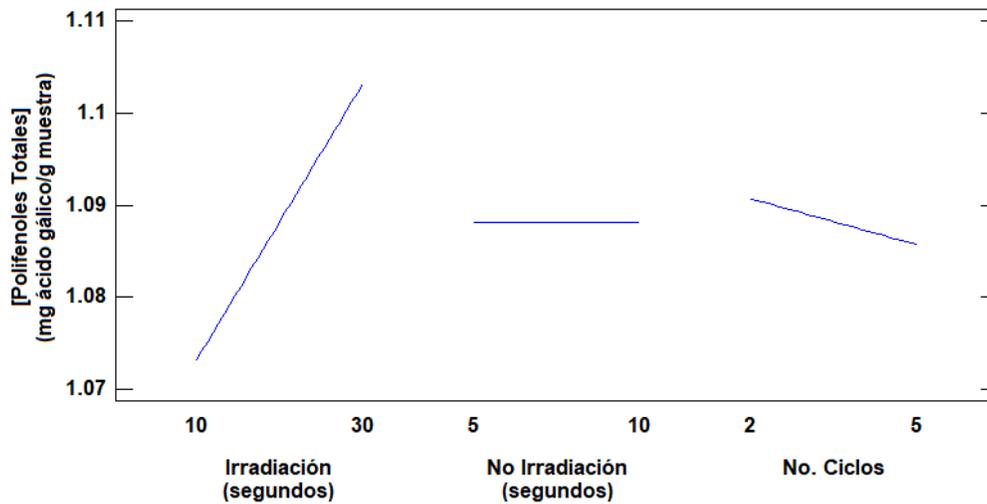


Gráfico 10. Diagrama de Pareto obtenido en el diseño de experimentos empleando la extracción por ultrasonido con muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.*



Factor	Valor Bajo	Valor Alto	Valor Óptimo
Irradiación (seg)	10.0	30.0	30.0
No irradiación (seg)	5.0	10.0	10.0
# Ciclos	2.0	5.0	2.0

Gráfico 11. Efecto de los factores en la extracción de polifenoles totales por el método de ultrasonido y optimización de las condiciones de extracción utilizando muestra húmeda de gualumbos *Agave spp.*

Por otro lado, en el Gráfico 11 se pueden apreciar los efectos de los parámetros considerados en la extracción de polifenoles totales en la muestra por ultrasonido, en donde a un mayor tiempo de irradiación y de no irradiación se tiene

una mejor extracción de los compuestos de interés, utilizando un menor número de ciclos. Con base en estos resultados, a pesar de que no se tiene una diferencia significativa en la extracción, se puede decir que en la muestra húmeda de gualumbos, las condiciones óptimas de extracción de polifenoles totales empleando el método de ultrasonido son **tiempos de irradiación y de no irradiación altos con un menor número de ciclos, es decir, un menor tiempo total de irradiación (30 segundos de irradiación, 10 segundos de no irradiación por 2 ciclos)** (Ver Gráfico 11).

En la muestra seca de gualumbos *Agave spp.* a diferencia de la muestra húmeda, sí existe una diferencia significativa tanto para el tiempo de irradiación como el número de ciclos, ya que el valor-P es menor a 0.05, rechazándose entonces la hipótesis nula (Ver Tabla 15). Del mismo modo, en el Gráfico 12 se logra observar en el diagrama de Pareto que efectivamente se tiene una diferencia significativa en dichos factores, teniendo tanto el tiempo de irradiación, como el de no irradiación un efecto positivo en la extracción, mientras que, el número de ciclos tiene un efecto negativo en la extracción de los compuestos polifenólicos.

Con base en esto se tiene que a un mayor tiempo de irradiación, con un mayor tiempo de no irradiación y un menor número de ciclos, se logra extraer una mayor cantidad de polifenoles totales en la muestra de gualumbos. La extracción con la muestra húmeda no presentó diferencias significativas en la extracción de polifenoles totales, mientras que, en la muestra seca sí, en ambos casos, el tiempo de no irradiación no influyó en la extracción, sin embargo, tanto para la extracción con muestra húmeda como para muestra seca se considera como óptimo un mayor tiempo de no irradiación, ya que éste es un tiempo que se da de descanso entre cada irradiación, debido a que con cada irradiación se genera un calentamiento en la muestra, por lo que es mejor que se tenga un mayor tiempo de no irradiación para así permitir que la muestra no se sobrecaliente, ya que los compuestos polifenólicos son inestables. Por otro lado, el número de ciclos sí influye en este caso en la extracción, y lo hace de una forma negativa, esto se debe a que, al aumentar el número de ciclos, se tiene un mayor tiempo total de irradiación en la muestra lo que puede llegar a generar una oxidación de los

polifenoles dando como resultado una menor extracción de estos compuestos en la muestra.

Tabla 15. ANOVA obtenido en el diseño factorial completo 2³ empleando la extracción por ultrasonido con muestra seca de gualumbos *Agave spp.*

Fuente	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Irradiación	10.1025	1	10.1025	42.25	0.0029
B: No irradiación	0.762613	1	0.762613	3.19	0.1487
C: # Ciclos	4.57531	1	4.57531	19.13	0.0119
AB	0.0105125	1	0.0105125	0.04	0.8442
AC	0.0045125	1	0.0045125	0.02	0.8974
BC	0.117613	1	0.117613	0.49	0.5218
Error total	0.956543	4	0.239136		
Total (corr.)	16.5296	10			

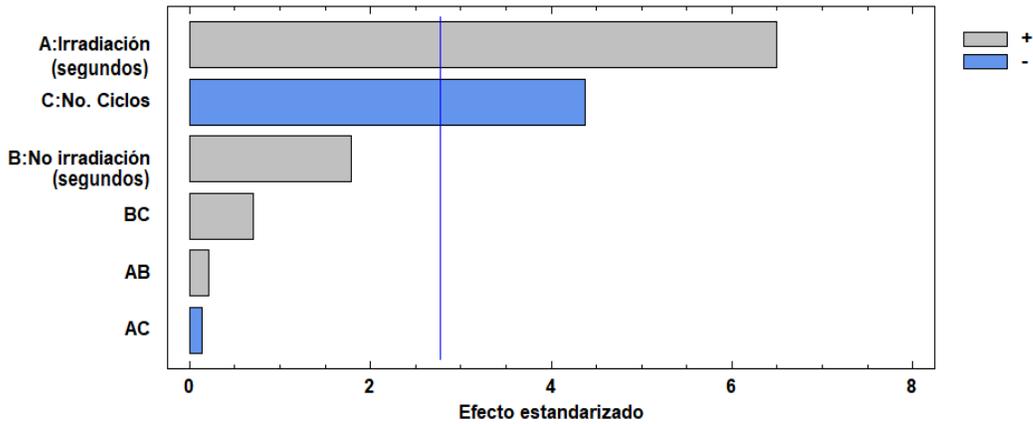
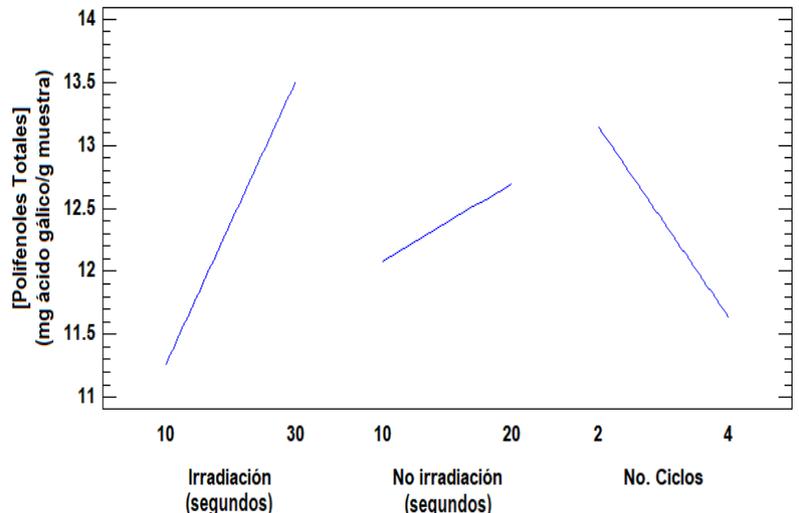


Gráfico 12. Diagrama de Pareto obtenido en el diseño de experimentos empleando la extracción por ultrasonido con muestra seca de gualumbos *Agave spp.*

Factor	Valor Bajo	Valor Alto	Valor Óptimo
Irradiación (seg)	10.0	30.0	30.0
No irradiación (seg)	10.0	20.0	20.0
# Ciclos	2.0	4.0	2.0

Gráfico 13. Efecto de los factores en la extracción de polifenoles totales por el método de ultrasonido y optimización de las condiciones de extracción utilizando muestra seca de gualumbos *Agave spp.*



Con base en lo anterior, se tiene entonces que las condiciones óptimas de extracción por ultrasonido utilizando la muestra seca de gualumbos son **mayor tiempo de irradiación y de no irradiación con un menor número de ciclos (30 segundos de irradiación, 20 segundos de no irradiación y 2 ciclos)** (Ver Gráfico 13). Teniendo la optimización de las condiciones de extracción por el método de ultrasonido, se utilizaron para las extracciones posteriores con las muestras de gualumbos *Agave salmiana* tanto verde como madura.

5.4.2 *Agave salmiana*.

Al realizar la extracción por ultrasonido con las muestras de *Agave salmiana*, ocurrió nuevamente la turbidez en el extracto, por lo que de igual manera que con la extracción con agitación y calentamiento, se realizó el método de Carrez para poder eliminar dicha turbidez.

Los resultados obtenidos y la comparación de los resultados se presentan en el Gráfico 14.

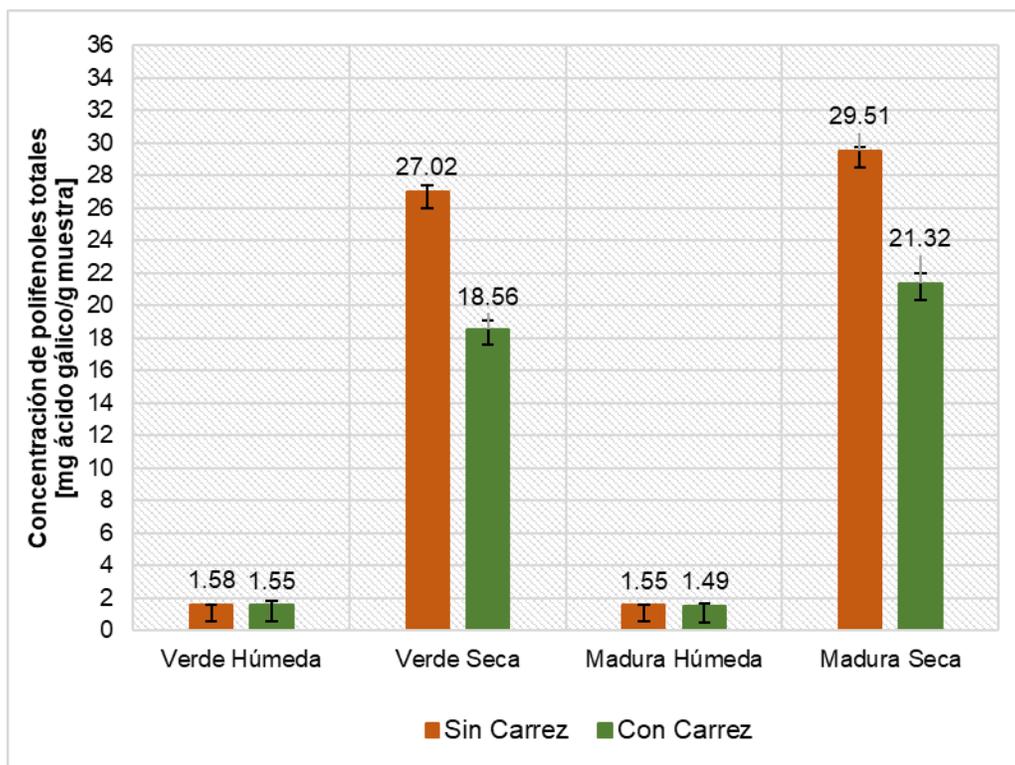


Gráfico 14. Comparación de resultados obtenidos tras la adición de los reactivos de Carrez en la determinación de polifenoles totales en gualumbos *Agave salmiana* utilizando como método de extracción ultrasonido.

En el Gráfico 14 se muestra que al adicionar los reactivos de Carrez en las muestras de gualumbos *Agave salmiana* se disminuye la cuantificación de igual forma cerca de un 30% en ambas muestras (31.31% en la muestra verde y un 27.75% en la muestra madura), lo cual indica el porcentaje de interferencia de la turbidez en la muestra al momento de la cuantificación de los polifenoles totales.

5.4.3 Concentración de polifenoles totales en gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana* por el método de ultrasonido.

Del mismo modo que con la extracción por agitación magnética, para poder hacer comparables los resultados obtenidos de polifenoles totales, para la extracción de la muestra de gualumbos *Agave spp.* se realizó la adición de los reactivos de Carrez. Los resultados obtenidos para ambas muestras de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana* se pueden observar en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados obtenidos de polifenoles totales en las muestras secas de gualumbos mediante la extracción de ultrasonido.

Muestra seca de gualumbos	[Polifenoles Totales]
	mg ácido gálico/g muestra
<i>Agave spp.</i>	15.26 ± 0.51
<i>Agave salmiana</i> (Verde)	18.56 ± 0.52
<i>Agave salmiana</i> (Madura)	21.32 ± 0.68

Los resultados obtenidos en las muestras de gualumbos utilizando el método de extracción de ultrasonido siguen la misma tendencia que con el método de agitación magnética y calentamiento, ya que se presenta una menor cantidad de polifenoles totales en los gualumbos de *Agave spp.* y una mayor cantidad en la muestra madura de los gualumbos *Agave salmiana*, como se puede apreciar en la Tabla 18.

A pesar de que se tiene la misma tendencia, no se tiene la misma cantidad de polifenoles totales, ya que con el método de ultrasonido se extrae una menor cantidad de estos compuestos en comparación con los que se logran extraer con el método de agitación magnética (aproximadamente un 21% más con este último método de extracción), y esto debido a lo que ya se ha mencionado anteriormente: los polifenoles se pueden oxidar al aumentar el tiempo de extracción de

ultrasonido, debido a las irradiaciones que se generan y el calentamiento en la muestra, lo que genera una disminución en la cuantificación de polifenoles totales.

Sin embargo, como ya se mencionó, se sigue manteniendo la misma tendencia en la cantidad de compuestos polifenólicos en las muestras en comparación a lo que se obtuvo con el método de agitación magnética, lo que indica que efectivamente, la muestra de gualumbos *Agave salmiana* en su forma madura presenta una mayor cantidad de polifenoles totales.

Con base en los resultados obtenidos utilizando los tres métodos de extracción, se tiene que el método de agitación magnética es con el que se logra una mayor extracción de los compuestos de interés. La optimización del método de ultrasonido se realizó a pesar de que se extrajo menor cantidad de polifenoles totales, sin embargo, es un método mucho más rápido y sencillo de realizar en comparación con el método de agitación magnética y agitación manual, no obstante, no se logra una mayor extracción de los compuestos polifenólicos, por lo que, para las posteriores cuantificaciones se decidió utilizar el método de extracción de agitación magnética y calentamiento utilizando la muestra seca y añadiendo los reactivos de Carrez en ambas muestras de gualumbos con las condiciones óptimas ya mencionadas, ya que con la muestra húmeda, no se logra tener la cuantificación correcta debido a la interferencia que ocasiona el agua presente en la muestra.

5.5 Determinación de interferencias en la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA.

5.5.1 Hidrólisis ácida.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los interferentes al momento de cuantificar los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu por FIA son los glucósidos ya que éstos se pueden encontrar unidos también a los polifenoles, por ejemplo, los flavonoides (uno de los tipos de polifenoles) se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides).

Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o

como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios. (Quiñones et al, 2012). Por esta razón, se buscó una metodología para poder hidrolizar los enlaces O-glucósidos que se encontraran presentes en los extractos de gualumbos, y una de las metodologías empleadas para esto, es utilizando la hidrólisis ácida, ya que con el medio ácido, se protona el glucósido y de esta forma se libera, dejando que los polifenoles como son los flavonoides y las agliconas se pueden extraer utilizando acetato de etilo con un embudo de separación, mientras que, los azúcares se van a la fase acuosa.

Los extractos de gualumbos de *Agave spp.* antes y después de realizar la hidrólisis ácida se mandaron a un análisis de HPLC y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 17. Todas las extracciones se hicieron utilizando el método de agitación magnética utilizando las condiciones ya mencionadas en la parte de metodología, y la muestra seca para ambas muestras de gualumbos.

Tabla 17. Polifenoles presentes en los extractos de gualumbos *Agave spp.* antes y después de la hidrólisis ácida.

Estándar Polifenol	Concentración para cada estándar (mg polifenol/g muestra)	
	Antes de hidrolizar	Después de hidrolizar
Ácido 3, 4-dihidroxibenzoico	-	0.04322
Ácido 4-hidroxibenzoico	-	0.45308
4-hidroxibenzaldehído	-	0.93593
Ácido vainillínico	-	0.56262
Vainillina	0.09604	2.07001
Ácido p-cumárico	0.08268	1.32233
Ácido transferúlico	0.09709	0.12701
Ácido sinápico	0.01738	0.01850
Naringenina	0.06758	-
Concentración total de polifenoles cuantificada	0.36077	5.53270

Con base en lo obtenido en la Tabla 17, se puede observar que efectivamente, la hidrólisis ácida aumenta la concentración de los polifenoles libres en la muestra de gualumbos (en este caso provenientes de *Agave spp.*), sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, este aumento se puede deber a que al estar unidos a glucósidos los polifenoles no se puedan cuantificar utilizando

el método de Folin-Ciocalteu, por lo que, es posible que cuando se encuentren los polifenoles en forma de glucósidos (principalmente flavonoides), éstos no se logren cuantificar comparados a cuando se encuentran en su forma libre.

Los polifenoles que se encontraron presentes en la muestra de gualumbos *Agave spp.* no son únicamente los que se presentan en la Tabla 17, sino sólo son algunos de ellos, ya que el análisis de HPLC sólo da una idea de los compuestos fenólicos presentes en la muestra, debido a que es un análisis que requiere de estándares para poder comparar, sin embargo, hacer un análisis completo requiere de todos los estándares posibles, lo cual llega a ser muy costoso y complejo, por lo que únicamente se utilizaron sólo algunos de los estándares de polifenoles con los que se contaba para el análisis. Si comparamos la cantidad de polifenoles que se logra cuantificar por HPLC, después de la hidrólisis ácida la concentración de algunos fenoles aumenta hasta 21 veces (vainillina). No obstante, después de hidrolizar los glucósidos, sólo se obtiene el 29.57% de los polifenoles totales con respecto a los cuantificados con la reacción de Folin-Ciocalteu (18.71 mg ácido gálico/g muestra) por la misma razón ya mencionada, ya que éstos no son los únicos presentes en la muestra, pero sí los estándares con los que se realizó el análisis.

Por otro lado, los polifenoles que se logran cuantificar en el extracto inicial, sin realizar la hidrólisis ácida, aumentan su concentración con la hidrólisis, sin embargo, la naringenina que se logra cuantificar en el extracto antes de hidrolizar los glucósidos se pierde en el extracto final después de hidrolizar, esto se puede deber a que al finalizar los 120 minutos del reflujo en la hidrólisis, al separar los polifenoles de los azúcares, se realizan dos lavados: el primero con acetato de etilo y el segundo con agua destilada, por lo que posiblemente en alguno de estos lavados se haya perdido este polifenol.

Entre los polifenoles que se encuentran en la muestra de gualumbos *Agave spp.* son: el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vainillínico, 4-hidroxibenzaldehido, vainillina, ácido p-cumárico, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina, siendo la vainillina y el ácido p-cumárico quienes se encuentran en una mayor concentración.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el análisis de HPLC en los extractos de la muestra de gualumbos *Agave salmiana* en la hidrólisis ácida para la muestra verde y madura se muestran en la Tabla 18. En donde del mismo modo, se realizó el extracto utilizando la muestra seca y las condiciones óptimas de extracción por el método de agitación magnética, y se realizó un estudio de HPLC al extracto antes y después de realizar la hidrólisis ácida.

Como se puede observar en la Tabla 18, la cantidad de polifenoles que se encontró en la muestra de gualumbos *Agave salmiana* es menor en comparación con la muestra de *Agave spp.*, sin embargo, no hay que olvidar que estos polifenoles no son los únicos presentes en las muestras, sino que son los que se lograron cuantificar por el análisis de HPLC ya que son con los estándares con los que se contaba. Para la muestra verde se logró cuantificar el 1.77% de los polifenoles totales (considerando que se obtuvo una concentración de 24.56 expresados como mg de ácido gálico/g de muestra usando la reacción de Folin-Ciocalteu), mientras que, para la muestra madura se consiguió cuantificar el 9.52% de los polifenoles totales (de los 26.87 mg de ácido gálico/g muestra obtenidos).

Tabla 18. Polifenoles presentes en la muestra de gualumbos *Agave salmiana*. antes y después de la hidrólisis ácida en la muestra verde y madura.

Estándar Polifenol	Concentración para cada estándar (mg polifenol/g muestra)			
	VERDE		MADURA	
	Antes de hidrolizar	Después de hidrolizar	Antes de hidrolizar	Después de hidrolizar
1,2-dihidroxibenceno	0.07258	-	-	-
4-hidroxibenzaldehído	-	0.17712	-	0.38809
Ácido vainillínico	-	-	0.14123	-
Vainillina	-	-	-	0.42909
Ácido p-cumárico	-	0.09293	-	1.15709
Ácido transferúlico	-	0.16491	-	-
Ácido sinápico	0.00945	-	-	-
Naringenina	0.03212	-	0.84149	0.58326
Concentración total de polifenoles cuantificada	0.11415	0.43496	0.98272	2.55753

No obstante, antes de hidrolizar los enlaces O-glucósidos, se tienen una menor cantidad de polifenoles que se puedan cuantificar, en ambos casos (muestra verde y madura), sin embargo, se encuentran en una pequeña cantidad, por lo que, después de realizar el lavado en la hidrólisis ácida se pierden, pero se logran cuantificar otros polifenoles que no estaban como sucedió en el caso de la muestra verde de gualumbos. Para el caso de la muestra madura sucedió algo similar, antes de hidrolizar se cuantificaron sólo dos polifenoles y después de la hidrólisis se logró cuantificar 4 teniendo de igual forma pérdidas debido al lavado que se realiza, sin embargo, del mismo modo que con la muestra de *Agave spp.* sí tuvo un mejor rendimiento y esto puede atribuirse a que se hidrolizan los glucósidos unidos a los polifenoles.

En la muestra tanto madura como verde de *Agave salmiana* coinciden algunos polifenoles, ya que se trata de la misma muestra, pero con un estado de maduración distinto, con base en esto y en lo obtenido en la cuantificación de polifenoles totales, se puede decir que en el caso de la muestra de gualumbos *Agave salmiana*, al estar maduros, se producen una mayor cantidad de polifenoles. Los compuestos polifenólicos que se lograron cuantificar en la muestra de gualumbos *Agave salmiana* son 1,2-dihidroxibenceno, 4-hidroxibenzaldehído, ácido p-cumárico, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina en la muestra verde, mientras que, en la muestra madura se tiene 4-hidroxibenzaldehído, ácido vainillínico, vainillina, ácido cumárico y naringenina.

Los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y verduras, y existen más de 8000 compuestos polifenólicos identificados. Las plantas contienen una amplia variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas. Los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos como el gálico, vainillínico, 4-hidroxibenzoico y los aldehídos como vainillina también son abundantes en plantas (Porrás et al, 2009). Con base en lo reportado en la literatura, se tiene que coincide con la información obtenida de los grupos de polifenoles presentes en

ambas muestras de gualumbos (*Agave spp.* y *Agave salmiana*), si bien, no se tiene información acerca los compuestos que se encuentren en estas muestras, pero con este análisis se da una idea de los compuestos que se tienen en esta flor de maguey.

Por otro lado, se intentó medir la cantidad de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu en el extracto después de llevar a cabo la hidrólisis ácida, sin embargo, no fue posible debido a que como ya se mencionó en la metodología, al final del procedimiento se ocupa acetato de etilo para así poder separar los compuestos polifenólicos de los azúcares, y éste al ser un compuesto orgánico insoluble en agua, no permitía cuantificar la cantidad de polifenoles ya que al pasar por el sistema FIA y llegar al detector, se volatilizaba generando únicamente ruido en la señal y haciendo imposible el poder medir la absorbancia. Por lo que, se decidió realizar únicamente el análisis HPLC en las muestras.

5.5.1.1 Estudio cromatográfico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana* adicionados con los reactivos de Carrez.

La determinación de los compuestos fenólicos presentes en ambas muestras de gualumbos se determinó realizando los extractos con la muestra seca y utilizando las condiciones óptimas de extracción por agitación magnética y calentamiento, con y sin la adición de los reactivos de Carrez y se enviaron a un análisis de HPLC (todos los análisis por HPLC se realizaron en la USAII). En el estudio para el HPLC no interfiere la turbidez de los extractos (ya que se filtran para su análisis, no obstante, se tiene mucha pérdida al filtrar y en el estudio por HPLC no se requieren grandes cantidades del extracto a diferencia del método de Folin-Ciocalteu por FIA, que al ser un flujo continuo se requiere una mayor cantidad del extracto, por esta razón se decidió realizar la adición de los reactivos de Carrez para la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu), sin embargo, se realizó el extracto con y si la adición de los reactivos de Carrez para poder determinar si al agregar éstos se perdía alguna parte de los polifenoles.

Los resultados obtenidos en el análisis por HPLC para la determinación de polifenoles presentes en las muestras de gualumbos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Compuestos fenólicos presentes en las muestras de gualumbos

Agave spp. y *Agave salmiana*

Estándar polifenol	Concentración para cada estándar (mg de polifenol/g muestra)					
	<i>Agave spp.</i>		<i>Agave salmiana</i>			
			Verde		Madura	
	Sin Carrez	Con Carrez	Sin Carrez	Con Carrez	Sin Carrez	Con Carrez
Ácido clorogénico	-	-	0.48453	-	-	-
Ácido vainillínico	-	-	-	-	0.22519	-
Ácido transferúlico	-	-	0.15709	0.13428	-	-
Ácido sinápico	0.02963	0.01150	-	-	-	-
Naringenina	0.30669	-	0.31026	0.12906	1.17300	0.83609

Como se puede observar en la Tabla 19, la adición de los reactivos de Carrez en el extracto sí genera algunas pérdidas de los polifenoles que se encuentran presentes en las muestras tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la adición de estos reactivos de Carrez fue necesaria para poder eliminar la turbidez de los extractos de *Agave salmiana* ya que en este caso, sí afectaba la cuantificación de polifenoles totales, en el caso del análisis por HPLC no se tiene interferencia por parte de la turbidez del extracto (se filtra con ayuda de un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.45 µm), pero se realizó el estudio en los extractos con Carrez para saber si afectaba la adición de dichos reactivos. Por otro lado, como ya se ha visto, el análisis por HPLC no cuantifica todos los polifenoles presentes en las muestras, ya que es un estudio complejo y costoso, sólo se comparó con los estándares disponibles. En la sección 5.5.1 Tablas 17 y 18, se muestran también los compuestos fenólicos encontrados en las muestras de gualumbos (antes de la hidrólisis ácida), no obstante, el extracto que se preparó para ese análisis se hizo más concentrado, ya que se utilizó 0.1 g de muestra seca con 10 mL de extractante MetOH-H₂O (50%), sin embargo, para el análisis de HPLC con y sin la adición de los reactivos de Carrez se realizó el extracto con las condiciones óptimas de extracción: 0.2 g de muestra seca con 25 mL de extractante MetOH-H₂O (50%). Por lo tanto, al estar más diluida la muestra no se logró cuantificar todos los polifenoles que se muestran en la Tabla 17 y 18, ya que además se

encuentran en concentraciones bajas. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos en la Tabla 17 y 18 (mencionada en la sesión 5.5.1) además se tienen más polifenoles presentes en la muestra de gualumbos tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana*. Se ha mencionado que un análisis completo de HPLC es muy costoso y complejo debido a que se requieren de estándares ya que cada compuesto tiene un tiempo de retención distinto además de absorber a diferentes longitudes de ondas. Para ejemplificar esto, en los Gráficos 15, 16, 17, 18 y 19 se observan cromatogramas realizados en la muestra de *Agave salmiana* en su estado de maduración verde sin la adición de los reactivos de Carrez.

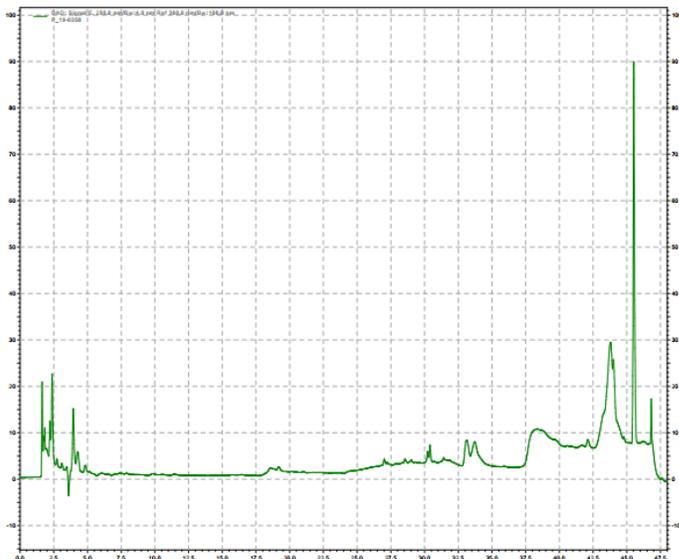


Gráfico 15. Cromatograma de la muestra verde de *Agave salmiana* a una longitud de onda de 250 nm.

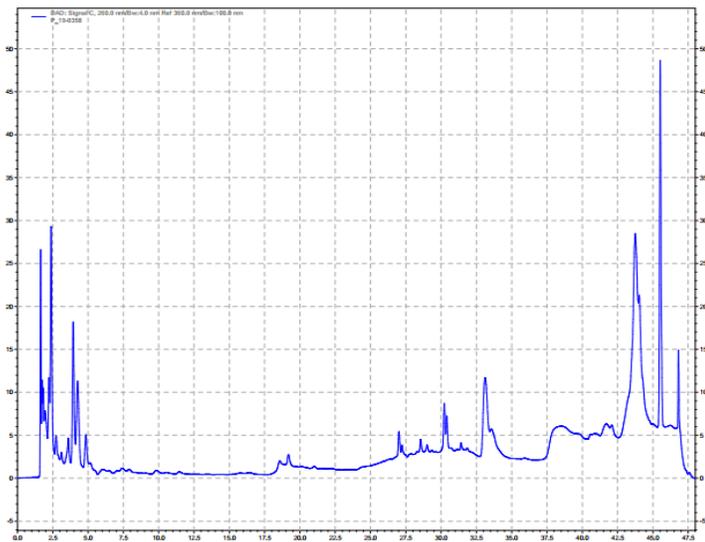


Gráfico 16. Cromatograma de la muestra verde de *Agave salmiana* a una longitud de onda de 260 nm.

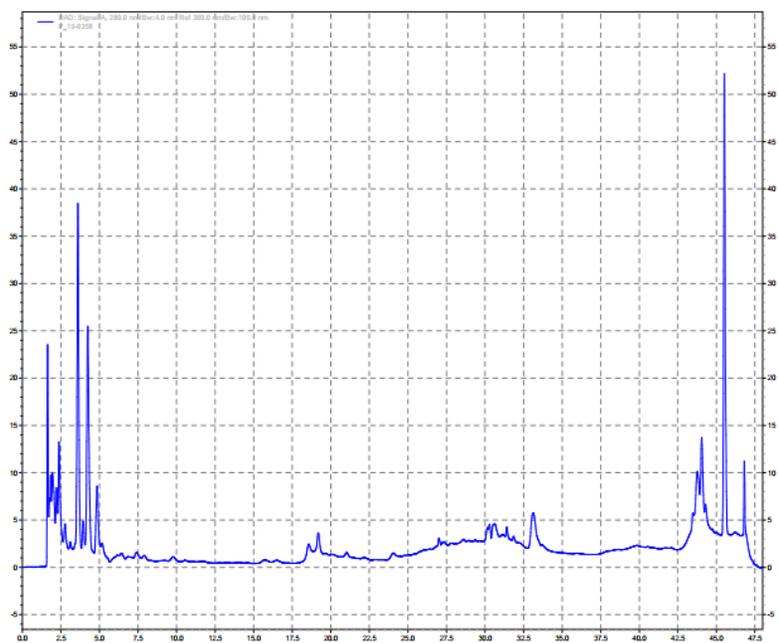


Gráfico 17. Cromatograma de la muestra verde de *Agave salmiana* a una longitud de onda de 280 nm.

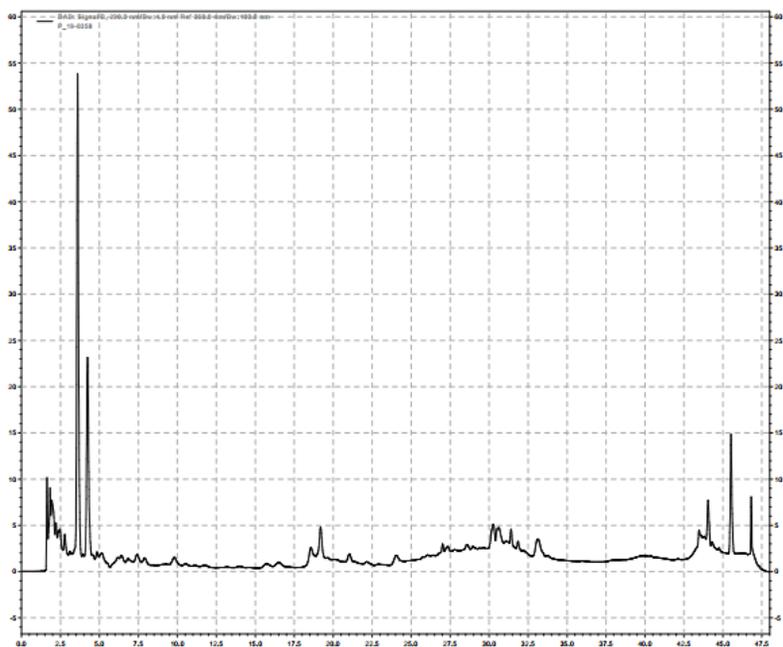


Gráfico 18. Cromatograma de la muestra verde de *Agave salmiana* a una longitud de onda de 290 nm.

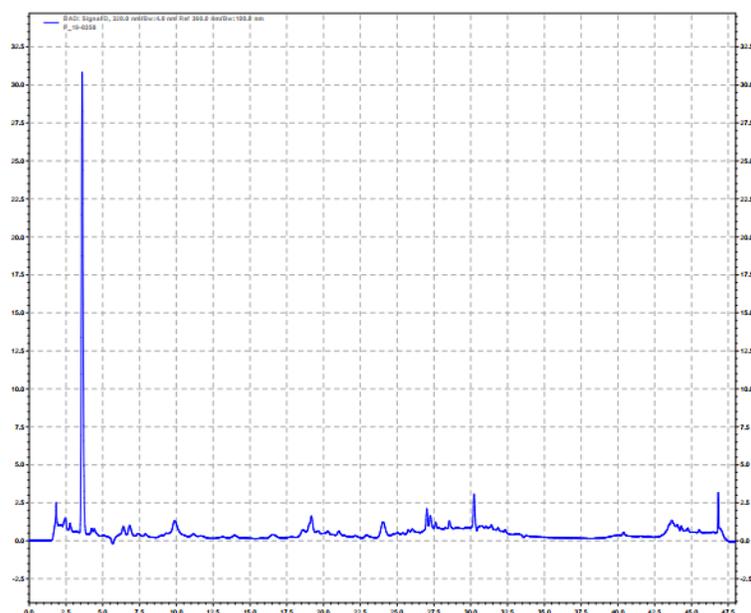


Gráfico 19. Cromatograma de la muestra verde de *Agave salmiana* a una longitud de onda de 320 nm.

Como se puede observar en los cromatogramas, hay muchos compuestos en cada uno de ellos, que se observan como picos, sin embargo de estos compuestos sólo se logró cuantificar 5 compuestos polifenólicos (1,2-dihidroxibenceno, ácido clorogénico, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina), pero no significa que sean los únicos compuestos polifenólicos presentes, sólo que fueron los únicos que se lograron cuantificar ya que se contaba con sus estándares. Esto mismo ocurre en las demás muestras de gualumbos, existen muchos compuestos fenólicos, sin embargo, no fue posible poder determinar cada uno de ellos.

Según la literatura, en las verduras los principales polifenoles presentes son flavonoides (como naringenina), derivados de ácido benzoico (como ácido 4-hidroxibenzoico), ácidos fenólicos (como ácido p-cumárico) entre otros, los cuales son los que se encontraron presentes en las muestras de gualumbos tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana*.

A pesar de que no se cuenta con información precisa de los compuestos que pueda tener esta flor de maguey, este estudio abre las puertas para un

posterior análisis y de esta forma poder conocer más sobre este alimento que es muy común en diversos estados del país, además de que proviene del maguey siendo éste algo completamente característico de México.

Los compuestos polifenólicos presentes en las muestras de gualumbos analizadas son:

- *Agave spp.*: Ácido 3,4-dihydroxibenzoico, ácido 4-hydroxibenzoico, 4-hydroxibenzaldehído, ácido vainillínico, ácido p-cumárico, vainillina, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina.
- *Agave salmiana (verde)*: 1,2-dihydroxibenceno, ácido p-cumárico, ácido clorogénico, ácido 4-hydroxibenzoico, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina.
- *Agave salmiana (madura)*: Ácido-4-hydroxibenzoico, ácido vainillínico, vainillina, ácido p-cumárico y naringenina.

Estos compuestos polifenólicos presentes en las muestras de gualumbos son algunos de los que contribuyen a la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, no obstante.

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal. En los últimos años se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles puede mejorar la salud y disminuir la incidencia de enfermedades cardiovasculares. La capacidad de los polifenoles para modelar la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismos de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. (Quiñones et al, 2012)

5.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Otro de los interferentes que se pueden encontrar en la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu son las proteínas y/o aminoácidos presentes en la muestra, por lo tanto, para poder determinar si éstos influían en las muestras de gualumbos, se realizó una electroforesis en gel de

poliacrilamida utilizando la muestra húmeda y seca de gualumbos de *Agave salmiana*, así como los extractos con y sin la adición de los reactivos de Carrez. El gel obtenido se muestra en la Figura 28.

El gel se decidió realizar únicamente con la muestra de gualumbos *Agave salmiana* ya que es la flor que proviene del maguey pulquero y es el que comúnmente se consume, además de que en comparación con la muestra de gualumbos provenientes de *Agave spp.* tienen una mayor cantidad de polifenoles totales. Los extractos analizados se realizaron utilizando las condiciones óptimas de extracción por el método de agitación magnética y calentamiento y utilizando la muestra seca, para que de esta forma no haya interferencia del agua en la extracción de los compuestos polifenólicos, y estos extractos se concentraron hasta un volumen de 2 mL con la ayuda de un rotavapor.

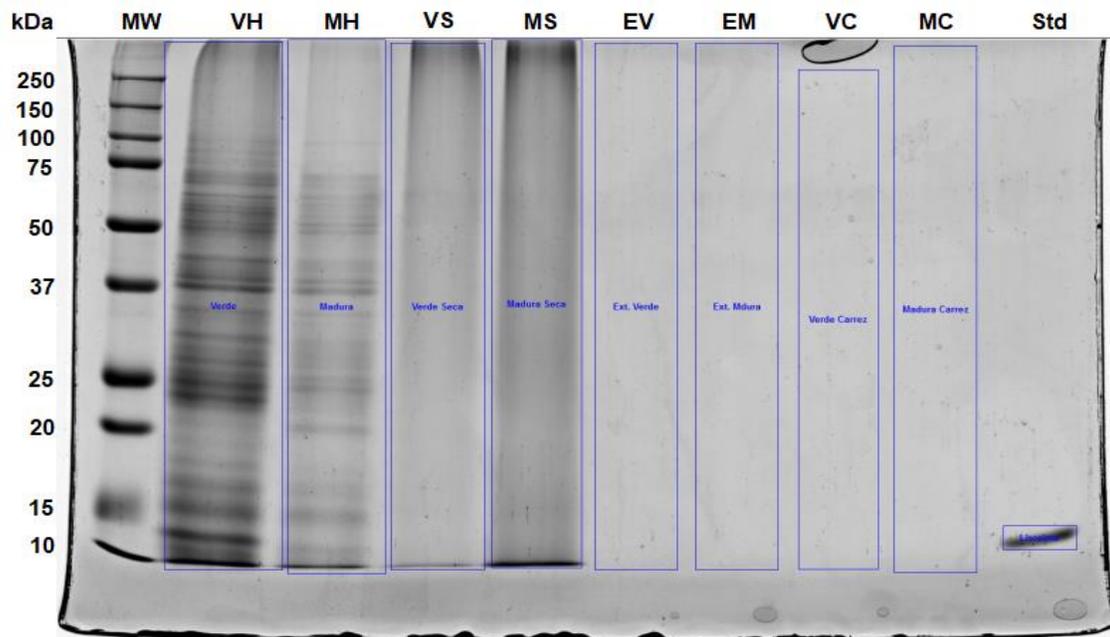


Figura 28. Electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando la muestra de gualumbos y extractos de *Agave salmiana*. Donde MW: Marcador de peso molecular; VH: Muestra húmeda verde; MH: Muestra húmeda madura; VS: Muestra verde seca; MS: Muestra madura seca; EV: Extracto de muestra verde sin Carrez; EM: Extracto de muestra madura sin Carrez; VC: Extracto de muestra verde + Carrez; MC: Extracto de muestra madura + Carrez; Std: Estándar de lisozima.

En la Figura 28 se puede observar en los pozos de VH y MH que se tiene una gran cantidad de proteínas (cada banda que se observa es una proteína distinta), sin embargo, no se determinaron cuáles eran estas proteínas presentes en las muestras ya que el análisis para determinarlas es un proceso bastante costoso y amplio además de no ser el objetivo de la presente tesis.

Las muestras VH y MH son en crudo, por lo que no se tiene un tratamiento previo y es por esta razón que se puede observar que la proteína está intacta, por otro lado, las muestras VS y MS sí tienen un tratamiento previo, ya que se secan a 100°C por 6 horas para la eliminación del agua presente en la muestra, por lo que se ocasiona una desnaturalización de las proteínas debido a la alta temperatura y el tiempo. La desnaturalización implica que las proteínas pierden su estructura cuaternaria (si es el caso), terciaria y secundaria, quedando únicamente la estructura primaria y/o aminoácidos presentes, esta desnaturalización se observa en el gel como un barrido, justo como se puede observar en la Figura 28, estos aminoácidos y/o cadenas de aminoácidos pueden interferir en el análisis de la cuantificación de los polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, sin embargo, al momento de realizar el extracto (utilizando la muestra seca), ya no se tiene esta interferencia por parte de los aminoácidos, ya que probablemente se pierdan al momento del filtrado, esto se puede observar en la Figura 28 en los pozos EV y EM, no obstante, como se ha mencionado anteriormente, al momento de realizar los extractos (para la cuantificación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu), éstos quedaban turbios, lo cual interfería con la cuantificación de polifenoles totales, por lo que fue necesario el adicionar los reactivos de Carrez para que de esta manera se eliminara dicha turbidez, además al añadir estos reactivos se precipita la proteína presente.

Como se puede observar en los pozos VC y MC en la Figura 28, al igual que los extractos sin la adición de los reactivos de Carrez (pozos EV y EM) ya no se observa que se tenga proteína en el extracto.

Con base en lo anterior, la proteína presente en las muestras de gualumbos, no mostró tener una interferencia significativa para la cuantificación de polifenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu, ya que como se puede

observar en la Figura 28, en los pozos EV, EM, VC y VM no se logra percibir ninguna banda de proteína en el gel de poliacrilamida, por lo que su interferencia es nula.

5.6 Curvas de calibración: Capacidad antioxidante.

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC por FIA se realizó una curva de calibración utilizando como estándar una disolución de Trolox. La curva de calibración se muestra en el Gráfico 20, mientras que, los parámetros estadísticos obtenidos en la curva de calibración se presentan en la Tabla 20.

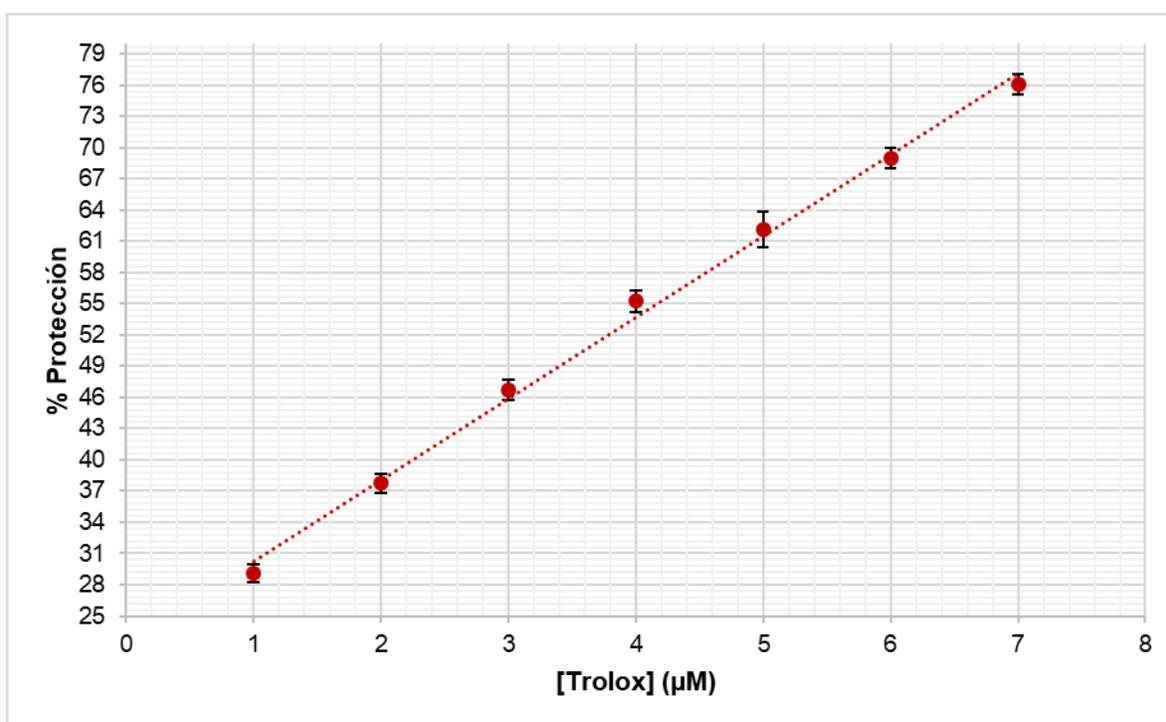


Gráfico 20. Curva de calibración: Trolox.

Tabla 20. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración para la cuantificación de la capacidad antioxidante por el método de ORAC por FIA.

Estándar	Pendiente	Ordenada al origen	R ²	LD	LC	Intervalo lineal
Trolox	7.8196 ± 0.2087	22.437 ± 0.9335	0.9965	0.47 µM	1.41 µM	1 – 7 µM

En el Gráfico 20 se puede observar la señal analítica obtenida por la metodología de ORAC por FIA realizada.

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizó la fase negativa de la señal (Ver Figura 29). En la zona de la cola del bolo inyectado donde el AAPH reacciona con fluoresceína. Cuando se utiliza un antioxidante, éste puede retardar la oxidación de la fluoresceína dependiendo de la capacidad antioxidante que presente. Por ende, mientras menor sea la bajada de la parte negativa del pico, mayor capacidad presenta la muestra empleada (Ver Figura 30). (Jiménez, 2019)

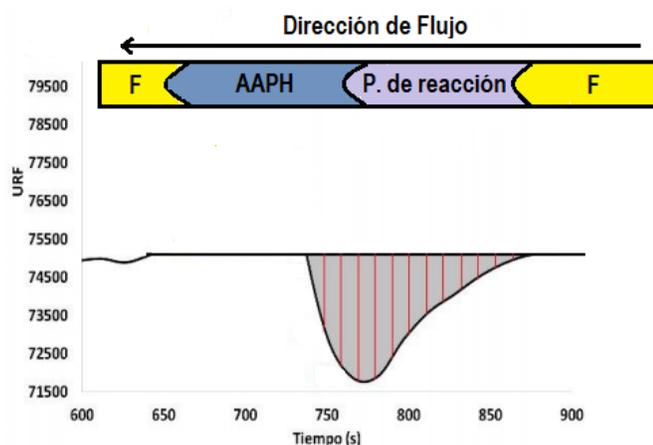


Figura 29. Reacción de fluoresceína con AAPH. URF: Intensidad de Fluorescencia. F= Fluoresceína.

La capacidad antioxidante se obtuvo midiendo el área bajo la curva de los picos obtenidos en fase negativa (utilizando el método de los trapecios) de la reacción para posteriormente transformarlos a porcentajes de protección. El área bajo la curva correspondiente al blanco de reacción entre fluoresceína y AAPH sin utilizar el estándar de Trolox indica que se tiene un 100% de reacción y por ende 0% de protección, si bien, conforme se introduzca al sistema FIA el estándar de Trolox con concentraciones en aumento, el porcentaje de reacción irá disminuyendo, mientras que, el porcentaje de protección se incrementa como se puede apreciar en la Figura 30.

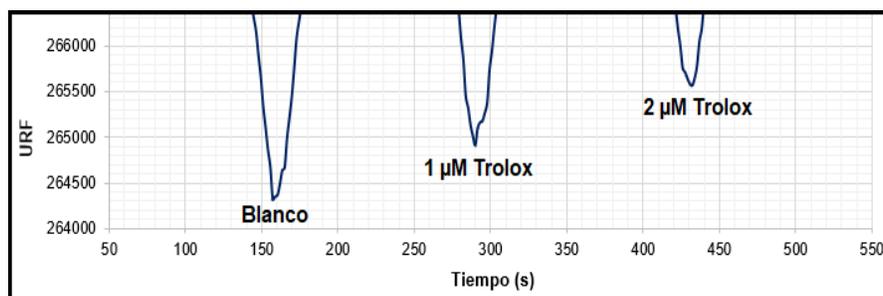


Figura 30. Protección antioxidante de Trolox utilizando el método de ORAC por FIA

5.7 Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante obtenida en los extractos de gualumbos tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana* se muestran en la Tabla 21. La capacidad antioxidante se expresó como μmol de Trolox por gramo de muestra.

El extracto para la cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó utilizando las muestras secas y las condiciones óptimas de extracción por el método de agitación magnética y calentamiento.

Tabla 21. Capacidad antioxidante en muestras de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana* utilizando el método de ORAC por FIA.

Muestra	Capacidad antioxidante (μmol Trolox/g muestra)
<i>Agave spp.</i>	0.34 ± 0.05
<i>Agave salmiana</i> (verde)	0.80 ± 0.12
<i>Agave salmiana</i> (madura)	2.39 ± 0.19

Con base en lo obtenido se puede observar que la muestra de gualumbos *Agave salmiana* presenta una mayor capacidad antioxidante en comparación con la muestra de *Agave spp.* Sin embargo, también se puede apreciar que entre el estado de maduración de la muestra de *Agave salmiana* existe una diferencia significativa entre la capacidad antioxidante, siendo el estado maduro quien presenta una mayor protección antioxidante, debido a que se tiene una mayor cantidad de compuestos polifenólicos en esta muestra y en este estado de maduración.

5.8 Comparación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales en las muestras de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana*.

La comparación de los resultados obtenidos tanto en la cantidad de polifenoles totales (expresados como mg de ácido tánico/g de muestra) como de la capacidad antioxidante (expresados como μmol de Trolox/g de muestra) para las muestras de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana*, se presentan en el Gráfico 21.

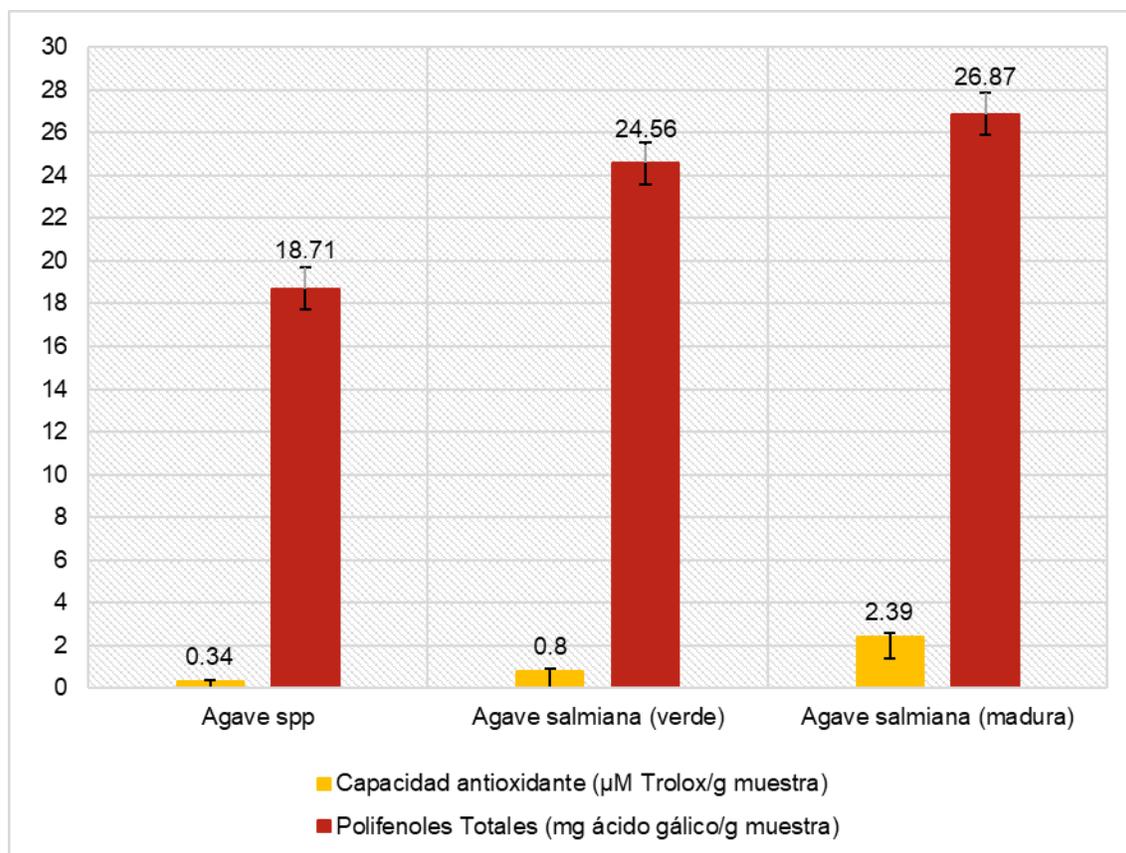


Gráfico 21. Comparación de los resultados de concentración de polifenoles totales y capacidad antioxidante en las muestras de gualumbos *Agave spp.* y *Agave salmiana*.

La muestra de gualumbos *Agave salmiana* presenta una mayor cantidad de polifenoles totales en comparación con la muestra de *Agave spp.* por lo tanto, se espera que esta muestra presente una mayor capacidad antioxidante, lo cual sí ocurrió y se puede observar en el Gráfico 21. Si bien es cierto, que no es posible realizar una comparación completamente exacta, ya que la concentración de polifenoles totales y la capacidad antioxidante se realizan por métodos distintos y se expresan en unidades diferentes, sin embargo, sí se puede hacer una relación. En este caso, tanto la concentración de polifenoles totales como la capacidad antioxidante en las muestras siguen la misma tendencia: una mayor concentración de polifenoles en la muestra de gualumbos *Agave salmiana* con un estado de maduración maduro al igual que una mayor capacidad antioxidante, mientras que, en la muestra de gualumbos *Agave spp.* se presentó una menor concentración de compuestos polifenólicos y una menor capacidad antioxidante.

Como se ha estado mencionando, el estado de maduración en los gualumbos de *Agave salmiana* representa en este caso una diferencia en la concentración de polifenoles totales, y por ende, en la capacidad antioxidante. En el estado verde, se tiene una menor cantidad de polifenoles, ya que en estado maduro se produce una mayor cantidad de compuestos polifenólicos en la flor de maguey, lo cual se ve reflejado en su sabor, el cual es más amargo cuando se tiene un estado maduro.

El contenido de polifenoles en plantas y frutos tiene variaciones que dependen del genotipo, especie, condiciones ambientales, grado de madurez, composición del suelo, ubicación geográfica y condiciones de almacenamiento.

Adicionalmente, a la capacidad antioxidante de estos compuestos polifenólicos se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobiana, anticancerígenas, entre otras (Valencia et al, 2017), por lo que en la actualidad se tiene un gran interés en los polifenoles presentes en los alimentos. En los últimos años, numerosos estudios han avalado los efectos benéficos de la ingesta de polifenoles sobre la salud humana, porque las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes (Quiñones et al, 2012).

6. CONCLUSIONES.

Las muestras de gualumbos tanto de *Agave spp.* como de *Agave salmiana* presentaron un alto valor de humedad (ya que se trata de una flor), teniendo un $96.65 \pm 0.58\%$ en la muestra de *Agave spp.*; $90.59 \pm 0.65\%$ en la muestra verde de *Agave salmiana* y $92.10 \pm 0.65\%$ en la muestra madura de *Agave salmiana*. Al tener un alto contenido de humedad, ésta influye en la extracción de polifenoles como se pudo observar en los resultados obtenidos en las muestras húmedas, mientras que, al secar la muestra se logró cuantificar de una mejor manera la concentración de compuestos fenólicos ya que no hubo interferencia por parte del agua en las muestras.

El método de extracción por el cual se obtuvo una mayor eficiencia fue el método por agitación magnética, tanto en la muestra húmeda como en la muestra seca de gualumbos, sin embargo, las condiciones óptimas de extracción entre ambas muestras sí tuvo una variación en el tiempo, mientras que, la temperatura se mantuvo como óptima a 50°C para la muestra seca y húmeda, debido a la cantidad de agua presente, ya que la muestra húmeda al presentar evidentemente una mayor cantidad de agua, requirió mayor tiempo de extracción (60 min), mientras que, con la muestra seca, bastó con 30 min para obtener la mayor cantidad de polifenoles en el extracto. Por otro lado, el método de ultrasonido presentó una menor eficiencia para la extracción de los polifenoles, a pesar de que teóricamente este método mejora la extracción, ya que se tiene una mayor penetración del extractante debido a las ondas de ultrasonido, no obstante, también se pueden llegar a oxidar los compuestos en la muestra, cosa que posiblemente ocurrió en este caso, ya que se obtuvo una menor concentración de compuestos fenólicos en comparación con el método de agitación magnética. Por otra parte, con el método de agitación manual se obtuvo una menor extracción de compuestos fenólicos en las muestras, por lo que incluso no se optimizó este método.

El método de Folin-Ciocalteu presenta ciertas desventajas para la cuantificación de polifenoles totales, ya que no es completamente específico para dichos compuestos fenólicos, sin embargo, quienes mayormente podrían llegar a

interferir en la cuantificación son los glucósidos y las proteínas o aminoácidos, sin embargo, de estos últimos no se encontró influencia en la cuantificación, mientras que, en los glucósidos sí se logró comprobar que efectivamente influyen en su cuantificación, principalmente si se encuentran unidos a los polifenoles como flavonoides.

La adición de los reactivos de Carrez fue necesaria para la eliminación de la turbidez en los extractos de las muestras de *Agave salmiana* tanto verde como madura, sin embargo, se tienen algunas pérdidas de compuestos fenólicos como se pudo observar en los análisis por HPLC. No obstante, la turbidez presenta una interferencia cercana al 30%.

La muestra de gualumbos *Agave salmiana* en un estado maduro presentó una mayor cantidad de polifenoles totales (26.87 mg ácido gálico/g muestra seca) en comparación con la muestra verde y la muestra de *Agave spp.* (24.56 y 18.71 mg de ácido gálico/g muestra seca respectivamente); y por ende, la muestra madura de *Agave salmiana* presentó una mayor capacidad antioxidante (2.39 μ mol Trolox/g muestra).

Los compuestos fenólicos presentes en la muestra concuerdan con lo mencionado en la literatura, entre estos compuestos se tiene al ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldeído, ácido clorogénico, 1,2-hidroxibenceno, ácido vainillínico, vainillina, ácido p-cumárico, ácido transferúlico, ácido sinápico y naringenina, siendo éstos sólo algunos de los polifenoles contribuyentes a la capacidad antioxidante en las muestras analizadas.

7. REFERENCIAS.

Aguilar, B., Enríquez, J., Rodríguez, G., Granados, D., & Martínez, B. (2014). El estado actual del *Agave salmiana* y *A. mapisaga* del valle de México. *Revista Mexicana de agroecosistemas*. 1(2), 107.

Alcaide, A. (2015). Caracterización de polifenoles y su acción sobre sirtuínas en modelos de inflamación intestinal y cáncer. Tesis de Doctorado.

Azzi, A. (2017). Estrés oxidativo. *SEBBM Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, 193, 15 – 20

Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 10 (2), 42.

Barroso, E., & Quiroz, M. (2016). Extracción, cuantificación y actividad antioxidante de polifenoles extraíbles totales en cáscara de nuez y granos de café. Instituto Tecnológico de la Paz

Cañizares, M. (2002). Análisis por inyección en flujo: Herramienta clave para la automatización analítica. *Revista de la Sociedad Química de México*. 46 (2), 167.

Castro, L., Ortega, A., & Lozada, J. (2015). Modificaciones enzimáticas de compuestos fenólicos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 9, 5 – 14.

Chávez, K. (2017). Evaluación de microdispositivos para la extracción líquido – líquido de compuestos fenólicos en aceite de oliva. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cofré, A. (2015). Determinación de polifenoles totales, actividad antioxidante y antocianinas de jugo de murtila (*Ugni molinae Turcz*) obtenido por condensación de vapor. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile.

Delgado, M. (2016). Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entretextos Universidad Iberoamericana León*, 21, 3.

Diccionario enciclopédico de la Gastronomía Mexicana. (s.a.). Diccionario gastronómico. Ediciones Larousse Cocina. [En línea]. Disponible en: <https://laroussecocina.mx/palabra/flor-de-maguey/>

Dosal, M., & Villanueva, M. (2008). Introducción a la metrología química Curvas de calibración en los métodos analíticos. Facultad de Química UNAM. [En línea]. Disponible en:

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf

Elejalde, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos oxidantes. *Anales de Medicina Interna*. 18, 326 – 335.

Escutia, L. (2011). Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en uva. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Espinosa, L. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Herbario CICY*. pp. 161 – 164

Flores, R. (2018). Extracción asistida por ultrasonido de polifenoles en uva. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

García, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*. 87, 14 – 23

García, A. (2018). México cuenta con 159 especies de agave; Investigadores de la UNAM encuentran 4 nuevas. UNAM [En línea]. Disponible en: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_045.html.

García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., & Alcántara, A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., 132.

García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu. Universitat Politècnica de Valencia.

- García, E., Méndez, S., & Talavera, D. (2010). El género *Agave spp.* en México: Principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*. 5. 109 – 129
- García, F. (2017). Agave de la producción de maguey (*Agave spp.*) en México. En XI Congreso de la Asociación Española de Economía Agraria. España. pp. 312 – 316
- Gil, A. (2010). Tratado de nutrición. Madrid: Editorial Médica Panamericana. pp. 399 – 426
- Gómez, S., Vivó, M., & Soria, E. (2001). Temas para residentes: Pruebas de significación en Bioestadística. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50, 4.
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. Universidad Nacional de Colombia
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Nacional de Metrología.
- Herrera, J., Jelezova, M., Cruz, F., Dinkova, T. (2018). Protein disulfide isomerase (PDI1-1) differential expresión and modification in Mexican malting barley cultivars. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 1 – 19.
- Jiménez, W. (2019). Evaluación de capacidad antioxidante por el método ORAC utilizando un sistema de análisis por inyección en flujo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- López, A. (s.a.). Revisión bibliográfica Métodos de extracción. UDLAP Universidad de las Américas Puebla.

López, P. (2015). Determinación de la capacidad antioxidante de *Sambucus ebulus* L. utilizando el método ORAC. Trabajo de fin de grado Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

Medina, N. (2017). Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Mendoza, B., Gómez, E., Ávila, M., Hernández, E., & Rodríguez, M. (2016). Aprovechamiento integral del maguey (*Agave* spp.) en el Altiplano Hidalguense. En *Biotecnología y Alimentos en Hidalgo: Transitando a la Bioeconomía* (57 - 71). Ciudad de México: Amalgama Arte Editorial.

Molina, L. (2012). Análisis de principios activos y constituyentes naturales o contaminantes de alimentos mediante sensores luminiscentes en flujo. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.

Naranjo, J. (2016). Evaluación de dos métodos para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de gulupa (*Passiflora edulis Sims.*) con aplicación en productos mínimamente procesados. Trabajo de grado Ingeniería de Alimentos. Universidad de la Salle.

Narváez, A., Martínez, T., & Jiménez, M. (2015). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*. 56, 33 – 44

Nieto, R., Vargas, J., Nieto, J., Rodríguez, A., Manuel, V., Hernández, J., & Ortiz, M. (2016). El cultivo de maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el Valle del Mezquital. Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. pp. 19 – 26

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity using Fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619 – 4626.

Picó, Y. (2013). Ultrasound – assisted extraction for food and environmental samples. *Elsevier*, 43, 84 – 99.

Pisoschi, A., & Petre, G. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry an Analytical Biochemistry*.

Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3, 121 – 134

Quiñones, M., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76 – 89.

Rajendran, P. Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Nesamony, E., Lakshminarasaiah, U., & Nishigaki, I. (2014). Clinica Chimica Acta Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332 – 347.

Rodríguez, Z., Robaina, M., Jáuregui, U., Blanco, A., & Rodríguez, J. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45.

Rojas, A. (2010). Determinación de la capacidad antioxidante en extractos de vainilla. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Santos, C. (2002). Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta. Universidad de Salamanca. Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). El quiote y sus flores, las delicias del maguey. Gobierno de México. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-quiote-y-sus-flores-las-delicias-del-maguey?idiom=es>.

Universidad Autónoma de Chihuahua. (s.a.). Espectrometría visible y ultravioleta. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Universidad Nacional de Quilmes. (2010). Electroforesis en gel de poliacrilamida. Introducción a la Biología Celular y Molecular. Universidad Nacional de Quilmes. [En línea]. Disponible en: <https://ibcmunq.files.wordpress.com/2010/03/tp3.pdf>

Valencia, E., Ignacio, I., Sosa, E., Bartolomé, M., Martínez, E., & García, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15 – 29.

Verduzco, J., Predo, C., & Mercado, R. (2009). Caracterización e identificación taxonómica del maguey. VII Simposium-Taller “Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noroeste de México”. Facultad de Agronomía UANL RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, 2, pp.76 – 99

Vila, R. (1987). Contribución al estudio de polifenoles y aceites esenciales en el género *Thymus L.* Universitat de Barcelona. Facultad de Farmacia. Disponible en: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/1653/01.RVC_1de3.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Zamora, F., Herмосín, I., García, E., Castillo, N. (2014). Factores que condicionan la astringencia y el sabor amargo de los vinos tintos; influencia de la madurez de la uva y de las técnicas de crianza. Instituto de la vid y el vino Castilla la Mancha. pp. 1 – 12.

Zapata, S., Piedrahita, A., & Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect Nut Hum.* 16, 25 – 36.