



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN.

Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del  
marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO.

P R E S E N T A:

Misael Eulices Fernández Salazar

ASESORES:

Dra. María Gabriela Vargas Martínez.

Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

**Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.**

Que presenta el pasante: **Misael Euclides Fernández Salazar**

Con número de cuenta: **412017911** para obtener el título de: **Licenciado en Química**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2020.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                               | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. José Guillermo Penieres Carrillo |       |
| <b>VOCAI.</b>        | Dra. María Gabriela Vargas Martínez  |       |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      |       |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo       |       |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dr. Benjamin Velasco Bejarano        |       |

NOTA: los sindicales suplentes están obligadas a presentarse el día y hora del Examen Profesional [art. 127].



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
Escuela de FES Cuautitlán.

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

Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.

Que presenta el pasante: Misael Eulices Fernández Salazar  
Con número de cuenta: 412017911 para obtener el título de: Licenciado en Química

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcaatl, Méx. a 08 de Diciembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

|               | NOMBRE                               | FIRMA |
|---------------|--------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE    | Dr. José Guillermo Penieres Carrillo |       |
| VOCAL         | Dra. María Gabriela Vargas Martínez  |       |
| SECRETARIO    | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      |       |
| 1er. SUPLENTE | Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo       |       |
| 2do. SUPLENTE | Dr. Benjamín Velasco Bejarano        |       |

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

LMCF/cgs\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

**Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.**

Que presenta el pasante: **Misael Eulices Fernández Salazar**

Con número de cuenta: **412017911** para obtener el título de: **Licenciado en Química**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2020.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                               | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. José Guillermo Penieres Carrillo | _____ |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Gabriela Vargas Martínez  | _____ |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      |       |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo       | _____ |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dr. Benjamín Velasco Bejarano        | _____ |

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

LMCF/cga\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
Escuela de FES Cuautitlán.

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

**Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.**

Que presenta el pasante: **Misael Eulices Fernández Salazar**  
Con número de cuenta: **412017911** para obtener el título de: **Licenciado en Química**

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2020.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                               | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. José Guillermo Penieres Carrillo | _____ |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. María Gabriela Vargas Martínez  | _____ |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      | _____ |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo       | _____ |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dr. Benjamín Velasco Bejarano        | _____ |

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





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
Departamento de Exámenes Profesionales  
FES Cuautitlán.

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

**Extracción, identificación y cuantificación de los polifenoles del marrubio (*Marrubium vulgare*) por electroforesis capilar.**

Que presenta el pasante: **Misael Eulices Fernández Salazar**

Con número de cuenta: **412017911** para obtener el título de: **Licenciado en Química**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Diciembre de 2020.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

|                      | NOMBRE                               | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------------|-------|
| <b>PRESIDENTE</b>    | Dr. José Guillermo Penieres Carrillo | _____ |
| <b>VOCAL</b>         | Dra. Maria Gabriela Vargas Martinez  | _____ |
| <b>SECRETARIO</b>    | Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez      | _____ |
| <b>1er. SUPLENTE</b> | Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo       | _____ |
| <b>2do. SUPLENTE</b> | Dr. Benjamín Velasco Bejarano        |       |

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

LMCF/cga\*

## Agradecimientos



*Este trabajo está dedicado a todas las personas que me han acompañado en este camino, que siempre confiaron en mí y me dieron todo su apoyo incondicional.*

*A mi tía Paty que siempre me ha apoyado en todos los aspectos de mi vida y siempre me ha guiado por el camino del conocimiento, gracias por enseñarme que siempre hay que esforzarse para ser mejores personas, siempre hay que perseverar y alcanzar las metas que nos proponemos.*

*Gracias por todo el cariño que me has dado tía, te amo mucho.*

*A mis padres Lilitiana y Jorge que me enseñaron valores para guiarme por la vida y siempre me han dado su amor, apoyo y comprensión en todos los momentos difíciles, gracias los amo.*

*A mis hermanas Eve y Dany gracias por ser mi compañía, siempre busquen ser mejores personas, las amo.*

*A mis abuelitos Rosa, Evelio, Lucía y Baltazar gracias por compartirme sus conocimientos, su cariño y preocuparse por mí cuando estaba pequeño.*



*A mi abuelita Rosa, gracias por ser la abuelita más linda del mundo, tengo muchos recuerdos bonitos de cuando salíamos de vagos a Puebla o cuando me quedaba en tu casa las vacaciones, te amo mucho abue.*

*A mi abuelito Evelio gracias por ayudarme a resolver mis tareas de matemáticas cuando iba a la primaria, es un bonito recuerdo que me ha quedado.*

*A mi abuelita Lucia muchas gracias por enseñarme mis tradiciones y raíces, porque me quedo el bonito recuerdo de las ofrendas que ponías en noviembre y de cómo nos hacías pedir posada a mis primos y a mí, el 24 de diciembre, gracias por esos bellos recuerdos abuelita.*

*A todos mis tíos que siempre me han apoyado y siempre han compartido muchas cosas bonitas conmigo les doy las gracias porque este es el esfuerzo de todos y todos pusieron su granito de arena en mi vida para que este trabajo se realizara.*

*A la familia Fernández, a la Familia Salazar, a la Familia Méndez y a la Familia Zamora, muchísimas gracias a todos.*

*A mis asesoras de tesis Gabriela Vargas Martínez y Brigida del Carmen Camacho Enriquez, les estoy sumamente agradecido por el apoyo incondicional que pusieron en mí, su paciencia, su confianza, su amistad, su palabras de aliento cuando las cosas se ponían complicadas en la experimentación, gracias por sus consejos, por compartir sus conocimientos conmigo y por ser mi guía en los primeros pasos que estoy dando en la química.*

*A todos mis profesores que desde la primaria compartieron sus conocimientos conmigo y me pusieron retos que me ayudaron a ser más hábil y a evolucionar, muchas gracias.*

*Al equipo de trabajo del laboratorio de Fitoquímica, muchas gracias por contribuir con sus conocimientos y materiales para la realización de este trabajo,*

*A mi asesorita Ale, gracias por apoyarme con tus consejos, en mi trabajo con las Artemias.*

*A Miguel Romero y a Thalia Serrano muchísimas gracias por ayudarme en la recolección de las plantas.*

*A la doctora Ganem que me permitió utilizar su equipo para liofilizar algunas muestras.*

*A mis compañeros de generación y principalmente a mis amigos con los que compartí los mejores momentos en la facultad a Monter, Raúl, Daniel, Montse, Juan, Ariel, Beto, Uziel, Jonathan, Jonito, Gaby, Andy, Cleo, Juan, Alma, Jesús, Rodrigo, Oscar, Héctor, Liz, Juan José, Víctor, muchas gracias por compartir buenos momentos, son unas excelentes personas.*

*A mis amigos de toda la vida, Antonio, Osiris, Salvador, Omar, Juan, Alexis, Mauricio, Christian, Yuri, Grisel, Anel, Isaac, Gabriel, Andy, Vero, Ale, Silvia, Sara gracias por ayudarme a regular mis niveles de estrés.*

*A la "Universidad Nacional Autónoma de México" y a la "Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán" que me permitieron nutrirme de conocimientos en sus instalaciones en las cuales he vivido muchas experiencias académicas y personales muy importantes, como la realización del siguiente trabajo.*

# Índice general

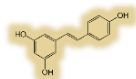
## Química



Figura 1: Estudio del *Marrubium vulgare* L. Elaboración propia

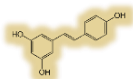


Marrubio

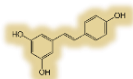


## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Abreviaturas y símbolos.....  | IX  |
| Resumen.....  | XII |
| 1 Introducción.....   | 1   |
| 2 Marco teórico.....  | 2   |
| 2.1 Marrubio ( <i>Marrubium vulgare L.</i> ).....                   | 2   |
| 2.1.1 Nombre y localización.....                                    | 2   |
| 2.1.2 Características.....  | 3   |
| 2.1.3 Composición química.....                                      | 3   |
| 2.1.4 Usos y aplicaciones.....                                      | 4   |
| 2.2 Estrés oxidativo.....   | 4   |
| 2.2.1 Radicales libres.....   | 5   |
| 2.2.2 Antioxidantes.....  | 6   |
| 2.3 Fenoles.....  | 6   |
| 2.3.1 Importancia.....  | 7   |
| 2.4 Extracción.....   | 8   |
| 2.4.1 Extracción con calor convencional (ECC).....                  | 10  |
| 2.4.1 Extracción asistida por ultrasonificación (EUS).....          | 10  |
| 2.5 Hidrólisis.....   | 11  |
| 2.6 Electroforesis.....   | 12  |
| 2.6.1 Historia.....   | 12  |
| 2.7 Electroforesis capilar (CE).....                                | 12  |
| 2.7.1 Partes básicas del equipo de electroforesis capilar (CE)..... | 13  |
| 2.7.2 Modalidades de electroforesis.....                            | 15  |
| 2.7.3 Ventajas de la electroforesis capilar.....                    | 16  |
| 2.8 Principios de la separación por electroforesis.....             | 16  |

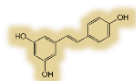


|  |    |
|--|----|
| 2.8.1 Movilidad electroforética .....  | 16 |
| 2.8.2 Flujo electroosmótico (FEO) .....  | 16 |
| 2.8.3 Velocidad lineal del FEO .....   | 17 |
| 2.8.4 Potencial zeta .....   | 17 |
| 2.9 Toxicidad en Artemia franciscana.....  | 18 |
| 2.9.1 Toxicidad aguda .....  | 18 |
| 2.9.2 Toxicidad crónica .....  | 18 |
| 3 Objetivos.....   | 19 |
| 3.1 Objetivo general del trabajo:.....   | 19 |
| 3.2 Objetivos particulares:.....   | 19 |
| 4 Metodología .....  | 20 |
| 4.1 Colecta de la planta .....   | 20 |
| 4.1.1 Preparación del material vegetal.....                                      | 20 |
| 4.2 Tamiz Fitoquímico.....   | 20 |
| 4.2.1 Extracción .....   | 20 |
| 4.2.2 Separación .....   | 20 |
| 4.3 Cuantificación de los fenoles totales .....                                  | 21 |
| 4.3.1 Extracción de la muestra de marrubio para análisis de fenoles totales..... | 21 |
| 4.3.2 Curva de calibración de ácido gálico. ....                                 | 22 |
| 4.4 Análisis de polifenoles por Electroforesis.....                              | 22 |
| 4.4.1 Extracción .....   | 22 |
| 4.4.2 Separación .....   | 23 |
| 4.5 Extracción asistida por ultrasonido .....                                    | 23 |
| 4.5.1 Determinación del tiempo.....  | 23 |
| 4.6 Hidrólisis de los extractos .....  | 24 |
| 4.7 Condiciones de separación por electroforesis capilar.....                    | 25 |

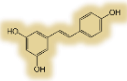


|  |    |
|--|----|
| 4.8 Identificación y cuantificación de los polifenoles.....  | 26 |
| 4.8.1 Identificación .....   | 26 |
| 4.8.2 Precisión .....  | 26 |
| 4.8.3 Cuantificación de los componentes.....   | 27 |
| 4.9 Determinación de la dosis letal media del extracto acuoso.....   | 29 |
| 4.9. Preparación del extracto acuoso (Liofilizado) .....   | 29 |
| 4.9.1 Eclosión de Artemias .....   | 29 |
| 4.9.3 Preparación de los sistemas prueba para la determinación de DL <sub>50</sub> .....                           | 30 |
| 5 Resultados y análisis .....  | 31 |
| 5.1 Tamiz fitoquímico .....  | 31 |
| 5.2 Fenoles totales.....   | 32 |
| 5.3 Condiciones de extracción.....   | 33 |
| 5.3.1 Extracción con calor convencional y asistido por ultrasonido .....   | 33 |
| 5.3.2 Comparación de la extracción con diferentes disolventes.....   | 35 |
| 5.3.3 Determinación del tiempo de extracción, asistido por ultrasonido .....                                       | 36 |
| 5.3.4 Hidrólisis de los extractos acuosos y etanolicos.....  | 37 |
| 5.4 Identificación de polifenoles. ....  | 38 |
| 5.5 Selección del estándar interno. ....   | 41 |
| 5.5.1 Precisión del sistema. ....  | 42 |
| 5.7 Cuantificación de los compuestos en los extractos de marrubio.....   | 44 |
| 5.8 Evaluación de la toxicidad del extracto acuoso de marrubio.....  | 46 |
| 5.9 Respuesta transformada por probit. ....  | 47 |
| 6 Conclusiones .....   | 49 |
| 6.1 Prospectivas.....  | 49 |
| 7 Anexos .....   | 50 |
| Anexo I.- Documento de la identificación taxonómica de la planta utilizada<br>( <i>Marrubium vulgare L.</i> )..... | 50 |





|   |    |
|---|----|
| Anexo II.- Análisis fitoquímico .....   | 51 |
| Reacción de Fehling .....   | 52 |
| Reacción de Shinoda.....  | 52 |
| Reacción de cloruro férrico .....   | 53 |
| Reacción de Baljet .....  | 54 |
| Anexo III.- Determinación de fenoles totales .....  | 55 |
| Anexo IV.- Escalas de zonas de predominio de los polifenoles detectados .....                             | 57 |
| Anexo V.- Identificación de polifenoles.....  | 60 |
| Arbutina .....  | 60 |
| Resveratrol.....  | 61 |
| (+)-Catequina .....   | 62 |
| Tirosol .....   | 63 |
| Resorcinol .....  | 65 |
| (-)-Epicatequina .....  | 66 |
| Rutina.....   | 67 |
| Ácido nordihidroguayarético (NDGA).....   | 68 |
| Ácido ferúlico .....  | 69 |
| Anexo VI.- Concentración de los polifenoles estándar, para la cuantificación .....                        | 70 |
| Anexo VII.- Validación del modelo lineal de las curvas de calibración de los<br>compuestos fenólicos..... | 71 |
| Ácido ferúlico .....  | 72 |
| Arbutina .....  | 76 |
| (+)-Catequina .....   | 81 |
| Resorcinol .....  | 84 |
| Resveratrol.....  | 89 |
| Tirosol .....   | 92 |
| Anexo VIII.- Materiales, reactivos y equipos .....  | 96 |



---

|   |    |
|---|----|
| Materia vegetal.....  | 96 |
| Reactivos para el tamiz fitoquímico .....                         | 97 |
| Fenoles de referencia .....                                       | 97 |
| Reactivos para la separación por electroforesis capilar (CE)..... | 97 |
| Equipos .....   | 97 |
| 8 Referencias .....   | 98 |

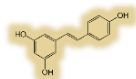
# Abreviaturas y símbolos



*Figura II: Especie Marrubium vulgare L.*

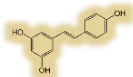
*Nota: Imagen adaptada de: Freixa, B. (2002)*



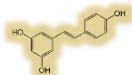


## Abreviaturas y símbolos.

| Significado   | Abreviatura | Significado                            | Símbolo           |
|---|-------------|--|-------------------|
| Ácido   | ác          | Carga eléctrica                        | Q                 |
| Ácido ascórbico   | HAsc        | Coefficiente de determinación          | r <sup>2</sup>    |
| Ácido etilendiamintetraacético  | EDTA        | Coefficiente de flujo electroosmótico  | μ <sub>eo</sub>   |
| Altura  | h           | Concentración del estándar interno     | [E.I.]            |
| Análisis de varianza (analysis of variance)                                       | ANOVA       | Constante dieléctrica del medio        | ε                 |
| Área  | A           | Cuadrados medios de la falta de ajuste | MS <sub>FDA</sub> |
| Cromatografía capilar electrocinética micelar                                     | CCEM        | Cuadrados medios del error puro        | MS <sub>EP</sub>  |
| Cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography) | HPLC        | Desviación estándar relativa           | %RSD              |
| Electroforesis capilar (Capillary electrophoresis)                                | CE          | Dosis letal media                      | DL <sub>50</sub>  |
| Electroforesis capilar de enfoque isoeléctrico                                    | ECEI        | F calculada experimentalmente          | F <sub>exp</sub>  |



|   |                           |  |                           |
|---|---------------------------|--|---------------------------|
| <b>Electroforesis capilar en zona</b>   | <b>ECZ</b>                | <b>F de tablas de distribución de Fisher</b> | <b>F<sub>tablas</sub></b> |
| <b>Equivalentes</b>   | <b>eq</b>                 | <b>Flujo electroosmótico</b>                 | <b>FEO</b>                |
| <b>Espectroscopia de absorción atómica</b>                                      | <b>EAA</b>                | <b>Grados de libertad</b>                    | <b>gl</b>                 |
| <b>Extracción asistida por calor convencional</b>                               | <b>ECC</b>                | <b>Horas</b>                                 | <b>hrs</b>                |
| <b>Extracción asistida por calor convencional en medio acuoso</b>               | <b>ECCA</b>               | <b>Kilohercios</b>                           | <b>kHz</b>                |
| <b>Extracción asistida por calor convencional en medio etanol-agua (70:30)</b>  | <b>ECC<sub>E-A</sub></b>  | <b>Kilovoltio</b>                            | <b>kV</b>                 |
| <b>Extracción asistida por calor convencional en medio metanol-agua (70:30)</b> | <b>ECC<sub>M-A</sub></b>  | <b>Megahercios</b>                           | <b>MHz</b>                |
| <b>Extracto acuoso hidrolizado, asistido por ultrasonido.</b>                   | <b>EUS<sub>E-AH</sub></b> | <b>Micrometro</b>                            | <b>µm</b>                 |
| <b>Extracción asistida por ultrasonido</b>                                      | <b>EUS</b>                | <b>Microsegundo</b>                          | <b>µs</b>                 |
| <b>Extracción asistida por ultrasonido, en medio acuoso</b>                     | <b>EUS<sub>A</sub></b>    | <b>Mililitro</b>                             | <b>mL</b>                 |
| <b>Extracción asistida por ultrasonido, en etanol-agua (70:30)</b>              | <b>EUS<sub>E-A</sub></b>  | <b>Minuto</b>                                | <b>min</b>                |



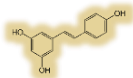
|   |                           |  |                      |
|---|---------------------------|--|----------------------|
| <b>Extracción asistida por ultrasonido, en metanol-agua (70:30)</b>   | <b>EUS<sub>M-A</sub></b>  | <b>Molaridad</b>                       | <b>M</b>             |
| <b>Extracto hidroalcohólico hidrolizado, asistido por ultrasonido</b> | <b>EUS<sub>E-AH</sub></b> | <b>Movilidad</b>                       | <b>μ</b>             |
| <b>Intervalo de confianza</b>   | <b>IC</b>                 | <b>Nanómetro</b>                       | <b>nm</b>            |
| <b>Isotacoforesis capilar</b>   | <b>ITC</b>                | <b>Ordenada al origen o intercepto</b> | <b>b<sub>0</sub></b> |
| <b>Límite de cuantificación (limit of quantification)</b>             | <b>LOQ</b>                | <b>Pendiente</b>                       | <b>b<sub>1</sub></b> |
| <b>Límite de detección (limit of detection)</b>                       | <b>LOD</b>                | <b>Potencial de hidrógeno</b>          | <b>pH</b>            |
| <b>No cuantificable</b>   | <b>NC</b>                 | <b>Potencial zeta</b>                  | <b>Z</b>             |
| <b>No detectable</b>  | <b>ND</b>                 | <b>Radio molecular</b>                 | <b>R</b>             |
| <b>Partes por millón</b>  | <b>ppm</b>                | <b>Tiempo de migración</b>             | <b>t<sub>m</sub></b> |
| <b>Plasma acoplado inductivamente</b>                                 | <b>ICP</b>                | <b>Ultravioleta/Visible</b>            | <b>UV-Vis</b>        |
| <b>Relación de áreas</b>  | <b>Rel A</b>              | <b>Viscosidad</b>                      | <b>η</b>             |



# Resumen



Figura III: Extracción, tamiz fitoquímico y DL<sub>50</sub>. Elaboración propia



## Resumen

Uno de los desafíos que enfrenta la humanidad a través de los tiempos ha sido la lucha contra las enfermedades que le aquejan. El hombre desde su aparición en la faz de la tierra ha encontrado, en la naturaleza misma, los medios necesarios para afrontar esta lucha en la que las plantas son el principal recurso utilizado. Las plantas han mostrado ser un recurso medicinal muy valioso y entre ellas se encuentra el marrubio (*Marrubium vulgare* L.). Planta de la familia de las labiadas, originaria de Europa, Asia y del norte de África que se desarrolla en la orilla de los caminos, terrenos abandonados y áreas con disturbio (Vibrans, 2011), distribuida en prácticamente todo el territorio mexicano en suelos fértiles y secos (Carreto & Ortega, 2018). Marrubio es una planta de Europa, naturalizada en México como maleza ruderal (Vibrans, 2011).

El marrubio es una planta mencionada por Hipócrates en una obra sobre esterilidad de las mujeres y Dioscórides la utilizaba como emenagogo, e indica que la planta se debe manejar con cuidado en pacientes con enfermedades renales. En el siglo IX, el marrubio se consideraba como una medicina potente, mientras que, en el siglo XVI, Pietro Mattioli la prescribía a las mujeres para estimular la secreción de leche. En México se utiliza el cocimiento para curar afecciones respiratorias, en forma tópica como astringente y por vía oral para eliminar gusanos intestinales y “contra la bilis”. (Reader's Digest, 1987), además para el tratamiento de las hemorroides junto con otras plantas (toloache y malva) (Vibrans, 2011).

El valor cultural de esta planta en el tratamiento de estas enfermedades es considerable, sin embargo, no hay estudios suficientes que avalen su seguridad y eficacia, pilares de las estrategias de la Organización Mundial de la Salud (2014-2023) sobre medicina tradicional. En el afán de contribuir en los estudios basados en evidencias se desarrolló una metodología que permitió establecer un perfil químico cualitativo y cuantitativo de los polifenoles presentes en los extractos acuoso e hidroalcohólico por Electroforesis Capilar y se determinó la capacidad antioxidante del extracto acuoso por espectrofotometría UV-VIS utilizando el reactivo de Folin-Denis.

Por otro lado, como una contribución a los estudios de seguridad se determinó la DL<sub>50</sub> del extracto acuoso de marrubio utilizando como sujeto de prueba, *Artemia franciscana*, crustáceo sensible a una gran variedad de compuestos químicos, de fácil manejo en el laboratorio, y con un cultivo relativamente sencillo y barato.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de polifenoles como ácido ferúlico, (+)-catequina, resveratrol, resorcinol, tirosol, ácido nordihidroguayarático, arbutina, (-)epicatequina y rutina. El estudio toxicológico resultó en una DL<sub>50</sub>= 2562.86 mg/L, que de acuerdo con los criterios de Sanabria-Galindo (1997) la califican como de letalidad mínima que denota la seguridad de uso.

# Introducción

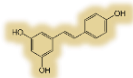


*Figura IV: Especie Marrubium vulgare L.*

*Nota: Imagen adaptada de: Ortiz, P. Cervantez, G. & Chimal, H. (2017)*



1



## 1 Introducción

El marrubio (*Marrubium vulgare* L.), es una planta de la familia de las lamiaceae, en México se encuentra ampliamente distribuido y se conoce con distintos nombres, por ejemplo: malcubio, malva del sapo, malvarrubina, marrubio blanco, mata ceniza, vitzacua, melcupis en Baja California Norte, tzopiloshihuítl en el Estado de México, k'ameri en Michoacán y kathuchjeekunia en Puebla (Carreto & Ortega, 2018). Se tiene referencia de que esta planta ha sido utilizada desde el siglo XVII para curar distintos padecimientos como son: enfermedades respiratorias (catarros, tos, bronquitis, resfríos, gripes, faringitis, asma), fiebre, falta de apetito, diarreas, dispepsias (digestiones difíciles de tipo crónico), trastornos menstruales, lesiones cutáneas, heridas superficiales y quemaduras, así como afecciones del cuero cabelludo (Ministerio de salud, 2009). En la actualidad se han reportado artículos que mencionan diversas propiedades de los extractos de marrubio, por ejemplo, se utilizan para tratar enfermedades como la diabetes mellitus de tipo 1 (Elmhdwi, Muktar, & Atitalla, 2015), presentan actividad hepatoprotectora (Akther, Sultana, & Akther, 2013), antifúngica y larvicida (Aouati & Berchii, 2015), entre otros usos.

Debido a la diversidad de aplicaciones que el marrubio presenta en la medicina tradicional mexicana y en diversos estudios publicados recientemente, (Bouterfas, Mehdadi, ELaoufi, Latreche & Benchiha, 2016; Elmhdwi, Muktar, & Atitalla, 2015; Aouati & Berchii, 2015) consideramos importante conocer el perfil fenólico del marrubio, ya que muchas de las aplicaciones que presenta la planta podrían estar relacionadas con la actividad antioxidante de los fenoles, los cuales se ha demostrado que presentan dicha actividad, por lo que ayudan a prevenir los daños producidos por el estrés oxidativo y, por lo tanto, prevenir enfermedades. El estudio de la planta en busca de compuestos fenólicos se realizó mediante la aplicación de técnicas sencillas y de bajo costo como electroforesis capilar y espectrofotometría UV-VIS.

La técnica de electroforesis capilar es una técnica que aún no es aprobada por la "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, en el análisis de plantas" (Secretaría de salud, 2013), sin embargo, se decidió utilizarla debido a que es una técnica barata, que requiere de volúmenes pequeños, no genera residuos tóxicos, presenta una alta sensibilidad y repetibilidad, así como tiempos de migración cortos y un sistema de detección de arreglo de diodos (DAD) que permite la detección de una amplia gama de moléculas, por lo que es otra técnica que permite realizar el análisis confiable de la composición química de los extractos vegetales.

Debido a que la mayoría de las aplicaciones del marrubio están relacionadas con la salud, se considera de suma importancia establecer la seguridad de uso del extracto acuoso a través del ensayo de letalidad de *A. franciscana*.

# Marco teórico

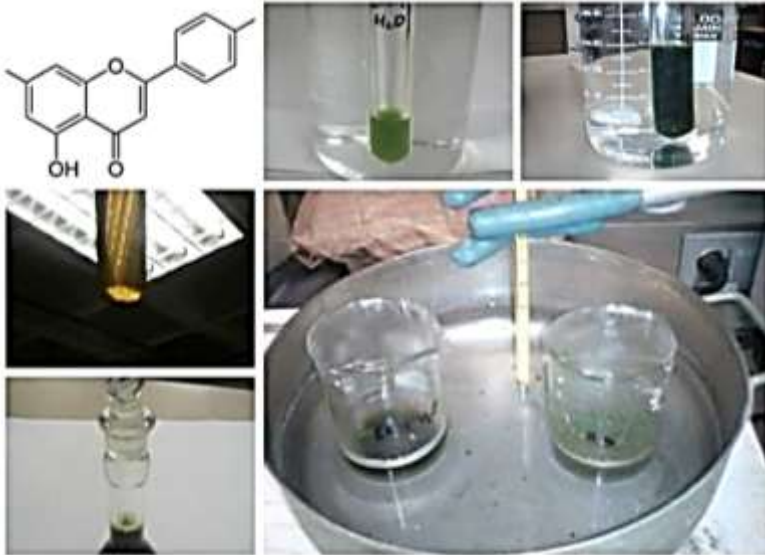
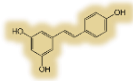


Figura V: Extracción, tamiz fitoquímico y Cuantificación. Elaboración propia

2





## 2 Marco teórico

### 2.1 Marrubio (*Marrubium vulgare L.*)

#### 2.1.1 Nombre y localización

El marrubio es proveniente de Asia, Europa, del norte de África y en la actualidad se encuentra distribuido prácticamente en todo el territorio mexicano, se puede encontrar en estados como Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas, (Mondragon Pichardo & Tenorio Lezama, 2018)

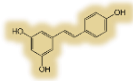
El marrubio habita en lugares baldíos nitrificados a menudo algo húmedos, como los bordes de cultivos, caminos y escombreras cerca de zonas habitadas, común en terrenos de cultivo abandonados y cultivada en huertos familiares, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, pastizal, así como a bosques mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de encino-pino y de junípero (Carreto & Ortega, 2018). En altitudes entre 0 y 1500 m. Generalmente, el tipo de suelo no le afecta, aunque suele preferir los suelos calizos; puede soportar temperaturas de hasta -10 °C (Gutiérrez Carreto & Frade García, 2016).



Figura 2.1 Especie *Marrubium vulgare L.*

Nota: Imagen adaptada de: Carreto & Ortega, 2018.





### 2.1.2 Características

“El marrubio es una planta herbácea, perenne, de 20 y 85 cm, basalmente leñosa, con tallos blancos lanosos y con un olor similar al moho y la humedad. Hojas de 1.5-5x1-5 cm, ovadas, agudas, crenadodentadas, de color verde oscuro, pecioladas y cubiertas de una pelusa corta de color grisáceo inflorescencias en verticilastros globosos, densos; brácteas foliáceas; bractéolas lineares y flores color blanco. El caliz de 8 a 10 mm, obcónico con el limbo mucho más corto que el tubo, con 5 dientes iguales, agudos, mucronados o casi espinescentes. Corola de 5-8 mm, bilabiada, de color crema con máculas púrpuras; labio superior convexo, peloso, e inferior trilobado. Fruto en núcula, aplanada o trigonal. En la figura 2.1 se muestra un ejemplar de marrubio” (Mondragon Pichardo & Tenorio Lezama, 2018; Carreto & Ortega, 2018).

### 2.1.3 Composición química

El marrubio se diferencia de las demás labiadas por acumular diterpenos no volátiles en sus pelos tectores y producir cantidades muy pequeñas de aceite esencial, pese a su fuerte olor, cuyo contenido en esencia es de trazas. El principal compuesto de los extractos de las hojas del marrubio es la marrubiína, una lactona diterpénica amarga con un núcleo labdanofuránico (1% del extracto fluido).

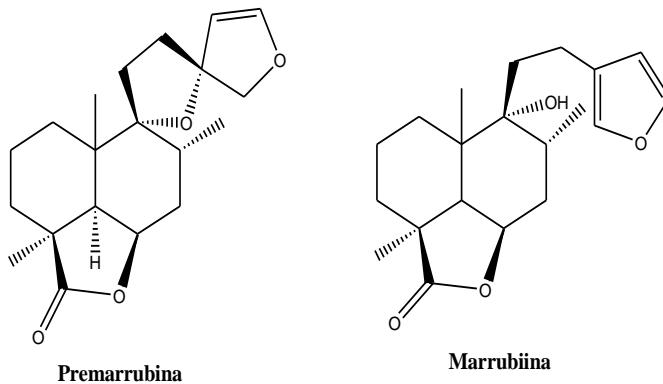
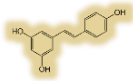


Figura 2.2 Estructura de la marrubiina y su precursor. Nota: imagen adaptada de: Freixa, B. (2002)

“La marubiína (figura 2.2) no se encuentra como tal en la planta, sino que se forma por transformación de su precursor inestable durante el proceso de extracción; otros diterpenos relacionados estructuralmente son el marrubiol, el peregrinol y el vulgarol. El aceite esencial está formado principalmente por triciclono,  $\beta$ -pineno, bisabolol,  $\beta$ -elemona e isomenton-8-tiol. Se ha reportado que contiene flavonoides, entre los que destacan apigenina, luteolina y sus derivados 7-glucósido, 7-lactato, 7-(2-glucosil)lactato y 7-(2-glucosil) lactato, y los correspondientes 3-glucósido y 3-ramnoglucósido, vitexina, vicenina II y crisoeriol. Contiene ácidos fenólicos y derivados: cafeico, clorogénico, 1-



cafeilquínico y criptoclorogénico. También contiene taninos (2-3%), saponinas, mucílagos y materias minerales”. (Sales de potasio, hierro y vitamina C) (Bouterfas, Mehdadi, Elaoufi, Latreche, & Benchiha, 2016).

#### 2.1.4 Usos y aplicaciones

El marrubio tiene diversas aplicaciones en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema digestivo y el sistema respiratorio, tradicionalmente se ha utilizado para tratar problemas de asma, bronquitis, catarros, gripe, resfríos y tos, también se ha utilizado para tratar problemas estomacales, dispepsias y faltas de apetito (Ministerio de salud, 2010).

“Se le atribuyen propiedades coleréticas, acción que puede explicarse, al menos en parte por la presencia de los ácidos cafeico y clorogénico, en esta actividad podría estar implicado también el ácido marrúbico, del cual se ha demostrado que estimula la secreción de sales biliares, este ácido no se encuentra en la planta ni en sus extractos; sin embargo, se forma por saponificación a partir de la marrubiína. La guía alemana de plantas medicinales (Comisión E) aprueba el uso del marrubio y sus preparados en casos de pérdida de apetito y trastornos dispépticos, como flatulencia y sensación de saciedad” (Freixa, 2002).

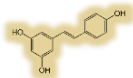
“Por otro lado, tiene propiedades diuréticas debido a su contenido en sales potásicas, popularmente se ha utilizado incluso como febrífugo en casos de malaria. El marrubio debe ser utilizado con precaución, ya que la marrubiína es un agente cardioactivo que puede producir arritmias a dosis elevadas, además es un emenagogo y un abortivo, por lo que debe evitarse totalmente su uso en mujeres embarazadas y en niños menores de 2 años” (Freixa, 2002).

Se ha demostrado que el extracto acuoso de marrubio ayuda a disminuir los niveles de glucosa en la sangre, así como los niveles de citoquinas y de óxido nítrico, los cuales están relacionados con la diabetes mellitus tipo 1; (Elmhdwi, Muktar, & Atitalla, 2015). También presenta una fuerte actividad hepatoprotectora (Akther, Sultana, & Akther, 2013).

Finalmente, se ha reportado que el extracto acuoso e hidroalcohólico del marrubio presentan actividad antifúngica y larvicida (Aouati & Berchii, 2015; Bouterfas, y otros, 2016).

## 2.2 Estrés oxidativo

En la actualidad se sabe que uno de los procesos biológicos naturales del cual se derivan algunas enfermedades es el estrés oxidativo; todos los organismos que presentan una respiración aerobia utilizan oxígeno para realizar sus procesos biológicos, el oxígeno es un elemento que presenta un doble efecto fisiológico: por una parte es esencial para la obtención de energía, pero también presenta efectos tóxicos en el organismo, debido a que de él se derivan diversas moléculas inestables denominadas radicales libres los cuales tienen efectos dañinos en las células (Constanza Corrales & Muñoz Ariza, 2012).



El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por presentar elevados niveles de radicales libres y especies reactivas, los cuales no puede contrarrestar la célula con sus mecanismos de defensa (Lozano Casanova, 1999).

“El estrés oxidativo puede tener diferente magnitud, desde el estrés oxidativo leve, en el cual las moléculas antioxidantes son suficientes para restablecer el equilibrio, hasta el estrés oxidativo grave, el cual llega a tener grandes alteraciones en el metabolismo celular como rompimiento en la cadena de DNA, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  catalítico, daño a los transportadores membranales de iones y otras moléculas específicas, así como peroxidación de lípidos” (Dorado Martínez, Rugerío Vargas, & Rivas Arancibia, 2003).

### 2.2.1 Radicales libres.

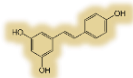
“Desde el punto de vista químico, los radicales libres son pequeñas moléculas con un electrón sin aparear, son altamente reactivos y, por lo tanto, tienen un tiempo de vida corto, son fácilmente difusibles y se producen generalmente en las células por diferentes mecanismos, a través de reacciones de transferencia de electrones entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo” (Venereo Gutierrez, 2002).

“Algunos radicales libres se producen generalmente a través de reacciones de transferencia de electrones, con o sin participación enzimática, pero mediada por iones metálicos de transición; tal es el caso del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que es generado siempre que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entra en contacto con iones cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) o iones hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ), ya que el peróxido de hidrógeno y los complejos metálicos están presentes en humanos, es lógico asumir que el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) puede ser formado *in vivo*”.

Los mecanismos de formación de los radicales libres son tres:

1. Transferencia electrónica, en la que se produce la cesión de un electrón a una molécula.
2. Pérdida de un protón de una molécula.
3. Ruptura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula, de manera que cada fragmento obtenido conserva uno de los electrones apareados del enlace.

“Si más del 95% del  $\text{O}_2$  consumido por las células de nuestro organismo es reducido vía acuosa por el citocromo oxidasa mitocondrial, completamente a  $\text{H}_2\text{O}$  durante la respiración mitocondrial, un pequeño porcentaje (<5%) es convertido a especies reactivas de oxígeno. Una vez que se ha formado el radical libre en la reacción de iniciación, éste tiene la capacidad de ceder el electrón a cualquier otro compuesto, originándose nuevos radicales, lo cual constituye la reacción de propagación en cadena que puede amplificarse tanto que llegue a afectar a los tejidos corporales” (Saavedra, 2010).



## 2.2.2 Antioxidantes

Como ya se mencionó anteriormente, todos los seres vivos que utilizan oxígeno para obtener energía liberan radicales libres, los cuales deterioran la estructura y funcionamiento celular, sin embargo, este proceso suele ser controlado gracias a mecanismos de defensa que ayudan a neutralizar estos efectos dañinos, los organismos aerobios, producen enzimas y moléculas que contrarrestan el efecto oxidante de los radicales libres, a estas defensas se las denomina antioxidantes.

Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de estos causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células.

“La enzima aldehído oxidasa (AOX) constituye la primera línea de defensa contra el daño oxidativo y se encarga de eliminar los radicales derivados del oxígeno  $O_2$  y el  $H_2O_2$ , en la segunda línea de defensa se encuentran moléculas no enzimáticas, capaces de reducir a los radicales libres, para evitar el daño oxidativo” (Venereo Gutierrez, 2002).

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos que consumimos diariamente y puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Coronado, Vega, Rey Gutierrez, Vázquez, & Radilla, 2015).

En la naturaleza, la principal fuente de moléculas antioxidantes son los productos de origen vegetal, existen diversas moléculas provenientes del metabolismo secundario de las plantas, las cuales presentan actividad antioxidante, entre los más importantes se encuentran la vitamina C, la vitamina E, los carotenoides y los flavonoides (Coronado, Vega, Rey Gutierrez, Vázquez, & Radilla, 2015).

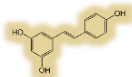
## 2.3 Fenoles

Los fenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que provienen del metabolismo secundario de las plantas, se caracterizan por presentar al menos un anillo bencénico sustituido por uno o más grupos hidroxilo.

Existen diferentes criterios, como estructura y origen, para clasificar los polifenoles. En la figura 2.3 se muestra un ejemplo.

Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos, (derivados del ácido benzoico y del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones & Aleixander, 2012).

Los principales grupos de polifenoles son provenientes de las rutas del ácido shikímico y la del acetato-malonato, entre ellos se encuentra los ácidos fenólicos derivados de ácido p-hidroxibenzoico y del ácido p-hidroxicinámico, los lignanos del ácido cinámico, los alcoholes fenólicos y los metabolitos de biosíntesis mixta estilbenos y flavonoides. En la figura 2.3 se muestran algunos ejemplos.



La ruta del ácido shikímico 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); la ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

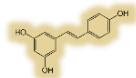
| Derivados del ác. p-hidroxibenzoico              | Biosíntesis mixta                                  |   |
|--|--|---|
| <p><math>R_1=R_2=R_3= OH</math> Ácido Gálico</p> | <p><b>Estilbenos</b></p> <p>R=H Resveratrol</p>    | <p><b>Flavonoides</b></p>                 |
|  | <p><b>Derivados de ácidos hidroxicinámicos</b></p> |   |
| <p><math>R_1=OH</math> Ácido p-cumárico</p>      | <p><math>R_1=OH; R_2=H</math> Tirosol</p>          | <p><math>R_1=R_2=OH</math> Enterodiol</p> |

Figura 2. Clasificación de compuestos fenólicos de acuerdo con su origen

“Los fenoles tienen la característica de presentar actividad antioxidante, antimicrobiana, antimicótica y protegen a las células de los efectos de los rayos UV-VIS. Diversos estudios indican que la función antioxidante de los polifenoles radica en un amplia gama de actividades biológicas como secuestradores de radicales libres y quelantes metálicos, además de que presentan actividad en la modulación de enzimas y tienen efectos sobre las vías de señalización celular y en la expresión de genes” (Rodrigo, Miranda, & Leonardo, 2011).

### 2.3.1 Importancia

“Los fenoles son los principales antioxidantes de la dieta y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides. Algunos alimentos destacan por su alto contenido en compuestos fenólicos entre ellos el té verde, el vino, las frutas y el cacao, por mencionar algunos; los polifenoles contenidos en estos



alimentos son altamente efectivos como defensa antioxidante” (Quiñones & Aleixander, 2012).

Los polifenoles son responsables de ciertos sabores característicos y de la astringencia que presentan algunas plantas o frutas, esta última característica es debido a la capacidad que tienen los polifenoles de precipitar proteínas y de complejarse con macromoléculas, es por esto que su aplicación es muy común en la industria del curtido de pieles, debido a que ayuda a formar enlaces entre las fibras de colágeno, lo cual le confiere resistencia al agua, al calor y la abrasión (Isaza Martínez, 2007).

Diversos estudios han demostrado que una dieta alta en productos vegetales, ricos en compuestos fenólicos, ayuda a prevenir diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo de las células, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y Alzheimer por lo que se ha demostrado que ayudan al buen funcionamiento y protección del sistema cardiovascular y cerebrovascular (Sánchez Valle & Méndez Sánchez, 2013).

Debido a las propiedades de los fenoles y las aplicaciones reportadas de los extractos de marrubio, consideramos importante conocer el perfil electroforético de los polifenoles presentes en las hojas, con el fin de observar la relación entre sus propiedades y la presencia de algún polifenol.

Actualmente se están realizando muchísimos estudios con esta planta a nivel mundial, debido a la diversidad de propiedades que presenta y, en el caso particular de México, es importante su estudio debido a su amplia distribución y propiedades benéficas que se le han encontrado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I, que es una enfermedad que padecen el 15.8 % de los adultos de este país (Elmhawi, Muktar, & Atitalla, 2015; Mejía, 2017).

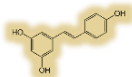
## 2.4 Extracción

El término extracción se define como la transferencia de una sustancia de un medio a otro.

Existen diversos métodos de extracción, los cuales tienen como fin la liberación del contenido celular y favorecer la obtención de los componentes químicos de las plantas.

Los procesos de extracción pueden ser variados y su elección depende principalmente de las propiedades físicas, químicas y estructurales de los metabolitos que se desea extraer, así como de las características de la materia prima que se esté analizando y otros factores así como la toxicidad y puntos de ebullición de los disolventes. (González Villa, 2004)

Existen métodos de extracción, por ejemplo: mecánicos como la expresión, métodos de extracción basados en puntos de ebullición como la destilación, métodos basados en la utilización de gases o métodos basados en la extracción con líquidos, en la figura 2.4 se muestran algunos.



La extracción con disolventes se divide en dos tipos: extracción continua y discontinua.

Extracción al equilibrio o métodos discontinuos. Son aquellos procesos que resultan cuando hay un gradiente de concentración, es decir, la distribución de la concentración de las sustancias dentro y fuera de la partícula vegetal alcanzan el valor de la constante de equilibrio, no existe diferencia y por tanto, el gradiente de concentración entre extracto crudo y la droga residual es cero.

Extracción exhaustiva o continua: Proceso de separación en el que siempre se mantiene el gradiente de concentración entre el líquido extractivo y la droga a extraer. En esta técnica el disolvente utilizado se va renovando, actuando en una sola dirección y nunca llegará a al equilibrio (DaSilva, Couto, & Bresolin, 2012).

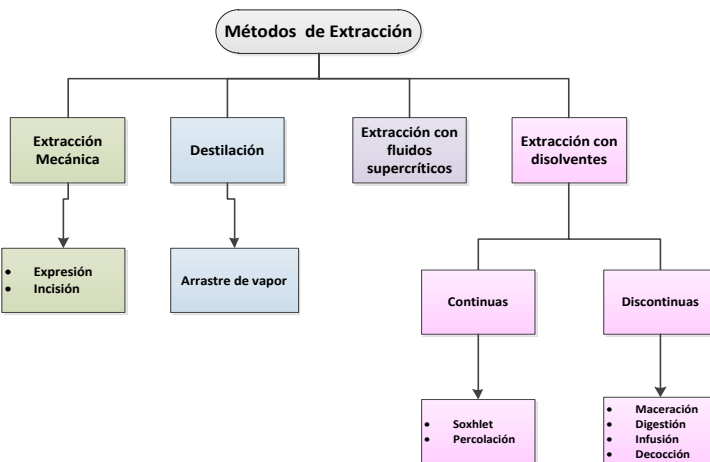
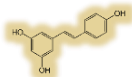


Figura 2.4 Métodos de extracción

Nota: Imagen adaptada de: Amaguaña, R & Churuchumbi R, (2018)

En un esfuerzo por desarrollar métodos de extracción con una mayor eficiencia se han combinado las energías alternas con los métodos convencionales para el desarrollo de nuevos métodos como la extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido.

Los métodos convencionales como destilación por arrastre de vapor y extracción por disolventes presentan algunas desventajas como: rendimientos bajos, pérdidas de compuestos volátiles, tiempos de extracción prolongados, y residuos tóxicos provenientes del disolvente utilizado. Estas condiciones han llevado al desarrollo de técnicas alternativas que superan las desventajas de los métodos tradicionalmente usados. Como una alternativa



a los métodos convencionales surgen los métodos con un enfoque verde entre los que se encuentra: extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y ultrasonido, entre otros, ver figura 2.5.

En este trabajo se realizaron extracciones con disolventes polares y se compararon dos formas de acelerar el proceso de extracción, la primera mediante infusión con calor convencional y la segunda aplicando ultrasonido como método alternativo, que es muy utilizado recientemente en la extracción de polifenoles (González Villa, 2004).

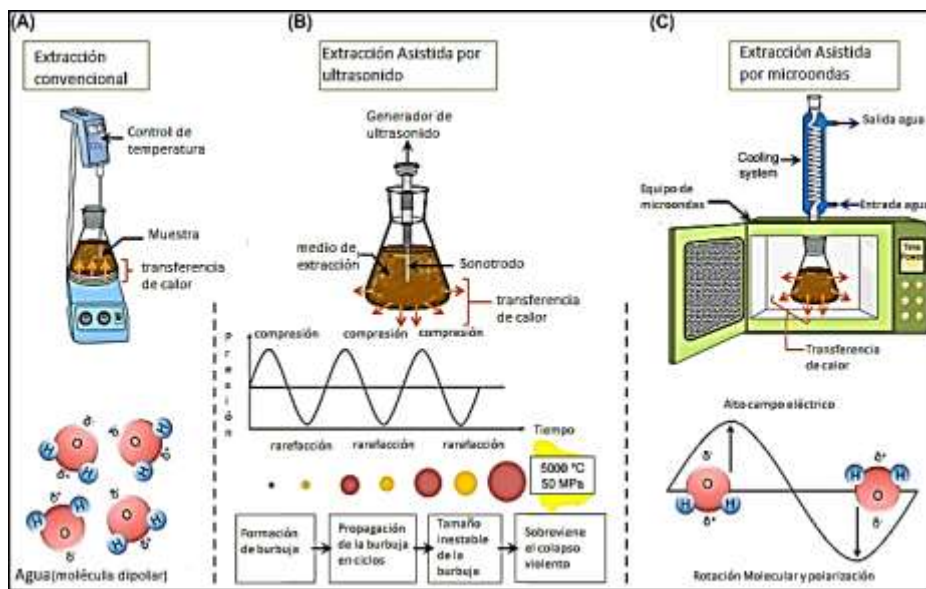


Figura 2.5 Método convencional y con un enfoque verde.

Nota: Imagen adaptada de: Roohinejad, y otros, (2018)

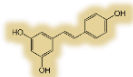
### 2.4.1 Extracción con calor convencional (ECC)

Durante la extracción se puede utilizar disolvente caliente para favorecer el proceso de difusión de los componentes, con el fin de realizar una mejor extracción y aumentar el gradiente de concentración entre la materia vegetal y el disolvente, como lo indica la ley de Fick (González Villa, 2004).

### 2.4.1 Extracción asistida por ultrasonicación (EUS)

Técnica innovadora fundamentada en el uso de las ondas ultrasónicas para la extracción de compuestos de una matriz vegetal (puede ser de otro tipo). La propagación de las ondas





ultrasónicas causa la implosión de burbujas, fenómeno conocido como cavitación (figura 2.6) que induce macroturbulencia, colisiones entre partículas a alta velocidad y perturbación en las partículas microporosas de la muestra. Como resultado, el soluto se difunde rápidamente de la fase sólida al disolvente. La extracción asistida por ultrasonido presenta varias ventajas: es amigable con el medio ambiente, simple, efectiva, económica, con altos rendimientos y aceleración cinética comparada con los métodos convencionales. Sin embargo, la eficiencia del instrumento disminuye con el tiempo, ya que la potencia disminuye progresivamente con el uso (Roohinejad, y otros, 2018).

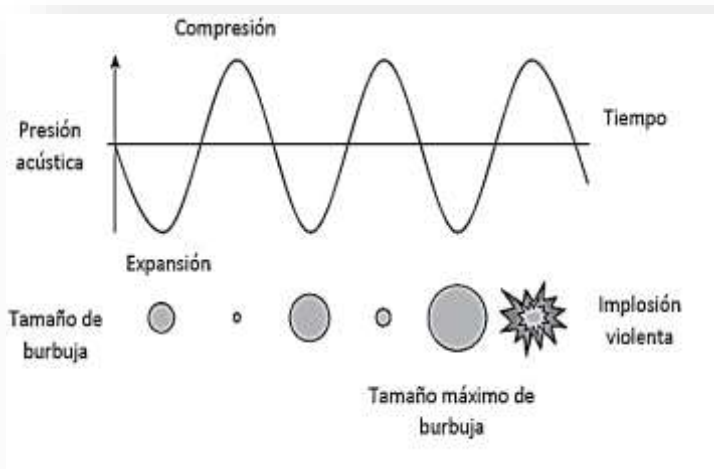


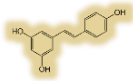
Figura 2.6 Fenómeno de cavitación

Imagen adaptada de: Ahmed, J. Ramaswamy, H. Kasapis, S & Boye J. (2010)

## 2.5 Hidrólisis

En la naturaleza, los polifenoles se encuentran en mayor proporción de una forma glicosilada, también se pueden encontrar en su forma libre y en forma de sulfatos, dímeros o polímeros (Quiñones & Aleixander, 2012).

Durante el proceso de identificación que se realizó en este trabajo, se utilizaron polifenoles libres, los cuales se comercializan generalmente en su forma libre, por lo que para poder realizar una comparación de las señales del extracto con los estándares utilizados, se realizó una hidrólisis del extracto, para tener cada polifenol en su forma libre y así tener respuestas comparables (Nardini, Cirillo, Natella, & Scaccini, 2002).



## 2.6 Electroforesis

Electroforesis proviene de dos palabras griegas, elektro que significa electricidad y phoros que significa movimiento (Valpueda, 2008).

La electroforesis es una técnica de separación, la cual se basa en la migración o desplazamiento diferencial de partículas cargadas (iones) y sustancias neutras, por atracción o repulsión en un medio conductor por acción de un campo eléctrico (Castagnino, 1999).

### 2.6.1 Historia

El desarrollo de la técnica de electroforesis capilar ha sido el resultado de múltiples descubrimientos a lo largo del tiempo, los cuales ayudaron a mejorar la técnica.

En 1809 Reuss citó en las memorias de la Sociedad Natural Imperial (Moscow), un fenómeno en el cual al inducir una corriente eléctrica dentro de un frasco con agua y arena se observa el movimiento migratorio de partículas de arena en el fondo del frasco, éste fue el primer fenómeno que indica la polarización de la sílice, ya que la arena está compuesta principalmente de dióxido de silicio, que es el material que se utiliza en la actualidad para la fabricación de tubos capilares que funcionan como cámaras de separación en la electroforesis capilar (Castagnino, 1999).

En 1816 se observó el transporte del agua por acción de una corriente galvánica, generada por la polarización negativa del capilar que une dos recipientes electródicos.

Debido al paso de la corriente eléctrica, se produce una primera capa de cationes llamada capa fija y una segunda capa llamada capa móvil y, debido a la polarización del agua, se produce una migración de las partículas hacia el cátodo, en contra del flujo de la corriente eléctrica, esta corriente líquida se denomina flujo electroosmótico (Castagnino, 1999).

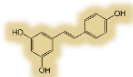
La electroforesis fue desarrollada inicialmente por Tiselius, quien comenzó a estudiar el proceso electroforético debido a la necesidad de más técnicas de separación de proteínas, por lo que le otorgaron el premio Nobel en 1948.

Tiselius trabajaba la electroforesis en medios libres sin elementos soporte, por lo que tuvo problemas vinculados con la difusión térmica y con la convección, problema que se resolvió utilizando medios anticonvectivos como agar, agarosa y poliacrilamida.

Éstos y otros descubrimientos fueron mejorando la técnica de electroforesis hasta llegar ahora a contar con equipos de electroforesis capilar muchísimo más precisos.

## 2.7 Electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar (CE) presenta el mismo fundamento de separación que la electroforesis clásica, la diferencia se encuentra en el empleo de capilares de sílice fundida



menores a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, en los cuales se lleva a cabo la separación de los componentes de una forma diferencial, con base en las movilidades electroforéticas de las partículas, las cuales están vinculadas con su relación carga/masa y con la conformación de los analitos (Revilla Vázquez, 2005).

La electroforesis capilar difiere de la electroforesis clásica básicamente en dos aspectos:

- Se realiza en tubos capilares de diámetro entre 10 y 200  $\mu\text{m}$ .
- No es necesario usar un medio anticonvectivo, aunque en ocasiones se utilizan los geles para el tamizado de macromoléculas (Revilla Vázquez, 2005).

### 2.7.1 Partes básicas del equipo de electroforesis capilar (CE)

Un equipo de electroforesis capilar está constituido por los componentes que se indican a continuación. Ver figura 2.7

- Un capilar de sílice fundida, recubierto de poliacrilamida con un diámetro interno de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$
- Dos electrodos (ánodo y cátodo)
- Una fuente de poder
- Viales donde se introducen los electrodos y el electrolito soporte
- Sistema de enfriamiento del capilar
- Sistema de inyección
- Un detector

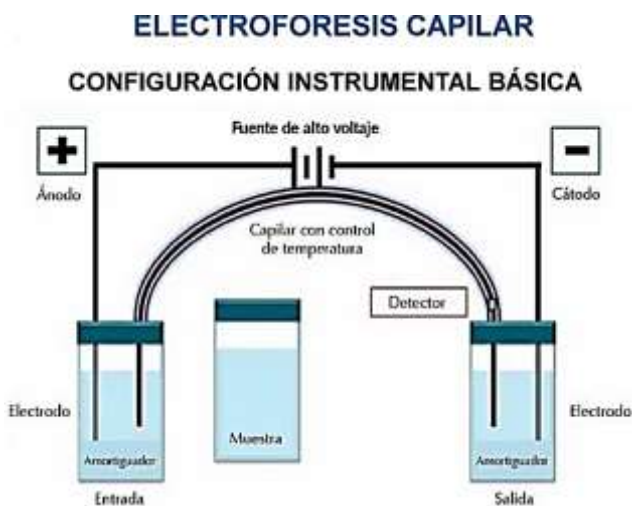
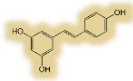


Figura 2.7 Componentes de un equipo de electroforesis capilar. Nota: Imagen adaptada de Chopin, D. (2012)



**Capilares:** Los capilares de sílice fundida revolucionaron la cromatografía de gases y han producido la cámara de separación en la electroforesis capilar, son una parte fundamental del equipo y en electroforesis capilar suelen tener un diámetro de entre 10 y 200  $\mu\text{m}$ " (Revilla Vázquez, 2005).

**Electrodos:** Un par de electrodos que realizan el trabajo de cátodo y ánodo, que son generalmente de platino.

**Fuente de poder:** Una fuente de potencia de alto voltaje de 20 a 30 kV, altamente estabilizada y automatizada para el mantenimiento estable de la tensión y la corriente (Castagnino, 1999).

**Detectores:** Existe gran diversidad de detectores que se utilizan en electroforesis capilar, con la finalidad de realizar el análisis de diversas muestras.

- Espectrofotométricos: UV-VIS (arreglo de diodos), fluorescencia
- Electroquímicos: Conductimétricos, amperométricos y potenciométricos
- Espectrométricos: Espectrómetro de masas
- Sistemas acoplados: plasma acoplado inductivamente (ICP), Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

**Electrolito soporte:** Existe una gran variedad de soluciones amortiguadoras para utilizar como medio soporte, según el pH al que se requiere trabajar.

Los sistemas amortiguadores efectivos tienen un intervalo de amortiguamiento de aproximadamente dos unidades de pH al rededor del valor del pKa.

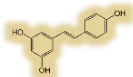
La solución amortiguadora utilizada debe presentar ciertas propiedades:

1. Buena capacidad de amortiguamiento de pH en el intervalo encontrado
2. Baja absorbancia en la longitud de onda de la detección
3. Baja movilidad (por lo que se necesita una baja concentración iónica) (Castagnino, 1999)

**Sistema de enfriamiento:** El sistema de enfriamiento es muy importante debido a que es el encargado de disipar el calor generado por la corriente eléctrica y evita cambios en la viscosidad y en la movilidad de las partículas.

Existen dos sistemas de enfriamiento:

1. Utilizando aire por medio de un ventilador
2. Utilizando un líquido, generalmente clorofluorocarbonos (CFC)



El sistema de enfriamiento por líquido suele ser teóricamente más eficiente que el sistema de enfriamiento por ventilación, sin embargo, el sistema de enfriamiento por ventilación suele ser más simple y más barato.

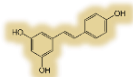
**Sistema de inyección:** Para tener una alta eficacia teórica, el sistema de inyección no debería introducir un ensanchamiento de la zona significativo, por lo que los métodos de inyección utilizados evitan el posible ensanchamiento de zonas debido a la conexión con válvulas de inyección.

Existen principalmente dos formas de inyección en CE, la inyección por gradiente de voltaje (electrocinética) y la inyección por gradiente de presión (hidrodinámica o hidrostática) entre los dos extremos del capilar (Revilla Vázquez, 2005).

### 2.7.2 Modalidades de electroforesis

La selectividad de esta técnica se debe a las diferentes modalidades de electroforesis capilar, las cuales permiten el analizar una gran diversidad de moléculas (Revilla Vázquez, 2005).

- **Electroforesis capilar en zona (ECZ):** Es el tipo de electroforesis más sencillo debido a que únicamente se lleva a cabo la separación de la muestra en un electrolito soporte y la separación de los compuestos aniónicos, catiónicos y neutros se da por acción del campo eléctrico y del flujo electro osmótico (FEO).
- **Cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM):** En este tipo de electroforesis se utilizan agentes surfactantes o tensoactivos los cuales son adicionados al electrolito soporte en ciertas concentraciones que produzcan la formación de micela; esta técnica ayuda en la separación de partículas neutras e inclusive partículas cargadas.
- **Electroforesis capilar de enfoque isoelectrico (ECEI):** Es una técnica utilizada generalmente para la separación de péptidos y proteínas basándose en su punto isoelectrico, se utiliza en la separación de especies zwitteriónicas las cuales a diferente pH presentan carga positivas, negativas o ambas, pero con una carga neta de cero a determinado pH.
- **Isotacoforesis capilar (IC):** En esta técnica se utilizan un electrolito líder, el cual debe de tener un tiempo de migración menor a todos los analitos y un electrolito terminal, y que debe de tener un tiempo de migración mayor a todos los analitos.
- **Electroforesis capilar en gel:** En esta técnica, el capilar se llena con un gel que funciona como tamiz molecular para producir una separación basada en el tamaño de las partículas.



### 2.7.3 Ventajas de la electroforesis capilar

El desarrollo de la electroforesis capilar trajo diversas ventajas como una alta resolución, una alta eficiencia en la separación, tiempos de análisis cortos, pequeñas cantidades de muestra, una alta selectividad y una aplicación en diversas áreas de la química (Revilla Vázquez, 2005).

Estas ventajas son consecuencia del desarrollo de los componentes y de la diversidad de variables que se pueden controlar como son la corriente eléctrica, el diámetro y largo del capilar, la elección de diversas soluciones electrolito, la modalidad de separación, así como la elección de diversos detectores (Revilla Vázquez, 2005).

## 2.8 Principios de la separación por electroforesis

### 2.8.1 Movilidad electroforética

La movilidad electroforética es una propiedad que depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito, por lo tanto, es evidente que los analitos cargados y pequeños tienen una alta movilidad mientras que las partículas cargadas con un alto peso molecular presentarían una movilidad baja.

En la ecuación 1 podemos ver la representación matemática de la movilidad, donde:

$$\mu = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad \text{Ecuación 1}$$

$\mu$  = Movilidad electroforética.

$\eta$  = Viscosidad de la solución.

$q$  = Carga del analito.

$r$  = radio molecular

### 2.8.2 Flujo electroosmótico (FEO)

El flujo electroosmótico se genera en el capilar debido a la presencia de un campo eléctrico, la solución electrolito entra en contacto con la superficie del capilar de sílice fundida por lo que queda cargada negativamente debido a la ionización de los grupos silanol (a pH mayor a 4) y provoca la atracción de partículas catiónicas de la solución electrolito, estas partículas forman una doble capa, la primera capa se llama capa estática debido a que los cationes se encuentran fuertemente adsorbidos a la superficie capilar, la segunda capa presenta una mayor movilidad y ésta genera el llamado flujo electroosmótico, el cual se mueve en contra de la corriente eléctrica, en dirección al cátodo, tal y como se muestra en la figura 2.8.

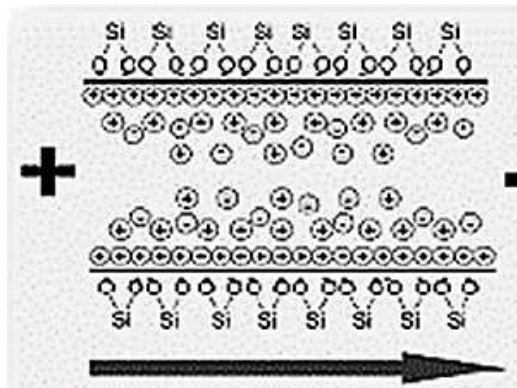
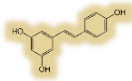


Figura 2.8 Flujo electroosmótico.

Nota: Imagen adaptada de: Lapizco, E. (2015)

### 2.8.3 Velocidad lineal del FEO

La velocidad lineal del flujo electroosmótico ( $v_{eo}$ ), está dada por la ecuación 2, la cual se muestra a continuación, donde:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon E \zeta}{4\pi\eta} \quad \text{Ecuación 2}$$

$\zeta$ =Potencial zeta.

E=Campo eléctrico.

$\eta$ =Viscosidad.

$\epsilon$ = constante dieléctrica del medio.

### 2.8.4 Potencial zeta

Los cationes que se encuentran cercanos a la superficie y pertenecen a la doble capa, generan un potencial muy cerrado entre la pared y los contraiones, que se denomina potencial zeta ( $\zeta$ ) como se describe en la ecuación 3, donde:

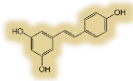
$$\zeta = \frac{\pi\eta\mu_{eo}}{\epsilon} \quad \text{Ecuación 3}$$

$\zeta$ =Potencial zeta.

$\mu_{eo}$ =Coeficiente de flujo electroosmótico.

$\eta$ =Viscosidad.

$\epsilon$ = constante dieléctrica del medio.



## 2.9 Toxicidad en *Artemia franciscana*

Existe la creencia de que el consumo de plantas medicinales, por ser de origen natural, no generan ningún daño al organismo, sin embargo, esta creencia es falsa ya que si una planta tiene efecto medicinal, también puede presentar un efecto tóxico.

Desde 1982 se han desarrollado bioensayos para la determinación de la toxicidad con la utilización de “camarones de mar” (*Artemia franciscana*); los cuales son utilizados como vía inicial de tamizaje tóxico de extractos, fracciones y compuestos depurados para discriminar aquellas muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*, demostrando ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes (Sanabria, 1997).

### 2.9.1 Toxicidad aguda

La toxicidad aguda es la capacidad de una sustancia de causar daño durante su exposición a ésta. Los síntomas se pueden presentar durante la exposición, pocas horas después o pocos días después de la exposición.

### 2.9.2 Toxicidad crónica

La toxicidad crónica es la propiedad de una sustancia de causar daños a largo plazo. Estos efectos tienen un período de latencia y se manifiestan después de un largo tiempo. Los efectos tóxicos crónicos pueden resultar de una exposición simple o después de repetidas exposiciones a lo largo de un período. Los efectos crónicos pueden ser neurológicos, mutagénicos, cancerígenos en el sistema reproductor y teratogénicos.



# Objetivos.

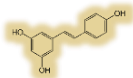


*Figura VI: Especie Marrubium vulgare L.*

*Nota: imagen adaptada de: Mondragon P. y Tenorio L. (2018)*

# 3





## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo general del trabajo:

Desarrollar una metodología para la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en las hojas de la planta marrubio (*Marrubium vulgare L.*) por electroforesis capilar, con el fin de contribuir al estudio fitoquímico de la planta.

### 3.2 Objetivos particulares:

-Realizar el estudio fitoquímico proximal para evaluar el tipo de compuestos que contienen las muestras vegetales de *Marrubium vulgare L.*, utilizando calor convencional.

-Analizar los extractos obtenidos mediante la extracción, utilizando calor convencional y ultrasonificación, con el fin de seleccionar el perfil electroforético que proporcione mayor cantidad de polifenoles.

-Seleccionar el disolvente adecuado para la extracción de los componentes fenólicos de las hojas de marrubio, con el fin de obtener el mayor número de polifenoles y mayor altura de la señal.

-Identificar los polifenoles presentes en los extractos de marrubio, mediante la comparación de los perfiles electroforéticos del extracto, y el extracto adicionado con un estándar, mediante la comparación de los tiempos de migración, forma de la señal analítica y comparación del espectro UV-VIS.

-Cuantificar los polifenoles identificados en los perfiles electroforéticos, con la medición de las curvas de calibración correspondientes e interpolación en el modelo lineal obtenido.

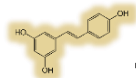
-Evaluar la mortalidad causada por el extracto acuoso de *Marrubium vulgare L.* en nauplio de *Artemia Franciscana*, para determinar la dosis letal media.

# Metodología



Figura VI: Trabajo experimental. Elaboración propia.





## 4 Metodología

### 4.1 Colecta de la planta

El material vegetal se recolectó en el mes de julio en el poblado de San Sebastián del municipio de Zumpango, Estado de México.

#### 4.1.1 Preparación del material vegetal

La conservación del material vegetal fue por desecación natural a la sombra, para lo cual, el material se extendió en una mesa sobre papel secante, protegido de la luz y el polvo.

Una vez que el material vegetal se secó, se separaron las hojas y se trituraron utilizando un molino de cuchillas. El polvo obtenido se pasó a través de un tamiz con malla número 60. Ver figura 4.1



Figura 4.1 Tamizado de la planta. Fotografía tomada en el laboratorio de química analítica de la FES Cuautitlán, Campo 1. Elaboración propia

### 4.2 Tamiz Fitoquímico.

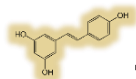
#### 4.2.1 Extracción

**Extracto acuoso:** Se pesó 1 g del polvo vegetal en un vaso de precipitados y se adicionaron 20 mL de agua desionizada. Se cubrió el sistema y se colocó en un baño María por 90 min a 50 °C. Terminado el tiempo se etiquetó como extracto acuoso.

**Extracto hidroalcohólico:** Se pesó 1g de materia prima vegetal previamente triturada y se adicionaron 20 mL de una mezcla etanol-agua (70:30), se cubrió y se colocó en un baño María durante 90 minutos a 50°C, finalizado el tiempo se etiquetó como extracto hidroalcohólico (figura 4.2).

#### 4.2.2 Separación

Los dos extractos se trabajaron por separado y debidamente etiquetados. Se introdujeron en una centrifugadora durante 15 min a una velocidad de 3000 rpm. Finalizado el tiempo



se filtraron a vacío, se concentraron utilizando un evaporador de flujo de nitrógeno durante 1 h a una temperatura de 40°C y 5 psi de presión. De cada extracto se tomó una alícuota de 2mL para realizar las pruebas a la gota indicadas en la tabla 4.1.



Figura 4.2 Extracto acuoso e hidroalcohólico. Fotografía tomada en el laboratorio de química analítica de la FES Cuautitlán, Campo 1. Elaboración propia

Tabla 4.1 Análisis fitoquímico (Anguiano, 1994)

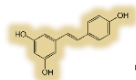
| Reacciones de identificación. |                              |                              |                 |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Reacción                      | Metabolito para identificar. | Extracto etanol-agua (70:30) | Extracto acuoso |
| Baljet                        | Lactonas                     | ✓                            | –               |
| Fehling                       | Azúcares reductores          | ✓                            | ✓               |
| FeCl <sub>3</sub>             | Fenoles                      | ✓                            | ✓               |
| Shinoda                       | Flavonoides                  | ✓                            | ✓               |

Nota: (-)= No se realizó la prueba, ( ✓ ) =Se realizó la prueba

### 4.3 Cuantificación de los fenoles totales.

#### 4.3.1 Extracción de la muestra de marrubio para análisis de fenoles totales.

Se pesó 1.21 g de polvo vegetal en un vaso de precipitados, se agregaron 20 mL de agua desionizada a 60 °C, se cubrió y se dejó enfriar durante 90 min, posteriormente se filtró y se centrifugó durante 15 min a 2500 rpm.



Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  del extracto y se hicieron reaccionar con 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Denis (tungstato de sodio y ácido fosfomolibdico en ácido fosfórico), con 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5 % y se llevó a un aforo de 10 mL, se dejó reposar durante 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 710 nm.

### 4.3.2 Curva de calibración de ácido gálico.

Se pesó 0.0264 g de ácido gálico, se disolvieron y se llevaron a un aforo de 10 mL, posteriormente se tomaron 400  $\mu\text{L}$  y se llevaron a un aforo de 10 mL para tener una solución estándar de concentración 103.48 mg/L. A partir de esta solución stock, se tomó el volumen indicado para cada sistema los cuales se muestran en la tabla A.I (anexo III), se hicieron reaccionar con 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Denis, 400  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5 %, se llevaron las soluciones a un aforo de 10 mL, protegiendo los sistemas de la luz dentro de una caja oscura y después de 30 min se midió la absorbancia de cada sistema, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis de la marca DYNAMICA modelo HALO-XB a una longitud de onda de 710 nm.

## 4.4 Análisis de polifenoles por Electroforesis

### 4.4.1 Extracción

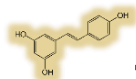
Se prepararon 6 extractos con las condiciones mostradas en la tabla 4.2. En todos los extractos se utilizaron 20 mL de disolvente (agua o etanol-agua o metanol-agua) y un tiempo de extracción de 60 min. En los sistemas 1,2 y 3 se utilizó calor convencional (ECC) y el resto fue una extracción asistida por ultrasonido (EUS).

Tabla 4.2 Condiciones de extracción de compuestos fenólicos asistido por diferente método y con diferente disolvente.

| Extracto | Abreviaturas       | Disolvente                    | Cantidad de hoja (g) | Temperatura del disolvente ( $^{\circ}\text{C}$ ) |
|----------|--------------------|-------------------------------|----------------------|---|
| 1        | ECC <sub>A</sub>   | Agua                          | 1.00                 | 60  |
| 2        | ECC <sub>E-A</sub> | EtOH-H <sub>2</sub> O (70:30) | 1.01                 | 60  |
| 3        | ECC <sub>M-A</sub> | MeOH-H <sub>2</sub> O (70:30) | 1.01                 | 60  |
| 4        | EUS <sub>A</sub>   | Agua                          | 1.02                 | 25  |
| 5        | EUS <sub>E-A</sub> | EtOH-H <sub>2</sub> O (70:30) | 1.00                 | 25  |
| 6        | EUS <sub>M-A</sub> | MeOH-H <sub>2</sub> O (70:30) | 1.02                 | 25  |

Nota: ECC: Extracción por calor convencional; EUS: Extracción Asistida por Ultrasonido.

Subíndices A: agua; E-A: Etanol-Agua y M-A: Metanol-Agua



#### 4.4.2 Separación

Finalizado el tiempo de extracción cada muestra se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, después de filtraron a vacío y se concentraron con el evaporador de flujo de nitrógeno durante 1 h a 40°C y 5 psi de presión. El extracto fluido nuevamente se filtró con acrodiscos de 0.45 micrómetros y se llevó a un aforo de 10 mL. Cada extracto se reservó para su análisis por electroforesis capilar. Ver figura 4.3.



Figura 4.3 Extractos de marrubio. Fotografía tomada en el laboratorio de química analítica de la FES Cuautitlán, Campo 1. Elaboración propia

### 4.5 Extracción asistida por ultrasonido

#### 4.5.1 Determinación del tiempo

Se prepararon 6 extractos, se pesó alrededor de 1 g de materia prima vegetal previamente tratada. Se adicionaron 20 mL de disolvente y se aplicó ultrasonido como se indica en la tabla 4.3.

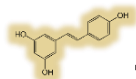


Tabla 4.3 Variación del tiempo de extracción de compuestos fenólicos.

| sistema | Abreviaturas       | Tiempo de extracción (min) |
|---------|--------------------|----------------------------|
| 1       | EUS <sub>A</sub>   | 30                         |
| 2       | EUS <sub>A</sub>   | 60                         |
| 3       | EUS <sub>A</sub>   | 90                         |
| 4       | EUS <sub>E-A</sub> | 30                         |
| 5       | EUS <sub>E-A</sub> | 60                         |
| 6       | EUS <sub>E-A</sub> | 90                         |

Posteriormente cada solución se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm por 15 min. Se filtraron las soluciones con vacío, se concentraron con el evaporador de flujo de nitrógeno por 1 hrs 40°C y 5 psi. Los extractos obtenidos nuevamente se centrifugaron en las mismas condiciones y finalmente se filtraron con acrodiscos de 0.45 micrómetros. La solución se llevó a un aforo de 10 mL. Las soluciones finales se reservaron para su posterior análisis por electroforesis capilar.

#### 4.6 Hidrólisis de los extractos.

Para la hidrólisis se prepararon 2 extractos:

En el primer extracto (**EUS<sub>AH</sub>**): Se pesó 0.507g de hoja de marrubio, se agregó 10 mL de disolvente, se cubrió y se aplicó ultrasonido durante 60 min.

En el segundo extracto (**EUS<sub>E-AH</sub>**): Se pesó 0.512g de hoja de marrubio, se agregó 10 mL de disolvente, se cubrió y se aplicó ultrasonido durante 60 min.

1. **EUS<sub>AH</sub>**: Extracción asistida por ultrasonido, en medio acuoso, hidrolizado
2. **EUS<sub>E-AH</sub>**: Extracción asistida por ultrasonido, en medio etanol-agua, hidrolizado

Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min, se filtraron a vacío, se concentró la solución con el evaporador de flujo de nitrógeno durante 90 min a 40°C y 5 psi, se agregó 1 mL de solución hidrolizante (hidróxido de sodio 3.6M, etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA) 20 mM y ácido ascórbico (HAsc) al 2%) y se colocó a baño María durante 60 min a 60 °C, como se muestra en la figura 5.4; se volvió a centrifugar cada solución a 3000 rpm durante 15 min, se filtró la solución con acrodiscos de 0.45 µm y se aforó a 5 mL, para posteriormente obtener el perfil electroforético. Ver figura 4.4



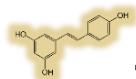


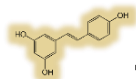
Figura 4.4 Hidrolisis del extracto de marrubio. Fotografía tomada en el laboratorio de química analítica de la FES Cuautitlán, Campo 1. Elaboración propia

#### 4.7 Condiciones de separación por electroforesis capilar

1. Las mediciones de los compuestos polifenólicos se realizaron con un capilar de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 51.5 cm de longitud total, 41 cm de longitud efectiva, un campo eléctrico de 26.6 kV y realizando una detección a una longitud de onda de 200 nm.
2. Al inicio de la experimentación se realizó el lavado del capilar como se indica en la tabla 4.4 y posteriormente se realizaron las medidas con el procedimiento que se indica en la tabla 4.5.
3. En cada evento se realizó un lavado con buffer de boratos durante 15 min, un tiempo de espera antes de la inyección de la muestra para lavar el capilar por fuera y en el momento de la separación de cada evento se obtuvieron corrientes de entre 80 y 90  $\mu\text{A}$ .

Tabla 4.4 Condiciones de lavado inicial

| Evento | Operación | Tiempo (min) | Solución              |
|--------|-----------|--------------|-----------------------|
| 1      | Enjuague  | 2            | Agua desionizada      |
| 2      | Enjuague  | 3            | NaOH (0.1M)           |
| 3      | Enjuague  | 10           | Agua desionizada      |
| 4      | Enjuague  | 3            | Buffer (boratos 50mM) |



En la tabla 5.5 se muestra el procedimiento de separación de los compuestos fenólicos por CE.

Tabla 5.5 Procedimiento de separación de los compuestos fenólicos por CE

| Evento | Operación  | Medida  | Valor | Tiempo | Solución.                 |
|--------|------------|---------|-------|--------|---------------------------|
| 1      | Enjuague   | Presión | 40    | 15 min | Buffer de boratos (50 mM) |
| 2      | Inyección  | Presión | 0.5   | 5 s    | muestra                   |
| 3      | Espera     | -       | -     | 0.2 s  | Buffer de boratos (50 mM) |
| 3      | Separación | Voltaje | 26.6  | 30 min | Buffer de boratos (50 mM) |

## 4.8 Identificación y cuantificación de los polifenoles

### 4.8.1 Identificación

Para la identificación de los polifenoles se consideraron tres aspectos analíticos:

- 1.- Se comparó la forma y tiempo de migración de las señales de los estándares con las señales del extracto.
- 2.- Se adicionó el estándar al extracto, con el fin de observar un aumento en el área o altura de la señal identificada en el extracto o descartar la presencia si aparece una señal a un tiempo diferente, ajeno al perfil del extracto.
- 3.- Se confirmó la presencia de los polifenoles comparando los espectros UV obtenidos en el extracto con el detector de arreglo de diodos.

Los extractos EUS<sub>A</sub>, EUS<sub>AH</sub>, EUS<sub>E-A</sub> y EUS<sub>E-AH</sub> se seleccionaron para la identificación de los compuestos polifenólicos y la cuantificación se realizó únicamente en los extractos EUS<sub>E-A</sub> y EUS<sub>E-AH</sub>, debido a que fueron: los extractos que presentaron más señales, con mayores áreas y alturas, además de que en estos extractos se encontraron todos los polifenoles detectados.

### 4.8.2 Precisión

Para determinar la precisión, se evaluó la repetibilidad, para lo cual se prepararon dos sistemas patrón de mezclas de estándares, pesando para cada estándar lo señalado en la tabla 4.6 y utilizando metilparabeno y ácido cafeico como estándares internos.

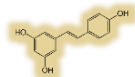


Tabla 4.6 Mezcla de estándares para repetibilidad.

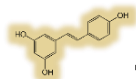
| Estándar             | Peso (mg) | Pureza (%) | [Estándar] <sub>Patrón</sub><br>(mg/L) | [Estándar] <sub>Dilución</sub><br>(mg/L) |
|----------------------|-----------|------------|--|--|
| arbutina             | 6.7       | 98         | 1313.2                                 | 52.52                                    |
| (+)-catequina        | 4.9       | 98         | 960.4                                  | 38.41                                    |
| resveratrol          | 3.9       | 99         | 772.2                                  | 30.88                                    |
| metilparabeno (E.I.) | 2.7       | 100        | 540                                    | 21.6                                     |
| ác ferúlico          | 2.4       | 99         | 95.04                                  | 11.40                                    |
| resorcinol           | 3.5       | 99         | 138.6                                  | 16.632                                   |
| tirosol              | 2.5       | 99.5       | 99.5                                   | 11.94                                    |
| ác cafeico (E.I.)    | 2.6       | 99         | 102.96                                 | 12.35                                    |

### 4.8.3 Cuantificación de los componentes

A continuación, en las tablas 4.7 y 4.8 se muestra como se prepararon las curvas de calibración para la cuantificación de los compuestos fenólicos.

Tabla 4.7 Preparación de las soluciones stock para construir las curvas de calibración

| Estándar                       | Peso (mg) | Pureza (%) | V <sub>aforo</sub><br>(mL) | [Fenol] <sub>Stock</sub><br>(20/25 mL) |
|--------------------------------|-----------|------------|----------------------------|--|
| <b>EUS<sub>E-A</sub></b>       |           |            |                            |  |
| arbutina                       | 12.8      | 98         | 25                         | 401.408                                |
| (+)-Catequina                  | 8.7       | 98         | 25                         | 272.832                                |
| Resveratrol                    | 10.5      | 99         | 25                         | 332.64                                 |
| <b>EUS<sub>E-AH</sub></b>      |           |            |                            |  |
| ácido ferúlico                 | 8.6       | 99         | 25                         | 272.44                                 |
| Resorcinol                     | 8.2       | 99         | 25                         | 259.77                                 |
| Tirosol                        | 8         | 99.5       | 25                         | 254.72                                 |
| <b>Estándar interno (E.I.)</b> |           |            |                            |  |
|                                | Peso (mg) | Pureza (%) | V <sub>aforo</sub><br>(mL) | [E.I.]                                 |
| Metilparabeno                  | 5         | 100        | 20                         | 250                                    |
| ácido cafeico                  | 6.6       | 99         | 25                         | 261.36                                 |



Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se utilizaron dos estándares internos, primero el metilparabeno para la cuantificación de los polifenoles en el EUS<sub>E-A</sub> y posteriormente el ácido cafeico para la cuantificación en los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-AH</sub>.

En la tabla 4.8 se indican los volúmenes tomados de la solución stock para construir las curvas de calibración.

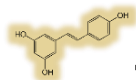
Tabla 4.8 Volúmenes tomados de las soluciones stock para construir las curvas de calibración

| Solución | V <sub>aforo</sub><br>(mL) | EUS <sub>E-A</sub><br>V <sub>solución stock</sub><br>(mL) | EUS <sub>E-AH</sub><br>V <sub>solución stock</sub><br>(mL) |
|----------|----------------------------|---|--|
| 1        | 25                         | 0.5   | 0.5  |
| 2        | 25                         | 1   | 1  |
| 3        | 25                         | 2   | 2  |
| 4        | 25                         | 3   | 3  |
| 5        | 25                         | 4   | 4  |
| 6        | 25                         | 5   | 5  |

A continuación, en la tabla 4.9 se muestran las concentraciones finales de las curvas de calibración.

Tabla 4.9 Concentración final de los estándares utilizados para construir las curvas de calibración

| Estándar      | Concentración de cada compuesto polifenólicos (mg/L) |       |       |       |       |       |
|---------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
|               | Solución   |       |       |       |       |       |
|               | 1  | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
| Arbutina      | 8.02   | 16.05 | 32.11 | 48.16 | 64.22 | 80.28 |
| (+)-Catequina | 5.45   | 10.91 | 21.82 | 32.73 | 43.65 | 54.56 |
| Resveratrol   | 6.65   | 13.30 | 26.61 | 39.91 | 53.22 | 66.52 |
| Ac ferúlico   | 5.44   | 10.89 | 21.79 | 32.69 | 43.59 | 54.48 |
| Resorcinol    | 5.19   | 10.39 | 20.78 | 31.17 | 41.56 | 51.95 |
| Tirosol       | 5.09   | 10.18 | 20.37 | 30.56 | 40.75 | 50.94 |
| Metilparabeno | 20   | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    |
| Ácido cafeico | 20.90  | 20.90 | 20.90 | 20.90 | 20.90 | 20.90 |



Posterior a la construcción de las curvas de calibración, se prosiguió a medir por CE los extractos EUS<sub>E-A</sub> y el EUS<sub>E-AH</sub> con la adición del estándar interno para poder cuantificar los polifenoles, las extracciones se realizaron como se indica a continuación.

Para la primera muestra del EUS<sub>E-A</sub> se pesó 0.522 g de hoja de marrubio, se agregaron 10 mL de solución etanol-agua (70:30), se cubrió y se aplicó ultrasonido durante 60 min, posteriormente se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm, se decantó, se llevó la solución al evaporador de flujo de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y se concentró durante 1 h a 35°C y 5 psi, posteriormente se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm y se filtró con acrodiscos de 0.45 µm, se agregó 0.4 mL de solución de metilparabeno a una concentración de 250 mg/L como estándar interno (E.I.) posteriormente se llevó a un aforo de 5 mL y finalmente se realizó la separación por CE.

Para la segunda muestra del EUS<sub>E-AH</sub> se pesó 1.0139 g de hoja de marrubio, se agregaron 20 mL de solución etanol-agua (70:30), se cubrió y se aplicó ultrasonido durante 60 min, se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm, se decantó y se llevó la solución al evaporador de flujo de N<sub>2</sub> y se concentró durante 1 h a 35 °C y 5 psi; posteriormente se adicionó 2 mL de solución hidrolizante (NaOH 3.6M, EDTA 20 mM y Hasc al 2%) y se colocó en baño María durante 30 minutos a 60°C, después se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm y se filtró con acrodiscos de 0.45 µm, se agregó 0.8 mL de ácido cafeico a una concentración de 261.36 mg/L, se llevó a un aforo de 10 mL y finalmente se realizó la separación por CE.

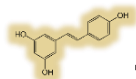
## 4.9 Determinación de la dosis letal media del extracto acuoso

### 4.9. Preparación del extracto acuoso (Liofilizado)

Se pesaron aproximadamente 10 g de hoja de marrubio y se le agregaron 100 mL de agua desionizada, se cerró el sistema y se realizó la extracción con ultrasonido durante 60 min, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min, se filtró a vacío y se congeló a -20 °C durante 48 hrs en un congelador General Electric, Modelo FCM 7DMB WH, finalmente se liofilizó el extracto a -50 °C durante 48 hrs en un liofilizador marca LABCONCO.

#### 4.9.1 Eclosión de Artemias

Se pesaron 20 mg de quistes de *Artemia franciscana* y se hidrataron durante media hora en agua desionizada con agitación constante, se filtraron y se colocaron durante 6 minutos en la solución desencapsuladora (3 mL de NaOCl al 6%, 3 mL de NaOH al 5 % y 20 mL de agua de mar), posteriormente se filtró y se lavaron los quistes con HCl 0.1 M durante 1 minuto, después se enjuagaron con agua desionizada abundante, se colocaron en un sistema de



eclosión, con luz y agua de mar a pH 7.5 y una temperatura de 25°C y 24 horas después se observó la presencia de Artemias franciscana en fase nauplio.

#### 4.9.3 Preparación de los sistemas prueba para la determinación de DL<sub>50</sub>

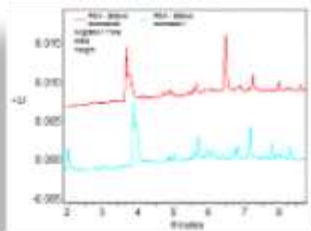
Se pesaron 0.9091 g de extracto de marrubio liofilizado en un tubo de ensayo y se agregaron 2.5 mL de polisorbato 60, 1.5 mL de DMSO y 5 mL de agua de mar, se agitaron con ayuda del vortex (Scientific Industries modelo Genie 2) hasta disolver el extracto, finalmente se llevó a un aforo de 200 mL con agua de mar; con esta solución de 4545.5 mg/L se prepararon los sistemas que se indican a continuación en la tabla 4.10.

Tabla 4.10 Sistemas preparados para la construcción de la curva de dosis letal media.

| Sistema | Volumen de solución Stock (mL) | Agua de mar (mL) | Volumen total. (mL) | Concentración (mg/L) |
|---------|--------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 1       | 0                              | 10               | 10                  | 0                    |
| 2       | 0.005                          | 9.99             | 10                  | 2.27                 |
| 3       | 0.05                           | 9.95             | 10                  | 22.72                |
| 4       | 2.00                           | 8                | 10                  | 909.10               |
| 5       | 3.00                           | 7                | 10                  | 1363.65              |
| 6       | 4.00                           | 6                | 10                  | 1818.20              |
| 7       | 5.00                           | 5                | 10                  | 2272.75              |
| 8       | 6.00                           | 4                | 10                  | 2727.30              |
| 9       | 7.00                           | 3                | 10                  | 3181.85              |
| 10      | 8.00                           | 2                | 10                  | 3636.40              |
| 11      | 9.00                           | 1                | 10                  | 4090.95              |
| 12      | 10.00                          | 0                | 10                  | 4545.50              |

Una vez que se prepararon las soluciones a diferente concentración con el extracto liofilizado, se colocaron 10 sujetos de estudio (Artemias) en 12 cajas Petri y se agregaron 10 mL de extracto liofilizado a diferente concentración como se indica en la tabla 4.10, posteriormente se monitoreó la respuesta después de 48 horas de exposición.

# Resultados y análisis.



5

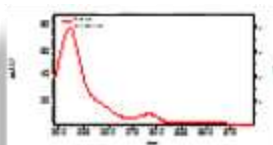
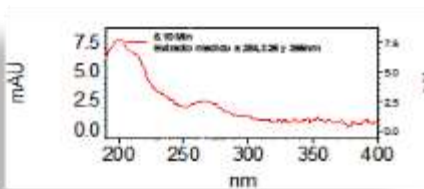
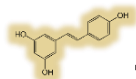


Figura VII: Electroferogramas. Elaboración propia



## 5 Resultados y análisis

### 5.1 Tamiz fitoquímico

Las pruebas a la gota realizadas al extracto acuoso e hidroalcohólico dieron los resultados mostrados en la tabla 5.1.

Tabla 5.1.- Análisis fitoquímico del extracto acuoso

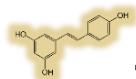
| Intensidad de las reacciones de identificación |                              |                              |                 |
|--|------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Reacción                                       | Metabolito para identificar. | Extracto etanol-agua (70:30) | Extracto acuoso |
| Baljet   | Lactonas                     | +++                          | -               |
| Fehling  | Azúcares reductores          | ++                           | +++             |
| FeCl <sub>3</sub>                              | Fenoles                      | +++                          | ++              |
| Shinoda  | Flavonoides                  | ++                           | ++              |

Nota: (+++) abundante; (++) moderado; (+) escaso; dudoso (+/-) y negativo (-) (Domínguez, 1988)

El tamiz fitoquímico se centró en detectar los metabolitos de interés para este proyecto. Primero los polifenoles, para lo que se realizó la prueba de cloruro férrico que detecta el anillo fenólico con la formación de un compuesto de coordinación de tipo  $Fe(OR)_6^{3-}$ , donde OR representa al fenol ionizado. Los colores que aparecen son azul, verde, violeta y rojo y son producidos por la absorción selectiva de la luz por el átomo de hierro influenciado por los residuos de fenólicos. Por otro lado, la reacción de Shinoda es una reacción compleja que involucra la reducción del flavonoide a la cianidina. La reducción se lleva a cabo por un metal (Mg) disuelto en ácido (HCl) y cuando reacciona con la solución de prueba (flavonoide) se presenta una producción vigorosa de hidrógeno (gas), rápidamente seguida por la aparición de un color rojo brillante y diferentes tonos como rojo-azuloso y violeta, formándose así la cianidina.

La prueba de Fehling para detectar azúcares reductores se llevó a cabo porque los polifenoles como flavonoides y taninos pueden encontrarse en forma libre o asociados a carbohidratos. La reacción se basa en la capacidad de los aldehídos de oxidarse a un ácido





carboxílico y liberar electrones que reducirán al átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  produciendo un cambio de color de la solución (azul) y un precipitado de color rojo ladrillo

El análisis dio como resultado pruebas positivas para las reacciones de cloruro férrico y Shinoda tanto en el extracto acuoso como en el extracto etanol-agua, estas reacciones permiten detectar la presencia de polifenoles como tanino y flavonoides, la reacción de Fehling para azúcares reductores también resultó positiva.

Finalmente, en el caso de la prueba de Baljet se realizó con el fin de detectar la presencia de un metabolito característico de esta especie, la marrubiína, que es una lactona diterpenoide. La reacción resulta en la interacción entre grupos metilenos activos con compuestos aromáticos (ácido pícrico) que tienen sustituyentes atractores de electrones, en medio básico, que conduce a la formación de un color naranja a rojo oscuro.

Los resultados obtenidos indican la presencia de moléculas con estructura de lactonas, Azúcares reductores, fenoles y flavonoides (ver anexo II).

## 5.2 Fenoles totales.

A continuación, en la figura 5.1 se observa la curva de calibración de ácido gálico, la cual se utilizó para determinar la capacidad antioxidante del extracto de marrubio, esta curva presentó un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9953.

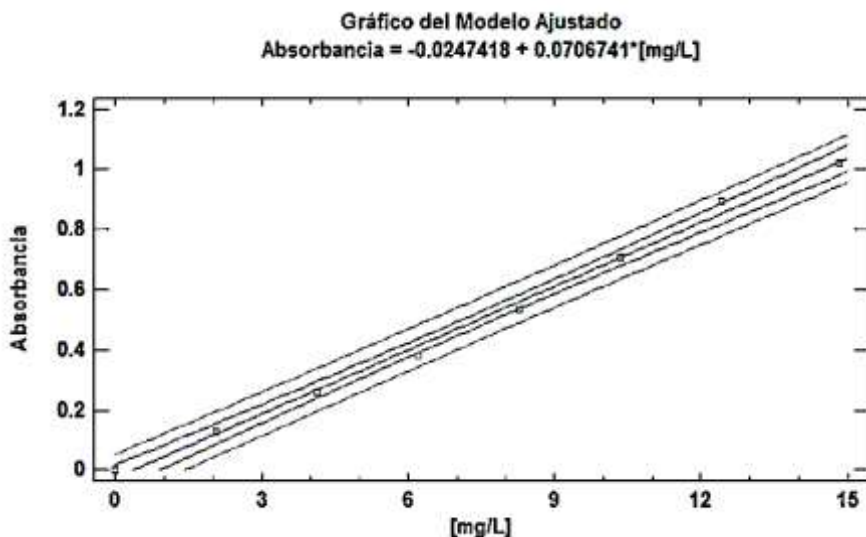
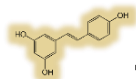


Figura 5.1 Gráfica de absorción de complejos de ácido gálico vs concentración



El análisis de fenoles totales indicó que el extracto acuoso presenta una capacidad antioxidante de 181.46 µg equivalentes (eq) de ácido gálico por mL, este resultado se comparó con la capacidad antioxidante de algunas otras plantas como se muestra a continuación en la tabla 5.2. (Muñoz Velázquez, 2012)

Tabla 5.2 Capacidad antioxidante de diferentes plantas

| Planta             | Fenoles totales (mg eq de ácido gálico/L) |
|--------------------|---|
| <b>Boldo</b>       | <b>312.71</b>                             |
| <b>Hierbabuena</b> | <b>231.85</b>                             |
| <b>Marrubio</b>    | <b>181.46</b>                             |
| <b>Árnica</b>      | <b>173.31</b>                             |
| <b>Limón</b>       | <b>71.69</b>                              |
| <b>Manzanilla</b>  | <b>69.28</b>                              |

Como se observa en la tabla 5.2, el marrubio presenta una capacidad antioxidante muy similar al árnica y aproximada a la hierbabuena, las cuales son plantas que se utilizan con frecuencia en la medicina tradicional mexicana.

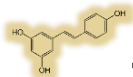
Estos estudios confirmaron la capacidad antioxidante del extracto de marrubio y, el estudio fitoquímico, la posible presencia de moléculas con las características de los fenoles, por lo que se prosiguió a su identificación en los extractos del marrubio, mediante la técnica CE.

### 5.3 Condiciones de extracción

Previamente a la identificación y cuantificación de los polifenoles de los extractos, se estudiaron dos tipos de energía alternativa en la extracción (calor convencional y ultrasonido), diferentes disolventes (agua, etanol-agua (70:30) y metanol-agua (70:30), así como la variación del tiempo de extracción de los extractos y la hidrólisis de los mismos.

#### 5.3.1 Extracción con calor convencional y asistido por ultrasonido

A continuación, en la figura 5.2 se observa la comparación de los electroferogramas obtenidos, usando agua como disolvente y realizando la extracción con calor convencional y ultrasonido (ECC<sub>A</sub> y el EUS<sub>A</sub>).



Los dos perfiles electroforéticos presentan una tendencia muy similar, por lo que se puede decir que no hay gran diferencia en los componentes que se extraen por los dos métodos, sin embargo, se puede observar que el perfil superior (1) perteneciente al EUS<sub>A</sub> presenta señales con áreas y alturas ligeramente mayores que en el perfil inferior (2), del ECC<sub>A</sub>, además el EUS<sub>A</sub> presenta dos señales más intensas en aproximadamente 9.5 y en 15.8 min.

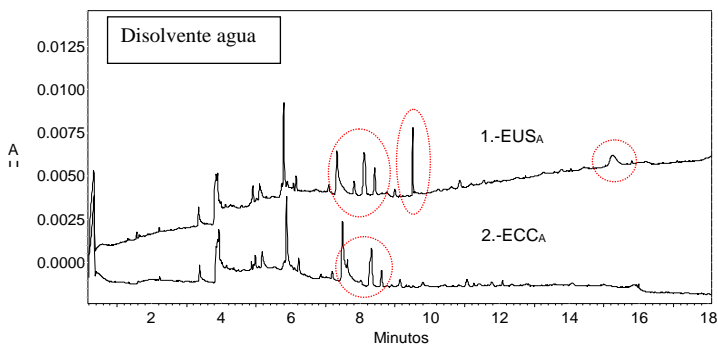


Figura 5.2 Comparación de la forma de extracción en extractos acuosos obtenidos por 1) ultrasonido y 2) calor convencional

En la siguiente figura 5.3, se observará la comparación de la extracción usando la mezcla de etanol: agua (70:30) como disolvente y calor convencional o ultrasonido como energías alternativas de extracción (ECC<sub>E-A</sub> y el EUS<sub>E-A</sub>), donde de igual manera en el perfil 1) EUS<sub>E-A</sub> se observan señales con una mayor área y altura en comparación con el 2) ECC<sub>E-A</sub>, además el EUS<sub>E-A</sub> presenta una señal con mayor altura en 8.2 min.

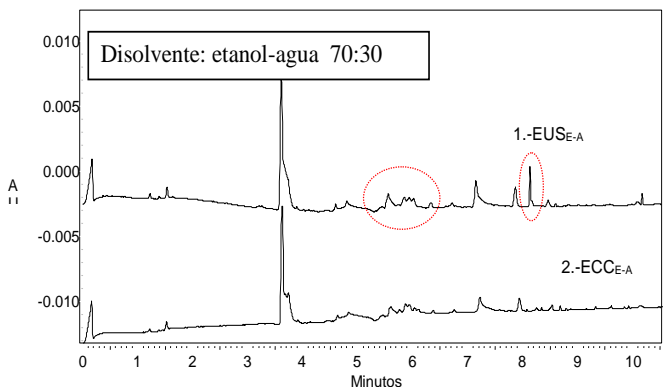
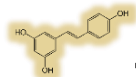


Figura 5.3 Comparación del método de extracción (1) ultrasonido o 2) calor convencional, usando etanol-agua (70:30) como disolvente.



Al utilizar mezclas de metanol-agua (70:30) como disolvente de extracción (figura 5.4) se observa que el perfil del ECC<sub>M-A</sub> y del EUS<sub>M-A</sub>, son similares a los extractos analizados anteriormente, se observa que el perfil superior perteneciente al 1) EUS<sub>M-A</sub>, presenta señales con áreas y alturas ligeramente mayores, por lo que se determinó que el ultrasonido como fuente alternativa es un mejor método de extracción, ya que permite obtener perfiles con mayor cantidad de señales y con áreas y alturas más grandes, comparado con 2) ECC<sub>M-A</sub>.

A.

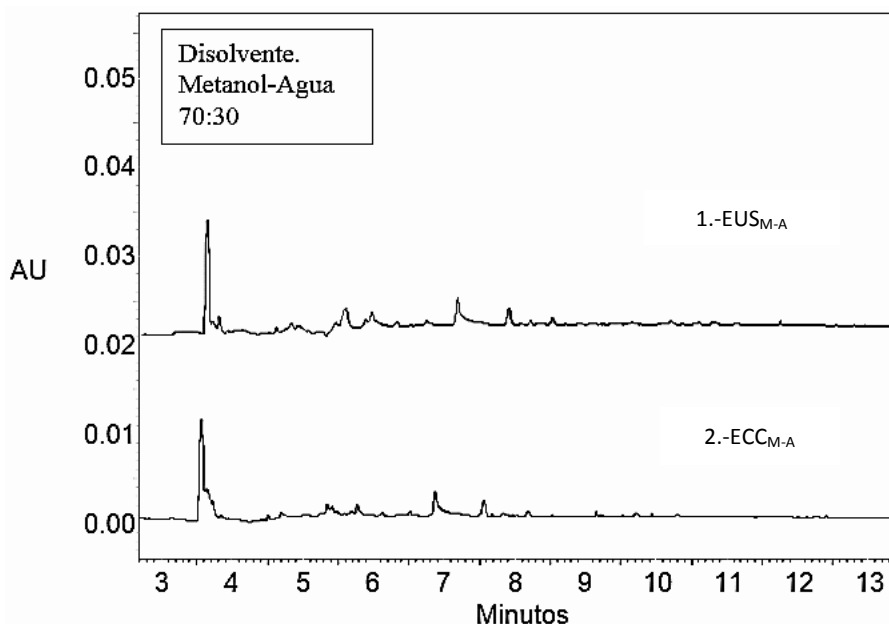
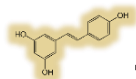


Figura 5.4 Comparación del tipo de extracción (1) ultrasonido o (2) calor convencional, utilizando una mezcla de etanol-agua (70:30) como disolvente.

### 5.3.2 Comparación de la extracción con diferentes disolventes.

En la figura 5.5 se muestran los perfiles electroforéticos que pertenecen a la extracción usando como disolventes agua, las mezclas de etanol-agua y metanol-agua (70:30) (EUS<sub>A</sub>, EUS<sub>E-A</sub> y el EUS<sub>M-A</sub>) se puede observar que la mayor cantidad de señales se obtienen en el EUS<sub>A</sub> y el EUS<sub>E-A</sub>, las señales se presentan antes de los 10 min, los 3 perfiles presentan una tendencia similar, sin embargo, el EUS<sub>A</sub> tiene una mayor cantidad de señales las cuales presentan una mayor área y altura, además de que se observa una señal adicional en 9.5 min; en el caso del extracto EUS<sub>E-A</sub>, presentó señales con áreas y alturas considerables y



similares al extracto obtenido en medio acuoso. Finalmente el EUS<sub>M-A</sub> presentó la misma tendencia con áreas y alturas menores, respectivamente.

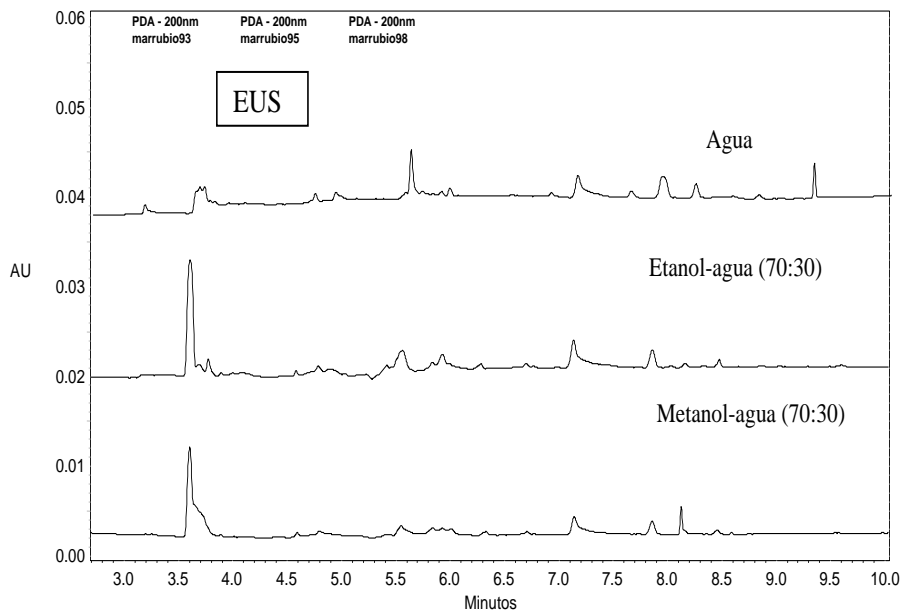


Figura 5.5 Electroferogramas obtenidos en la extracción asistida por ultrasonido.

### 5.3.3 Determinación del tiempo de extracción, asistido por ultrasonido

Una vez que se analizó la extracción mediante diferentes métodos y diferentes disolventes se prosiguió a estudiar cómo afecta el tiempo de extracción a los componentes.

En la figura 5.6 y 5.7, se muestran los EUS<sub>A</sub> y EUS<sub>E-A</sub> sometidos a diferentes tiempos de extracción; en estos electroferogramas se observa que el mejor tiempo de extracción de los compuestos es de 60 min, debido a que con este tiempo de sonicación se obtienen perfiles con señales más definidas, con áreas y alturas mayores en comparación a los extractos asistidos por sonicación durante 30 min, por lo que se consideró que aplicando ultrasonido únicamente 30 min, no se realiza una extracción completa de los componentes. En el caso de los extractos donde se aplicó ultrasonido durante 90 min, se puede ver que los extractos presentan una tendencia similar a los obtenidos durante 60 min de ultrasonificación, sin embargo, algunas señales presentan menores áreas y alturas, por lo que se consideró que el mejor tiempo para la extracción de los componentes es 60 min.

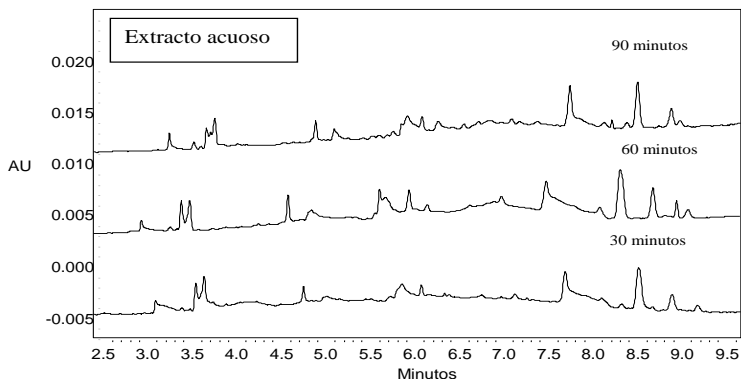
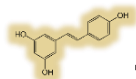


Figura 5.6 Variación del tiempo de ultrasonicación del extracto acuoso ( $EUS_A$ )

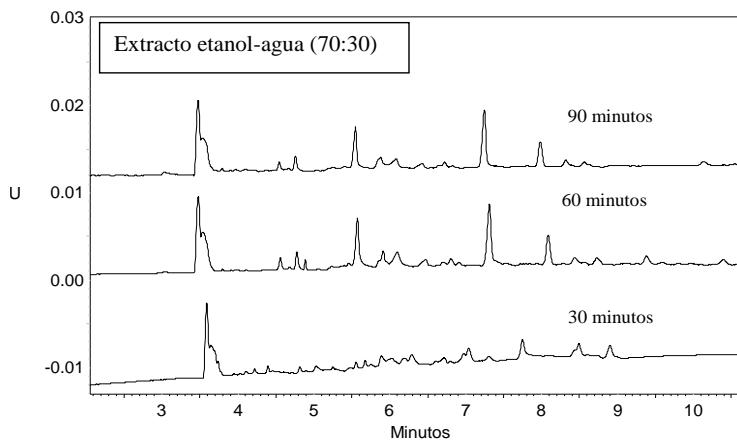


Figura 5.7 Variación del tiempo de ultrasonicación del extracto etanol-agua (70:30) ( $EUS_{E-A}$ )

### 5.3.4 Hidrólisis de los extractos acuosos y etanolicos

Una vez que se determinó el tiempo de extracción, se prosiguió a obtener el perfil electroforético de los extractos  $EUS_A$ ,  $EUS_{E-A}$ ,  $EUS_{AH}$  y del  $EUS_{E-AH}$ , los cuales se muestran en la figura 5.8 y 5.9, aquí se observa que los cuatro electroferogramas tienen una tendencia muy similar, sin embargo, el  $EUS_{E-A}$  y el  $EUS_{E-AH}$  presentan una mayor cantidad de señales, además de que presentan una mayor área y altura, por lo que se decidió que estos extractos son los óptimos para realizar la cuantificación en los extractos de las hojas de marrubio, sin embargo, la identificación de los polifenoles se realizó en los cuatro extractos  $EUS_A$ ,  $EUS_{E-A}$ ,  $EUS_{AH}$ , y del  $EUS_{E-AH}$ .

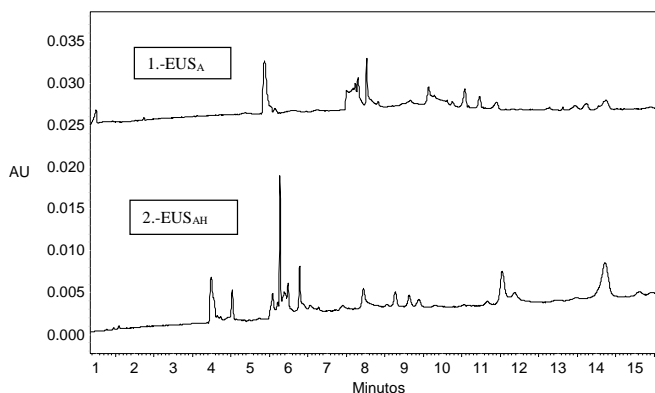
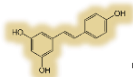


Figura 5.8 Hidrolisis de extractos acuosos

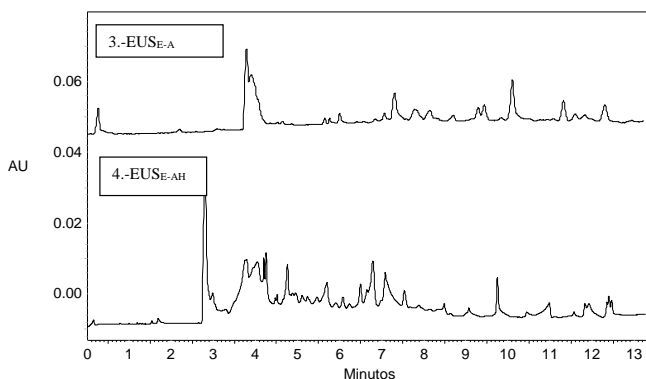


Figura 5.9 Hidrolisis de extractos etanol-agua (70:30)

## 5.4 Identificación de polifenoles.

Después de la determinación de las mejores condiciones de extracción, se prosiguió a la identificación de los polifenoles presentes en los extractos EUS<sub>A</sub>, EUS<sub>E-A</sub>, EUS<sub>AH</sub> y del EUS<sub>E-AH</sub>.

A continuación, se presenta un ejemplo de la identificación del resveratrol en el EUS<sub>E-A</sub>.

En la figura 5.10 se observan dos electroferogramas, el de la parte inferior pertenece al EUS<sub>E-A</sub> y en la parte superior se presenta el EUS<sub>E-A</sub> adicionado con estándar de resveratrol, en este electroferograma se ve claramente el aumento del área y la altura de una señal que se encuentra a 6.4 min por lo que se confirmó la presencia del resveratrol debido al enriquecimiento del extracto.

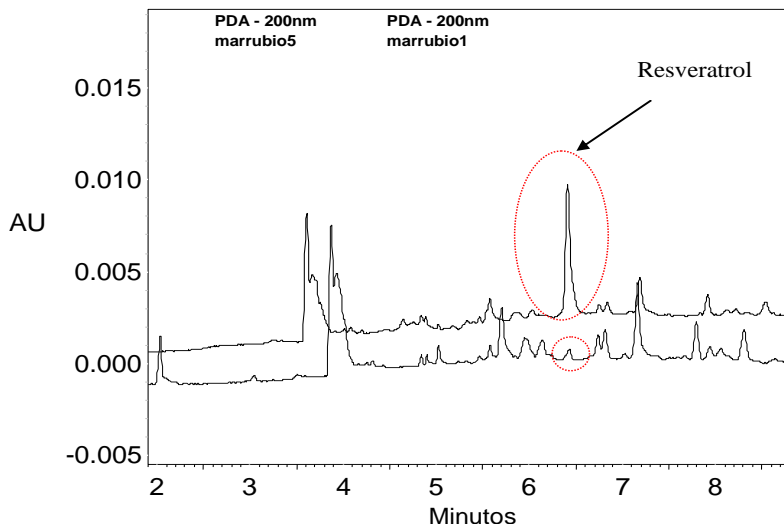
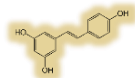


Figura 5.10 Adición de estándar de resveratrol en el extracto etanol-agua (70:30)

Posteriormente se realizó la identificación de la señal, comparando los espectros UV-Vis de la señal presente en el EUS<sub>E-A</sub> y el espectro UV-Vis correspondiente del estándar utilizado.

En la figura 5.11 se presenta el espectro UV-Vis de la señal que se sospecha que es resveratrol y el espectro UV-Vis del estándar de resveratrol en donde se ve claramente que los espectros son bastante similares y en ambos se puede observar un máximo de absorbancia en 200 nm y otro máximo en 325 nm, por lo que queda confirmada la presencia de resveratrol en el EUS<sub>E-A</sub>.

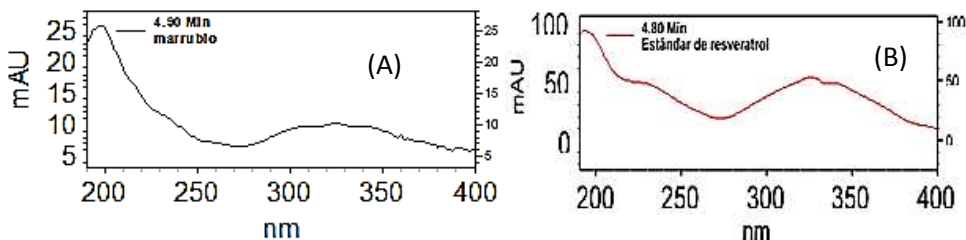
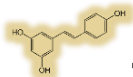


Figura 5.11 Identificación de resveratrol por UV, medido a 365 nm. A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de resveratrol

De la misma forma se identificaron todos los fenoles presentes en los extractos, los cuales se muestran en la tabla 5.3 y en el anexo V se indica a detalle su identificación.





Debido a que el EUS<sub>E-A</sub> y EUS<sub>E-AH</sub> presentaron una mayor cantidad de señales y casi todos los polifenoles detectados se encontraron principalmente en estos extractos, se decidió que estos son los óptimos para realizar la cuantificación de los polifenoles presentes en las hojas de marrubio. Ver figura 5.12.

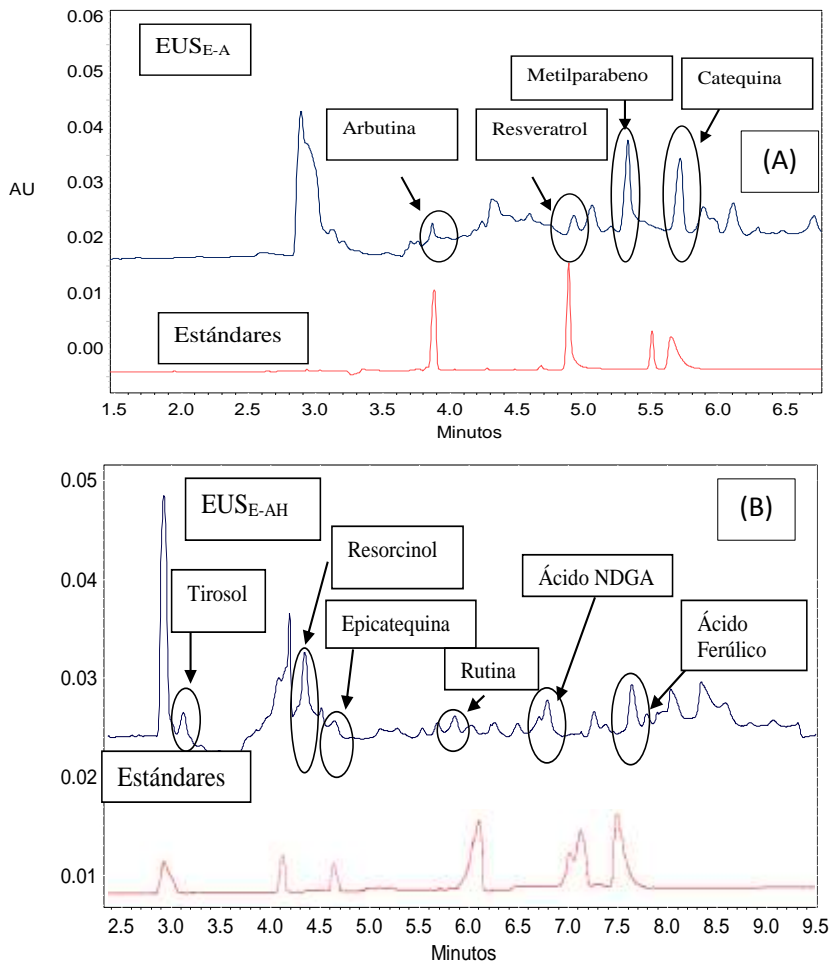


Figura 5.12 Polifenoles encontrados en los extractos de hojas de marrubio EUS<sub>E-A</sub> (A) y EUS<sub>E-AH</sub> (B)

Cabe mencionar que algunos polifenoles como la (-)-epicatequina y el ácido NDGA no se agregaron a la cuantificación, debido a que sus señales tenían áreas y alturas pequeñas un poco por arriba del nivel del ruido por lo que se complica mucho su cuantificación.

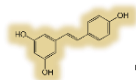


Tabla 5.3 Polifenoles encontrados en los extractos de hojas de marrubio

| Polifenol identificado | EUS <sub>A</sub> | EUS <sub>AH</sub> | EUS <sub>E-A</sub> | EUS <sub>E-AH</sub> |
|------------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Ácido ferúlico         | -                | -                 | -                  | ✓                   |
| Ácido NDGA             | -                | -                 | -                  | ✓                   |
| Arbutina               | -                | -                 | ✓                  | -                   |
| (+)-Catequina          | -                | ✓                 | ✓                  | -                   |
| (-)-Epicatequina       | ✓                | -                 | -                  | ✓                   |
| Resorcinol             | -                | -                 | -                  | ✓                   |
| Rutina                 | ✓                | -                 | -                  | ✓                   |
| Resveratrol            | -                | -                 | ✓                  | -                   |
| Tirosol                | -                | -                 | -                  | ✓                   |

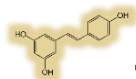
Nota: (-)= No identificado en el extracto, ( ✓ ) =Identificado en el extracto

### 5.5 Selección del estándar interno.

Debido a que los extractos de plantas son matrices muy complejas, se utiliza un estándar interno (E.I.) el cual tiene la finalidad de minimizar los errores de inyección debido a pequeños cambios en la viscosidad, lo que provoca que entre cantidades diferentes de muestra al capilar, y por lo tanto haya variaciones en las áreas y alturas de las señales que se detectan.

La elección del E.I. más adecuado, consistió en seleccionar un compuesto de estructura similar a los analitos de estudio, de alta pureza y que no se encuentra de forma natural en la muestra, su señal no se traslapa con otra señal y presenta una tendencia simétrica, lo cual permitió una buena integración.

En este experimento se utilizó el metilparabeno y ácido cafeico como estándares internos para la cuantificación de los fenoles del EUS<sub>E-A</sub> y el EUS<sub>E-AH</sub>.



### 5.5.1 Precisión del sistema.

De acuerdo a las guías de validación en lo que respecta a los tiempos de migración se obtuvieron % RSD < 2% y de acuerdo a los criterios de aceptación se puede afirmar que el método es preciso en el caso de los tiempos de migración, como se muestra en la tabla 5.4 y 5.5.

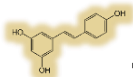
Tabla 5.4 Precisión (%RSD) en tiempos de migración de los polifenoles identificados en el EUS<sub>E-A</sub>

| Tiempos de migración (t <sub>m</sub> ) |   |                               |      |
|--|---|-------------------------------|------|
| Estándar                               | Promedio ( $\bar{x}$ )<br>en t <sub>m</sub><br>n=12 | Desviación<br>estándar<br>(s) | %RSD |
| Arbutina                               | 3.47  | 0.01                          | 0.28 |
| Resveratrol                            | 4.50  | 0.01                          | 0.22 |
| Metilparabeno (E.I.)                   | 5.12  | 0.03                          | 0.58 |
| (+)-Catequina                          | 5.26  | 0.02                          | 0.38 |

Tabla 5.5 Precisión (%RSD) en tiempos de migración de los polifenoles identificados en el EUS<sub>E-AH</sub>

| Tiempos de migración (t <sub>m</sub> ) |   |                               |      |
|--|---|-------------------------------|------|
| Estándar                               | Promedio ( $\bar{x}$ )<br>en t <sub>m</sub> n=6 | Desviación<br>estándar<br>(s) | %RSD |
| Ácido ferúlico                         | 14.4  | 0.20                          | 1.38 |
| Ácido cafeico (E.I.)                   | 23.01   | 0.34                          | 1.47 |
| Resorcinol                             | 5.95  | 0.02                          | 0.33 |
| Tirosol                                | 4.40  | 0.04                          | 0.90 |

Posterior a los experimentos de repetibilidad, se realizó la construcción de las curvas de calibración como se indica en el anexo VI, las curvas se midieron por triplicado y a continuación, en la figura 5.13, se muestra un ejemplo de las curvas realizadas para resveratrol.



En la figura 5.13 se muestra la curva de calibración medida por triplicado del estándar de resveratrol, se realizó con ayuda de la relación de alturas = Altura resveratrol/Altura E.I., aquí se observa que los residuales presentan una tendencia homocedástica, por lo que se puede decir que los resultados se ajustan al modelo lineal, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9998. En el caso de las demás curvas de calibración que se muestran en el anexo VI, presentan residuales también homocedásticos y con coeficientes de determinación mayores a 0.98, a continuación se muestra en la tabla 6.6 las ecuaciones y coeficientes de determinación de cada curva realizada.

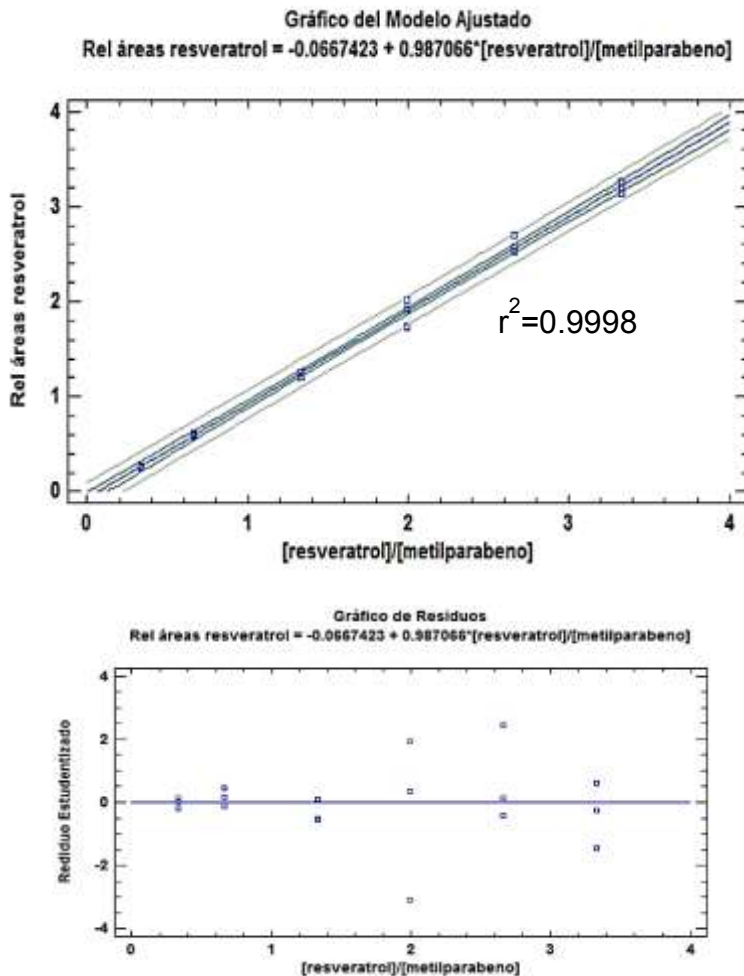


Figura 5.13 Curva de calibración de resveratrol y sus respectivos residuales

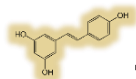


Tabla 5.6 Ecuaciones y coeficientes de determinación de las curvas de calibración

| Fenol          | $A_{std}/A_{E.I.}=(intercepto \pm S)+(pendiente \pm S)*([Fenol]/[E.I.])$                                    | $r^2$  |
|----------------|---|--------|
| Ácido ferúlico | $Rel A = (-0.0613727 \pm 0.05) + (1.31145 \pm 0.05)* \left( \frac{[ác ferulico]}{[ác cafeico]} \right)$     | 0.9980 |
| Arbutina       | $Rel A = (0.0121224 \pm 0.02) + (0.568406 \pm 0.02)* \left( \frac{[arbutina]}{[metilparabeno]} \right)$     | 0.9994 |
| (+)-Catequina  | $Rel A = (-0.110078 \pm 0.05) + (0.09233 \pm 0.05)* \left( \frac{[catequina]}{[metilparabeno]} \right)$     | 0.9976 |
| Resveratrol    | $Rel A = (-0.0667423 \pm 0.014) + (0.987066 \pm 0.014)* \left( \frac{[catequina]}{[metilparabeno]} \right)$ | 0.9981 |
| Resorcinol     | $Rel h = (0.0172848 \pm 0.02) + (0.770388 \pm 0.02)* \left( \frac{[resorcinol]}{[ác cafeico]} \right)$      | 0.9746 |
| Tirosol        | $Rel A = (-0.0921082 \pm 0.04) + (2.1037 \pm 0.04)* \left( \frac{[tirosol]}{[ác cafeico]} \right)$          | 0.9931 |

Rel= cociente, A=área y h=altura

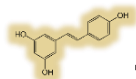
### 5.7 Cuantificación de los compuestos en los extractos de marrubio

La cuantificación de los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-A</sub>, se realizó con el metilparabeno como estándar interno de concentración 20 mg/L; en el caso de la segunda curva de calibración para el EUS<sub>E-AH</sub>, se utilizó el ácido cafeico como estándar interno a una concentración de 20.90 mg/L. A continuación, en la tabla 5.7 se muestran los límites de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) correspondientes a cada uno de los sistemas de calibración.

Tabla 5.7 LOD y LOQ de las curvas de calibración

| Fenol          | LOD= (3.3 * S <sub>y/x</sub> )/ m | LOQ= (10 * S <sub>y/x</sub> )/ m |
|----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                | (mg/L)                            | (mg/L)                           |
| Ácido ferulico | 3.12                              | 9.47                             |
| Arbutina       | 2.42                              | 7.35                             |
| (+)-Catequina  | 4.21                              | 6.37                             |
| Resorcinol     | 7.60                              | 23.04                            |
| Resveratrol    | 0.12                              | 0.38                             |
| Tirosol        | 5.44                              | 16.50                            |

Nota: S<sub>y/x</sub>=desviación estándar de regresión, b<sub>1</sub>=pendiente



En la tabla 5.8 se muestra el promedio de la concentración de los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-A</sub> y la cantidad de cada polifenol por cada 100 g de hoja de marrubio, en donde cada muestra fue medida por triplicado.

En la tabla 5.9 se muestra el promedio de la concentración de los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-AH</sub> y la cantidad de cada polifenol por cada 100 g de hoja de marrubio, cada muestra fue medida por triplicado.

Como se puede observar en las tablas 5.9 y 5.10, todos los polifenoles presentaron bajas concentraciones, en el caso del EUS<sub>E-A</sub> no se pudo cuantificar la arbutina, debido a que el valor de la concentración está por debajo del límite de detección, por lo que solo se logró la identificación mediante la adición del estándar y la comparación del espectro UV-Vis de la señal, en el caso de la (+)-catequina y el resveratrol si fue posible cuantificarlos, ya que sus concentraciones están por encima del límite de detección y cuantificación. En el caso del EUS<sub>E-AH</sub> sí se pudo cuantificar el resorcinol y el tirosol, aunque con alto error, ya que estos dos polifenoles quedan por encima del límite de detección, pero por abajo del límite de cuantificación.

Tabla 5.8 Cuantificación de los polifenoles del marrubio encontrados en el EUS<sub>E-A</sub>

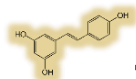
| Fenol         | [Fenol] mg/L | mg/100g de planta | Promedio ( $\bar{x}$ ) en $t_m$ n=6 | Desviación estándar (S) | %RSD |
|---------------|--------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|------|
| Arbutina      | 0.049        | 0.49              | 3.94                                | 0.017                   | 0.43 |
| (+)-catequina | 13.42        | 12.85             | 6.32                                | 0.008                   | 0.12 |
| Resveratrol   | 5.6262       | 5.388             | 5.13                                | 0.007                   | 0.13 |

Nota: %RSD= porcentaje de desviación estándar relativa

Tabla 5.9 Cuantificación de los polifenoles del marrubio encontrados en el EUS<sub>E-AH</sub>

| Fenol          | [Fenol] mg/L | mg/100g de planta | Promedio ( $\bar{x}$ ) en $t_m$ n=3 | Desviación estándar (S) | %RSD |
|----------------|--------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------|------|
| Ácido ferúlico | 12.46        | 12.29             | 14.81                               | 0.27                    | 1.82 |
| Resorcinol     | 8.45         | 8.34              | 5.58                                | 0.04                    | 0.71 |
| Tirosol        | 5.72         | 5.64              | 4.21                                | 0.02                    | 0.47 |

Nota: %RSD= porcentaje de desviación estándar relativa



Al igual que la arbutina, resorcinol y tirosol, hubo algunos polifenoles que no se pudieron cuantificar (ácido nordihidroguayaretico, (-)-epicatequina y rutina), debido a que su señales se encontraban un poco arriba del nivel del ruido en el extracto, sin embargo, se pudieron detectar gracias al detector de arreglo de diodos (DAD), el cual permitió la comparación de sus espectros de absorción con sus estándares correspondientes como se muestra en el anexo V.

### 5.8 Evaluación de la toxicidad del extracto acuoso de marrubio

El estudio de toxicidad del extracto acuoso indicó que su uso es seguro en el tratamiento de algunos padecimientos, debido a que la dosis crónica presenta una mínima letalidad; se realizó el estudio de la dosis letal media del extracto (DL<sub>50</sub>), en donde se observó que después de 24 h de exposición no se lograba llegar a la muerte de la mitad de la población, por lo que se realizó una exposición durante más tiempo para saber si el extracto presenta un efecto a largo plazo.

Después de 48 horas de exposición se observó la muerte de más de la mitad de la población (tabla 6.11) y se determinó que la dosis letal media DL<sub>50</sub> es de 2562.86 mg/L, por lo que de acuerdo con referencias de (Sanabria-Galindo, López, & Gualdrón, 1997)(tabla 5.10), el marrubio presenta una letalidad mínima y su uso es seguro.

Tabla 5.10 Criterios de letalidad

| Toxicidad          | Concentración mg/L |
|--------------------|--------------------|
| Letalidad elevada  | 0.1-100            |
| Letalidad moderada | 100-300            |
| Letalidad baja     | 300-640            |
| Letalidad mínima   | >640               |

Nota: Información obtenida de (Sanabria-Galindo, López, & Gualdrón, 1997)

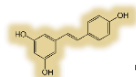


Tabla 5.11 resultados del bioensayo de letalidad de Artemia, utilizando el extracto acuoso de marrubio

| Dosis (mg/L) | Numero de sujetos por ensayo | Numero de sujetos muertos |          |          |                          |
|--------------|------------------------------|---------------------------|----------|----------|--------------------------|
|              |                              | Ensayo 1                  | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Total de sujetos muertos |
| 2.27         | 10                           | 0                         | 0        | 2        | 2                        |
| 22.73        | 10                           | 1                         | 1        | 0        | 2                        |
| 909.10       | 10                           | 3                         | 0        | 0        | 3                        |
| 1363.65      | 10                           | 4                         | 3        | 0        | 7                        |
| 1818.20      | 10                           | 4                         | 2        | 3        | 9                        |
| 2272.75      | 10                           | 4                         | 5        | 4        | 13                       |
| 2727.30      | 10                           | 6                         | 6        | 4        | 16                       |
| 3181.85      | 10                           | 5                         | 6        | 6        | 17                       |
| 3636.40      | 10                           | 8                         | 8        | 9        | 24                       |
| 4090.95      | 10                           | 8                         | 9        | 9        | 25                       |
| 4545.50      | 10                           | 5                         | 4        | 5        | 25                       |
| Control (+)  | 10                           | 10                        | 10       | 10       | 30                       |
| Control (-)  | 10                           | 0                         | 0        | 0        | 0                        |

Nota: Los resultados del análisis estadístico fueron obtenidos con el programa IBM SPSS Statistics 20

### 5.9 Respuesta transformada por probit.

En la figura 5.14 se muestra la gráfica de las respuestas obtenidas por el análisis probit en la que se puede ver que la pendiente presenta un coeficiente de determinación de 0.99 lo que nos indica que los datos se ajustan al modelo lineal y es confiable usarla para determinar la DL<sub>50</sub>.



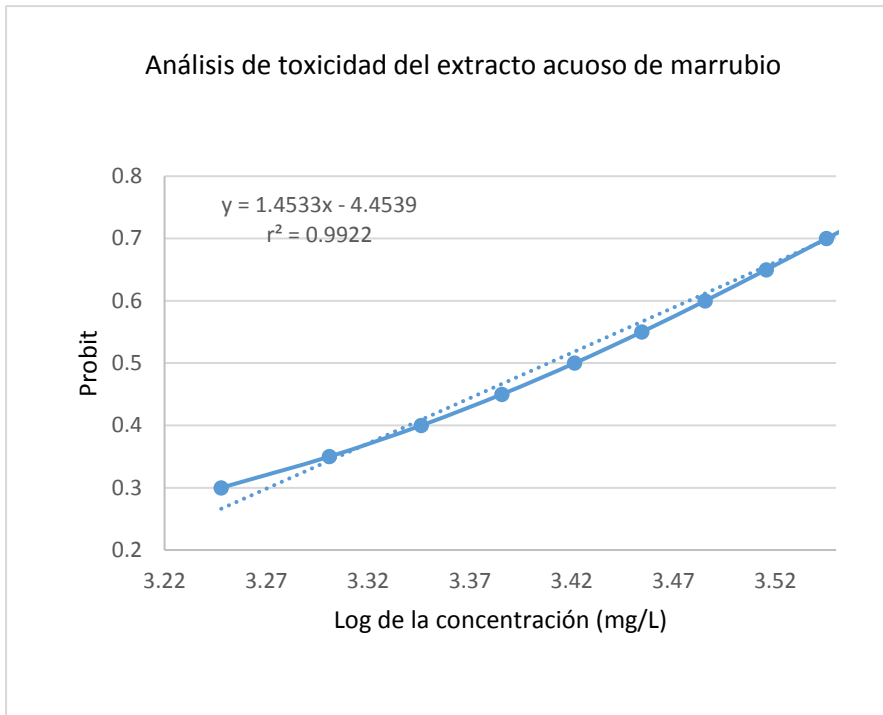
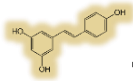


Figura 5.14 Análisis de toxicidad del extracto acuoso de marrubio

Nota: En estadística se llama función probit a la inversa de la función de distribución o función cuantil asociada con la distribución normal estándar. La función tiene aplicaciones en gráficos estadísticos exploratorios y modelos probit.

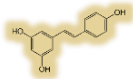
# Conclusiones



Figura VIII: Estudio del *Marrubium vulgare* L. Elaboración propia

6





## 6 Conclusiones

- Se desarrolló exitosamente una metodología para la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en las hojas del marrubio, utilizando la técnica de electroforesis capilar como método de separación y detección.
- El estudio fitoquímico indicó que los extractos de las hojas de marrubio presentan pruebas positivas para polifenoles, lo que es importante ya que dio las bases para proponer su determinación.
- El análisis de fenoles totales indicó que efectivamente la planta tiene una capacidad antioxidante, muy parecida a la de plantas que se utilizan cotidianamente como la hierbabuena o la manzanilla.
- Se seleccionó el método de extracción más adecuado que fue el asistido por ultrasonido, así como su tiempo de aplicación más conveniente para la extracción de los polifenoles.
- Se identificaron 9 polifenoles presentes en las hojas de marrubio de los que se cuantificaron 5 (ácido ferúlico, (+)-catequina, resveratrol, resorcinol y tirosol) los otros 4 (ácido nordihidroguayaretico, arbutina, (-)-epicatequina y rutina) se identificaron mediante el enriquecimiento del extracto y por comparación del espectro UV-Vis obtenido con el DAD, pero presentaron señales solo un poco por encima del ruido de la línea base y por debajo del LOD.
- Con ayuda del análisis de toxicidad del extracto acuoso de las hojas de marrubio se puede decir que el uso de la planta en el tratamiento de ciertos padecimientos es seguro, ya que presenta una dosis letal de 2562.86 mg/L y de acuerdo con referencia de (Sanabria-Galindo, López, & Gualdrón, 1997), no presenta un riesgo para la salud.

### 6.1 Prospectivas.

Este estudio que se realizó pretende contribuir con el conocimiento que se tiene del marrubio, con el fin de aprovechar al máximo sus propiedades y poder poner las bases para posteriores estudios en el tratamiento de algunos padecimientos como son la diabetes mellitus tipo I.

# Anexos.

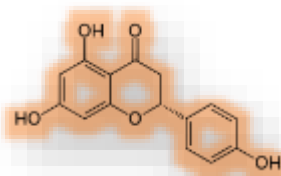
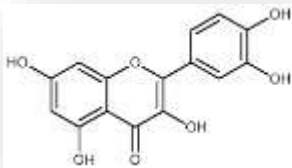
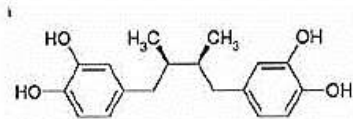
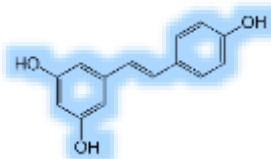
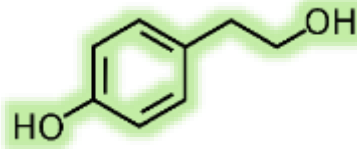
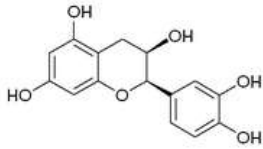
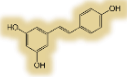


Figura IX: Anexos. Elaboración propia



## 7 Anexos

Anexo I.- Documento de la identificación taxonómica de la planta utilizada (*Marrubium vulgare* L.)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA  
**HERBARIO IZTACALA**




**FESI/NI/028/2016**

**LUIS ANGEL FLORES LINARES**  
Alumno de la Carrera de Química,  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM  
**Presente**

Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis de Licenciatura "Optimización del método de síntesis de nanopartículas de plata, usando como agente reductor el extracto acuoso de *Marrubium vulgare* L. (LAMIACEAE) (Marrubio) utilizada en la medicina tradicional mexicana", que se realiza en el Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez.

Así mismo, le informo que la planta ha sido integrada en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

| Nombre Científico           | Familia Botánica | Nombre Popular | No. de Registro |
|-----------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| <i>Marrubium vulgare</i> L. | LAMIACEAE        | "Marrubio"     | 2517 IZTA       |

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Los Reyes Iztacala, Estado de México, 4 de agosto 2016

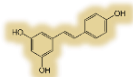


**M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO**  
Responsable del Herbario IZTA



C.c.p.- Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez  
Directora de Tesis, FES Cuautitlán, UNAM

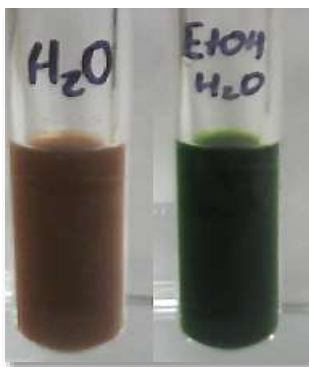
Av. de los Reyes No. 1 Los Reyes Iztacala, Cuautitlán, Estado de México.  
 C.P. 56200. Tel. 562 1 214 101-1000 0222-1376.  
 Herbario: IZTA@unam.mx, IZTA@cei.unam.mx



## Anexo II.- Análisis fitoquímico

A continuación, se muestran las imágenes de las reacciones realizadas en el estudio fitoquímico.

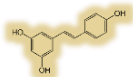
En la figura A.I se puede ver el extracto acuoso y el extracto etanol-agua (70:30), estos extractos presentaron un color café y verde respectivamente, muy intensos por lo que se diluyeron para realizar la comparación del color, figura A.II.



*Figura A.I Extracto acuoso e hidroalcohólico concentrados. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán, Elaboración propia*



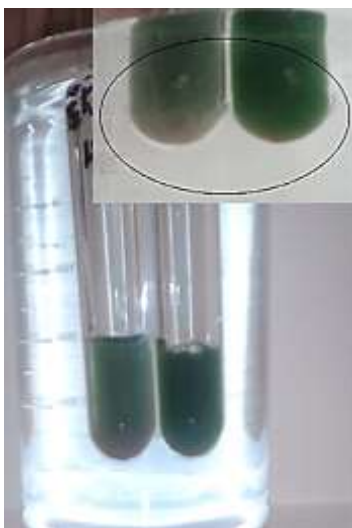
*Figura A.II Extracto acuoso e hidroalcohólico diluidos. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán, Elaboración propia*



## Reacción de Fehling

Se tomaron 2 mL de extracto y se hicieron reaccionar con 1 mL de solución de sulfato cúprico y 1 mL de solución de tartrato de sodio y potasio, posteriormente se calentó la solución en baño María durante 20 minutos.

La reacción es positiva para azúcares reductores, debido a que sí se observa la presencia de precipitado color rojo. En este caso los resultados fueron positivos para los dos extractos, ya que se observó un ligero precipitado color rojo ladrillo. Figura A.III



*Figura A.III Reacción de Fehling. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán, Elaboración propia*

## Reacción de Shinoda

Se tomaron 2 mL de extracto en un tubo de ensaye, se le agregaron 2 mL de agua desionizada, 1 mL de HCl concentrado y 0.5 g aproximadamente de magnesio metálico; cuando la reacción terminó, se agregó 1 mL alcohol amílico.

La presencia de una coloración amarilla, roja o naranja es la característica de una prueba positiva para flavonoides.

En este caso la prueba de detección de flavonoides fue positiva para los dos extractos, ya que en el extracto acuoso se nota una coloración naranja y una presencia relativamente abundante de precipitado color vino, en el caso del extracto hidroalcohólico, pasó de un color verde claro a un color café, como se observa en las figuras A.IV y A.V.

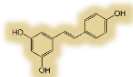


Figura A.IV Reacción de Shinoda en el extracto acuoso. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán. Elaboración propia



Figura A.V Reacción de Shinoda en el extracto hidroalcohólico. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán. Elaboración propia

## Reacción de cloruro férrico

Se tomaron 2 mL de extracto en un tubo de ensaye y se agregó 1 mL de solución de cloruro férrico al 5 %.

La presencia de color verde oscuro indica la presencia de fenoles.

Como podemos ver en las figuras A.VI y A.VII, la reacción de cloruro férrico fue positiva en el caso de los dos extractos, ya que los dos presentaron una coloración verde al reaccionar con la solución de cloruro férrico.



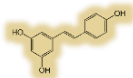


Figura A.VI Reacción de  $FeCl_3$  en el extracto acuoso. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán. Elaboración propia



Figura A.VII Reacción de  $FeCl_3$  en el extracto hidroalcohólico. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de campo 1, FES Cuautitlán, Elaboración propia

### Reacción de Baljet

Debido a que la solubilidad de las lactonas es mayor en soluciones etanólicas, únicamente se realizó el análisis en este extracto.

Se tomaron 2 mL de extracto en un tubo de ensaye, se agregó 1 mL de ácido pícrico al 1% en etanol y 1 mL de solución de hidróxido de sodio al 10%.

La presencia de precipitado color rojo ladrillo indica la presencia de lactonas, en este caso la prueba fue positiva, ya que se observó la aparición de sólido color rojo y el cambio de color de la solución de verde a café. Figura A.VIII

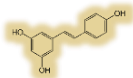


Figura A.VIII Reacción de Baljet en el extracto hidroalcohólico. Fotografía tomada en el laboratorio de desarrollo de métodos analíticos de FES Cuautitlán, campo 1. Elaboración propia

### Anexo III.- Determinación de fenoles totales

Preparación de la curva de ácido gálico, con el reactivo de Folin-Denis

Tabla A.I Sistemas preparados para la construcción de la curva de calibración de ácido gálico medido a una longitud de onda de 710 nm y con un volumen final de 10 mL.

| Solución | Vestándar en $\mu\text{L}$ | Concentración en mg/L | Absorbancia |
|----------|----------------------------|-----------------------|-------------|
| 1        | 0                          | 0                     | 0.003       |
| 2        | 200 $\mu\text{L}$          | 2.0697                | 0.133       |
| 3        | 400 $\mu\text{L}$          | 4.1395                | 0.261       |
| 4        | 600 $\mu\text{L}$          | 6.2092                | 0.381       |
| 5        | 800 $\mu\text{L}$          | 8.2790                | 0.538       |
| 6        | 1000 $\mu\text{L}$         | 10.3488               | 0.712       |
| 7        | 1200 $\mu\text{L}$         | 12.4185               | 0.896       |
| 8        | 1400 $\mu\text{L}$         | 14.8443               | 1.023       |

La curva realizada presento un  $r^2$  de 0.9953, como se muestra en la figura A.IX.

La concentración de fenoles totales del marrubio se obtuvo mediante interpolación con la curva de calibración, en este caso el extracto acuoso de marrubio presentó una absorbancia de 0.488.

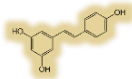


Gráfico del Modelo Ajustado  
 Absorbancia = -0.0247418 + 0.0706741\*[ácido gálico]

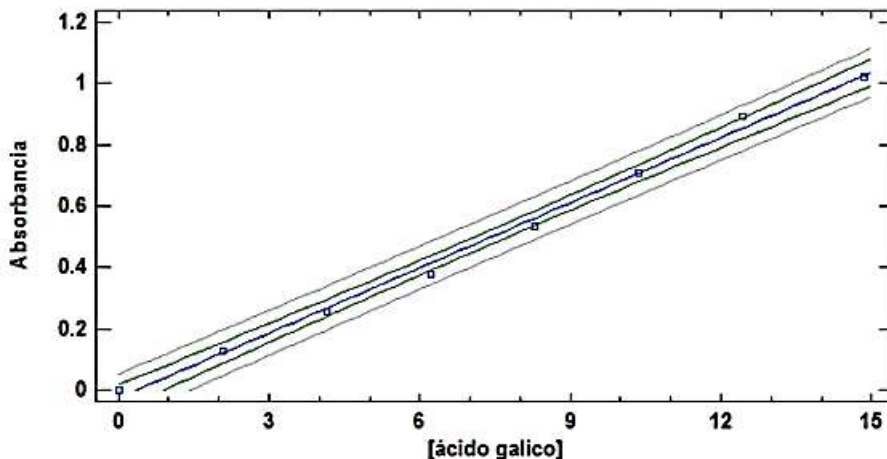


Figura A.IX Curva de calibración de ácido gálico

Absorbancia corregida = Absorbancia de la muestra- absorbancia de la matriz

Absorbancia corregida = 0.491-0.003 = 0.488

Con ayuda de la ecuación de la curva de calibración obtenemos la concentración de la muestra

$$y = 0.0706741x - 0.0247418$$

Despejando x y sustituyendo la absorbancia de la muestra:

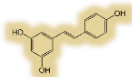
$$x = \frac{0.488 + 0.0247418}{0.070641}$$

$$x = 7.2584 \text{ mg/L}$$

Concentración de fenoles totales en el extracto es:

$$[\text{fenoles totales}] = \frac{(7.2584 \frac{\text{mg}}{\text{L}})(0.01\text{L})}{4 \times 10^{-4} \text{L}} = 181.4604 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

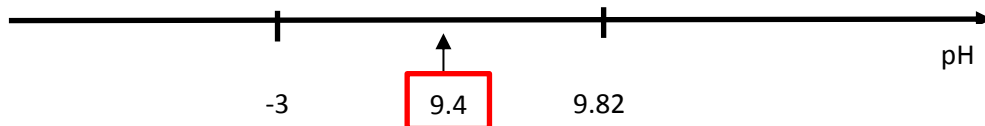
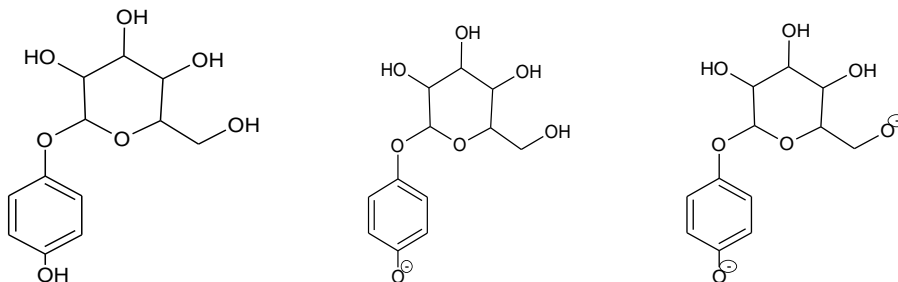
$$181.4604 \frac{\text{mg}}{\text{L}} (0.02\text{L}) = 3.6292 \text{ mg de } \frac{\text{ácido gálico}}{1210 \text{ mg}} = 0.0029 \frac{\text{mg de ácido gálico}}{\text{mg de planta}}$$



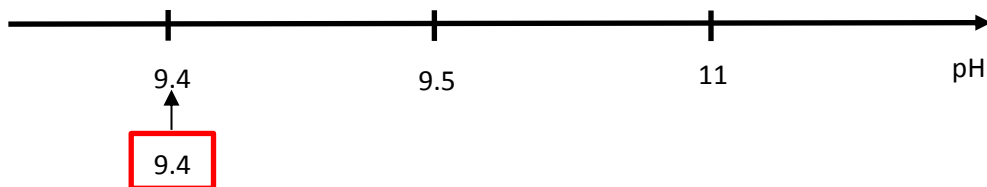
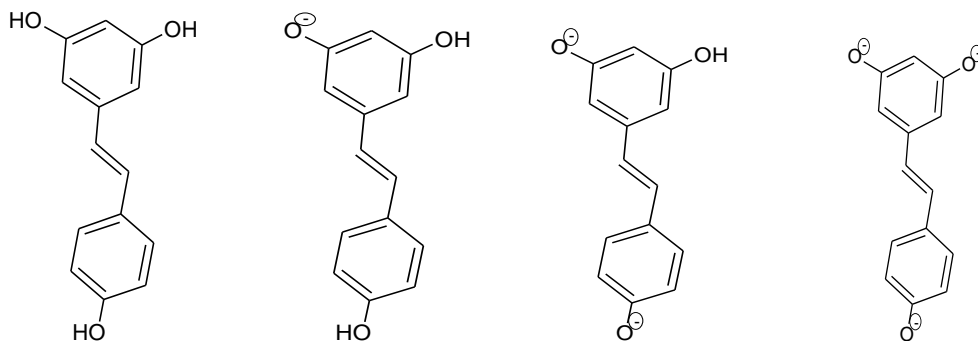
## Anexo IV.- Escalas de zonas de predominio de los polifenoles detectados

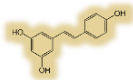
Las siguientes escalas de zonas de predominio EZP, muestran las especies de compuestos fenólicos presentes en el rango de pH de 0 a 14, con base a los pKa de cada polifenol, además se indica la especie en predominio a pH de 9.4, el cual es el pH de trabajo en la separación.

### Arbutina

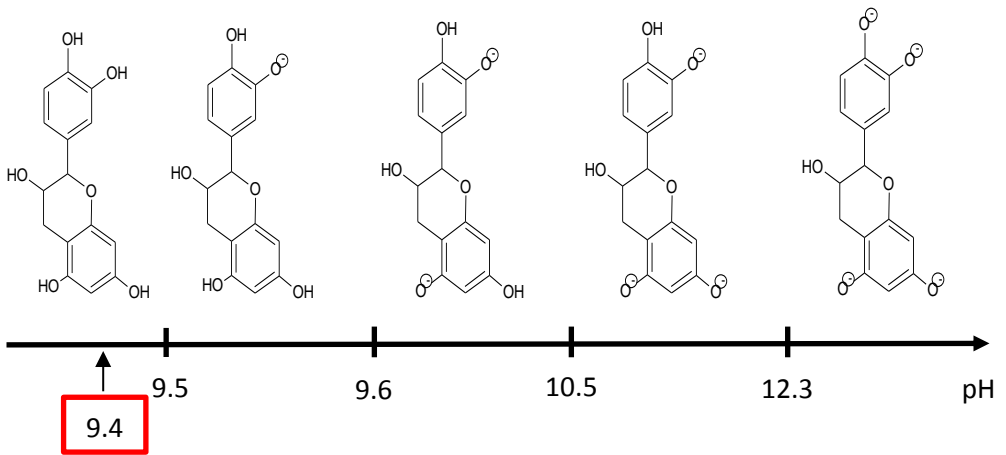


### Resveratrol

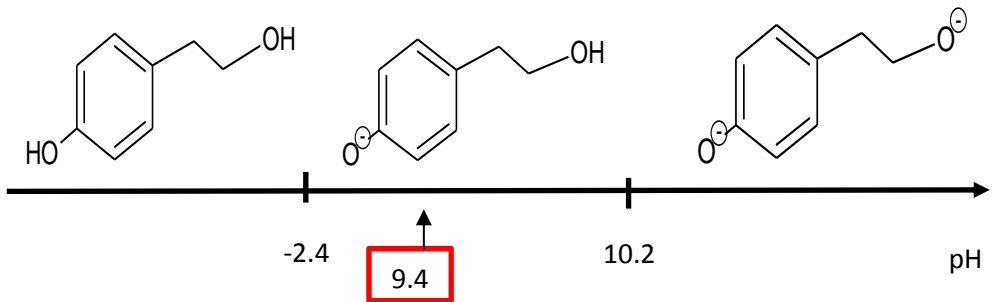




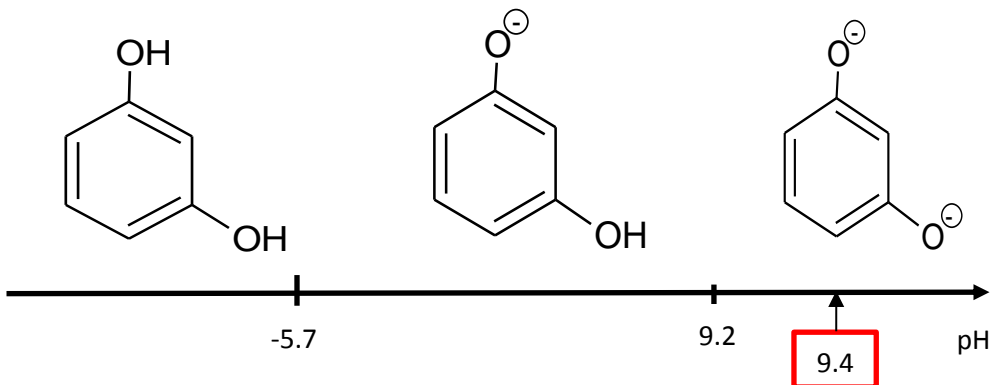
**(+)-Catequina**

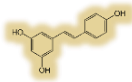


**Tirosol**

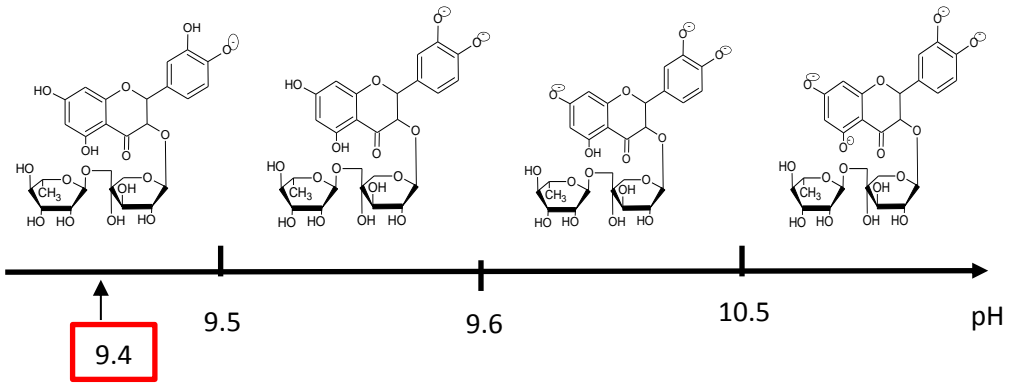


**Resorcinol**

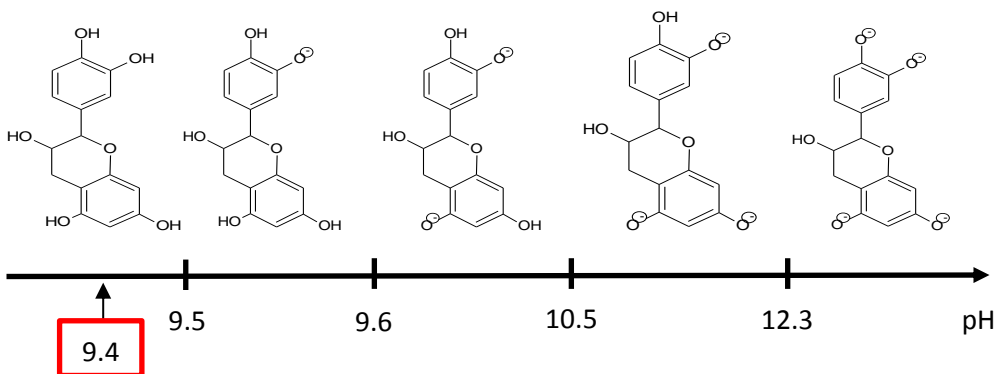




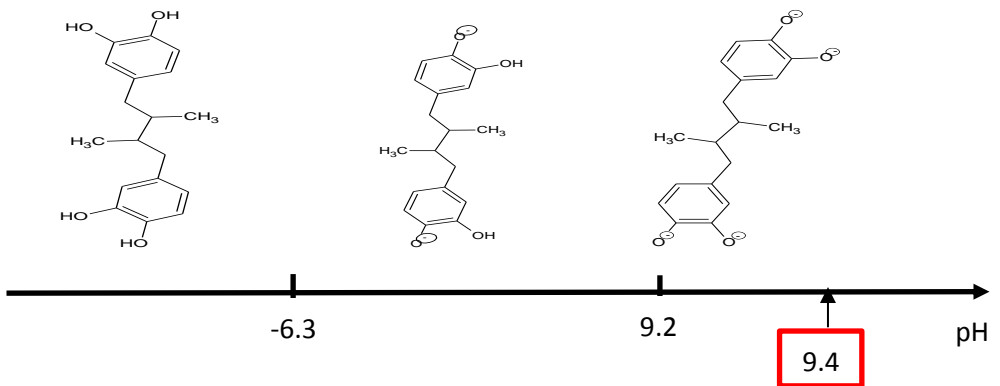
### Rutina

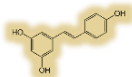


### (-)-Epicatequina

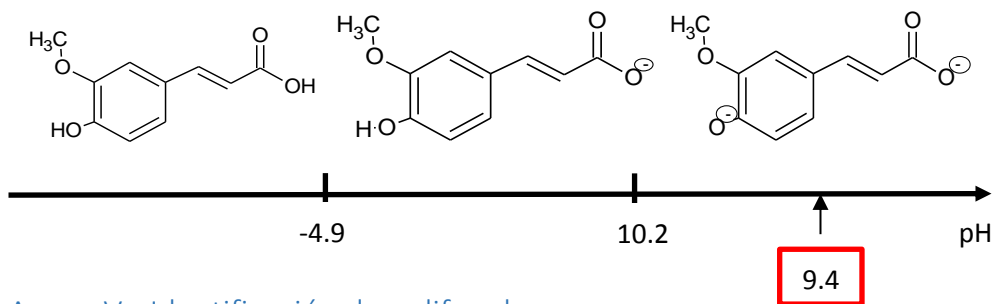


### Ácido NDGA





### Ácido ferúlico



### Anexo V.- Identificación de polifenoles

A continuación, se presentan los electroferogramas de la identificación de los polifenoles en el EUS<sub>E-A</sub> y en el EUS<sub>E-AH</sub>.

➤ EUS<sub>E-A</sub>

### Arbutina

En la figura A.X se muestran dos electroferogramas, el perfil inferior (1) pertenece al EUS<sub>E-A</sub> sin ninguna adición y en el perfil superior (2) se observa el EUS<sub>E-A</sub> enriquecido con el estándar de arbutina, se ve claramente el aumento de la altura de una señal a 5.03 minutos de  $t_m$ , por lo que se prosiguió a confirmar su presencia comparando el espectro UV-Vis del estándar con el de la señal de interés.

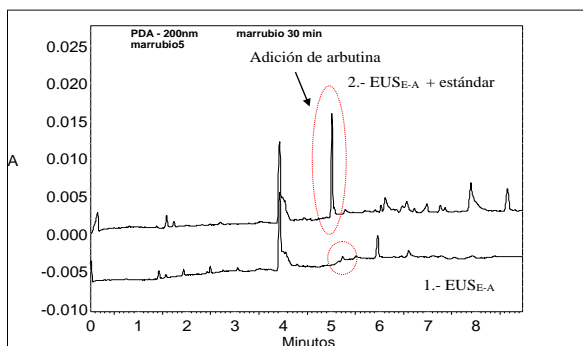
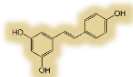


Figura A.X Identificación de arbutina por adición de estándar

En la figura A.XI se muestra la comparación de los espectros UV-Vis de la identificación de arbutina, el espectro (A) pertenece a la señal que se sospecha es arbutina (A) y el (B) del estándar de arbutina, claramente se observa que los dos espectros UV-Vis presentan una



tendencia muy similar y máximos de absorción a una longitud de onda de 200 nm, por lo que queda confirmada la presencia de arbutina en el extracto.

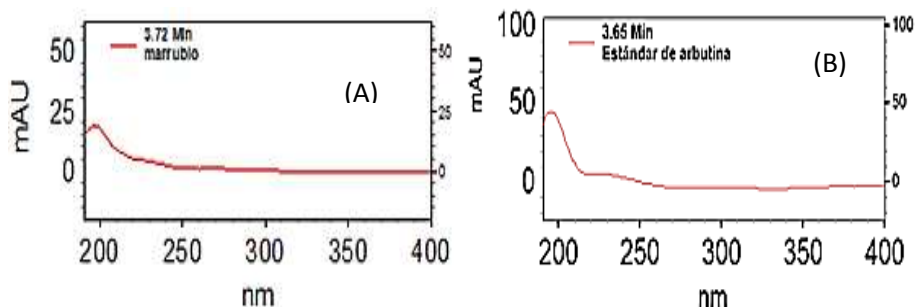


Figura A.XI Espectros de absorción UV-Vis de arbutina, medido a 326 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada en el extracto y B) espectro del estándar de arbutina

## Resveratrol

A continuación, se presenta la identificación de resveratrol, en la figura A.XII se puede ver dos electroferogramas, el de la parte inferior (1), pertenece al EUS<sub>E-A</sub> y en la parte superior (2) se presenta el extracto adicionado con estándar de resveratrol, en este electroferograma podemos ver claramente el aumento del área y la altura de una señal que se encuentra a 6.4 minutos de  $t_m$ , por lo que se confirmó la presencia del resveratrol debido al enriquecimiento del extracto.

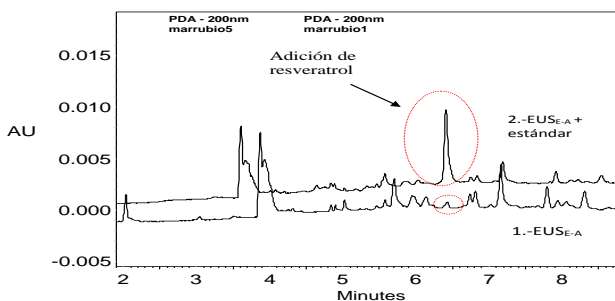
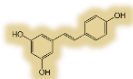


Figura A.XVII Identificación de resveratrol por adición de estándar

Posteriormente, se realizó la identificación de la señal, comparando los espectros UV-Vis de la señal presente en el extracto y el espectro UV-Vis correspondiente del estándar utilizado.

En la figura A.XIII (A) se presenta el espectro UV-Vis de la señal que se sospecha que es resveratrol y en la figura A.XIII (B) se observa el espectro UV-Vis del estándar de resveratrol,





los espectros son bastante similares y ambos presentan máximos de absorción en 200 nm y 325 nm, por lo que queda confirmada la presencia de resveratrol en el extracto etanol agua (70:30).

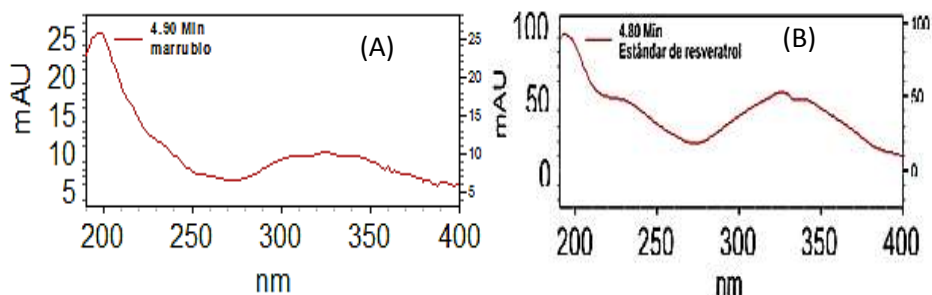


Figura A.XIII Espectros de absorción UV-Vis del resveratrol, medido a 365 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de resveratrol

### (+)-Catequina

Otro de los polifenoles encontrado en el EUS<sub>E-A</sub> fue la (+)-catequina, a continuación en la figura A.XIV se muestran dos electroferogramas, el perfil inferior (1) pertenece al extracto sin adicionar estándar y el perfil superior (2) pertenece al electroferograma del extracto, adicionado con el estándar de (+)-catequina.

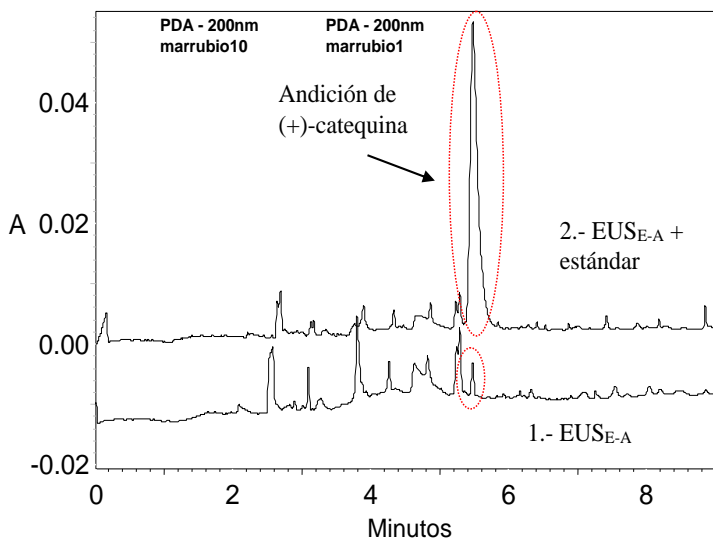
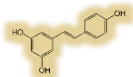


Figura A.XIV Identificación de (+)-catequina por adición de estándar



En el perfil superior se puede ver claramente el aumento del área y altura de una señal que aparece a 5.95 min de  $t_m$ , por lo que proseguimos a confirmar su presencia mediante la comparación de los espectros de absorción UV-Vis de la señal que se sospecha es (+)-catequina y el del estándar de (+)-catequina.

En la figura A.XV (A) se muestra el espectro de absorción de la señal que identificamos en el extracto y en la figura A.XV (B), se muestra el espectro de absorción del estándar de (+)-catequina. Como se puede ver, los dos presentan una tendencia similar y tienen máximos de absorción en 210 nm, por lo que con esta evidencia confirmamos la presencia de (+)-catequina en el extracto.

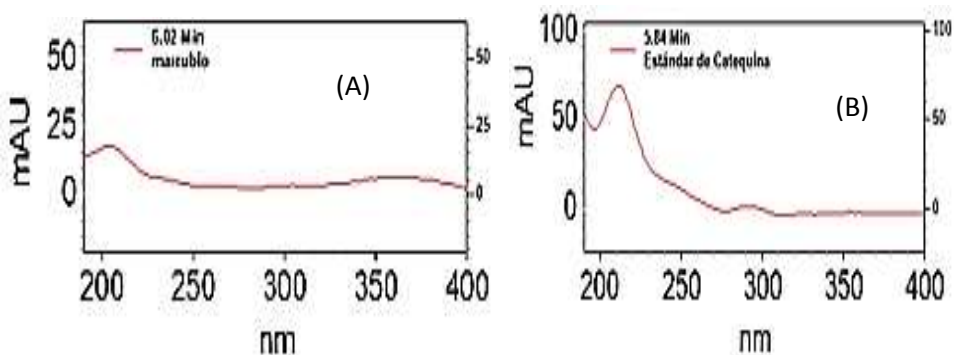


Figura A.XV Espectros UV-Vis de (+)-catequina, medido a 200 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de (+)-catequina

Estos tres polifenoles que se indicaron anteriormente son los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-A</sub>

A continuación, se presentan los polifenoles presentes en el EUS<sub>E-AH</sub>

➤ EUS<sub>E-AH</sub>

En el extracto hidrolizado se detectó la presencia de 6 polifenoles más, los cuales se muestran a continuación.

### Tirosol

En la figura A.XVI se presentan dos electroferogramas, en el perfil inferior (1) se puede observar el electroferograma del EUS<sub>E-AH</sub> como tal y en el perfil superior (2) se muestra el electroferograma del extracto, adicionado con el estándar de tirosol, el cual se observa claramente que se detecta a un tiempo de retención de 2.8 minutos de  $t_m$ .

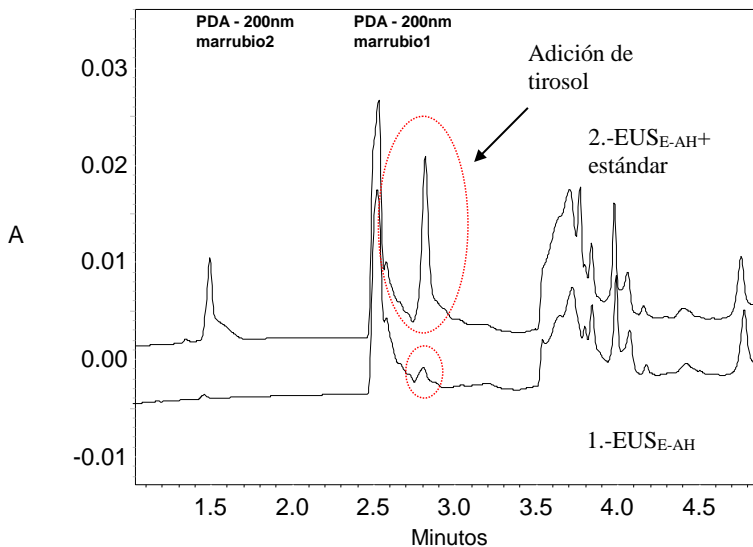
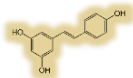


Figura A.XVI Identificación de tirosol por adición de estándar

Posteriormente se obtuvieron los espectros UV-Vis de la señal que se sospecha es tirosol y el espectro UV-Vis del estándar de tirosol.

En la figura A.XVII (A) se observa el espectro de absorción de la señal que analizamos en el extracto y en la figura A.XVII (B) el espectro de absorción del estándar de tirosol, los dos presentan una tendencia similar y máximos de absorción en 200 y 275 nm, por lo que queda confirmada la presencia de tirosol en el extracto.

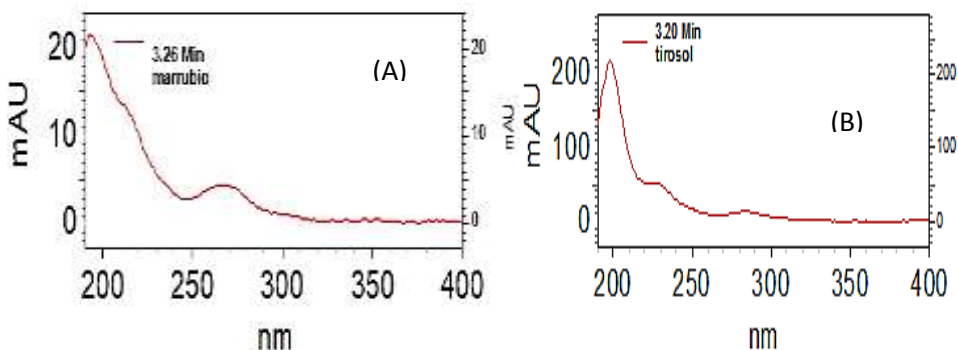
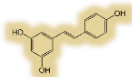


Figura A.XVII Espectros UV-Vis de tirosol, medido a 273 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de tirosol



## Resorcinol

En la figura A.XVIII se presentan los electroferogramas de la identificación de resorcinol, en el perfil inferior (1), se presenta el EUS<sub>E-AH</sub>, y en el perfil superior se observa el extracto adicionado con el estándar de resorcinol. Como se puede observar aumenta una señal muy pequeña, que se encuentra a 5.89 min, una vez que se detectó la presencia del extracto, proseguimos a confirmarlo con la comparación de los espectros de absorción de la señal y el estándar del resorcinol.

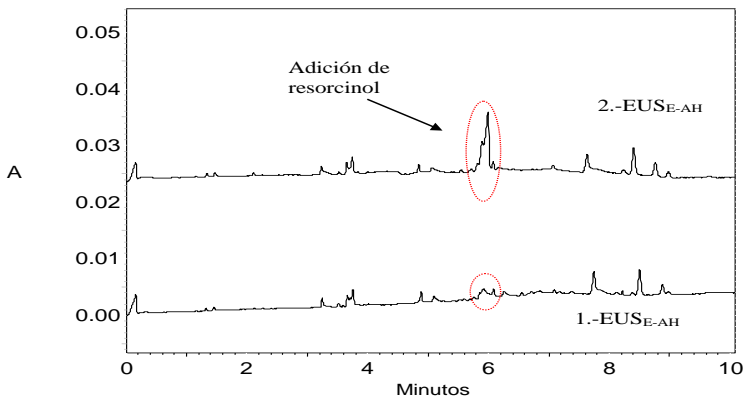


Figura A.XVIII Identificación de resorcinol por adición de estándar

En la figura A.XIX (A), se observar el espectro UV-Vis de la señal que se sospecha es resorcinol y en la figura A.XIX (B) el espectro UV-Vis del estándar de resorcinol, los dos espectros presentan un máximo en 200 nm y otro máximo en 270 nm, además de que los dos espectros tienen una tendencia muy similar, por lo que se confirma la presencia de resorcinol en el extracto.

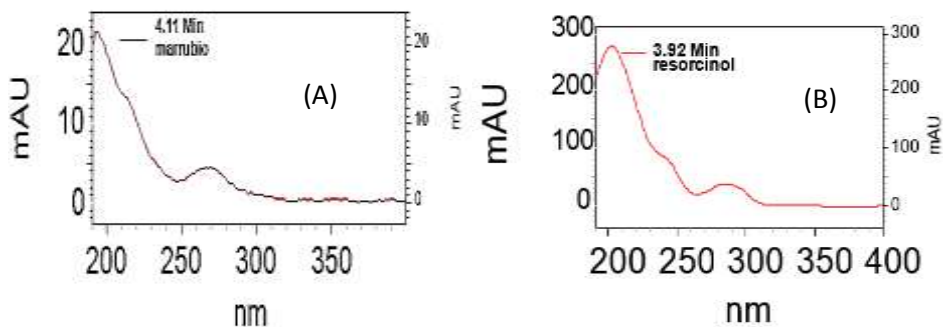
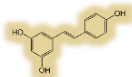


Figura A.XIX Espectro UV-Vis de resorcinol, medido a 280 nm. Nota: A) Espectros de la señal identificada y B) espectro del estándar de resorcinol.



## (-)-Epicatequina

A continuación, se presenta la identificación de (-)-epicatequina en el EUS<sub>E-AH</sub>, como podemos ver en la figura A.XX tenemos dos electroferogramas, el perfil inferior (1), pertenece al extracto y el perfil superior (2) pertenece al extracto adicionado con estándar de (-)-epicatequina, en este perfil se puede ver claramente el aumento del área de una señal que se encuentra a 8.2 min de  $t_m$ .

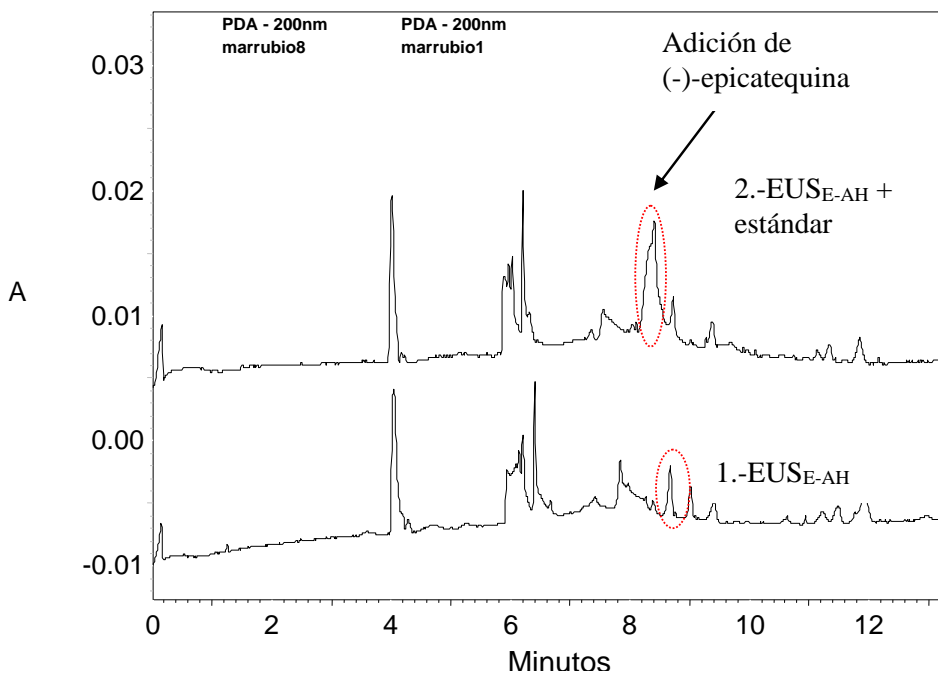


Figura A.XX Identificación de (-)-epicatequina por adición de estándar

Posteriormente confirmamos la presencia de (-)-epicatequina, con la comparación de los espectros de absorción de la señal que analizamos y del estándar de (-)-epicatequina, en la figura A.XXI (A) se presenta el espectro de absorción de la señal que analizamos en el extracto y en la figura A.XXI (B) el espectro de absorción del estándar de (-)-epicatequina. Como se puede observar, la tendencia de los dos espectros es parecida y los dos presentan máximos en 200 y 280 nm, por lo que con esta evidencia podemos confirmar la presencia de (-)-epicatequina en el extracto.

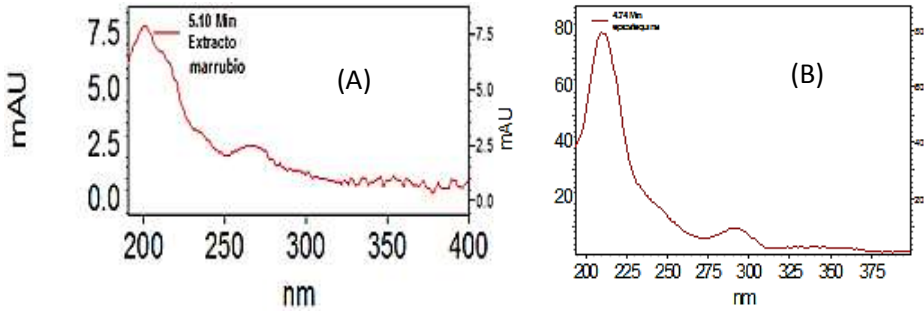
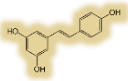


Figura A.XXI Espectros UV-Vis de (-)-epicatequina, medido a 280 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de (-)-epicatequina.

### Rutina

La rutina es otro polifenol que se detectó en el EUS<sub>E-AH</sub>, en la figura A.XII se observa el electroferograma de su identificación, en el perfil inferior (1) se muestra el electroferograma del EUS<sub>E-AH</sub> como tal y en el perfil superior (2) se presenta el extracto adicionado con estándar de rutina, como podemos ver hay una señal que aumenta de altura, en un  $t_m$  de 8.4 minutos.

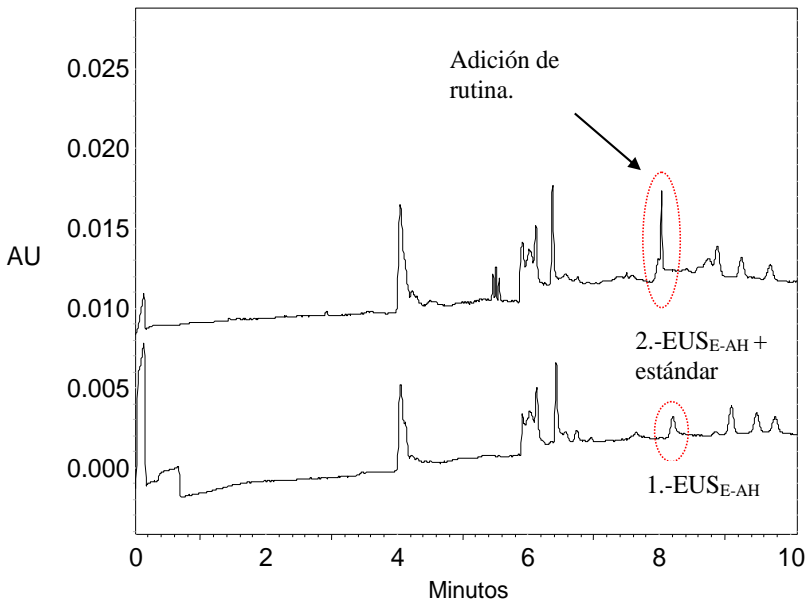
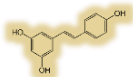


Figura A.XXII Identificación de rutina por adición de estándar



En la figura A.XXIII se muestra la comparación de los espectros de absorción de la señal que sospechamos es rutina (A) y el espectro de absorción del estándar de rutina (B), los dos espectros presentan una tendencia muy similar, con máximos de absorción en 220 y 275 nm, por lo que con ello confirmamos la presencia de rutina en el extracto.

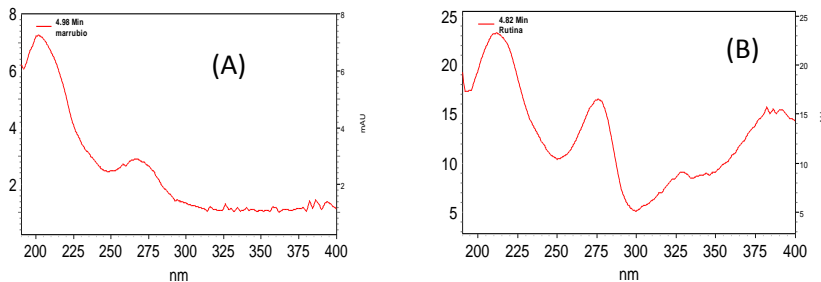


Figura A.XXIII Espectros UV-Vis de rutina, medido a 280 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de rutina

### Ácido nordihidroguayarático (NDGA)

A continuación, se muestra la identificación del ácido NDGA en el EUS<sub>E-AH</sub>. En la figura AXXIV se muestra el electroferograma de la identificación del ácido NDGA, en el perfil inferior (1) se presenta el electroferograma del extracto y en el perfil superior (2) se tiene el extracto adicionado con estándar de ácido NDGA, en él se observa claramente el aumento de la altura de una señal que se encuentra a 9.4 min de  $t_m$ , una vez que se detectó la señal proseguimos a comparar los espectros de absorción de la señal y el estándar de ácido NDGA.

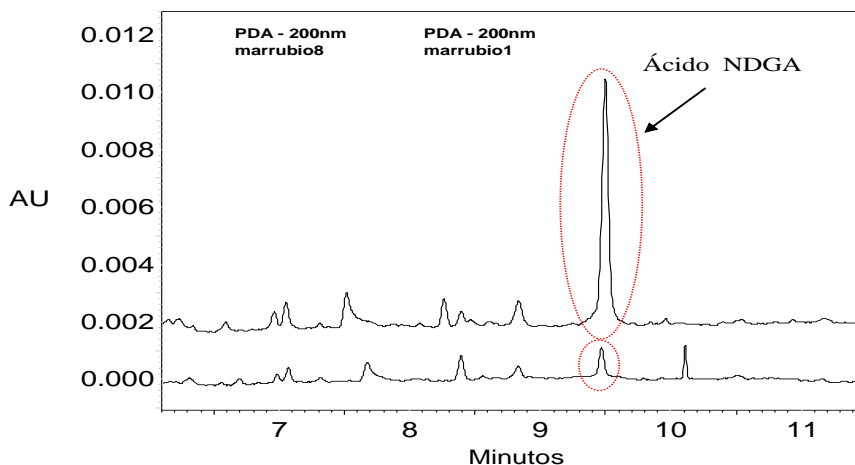
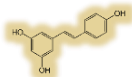


Figura A.XXIV Identificación de ácido NDGA por adición de estándar



A continuación, en la figura A.XXV (A) se presenta el espectro de absorción de la señal que se sospecha es ácido NDGA la cual presenta un máximo de absorción en 200 nm, y otro máximo en 300 nm, de igual forma en la figura A.XXV (B) se observa el espectro de absorción del ácido NDGA y presenta la misma tendencia y también máximos en 200 y 300 nm por lo que con estas evidencias podemos confirmar la presencia de ácido NDGA en el extracto.

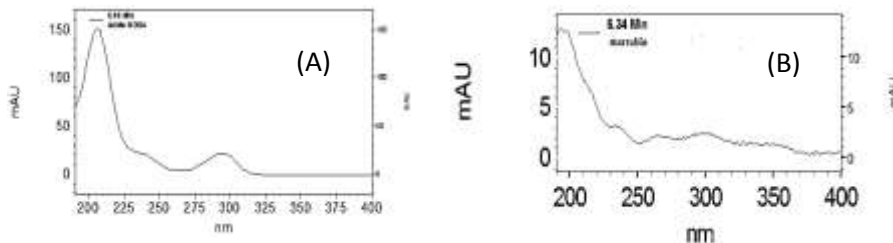


Figura A.XXV Espectros UV-Vis del ácido Nordihidroguayaretico (NDGA), medido a 290 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de ácido NDGA

## Ácido ferúlico

Finalmente, el último polifenol que se encontró en el extracto EUS<sub>E-AH</sub> fue el ácido ferúlico, a continuación en la figura A.XXVI se observa el electroferograma de la identificación de ácido ferúlico, en el perfil (1) se presenta el electroferograma del extracto como tal y en el perfil superior (2) el extracto adicionado con estándar de ácido ferúlico, aquí se puede observar que crece una señal que se encuentra a 8.2 min de  $t_m$ .

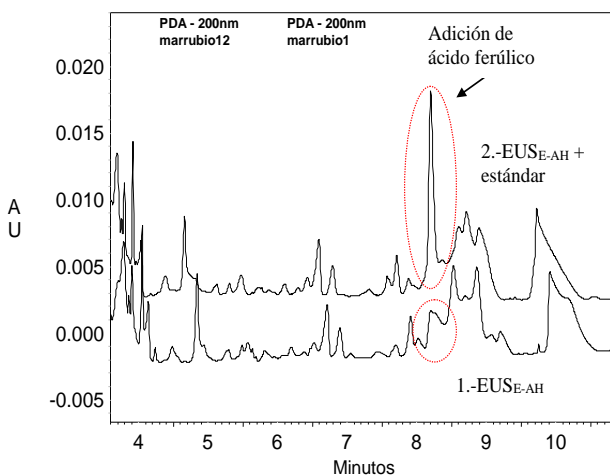
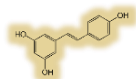


Figura A.XXVI Identificación de ácido ferúlico por adición de estándar





Posteriormente, para confirmar la presencia del ácido ferúlico en el extracto, comparamos el espectro de absorción de la señal que nos interesa la cual se muestra en la figura A.XXVI (A) y el espectro de absorción del estándar de ácido ferúlico, el cual se muestra en la figura A.XXVI (B), como se puede observar los dos espectros presentan máximos de absorción a en 200 y 350 nm, por lo que con estos resultados se confirma la presencia de ácido ferúlico en el extracto.

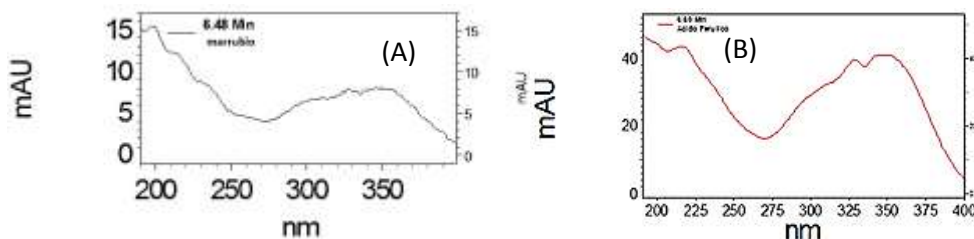


Figura A.XXVI Espectros UV-Vis de ácido ferúlico, medido a 350 nm. Nota: A) Espectro de la señal identificada y B) espectro del estándar de ácido ferúlico

## Anexo VI.- Concentración de los polifenoles estándar, para la cuantificación

Tabla A.II Concentración de los polifenoles estándar para la cuantificación en el extracto etanol-agua (70:30)

| Sistema | [Arbutina] (mg/L) | [(+)-Catequina] (mg/L) | [Resveratrol] (mg/L) | [Metilparabeno] E.I. (mg/L) | Volumen de Aforo (mL) |
|---------|-------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 1       | 8.0281            | 5.4566                 | 6.6528               | 20                          | 25                    |
| 2       | 16.0563           | 10.9132                | 13.3056              | 20                          | 25                    |
| 3       | 32.1126           | 21.8265                | 26.6112              | 20                          | 25                    |
| 4       | 48.1689           | 32.7398                | 39.9168              | 20                          | 25                    |
| 5       | 64.2252           | 43.6531                | 53.2224              | 20                          | 25                    |
| 6       | 80.2252           | 54.5664                | 66.528               | 20                          | 25                    |

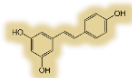


Tabla A.III Concentración de los polifenoles estándar para la cuantificación en el extracto etanol-agua (70:30) hidrolizado

| Sistema | [Ácido ferúlico] (mg/L) | [Tirosol] (mg/L) | [Ácido caféico] (mg/L) | [Resorcinol] (mg/L) | Vol. Aforo (mL) |
|---------|-------------------------|------------------|------------------------|---------------------|-----------------|
| 1       | 5.44896                 | 5.0944           | 20.90                  | 5.19552             | 25              |
| 2       | 10.89792                | 10.1888          | 20.90                  | 10.39104            | 25              |
| 3       | 21.79584                | 20.3776          | 20.90                  | 20.78208            | 25              |
| 4       | 32.69376                | 30.5664          | 20.90                  | 31.17312            | 25              |
| 5       | 43.59168                | 40.7552          | 20.90                  | 41.56416            | 25              |

### Anexo VII.- Validación del modelo lineal de las curvas de calibración de los compuestos fenólicos

La validación de los modelos lineales de las curvas de calibración, se realizó por medio de un análisis de varianzas con falta de ajuste (ANOVA). Con ayuda del software statgraphics centurión XVI, se obtuvo el gráfico de regresión lineal para las tres repeticiones de cada curva de calibración, utilizando los respectivos estándares internos; se determinó si hay una tendencia lineal en los datos y se obtuvieron los coeficientes y parámetros de la regresión lineal con su respectivo error, esto se realizó por el método de mínimos cuadrados, cuya ecuación lineal de la recta se establece en la ecuación 4.

$$y = b_0 + b_1x \tag{Ecuación 4}$$

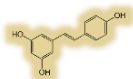
Donde “y” es la relación de áreas o alturas ( $A_{Fenol}/A_{E.I.}$  ó  $h_{Fenol}/h_{E.I.}$ ), “b<sub>0</sub>” es la ordenada al origen o intercepto, “b<sub>1</sub>” es la pendiente y “x” es la relación de concentraciones ( $[Fenol]/[E.I.]$ ).

En seguida se analizaron los datos con un gráfico de residuales, se descartaron los datos atípicos con un 95 % de confianza, y se confirmó el ajuste lineal observando si las varianzas de los datos son homogéneas, es decir, si son homocedásticos.

Posteriormente se realizó el test de falta de ajuste al comparar valores de F de la distribución de Fisher; para esto, se calculó F experimental (F<sub>exp</sub>) de acuerdo a la ecuación 5.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} \tag{Ecuación 5}$$

Donde MS<sub>FDA</sub> y MS<sub>EP</sub> son los cuadrados medios para la varianza de los residuales de la carencia de ajuste y el error puro, respectivamente, éstos se obtuvieron de los resultados



del análisis ANOVA que reporta el software statgraphics centurión XVI. A continuación se obtuvo el valor de F de tablas ( $F_{tablas}$ ) para un 95 % de confianza ( $\alpha=0.05$ ), se consideró que “k” es el número de puntos de la curva de calibración y “n” es el número total de corridas realizadas; de acuerdo a lo anterior, se obtuvieron los grados de libertad (gl) para  $MS_{FDA}$  y  $MS_{EP}$  cuyos valores son k-2 y n-k, respectivamente, de esta forma se estableció el valor de F de tablas. Una vez determinados los valores de  $F_{exp}$  y  $F_{tablas}$ , se comparan para establecer si hay o no un ajuste al modelo de acuerdo a las siguientes pruebas de hipótesis:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = \text{Hay ajuste al modelo.}$$

$$H_1 = F_{exp} > F_{tablas} = \text{Hay falta de ajuste al modelo.}$$

Finalmente se verificó que el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) sea mayor que 0.98, este criterio indica que hay un ajuste al modelo lineal.

Ya validado el modelo lineal, se calcularon algunos parámetros de validación; en primer lugar, se evaluó el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(b_1)$ ), cuyo criterio de aceptación es que no debe incluir el cero.

En seguida se calculó el límite de detección LOD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, cuya fórmula se establece en la ecuación 6.

$$LOD = ([E. I.]) \frac{3.3S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 6}$$

Dónde: [E.I.] es la concentración del estándar interno,  $S_{y/x}$  es la desviación estándar de regresión y  $b_1$  es la pendiente de la curva de calibración.

Posteriormente se calculó el límite de cuantificación LOQ con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la regresión, cuya fórmula se establece en la ecuación 7.

$$LOQ = ([E. I.]) \frac{10S_{y/x}}{b_1} \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde: [E.I.] es la concentración del estándar interno,  $S_{y/x}$  es la desviación estándar de regresión y  $b_1$  es la pendiente de la curva de calibración.

A continuación, se presenta la validación del modelo lineal de las curvas de calibración para cada uno de los compuestos polifenólicos de interés con su respectivo estándar interno, así como el cálculo de algunos parámetros de validación mencionados con anterioridad.

### Ácido ferúlico

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos, en la tabla A.IV se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

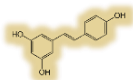


Tabla A.IV Datos de la curva de calibración para estándar de ácido ferúlico

| n  | Solución | [ácido ferúlico] (mg/L) | [ácido cafeico] (mg/L) | A <sub>ac ferúlico</sub> | A <sub>ac cafeico</sub> | $\frac{[\text{ác ferúlico}]}{[\text{ác cafeico}]}$ (mg/L) | $\frac{A_{\text{ferúlico}}}{A_{\text{cafeico}}}$ |
|----|----------|-------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|---|--|
| 1  | 1        | 5.4489                  | 20.9088                | 1379                     | 4979                    | 0.2606  | 0.2769   |
| 2  | 1        | 5.4489                  | 20.9088                | 1257                     | 4571                    | 0.2606  | 0.2749   |
| 3  | 1        | 5.4489                  | 20.9088                | 1355                     | 4687                    | 0.2606  | 0.2890   |
| 4  | 2        | 10.8979                 | 20.9088                | 2815                     | 4481                    | 0.5212  | 0.6282   |
| 5  | 2        | 10.8979                 | 20.9088                | 2892                     | 4844                    | 0.5212  | 0.5970   |
| 6  | 2        | 10.8979                 | 20.9088                | 2686                     | 4410                    | 0.5212  | 0.6090   |
| 7  | 3        | 21.7958                 | 20.9088                | 4820                     | 3889                    | 1.0424  | 1.2393   |
| 8  | 3        | 21.7958                 | 20.9088                | 4875                     | 3710                    | 1.0424  | 1.3140   |
| 9  | 3        | 21.7958                 | 20.9088                | 5074                     | 3844                    | 1.0424  | 1.3199   |
| 10 | 4        | 32.6937                 | 20.9088                | 7556                     | 3535                    | 1.5636  | 2.1374   |
| 11 | 4        | 32.6937                 | 20.9088                | 7887                     | 3968                    | 1.5636  | 1.9876   |
| 12 | 4        | 32.6937                 | 20.9088                | 7949                     | 3921                    | 1.5636  | 2.0272   |
| 13 | 5        | 43.5916                 | 20.9088                | 10824                    | 4196                    | 2.0848  | 2.5795   |
| 14 | 5        | 43.5916                 | 20.9088                | 11404                    | 4384                    | 2.0848  | 2.6012   |
| 15 | 5        | 43.5916                 | 20.9088                | 11047                    | 4048                    | 2.0848  | 2.7290   |

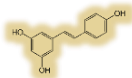


Tabla A.V Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de ácido ferúlico

| Parámetro                    | Valor estimado | Error  | Coficiente                      | valor  |
|------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|--------|
| Intercepto (b <sub>0</sub> ) | -0.06137       | 0.0295 | Correlación (r)                 | 0.9980 |
| Pendiente (b <sub>1</sub> )  | 1.31145        | 0.0230 | Determinación (r <sup>2</sup> ) | 0.9960 |

En la figura A.XXVII se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para ácido ferúlico, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

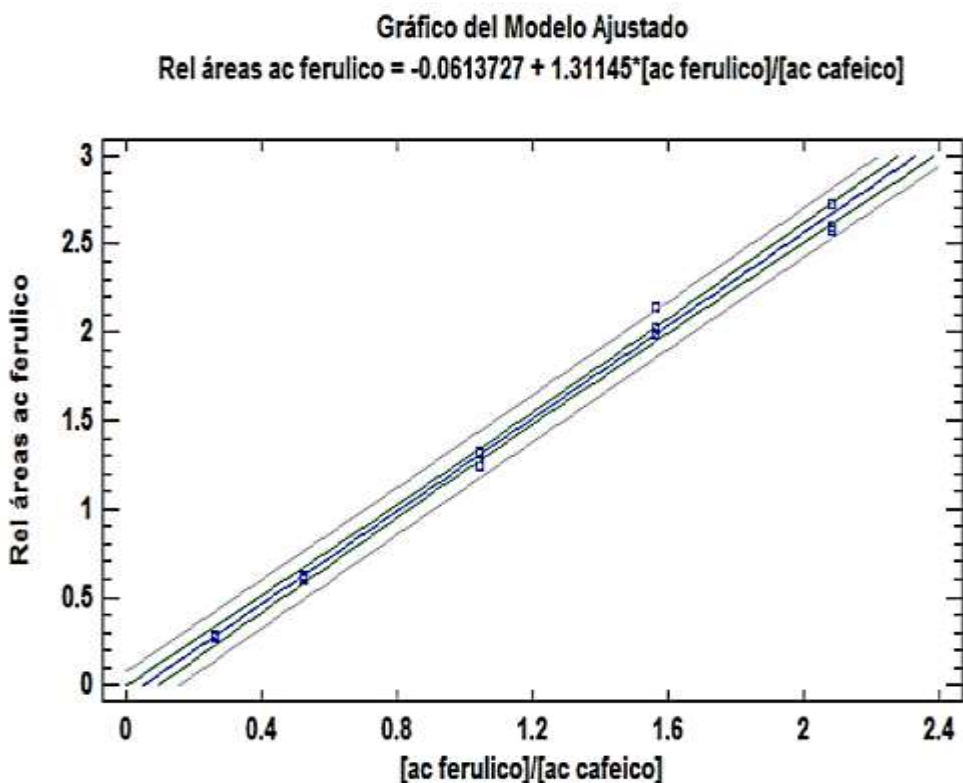
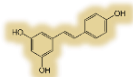


Figura A.XXVII Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de ácido ferúlico



En la figura A.XXVIII se encuentra el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

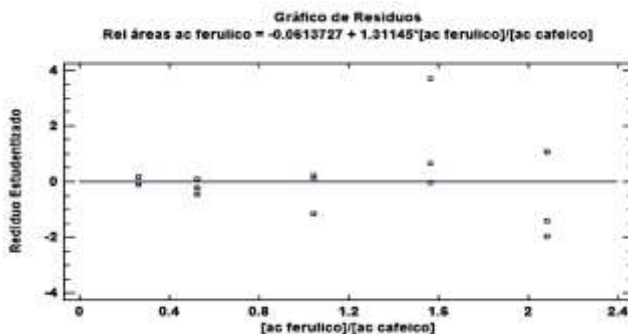


Figura A.XXVIII Gráfico de residuales para la curva de calibración de ácido ferúlico

En la tabla A.VI se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores MS<sub>FDA</sub>, MS<sub>EP</sub> y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.VI Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

| Fuente              | Suma de cuadrados (SS) | gl | Cuadrado medio (MS) |
|---------------------|------------------------|----|---------------------|
| Modelo              | 11.4939                | 1  | 11.4939             |
| Residuo             | 0.0460                 | 13 | 0.0035              |
| -Carencia de ajuste | 0.0162                 | 3  | 0.0054              |
| -Error puro         | 0.0297                 | 10 | 0.0029              |
| Total (corr)        | 11.5399                | 14 | -                   |

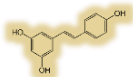
A partir de los datos de la tabla A.VI se calculó  $F_{exp}$ , como se muestra a continuación.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{0.0054}{0.0029} = 1.86$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas ( $F_{tablas}$ ), siendo los grados de libertad  $K-2=3$  y  $n-k=10$ , de esta forma se obtuvo un valor de  $F_{tablas}=3.71$ ; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = 1.86 < 3.71$$

Por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.



Se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cuyo valor es de 0.9960, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software statgraphics centurión XVI, el cual se muestra en la tabla A.VII.

Tabla A.VII intervalo de confianza para la curva de calibración de ácido ferúlico

| Intervalo de confianza (IC) |          |
|-----------------------------|----------|
| Inferior                    | Superior |
| 0.2272                      | 0.3335   |

Como se puede observar en la tabla A.VII, el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que se puede decir que es un modelo válido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ), con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.V y A.VI se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

$$LOD = (([E. I.]) \left( \frac{3.3S_y}{b_1} \right) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.0594)}{1.3114} \right) = 3.1253 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima de detectable de ácido ferúlico es 3.1253 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de las tablas A.V y A.VI y se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E. I.]) \left( \frac{10S_y}{b_1} \right) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.0594)}{1.3114} \right) = 9.4706 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de ácido ferúlico es 9.4706 mg/L

### Arbutina

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos. En la tabla A.VIII se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

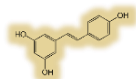


Tabla A.VIII Datos de la curva de calibración para estándar de arbutina

| n  | Soluci<br>ón | [Arbutina]<br>(mg/L) | [metilparabeno]<br>(mg/L) | A<br>Arbutina. | A<br>metilparabeno | $\frac{[Arbutina]}{[metilparabeno]}$<br>(mg/L) | $\frac{A_{(+)-Arbutina}}{A_{metilparabeno}}$ |
|----|--------------|----------------------|---------------------------|----------------|--------------------|--|--|
| 1  | 1            | 8.0281               | 20                        | 3171           | 13263              | 0.4014   | 0.2390                                       |
| 2  | 1            | 8.0281               | 20                        | 3389           | 14171              | 0.4014   | 0.239  |
| 3  | 1            | 8.0281               | 20                        | 3392           | 14715              | 0.4014   | 0.2305                                       |
| 4  | 2            | 16.0563              | 20                        | 6540           | 13312              | 0.8028   | 0.4912                                       |
| 5  | 2            | 16.0563              | 20                        | 6381           | 13390              | 0.8028   | 0.476  |
| 6  | 2            | 16.0563              | 20                        | 6610           | 13349              | 0.8028   | 0.4951                                       |
| 7  | 3            | 32.1126              | 20                        | 12832          | 14398              | 1.6056   | 0.8912                                       |
| 8  | 3            | 32.1126              | 20                        | 12698          | 13949              | 1.6056   | 0.9103                                       |
| 9  | 3            | 32.1126              | 20                        | 12818          | 14086              | 1.6056   | 0.9099                                       |
| 10 | 4            | 48.1689              | 20                        | 21177          | 15152              | 2.4084   | 1.3976                                       |
| 11 | 4            | 48.1689              | 20                        | 20277          | 14554              | 2.4084   | 1.3932                                       |
| 12 | 4            | 48.1689              | 20                        | 19245          | 14283              | 2.4084   | 1.3474                                       |
| 13 | 5            | 64.2252              | 20                        | 26143          | 13998              | 3.2112   | 1.8676                                       |
| 14 | 5            | 64.2252              | 20                        | 25938          | 14062              | 3.2112   | 1.8445                                       |
| 15 | 5            | 64.2252              | 20                        | 24992          | 13714              | 3.2112   | 1.8223                                       |
| 16 | 6            | 80.2816              | 20                        | 30511          | 12694              | 4.0140   | 2.4035                                       |
| 17 | 6            | 80.2816              | 20                        | 32251          | 13662              | 4.0140   | 2.3606                                       |
| 18 | 6            | 80.2816              | 20                        | 32461          | 13429              | 4.0140   | 2.4172                                       |



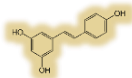


Tabla A.IX Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de arbutina

| Parámetro            | Valor estimado | Error  | Coficiente              | valor  |
|----------------------|----------------|--------|-------------------------|--------|
| Intercepto ( $b_0$ ) | 0.0121         | 0.0103 | Correlación ( $r$ )     | 0.9994 |
| Pendiente ( $b_1$ )  | 0.5684         | 0.0052 | Determinación ( $r^2$ ) | 0.9988 |

En la figura A.XXIX se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para arbutina, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

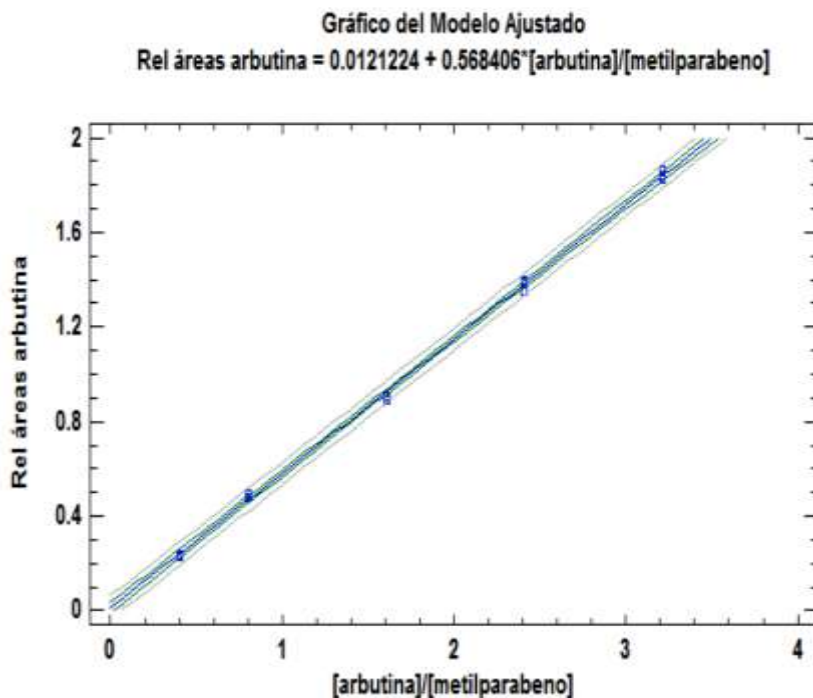


Figura A.XXIX

Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de arbutina

En la figura A.XXX se presenta el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

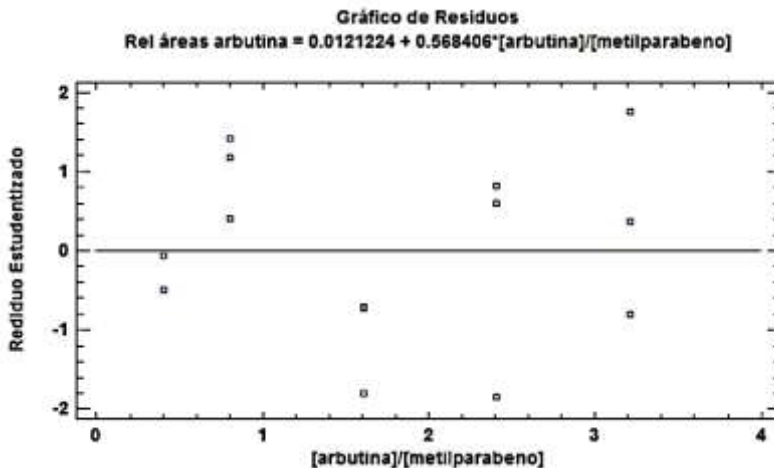
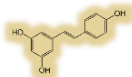


Figura A.XXX Gráfico de residuales para la curva de calibración de arbutina

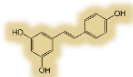
En la tabla A.X se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores  $MS_{FDA}$ ,  $MS_{EP}$  y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.X Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

| Fuente              | Suma de cuadrados (SS) | gl | Cuadrado medio (MS) |
|---------------------|------------------------|----|---------------------|
| Modelo              | 5.1225                 | 1  | 5.1225              |
| Residuo             | 0.0056                 | 13 | 0.0003              |
| -Carencia de ajuste | 0.0026                 | 3  | 0.0008              |
| -Error puro         | 0.0030                 | 10 | 0.0003              |
| Total (corr)        | 5.1282                 | 14 | -                   |

A partir de los datos de la tabla A.X se calculó  $F_{exp}$ , como se muestra a continuación.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{0.0008}{0.0003} = 2.6666$$



Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas ( $F_{tablas}$ ), siendo los grados de libertad  $K-2=4$  y  $n-k=12$ , de esta forma se obtuvo un valor de  $F_{tablas}=3.71$ ; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = 2.66 < 3.26$$

Por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cuyo valor es de 0.9988, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo, se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software statgraphics centurión XVI, el cual se muestra en la tabla A.XI.

Tabla A.XI intervalo de confianza para la curva de calibración de arbutina

| Intervalo de confianza (IC) |          |
|-----------------------------|----------|
| Inferior                    | Superior |
| 0.2215                      | 0.2289   |

Como podemos observar en la tabla A.11, el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que podemos decir que es un modelo válido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.IX y A.X se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

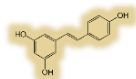
$$LOD = (([E. I.]) \left( \frac{3.3S_y}{b_1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.0209)}{0.5684} \right) = 2.4268 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima detectable de ácido ferúlico es 2.4268 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de las tablas A.IX y A.X, se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E. I.]) \left( \frac{10S_y}{b_1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.0209)}{0.5684} \right) = 7.3539 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de arbutina es 7.3539 mg/L.



(+)-Catequina

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos, en la tabla A.XII se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

Tabla A.XII Datos de la curva de calibración para estándar de (+)-catequina

| n  | Solución | [(+)-catequina] (mg/L) | [metilparabeno] (mg/L) | A <sub>(+)-catequina</sub> | A <sub>metilparabeno</sub> | $\frac{[(+) - catequina]}{[metilparabeno]}$ (mg/L) | $\frac{A_{(+)-catequina}}{A_{metilparabeno}}$ |
|----|----------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|--|---|
| 1  | 1        | 21.8265                | 20                     | 2820                       | 13263                      | 0.2728   | 0.2126  |
| 2  | 1        | 21.8265                | 20                     | 1653                       | 14171                      | 0.2728   | 0.1166  |
| 3  | 1        | 21.8265                | 20                     | 2815                       | 14715                      | 0.2728   | 0.1913  |
| 4  | 2        | 32.7398                | 20                     | 4798                       | 13312                      | 0.5456   | 0.3604  |
| 5  | 2        | 32.7398                | 20                     | 6101                       | 13390                      | 0.5456   | 0.4556  |
| 6  | 2        | 32.7398                | 20                     | 4350                       | 13349                      | 0.5456   | 0.3258  |
| 7  | 3        | 43.6531                | 20                     | 12520                      | 14398                      | 1.0913   | 0.8695  |
| 8  | 3        | 43.6531                | 20                     | 12202                      | 13949                      | 1.0913   | 0.8747  |
| 9  | 3        | 43.6531                | 20                     | 11944                      | 14086                      | 1.0913   | 0.8479  |
| 10 | 4        | 54.5664                | 20                     | 19929                      | 15152                      | 1.6369   | 1.3152  |
| 11 | 4        | 54.5664                | 20                     | 21255                      | 14554                      | 1.6369   | 1.4604  |
| 12 | 4        | 54.5664                | 20                     | 19543                      | 14283                      | 1.6369   | 1.368   |
| 13 | 5        | 21.8265                | 20                     | 27588                      | 13998                      | 2.1826   | 1.9708  |
| 14 | 5        | 21.8265                | 20                     | 27496                      | 14062                      | 2.1826   | 1.9553  |
| 15 | 5        | 21.8265                | 20                     | 26603                      | 13714                      | 2.1826   | 1.9398  |
| 16 | 6        | 32.7398                | 20                     | 30870                      | 12694                      | 2.7283   | 2.4318  |
| 17 | 6        | 32.7398                | 20                     | 31414                      | 13662                      | 2.7283   | 2.2993  |
| 18 | 6        | 32.7398                | 20                     | 32899                      | 13429                      | 2.7283   | 2.4498  |

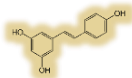


Tabla A.XIII Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de catequina

| Parámetro            | Valor estimado | Error  | Coficiente              | valor  |
|----------------------|----------------|--------|-------------------------|--------|
| Intercepto ( $b_0$ ) | -0.1100        | 0.0264 | Correlación (r)         | 0.9976 |
| Pendiente ( $b_1$ )  | 0.9233         | 0.0159 | Determinación ( $r^2$ ) | 0.9952 |

En la figura A.XXXI se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para arbutina, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

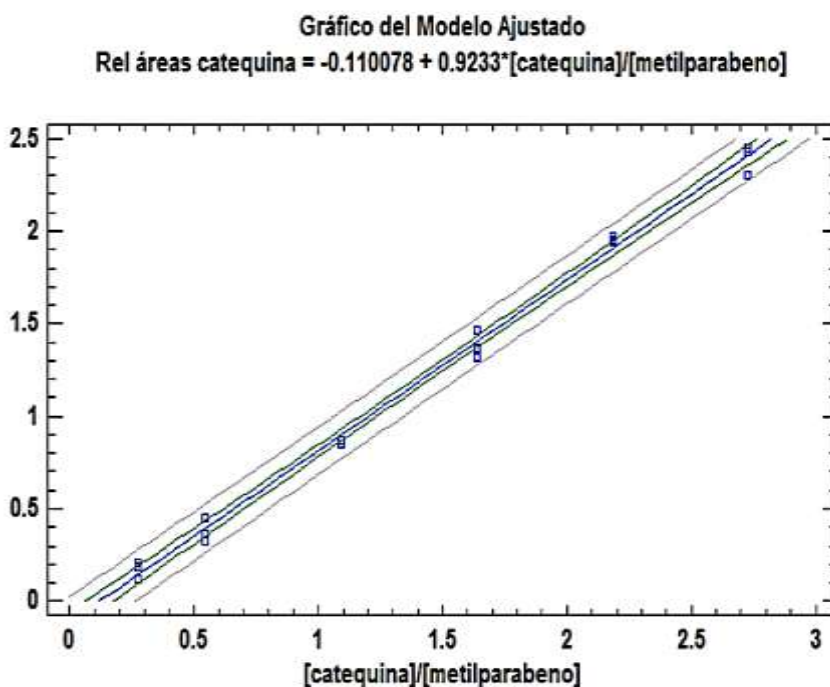


Figura A.XXXI Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de catequina

En la figura A.XXXII se presenta el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

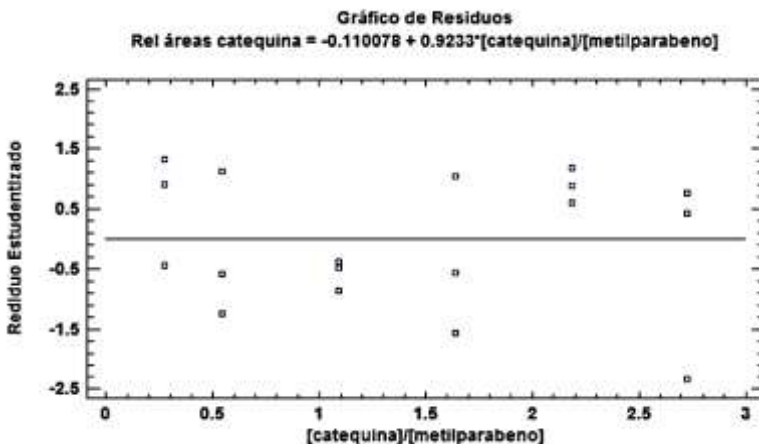
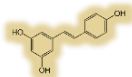


Figura A.XXXII Gráfico de residuales para la curva de calibración de ácido ferúlico

En la tabla A.XIV se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores  $MS_{FDA}$ ,  $MS_{EP}$  y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.XIV Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

| Fuente                     | Suma de cuadrados (SS) | gl        | Cuadrado medio (MS) |
|----------------------------|------------------------|-----------|---------------------|
| <b>Modelo</b>              | <b>5.1225</b>          | <b>1</b>  | <b>5.1225</b>       |
| <b>Residuo</b>             | <b>0.0056</b>          | <b>13</b> | <b>0.0004</b>       |
| <b>-Carencia de ajuste</b> | <b>0.0026</b>          | <b>3</b>  | <b>0.0008</b>       |
| <b>-Error puro</b>         | <b>0.0030</b>          | <b>10</b> | <b>0.0005</b>       |
| <b>Total (corr)</b>        | <b>5.1282</b>          | <b>14</b> | <b>-</b>            |

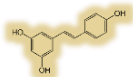
A partir de los datos de la tabla A.XIV se calculó  $F_{exp}$ , como se muestra a continuación.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{0.0008}{0.0005} = 1.60$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas ( $F_{tablas}$ ), siendo los grados de libertad  $K-2=4$  y  $n-k=12$ , de esta forma se obtuvo un valor de  $F_{tablas}=3.71$ ; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = 1.6 < 3.26$$

Por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.



Se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cuyo valor es de 0.9988, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software statgraphics centurión XIII, el cual se muestra en la tabla A.XIV.

Tabla A.XV Intervalo de confianza para la curva de calibración de (+)-catequina

| Intervalo de confianza (IC) |          |
|-----------------------------|----------|
| Inferior                    | Superior |
| 0.2215                      | 0.2589   |

Como podemos observar en la tabla A.XV el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que podemos decir que es un modelo válido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.XIII, se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

$$LOD = (([E.I.]) \left( \frac{3.3S_y}{b1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.0589)}{0.9233} \right) = 4.2103 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima de detectable de (+)-catequina es 4.2103 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de las tablas A.XIII y A.XIV, se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E.I.]) \left( \frac{10S_y}{b1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.0589)}{0.9233} \right) = 6.3792 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de (+)-catequina es 6.3792 mg/L.

### Resorcinol

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos, en la tabla A.XVI se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

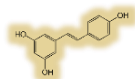
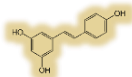


Tabla A.XVI Datos de la curva de calibración para estándar de resorcinol

| n  | Solución | [resorcinol]<br>(mg/L) | [ác cafeico]<br>(mg/L) | A <sub>resorcinol</sub> | A <sub>ác cafeico</sub> | $\frac{[\text{resorcinol}]}{[\text{ác cafeico}]}$<br>(mg/L) | $\frac{A_{\text{resorcinol}}}{A_{\text{ác cafeico}}}$ |
|----|----------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---|---|
| 1  | 1        | 5.1955                 | 20.9088                | 59970                   | 59970                   | 0.2484  | 0.1900  |
| 2  | 1        | 5.1955                 | 20.9088                | 52134                   | 52134                   | 0.2484  | 0.2114  |
| 3  | 1        | 5.1955                 | 20.9088                | 56249                   | 56249                   | 0.2484  | 0.1815  |
| 4  | 2        | 10.3910                | 20.9088                | 59466                   | 59466                   | 0.4969  | 0.3876  |
| 5  | 2        | 10.3910                | 20.9088                | 63325                   | 63325                   | 0.4969  | 0.3410  |
| 6  | 2        | 10.3910                | 20.9088                | 60406                   | 60406                   | 0.4969  | 0.3878  |
| 7  | 3        | 20.7820                | 20.9088                | 54766                   | 54766                   | 0.9939  | 0.7075  |
| 8  | 3        | 20.7820                | 20.9088                | 50229                   | 50229                   | 0.9939  | 0.7995  |
| 9  | 3        | 20.7820                | 20.9088                | 45605                   | 45605                   | 0.9939  | 0.9006  |
| 10 | 4        | 31.1731                | 20.9088                | 46978                   | 46978                   | 1.4909  | 1.3732  |
| 11 | 4        | 31.1731                | 20.9088                | 56732                   | 56732                   | 1.4909  | 1.1562  |
| 12 | 4        | 31.1731                | 20.9088                | 54238                   | 54238                   | 1.4909  | 1.252   |
| 13 | 5        | 41.5641                | 20.9088                | 62921                   | 62921                   | 1.9878  | 1.4494  |
| 14 | 5        | 41.5641                | 20.9088                | 67471                   | 67471                   | 1.9878  | 1.4604  |
| 15 | 5        | 41.5641                | 20.9088                | 64589                   | 4048                    | 1.9878  | 1.5198  |

Tabla A.XVII Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de resorcinol





| Parámetro                    | Valor estimado | Error  | Coficiente                      | valor  |
|------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|--------|
| Intercepto (b <sub>0</sub> ) | 0.017284       | 0.0421 | Correlación (r)                 | 0.9872 |
| Pendiente (b <sub>1</sub> )  | 0.770388       | 0.0344 | Determinación (r <sup>2</sup> ) | 0.9746 |

En la figura A.XXXIII se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para resorcinol, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

**Gráfico del Modelo Ajustado**  
**Rel alturas resorcinol = 0.0172848 + 0.770388\*[resorcinol]/[ac cafeico]**

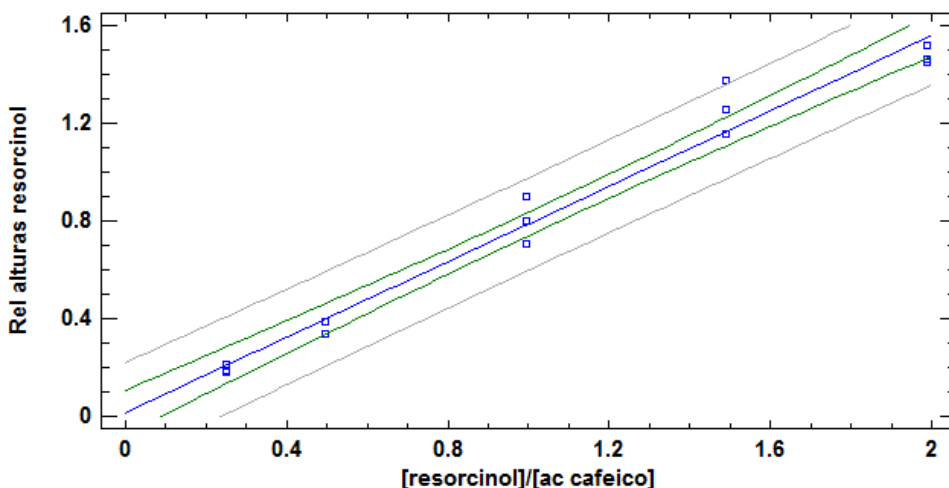


Figura A.XXXIII Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de resorcinol

En la figura A.XXXIV se observa el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

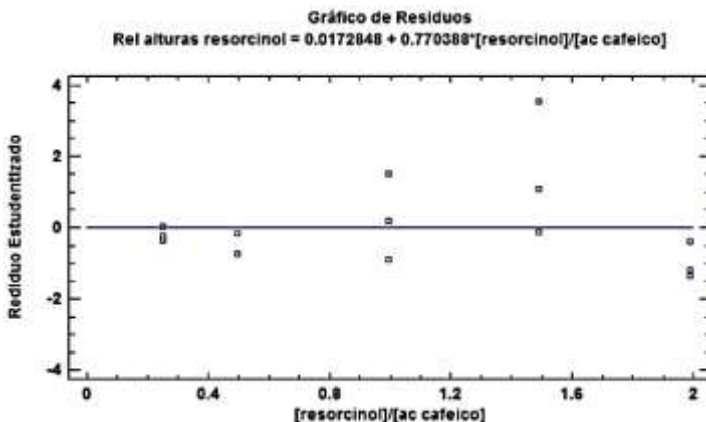
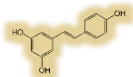


Figura A.XXXIV Gráfico de residuales para la curva de calibración de resorcinol

En la tabla A.XVIII se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores  $MS_{FDA}$ ,  $MS_{EP}$  y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.XVIII Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

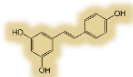
| Fuente              | Suma de cuadrados (SS) | gl | Cuadrado medio (MS) |
|---------------------|------------------------|----|---------------------|
| Modelo              | 3.6059                 | 1  | 3.6059              |
| Residuo             | 0.0938                 | 13 | 0.0072              |
| -Carencia de ajuste | 0.0467                 | 3  | 0.0155              |
| -Error puro         | 0.0470                 | 10 | 0.0047              |
| Total (corr)        | 3.6997                 | 14 | -                   |

A partir de los datos de la tabla A.XVIII se calculó  $F_{exp}$ , como se muestra a continuación.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{0.0155}{0.0047} = 3.2978$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas ( $F_{tablas}$ ), siendo los grados de libertad  $K-2=3$  y  $n-k=10$ , de esta forma se obtuvo un valor de  $F_{tablas}=3.71$ ; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = 3.2978 < 3.71$$



Por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cuyo valor es de 0.9872, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software statgraphics centurión XVI, el cual se muestra en la tabla A.XIX.

Tabla A.XIX Intervalo de confianza para la curva de calibración de resorcinol

| Intervalo de confianza (IC) |          |
|-----------------------------|----------|
| Inferior                    | Superior |
| 0.1328                      | 0.2845   |

Como se observar en la tabla A.XIX el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que se puede decir que es un modelo válido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.XVII y A.XVIII se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

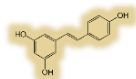
$$LOD = (([E. I.]) \left( \frac{3.3S_y}{b_1} \right)) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.0849)}{0.7703} \right) = 7.6048 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima de detectable de ácido ferúlico es 7.6048 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de las tablas A.4 y A.5 y se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E. I.]) \left( \frac{10S_y}{b_1} \right)) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.0849)}{0.7703} \right) = 23.0450 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de resorcinol es 23.0450 mg/L.



### Resveratrol

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos, en la tabla A.XX se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

Tabla A.XX Datos de la curva de calibración para estándar de resveratrol

| n  | Solución | [resveratrol]<br>(mg/L) | [metilparabeno]<br>(mg/L) | A <sub>resveratrol</sub> | A <sub>metilparabeno</sub> | $\frac{[\text{resveratrol}]}{[\text{metilparabeno}]}$<br>(mg/L) | $\frac{A_{\text{resveratrol}}}{A_{\text{metilparabeno}}}$ |
|----|----------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---|---|
| 1  | 1        | 6.6528                  | 20                        | 3300                     | 13263                      | 0.33264   | 0.248812  |
| 2  | 1        | 6.6528                  | 20                        | 3818                     | 14171                      | 0.33264   | 0.269423  |
| 3  | 1        | 6.6528                  | 20                        | 3876                     | 14715                      | 0.33264   | 0.263404  |
| 4  | 2        | 13.3056                 | 20                        | 8007                     | 13312                      | 0.66528   | 0.601487  |
| 5  | 2        | 13.3056                 | 20                        | 7799                     | 13390                      | 0.66528   | 0.582449  |
| 6  | 2        | 13.3056                 | 20                        | 8265                     | 13349                      | 1.33056   | 0.619147  |
| 7  | 3        | 26.6112                 | 20                        | 18056                    | 14398                      | 1.33056   | 1.254063  |
| 8  | 3        | 26.6112                 | 20                        | 16885                    | 13949                      | 1.33056   | 1.210481  |
| 9  | 3        | 26.6112                 | 20                        | 17069                    | 14086                      | 1.33056   | 1.211770  |
| 10 | 4        | 39.9168                 | 20                        | -                        | -                          | 1.99584   | 2.020327  |
| 11 | 4        | 39.9168                 | 20                        | 25310                    | 14554                      | 1.99584   | 1.739040  |
| 12 | 4        | 39.9168                 | 20                        | 27524                    | 14283                      | 1.99584   | 1.927046  |
| 13 | 5        | 53.2224                 | 20                        | 27588                    | 13998                      | 2.66112   | 2.696956  |
| 14 | 5        | 53.2224                 | 20                        | 27496                    | 14062                      | 2.66112   | 2.569122  |
| 15 | 5        | 53.2224                 | 20                        | 26603                    | 13714                      | 2.66112   | 2.532229  |
| 16 | 6        | 66.528                  | 20                        | 30870                    | 12694                      | 3.3264  | 3.255790  |
| 17 | 6        | 66.528                  | 20                        | 31414                    | 13662                      | 3.3264  | 3.201215  |
| 18 | 6        | 66.528                  | 20                        | 32899                    | 13429                      | 3.3264  | 3.131283  |

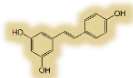


Tabla A.XXI Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de resveratrol

| Parámetro            | Valor estimado | Error    | Coefficiente            | valor  |
|----------------------|----------------|----------|-------------------------|--------|
| Intercepto ( $b_0$ ) | -0.066742      | 0.030503 | Correlación (r)         | 0.9981 |
| Pendiente ( $b_1$ )  | 0.9870         | 0.015109 | Determinación ( $r^2$ ) | 0.9962 |

En la figura A.XXXV se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para resveratrol, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

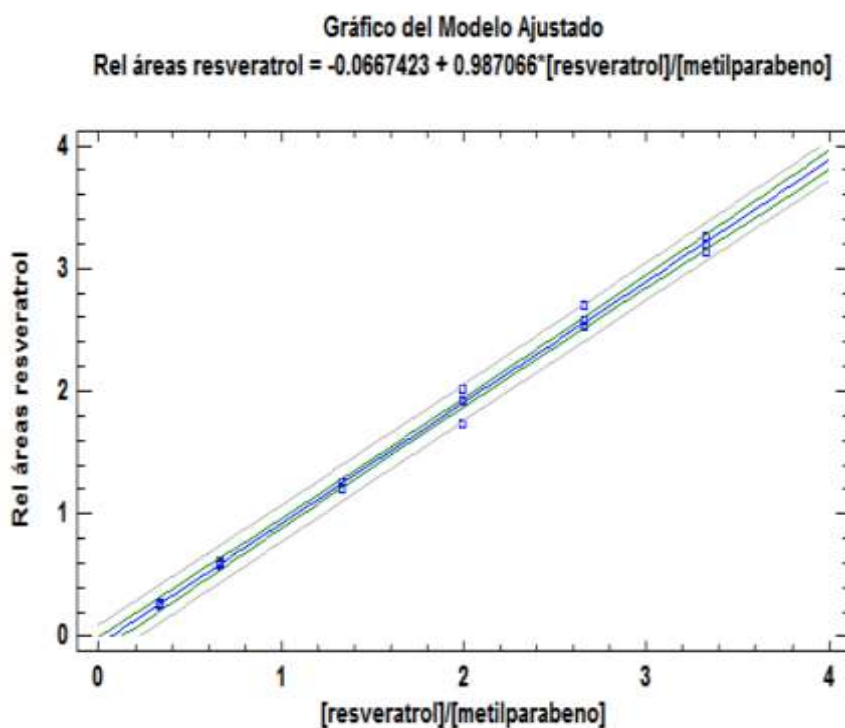


Figura A.XXXV Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de resveratrol

En la figura A.XXXVI se presenta el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que estos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

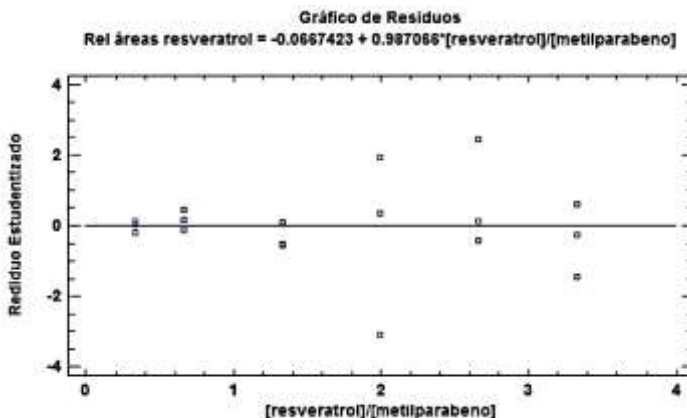
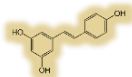


Figura A.XXXVI Gráfico de residuales para la curva de calibración de resveratrol

En la tabla A.XXII se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores  $MS_{FDA}$ ,  $MS_{EP}$  y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.XXII Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

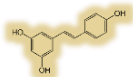
| Fuente              | Suma de cuadrados (SS) | gl | Cuadrado medio (MS) |
|---------------------|------------------------|----|---------------------|
| Modelo              | 19.6745                | 1  | 19.6745             |
| Residuo             | 0.073762               | 16 | 0.004610            |
| -Carencia de ajuste | 0.007841               | 4  | 0.001960            |
| -Error puro         | 0.065920               | 12 | 0.005493            |
| Total (corr)        | 19.7483                | 17 | -                   |

A partir de los datos de la tabla A.XXII se calculó  $F_{exp}$ , como se muestra a continuación.

$$F_{exp} = \frac{MS_{FDA}}{MS_{EP}} = \frac{0.0019}{0.0054} = 0.3518$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas ( $F_{tablas}$ ), siendo los grados de libertad  $K-2=4$  y  $n-k=12$ , de esta forma se obtuvo un valor de  $F_{tablas}=3.26$ ; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{exp} < F_{tablas} = 0.35 < 3.26 \text{ por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.}$$



Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) cuyo valor es de 0.9962, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software statgraphics centurión XVI, el cual se muestra en la tabla A.XXIII.

Tabla A.XXIII intervalo de confianza para la curva de calibración de resveratrol

| Intervalo de confianza (IC) |               |
|-----------------------------|---------------|
| Inferior                    | Superior      |
| <b>0.2057</b>               | <b>0.3174</b> |

Como podemos observar en la tabla A.XXIII el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que podemos decir que es un modelo valido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.XXI y AXXII se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

$$LOD = (([E. I. ]) \left( \frac{3.3S_y}{b_1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.0019)}{0.9870} \right) = 0.1270 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima de detectable de resveratrol es 0.1270 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de las tablas A.XXI y A.XXII y se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E. I. ]) \left( \frac{10S_y}{b_1} \right) = (20 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.0019)}{0.9870} \right) = 0.3850 \text{ mg/L}$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de resveratrol es 0.3850 mg/L.

### Tirosol

Se obtuvo la regresión lineal para las tres repeticiones de la curva de calibración y se utilizó como respuesta el área de los picos, en la tabla A.XXIV se muestran los valores obtenidos de las curvas de calibración, así como la concentración.

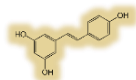
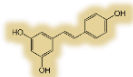


Tabla A.XXIV Datos de la curva de calibración para estándar de tirosol

| n  | Solución | [tirosol]<br>(mg/L) | [ácido<br>cafeico]<br>(mg/L) | A <sub>tirosol</sub> | A <sub>ác cafeico</sub> | $\frac{[\text{tirosol}]}{[\text{ác cafeico}]}$<br>(mg/L) | $\frac{A_{\text{tirosol}}}{A_{\text{ác cafeico}}}$ |
|----|----------|---------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|--|--|
| 1  | 1        | 6085                | 20.90                        | 0.3422               | 4979                    | 0.2436   | 0.3422   |
| 2  | 1        | 4701                | 20.90                        | 0.3469               | 4571                    | 0.2436   | 0.3469   |
| 3  | 1        | 3891                | 20.90                        | 0.3654               | 4687                    | 0.2436   | 0.3654   |
| 4  | 2        | 8053                | 20.90                        | 0.9138               | 4481                    | 0.4872   | 0.9138   |
| 5  | 2        | 7954                | 20.90                        | 0.8567               | 4844                    | 0.4872   | 0.8567   |
| 6  | 2        | 8212                | 20.90                        | 0.9541               | 4410                    | 0.4872   | 0.9541   |
| 7  | 3        | 14864               | 20.90                        | 2.0041               | 3889                    | 0.9745   | 2.0041   |
| 8  | 3        | 15243               | 20.90                        | 2.1644               | 3710                    | 0.9745   | 2.1644   |
| 9  | 3        | 15971               | 20.90                        | 2.1462               | 3844                    | 0.9745   | 2.1462   |
| 10 | 4        | 22168               | 20.90                        | 3.2240               | 3535                    | 1.4618   | 3.2240   |
| 11 | 4        | 22683               | 20.90                        | 2.9385               | 3968                    | 1.4618   | 2.9385   |
| 12 | 4        | 20629               | 20.90                        | 2.8528               | 3921                    | 1.4618   | 2.8528   |
| 13 | 5        | 46018               | 20.99                        | 3.8133               | 4196                    | 1.9491   | 3.8133   |
| 14 | 5        | 47692               | 20.90                        | 3.7267               | 4384                    | 1.9491   | 3.7267   |
| 15 | 5        | 51905               | 20.90                        | 4.2601               | 4048                    | 1.9491   | 4.2601   |





En la figura A.XXXVII se observa el gráfico de regresión lineal de la curva de calibración para tirosol, es evidente que los datos presentan una tendencia lineal.

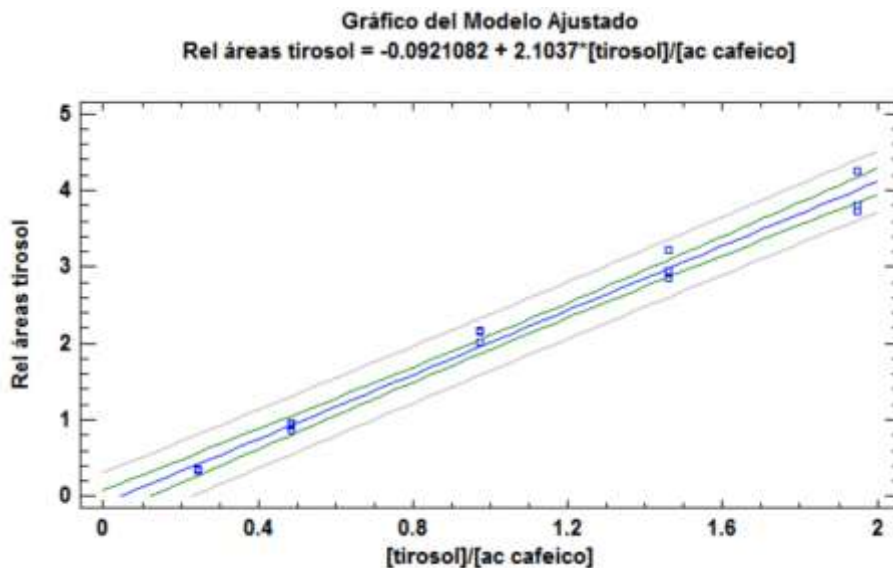


Figura A.XXXVII Regresión lineal con tres réplicas de la curva de calibración de tirosol

En la figura A.XXXVIII se observa el gráfico de residuales en donde se observa que no existen residuos atípicos, además se aprecia que éstos son homocedásticos, lo que indica que sus varianzas son homogéneas y por lo tanto se ajustan al modelo lineal.

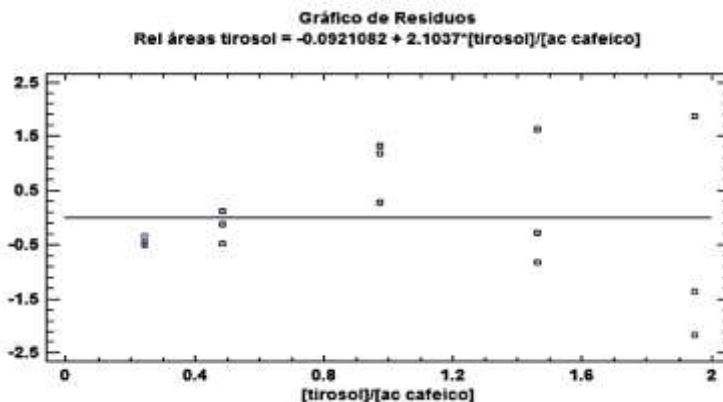


Figura A.XXXVIII Gráfico de residuales para la curva de calibración de tirosol

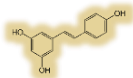


Tabla A.XXV Parámetros y coeficientes de la regresión lineal de la curva de calibración de tirosol

| Parámetro                    | Valor estimado | Error  | Coefficiente                    | valor  |
|------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|--------|
| Intercepto (b <sub>0</sub> ) | -0.0921        | 0.0824 | Correlación (r)                 | 0.9931 |
| Pendiente (b <sub>1</sub> )  | 2.1037         | 0.0687 | Determinación (r <sup>2</sup> ) | 0.9863 |

En la tabla A.XXVI se muestran los resultados del análisis de ANOVA, donde se obtienen los valores MS<sub>FDA</sub>, MS<sub>EP</sub> y los respectivos grados de libertad (gl).

Tabla A.XXVI Resultado del análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA)

| Fuente              | Suma de cuadrados (SS) | gl | Cuadrado medio (MS) |
|---------------------|------------------------|----|---------------------|
| Modelo              | 25.8517                | 1  | 25.8517             |
| Residuo             | 0.358921               | 13 | 0.032999            |
| -Carencia de ajuste | 0.98998                | 3  | 0.025992            |
| -Error puro         | 0.259922               | 10 | 0.027609            |
| Total (corr)        | 26.2107                | 14 | -                   |

A partir de los datos de la tabla A.XXVI se calculó F<sub>exp</sub>, como se muestra a continuación.

$$F_{\text{exp}} = \frac{MS_{\text{FDA}}}{MS_{\text{EP}}} = \frac{0.0259}{0.0276} = 0.9384$$

Posteriormente se comparó este valor con el reportado en tablas (F<sub>tablas</sub>), siendo los grados de libertad K-2=3 y n-k=10, de esta forma se obtuvo un valor de F<sub>tablas</sub>=3.71; por lo que se cumple:

$$H_0 = F_{\text{exp}} < F_{\text{tablas}} = 0.9384 < 3.71$$

Por lo tanto hay ajuste de los datos al modelo lineal.

Finalmente se evaluó el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) cuyo valor es de 0.9863, el cual es mayor a 0.98, por lo que se determinó que los datos se ajustan al modelo lineal.

Una vez que se validó el modelo se determinó el intervalo de confianza obtenido con ayuda de software Statgraphics centurión XVI, el cual se muestra en la tabla A.XXVII.

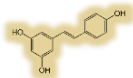


Tabla A.XXVII Intervalo de confianza para la curva de calibración de tirosol

| Intervalo de confianza (IC) |               |
|-----------------------------|---------------|
| Inferior                    | Superior      |
| <b>0.2721</b>               | <b>0.5687</b> |

Como podemos observar en la tabla A.XXVII el intervalo de confianza no pasa por el cero por lo que podemos decir que es un modelo válido, además de que se observa nuevamente un ajuste de los datos al modelo lineal.

Posteriormente se calculó el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión, de acuerdo a los datos de la tabla A.XXV y A.XXVI se obtuvo el LOD como se muestra a continuación:

$$LOD = (([E. I.]) \left( \frac{3.3S_y}{b_1} \right)) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{3.3(0.1661)}{2.1037} \right) = 5.4478 mg/L$$

Este valor nos dice que la concentración mínima de detectable de tirosol es 5.44 mg/L.

Finalmente calculamos el límite de cuantificación (LOQ) con base en la curva de calibración y la desviación estándar de regresión de acuerdo a los datos de la tabla A.XXV y se obtuvo el LOQ como se muestra a continuación:

$$LOQ = (([E. I.]) \left( \frac{10S_y}{b_1} \right)) = (20.9088 \frac{mg}{L}) \left( \frac{10(0.1661)}{2.1037} \right) = 16.5087 mg/L$$

Este valor nos dice que la concentración mínima cuantificable de tirosol es 16.50 mg/L.

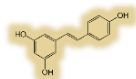
## Anexo VIII.- Materiales, reactivos y equipos

### Materia vegetal

El material vegetal utilizado se recolectó en el poblado de San Sebastián en el municipio de Zumpango, Estado de México. Se seleccionaron dos ejemplares para su herborización e identificación la cual fue realizada por la experta de la UNAM, la M. en C. Ma. Edith López Villafranco del herbario de IZTA, de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM. Tlalnepantla, Estado de México.

El órgano de la planta utilizado en este trabajo fueron las hojas.

El documento oficial se puede ver en el anexo I.



## Reactivos para el tamiz fitoquímico

Ácido pícrico, ácido clorhídrico, alcohol amílico, cloroformo, magnesio metálico, sulfato cúprico, tartrato de sodio y potasio, solución de cloruro férrico al 5%, solución de hidróxido de sodio al 10%, solución de carbonato de sodio al 7.5%.

## Fenoles de referencia

Reactivos marca Sigma-Aldrich: Reactivo de Folin-Denis, Acetina, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido elágico, ácido nordihidroguayarático, ácido p-cumárico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido siríngico, apigenina, arbutina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, galagina, kaempferol, luteolina, naringenina, quercetina, resorcinol, resveratrol, rutina y vainillina.

Reactivos marca Fluka: 2-(4-hidroxifenil)etanol 100%, 3-aminofenol.

## Reactivos para la separación por electroforesis capilar (CE)

Reactivos: etanol y metanol grado HPLC marca Fermont, hidróxido de sodio (NaOH), tetraborato de sodio decahidratado ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) y etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA) marca J.T. Baker.

Soluciones para la separación por CE: mezclas de extracción (etanol-agua (70:30), metanol-agua (70:30), solución hidrolizante (EDTA 20 mM, NaOH 3.6 N y HAsc al 2%).

## Equipos

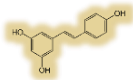
- Electroforesis capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter)
- Balanza analítica (BOECO), baño de ultrasonido (Transsonic T570 Elma®)
- Potenciómetro (Hanna instruments), desionizador (MilliQ)
- Bomba de vacío (PALL), equipo de liofilizado (Labconco)
- Evaporador térmico de flujo de nitrógeno (Vertex Dry)
- Espectrofotómetro UV-Vis de haz simple, marca DYNAMICA modelo HALO-XB
- Centrífuga Allegra 21 (Beckman Coulter)

# Bibliografía



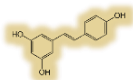
*Figura X: Fotografía del mural de la Biblioteca de FES Cuautitlán, Campo 1*



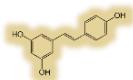


## 8 Referencias

- Abdennacer, B., Adnen, S., Isaam, B. S., Nesrine, R., Yassine, M., Karim, H., & Fernandez, X. (2015). Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Industrial crops and products*, 616.
- acofarma. (23 de 07 de 2018). Fichas de información técnica. Obtenido de <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/6731-b9f826b27e3551686f38a6f6595cdf19275b52a9/main/files/Arbutina.pdf>
- Ahmed, J., Ramaswamy, H., Kasapis, S., & Boye, J. (2010). Effect of Ultrasound on Food Processing. En "Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties". New York: CRC.
- Akther, N., Sultana, S., & Akther, M. (2013). Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity. *Investigación farmacéutica*, 565.
- Amaguaña Rojas, F. J., & Churuchumbi Rojas, E. F. (2018). Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*). Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Anguiano, E. Á. (1994). Tamizaje fitoquímico de plantas medicinales. La Habana, Cuba.: CYTED.
- Aouati, A., & Berchii, S. (2015). Larvicidal effect of *Marrubium vulgare* on *Culex pipiens* in eastern Algeria. *Energy procedia*, 74.
- Boutefas, K., Mehdadi, Z., Aouad, L., Elaoufi, M. M., Khaled, M. B., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016). La localité d'échantillonnage influence-t-elle. *Journal Mycologie Médicale*, 201.
- Boutefas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variation of leaves extracts of whit horehound (*marrubium vulgare*) from three geographical origins. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 10.

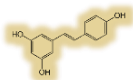


- Carreto, M., & Ortega, T. (31 de 08 de 2018). Otras plantas medicinales para afecciones respiratorias (I). *Panorama actual*, 411. Obtenido de Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Marrubium%20vulgare&id=7620>
- Castagnino, J. M. (1999). Electroforesis capilar. *Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 25, 297.
- Chopin Doroteo, M. (2012). Principios básicos de electroforesis. *Investigación en Discapacidad*, 86.
- Constanza Corrales, L., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10, 135.
- Coronado, M., Vega, S., Rey Gutierrez, L., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual. *Universidad Autónoma Metropolitana*, 206.
- Cortez Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., & Hernández Arrollo, M. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Historia de la medicina*, 123.
- DaSilva, L., Couto, A., & Bresolin, T. (2012). Medicinal Plants and Pharmaceutical Technology. En V. Cechinel-Filho, *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives* (4th ed., págs. 359-393). New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Delgado, J. (2011). Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. *Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 142.
- Diaz Hung, M., & González Fragela, M. (2014). Oxidative stress in neurological diseases: Cause or effect? *Neurología*, 451.
- Dorado Martínez, C., Rugerio Vargas, C., & Rivas Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Mexico: Departamento de fisiología, UNAM.

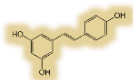


- Elmhawi, M. F., Muktar, M., & Atitalla, I. H. (2015). Hypoglycemic effects of *Marrubium vulgare* (Rubia) in experimentally induced autoimmune Diabetes Mellitus. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences.*, 4374.ETAT PUR. (19 de 07 de 2020). ETAT PUR. Obtenido de Etat PUR: <http://www.etatpur.es/index.php/rutina-ficha-produce>
- Freixa, B. (2002). Marrubio. *Plantas Medicinales y Drogas Vegetales*.
- Gonzalez Figueroa, M. E., & Diaz Hung, M. (2013). El estrés oxidativo en las enfermedades neurológicas. *Sociedad Española de Neurología*, 451.
- González Villa, A. A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. *Universidad Nacional de Colombia*, 5.
- Guntero, V., Longo, M., Ciparicci, S., & Martini, R. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de los residuos de la industria vinícola. VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química (pág. 1). San Francisco: Asociación argentina de ingenieros químicos.
- Gutiérrez Carreto, L., & Frade García, M. (2016). *Guía interpretativa del jardín botánico humbría de la virgen*. Andalucía: Junta de Andalucía.
- Gutierrez, J. V. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina militar*, 126.
- Isaza Martínez, J. H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*, 13.
- Lapizco Encinas, B. (2015). Aplicaciones de microfluídica en bioseparaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7, 205.
- Lozano Casanova, J. (1999). Estrés oxidativa, difusión endotelial y aterosclerosis. *Facultad de Medicina ISCMCamagüey*, 50.
- Masís Broge, A., Vega Solano, M., & Sánchez Valverde, J. P. (2013). El resveratrol y sus nuevos usos como terapia farmacológica. *Revista Médica de Costa Rica y centro América*, 70, 608.

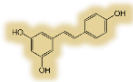




- Mejia, X. (14 de 11 de 2017). Excelsior. Obtenido de Excelsior:  
<https://www.excelsior.com.mx/nacional/2017/11/14/1201045>
- Mijangos Ricardez, O. F. (2010). Optimización de métodos de extracción acelerados mediante energías auxiliares y caracterización de la fracción fenólica de *Prosthechea* y *Prosthechea varicosa*. Oaxaca, México.: Instituto Politécnico Nacional.
- Ministerio de salud. (2009). Toronjil cuyano/Marrubio. Santiago de Chile: Ministerio de salud.
- Ministerio de salud. (2010). Medicamentos Herbarios tradicionales "103 especies. Santiago de Chile: Ministerio de salud.
- Mondragon Pichardo, J., & Tenorio Lezama, P. (27 de 02 de 2018). *Marrubium vulgare*. Obtenido de *Marrubium vulgare*:  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/marrubium-vulgare/fichas/ficha.htm>
- Morales, R. (18 de 02 de 2018). Flor Ibérica. Obtenido de Flor Ibérica:  
[http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/12\\_140\\_12\\_Marrubium.pdf](http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/12_140_12_Marrubium.pdf)
- Morales Mejía, J. C., & Almanza Salgado, R. (2015). Fotocatalisis heterogénea solar: aplicación de películas gruesas. *Technical Committee*, 145.
- Muñoz Velázquez, E. E. (2012). Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of commercial herbal infusions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 485.
- N H, M. (2010). Anticancer activity of *Marrubium alysson* L. and its phenolic constituents. *Drug Plants*, 185.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Scaccini, C. (2002). Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50.



- Nurko, J., Ming Lu, J., Weakley, S., & Jiamg, J. (2010). Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: An update. *Med Sci Monit*, 16.
- Ortiz Palacios, L., Cervantez Gutierrez, V., & Chimal Hernández, A. (2017). *Plantas Medicinales de San Francisco Tlaltenco*. Tláhuac Ciudad de México: UAM.
- Quiñones, M., & Aleixander, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 76.
- Revilla Vázquez, A. L. (2005). *Fundamentos de Electroforesis capilar*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roche, L. D. (2008). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Centro de Estudio para la Investigación y Evaluaciones Biológicas*, 9.
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Leonardo, V. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica*, 410.
- Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2018). Potential of Novel Technologies for Aqueous Extraction of Plant Bioactives. En H. Dominguez-González, & M. d. González-Muñoz, *Water Extraction of Bioactive Compounds From Plants to Drug Development* (págs. 399-419). Elsevier Inc. doi:10.1016/C2015-0-04878-X
- Saavedra, O. M. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica UV*, 33.
- Sánchez Barrera, A. (2015). Toxicidad aguda en *Artemia franciscana* Kellogg de aceites esenciales aislados de cinco especies. Cuautitlan Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salazar, J., Chavéz Domínguez, J. A., & García Hernández, M. (2010). Effect of Ultrasound on food processing. En J. Ahmed, H. Ramaswamy, S. Kasapis, &



- J. Boye, Novel foods processing: Effects on rheological and functional properties (pág. 65). New -york: Taylord and Francis Group.
- Sanabria-Galindo, A., López, S. I., & Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad, sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de ciencias químico-farmacéutica*, 26, 15.
- Sánchez Valle, V., & Méndez Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 161.
- Sánchez, M. E. (2013). Antioxidantes, Consumo de antioxidantes naturales en adultos mayores de entre 65 y 75 años con dislipidemia. Argentina: Universidad Abierta Interamericana.
- Secretaría de salud. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos* (segunda edición). México.
- Sri Balasubashini, M., Rukkumani, R., Viswanathan, P., & Venugopal, P. (2003). Ferulic Acid Alleviates Lipid Peroxidation. *Phytotherapy Research*, 18, 310.
- Stulzer, H., Tagliari, M., Zampirolo, J., Cechinel, V., & Schlemper, V. (2006). Antioedematogenic effect of marrubin obtained of *marrubium vulgare*. Santa Catarina: Science direct.
- Valpuesta, J. M. (2008). A la búsqueda del secreto de la vida. Una breve historia de la biología molecular. Madrid: Ministerio de ciencia e inovación.
- Valverde, P. (2007). La epicatequina. Un flavonoide para recordar. *Revista Especializada en Nutrición (ReNut)*, 7.
- Venereo Gutierrez, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Cuba: Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto".