



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**



“EFECTO DEL SECADO POR CONVECCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DEL FRUTO DE *Prunus serotina* PARA ESTANDARIZAR LA ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA Y DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LAS PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

I.I.A. ALMA KAREN CHÁVEZ MEZA

**DIRIGIDA POR**

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

**CODIRIGIDA POR**

Dra. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE, 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“EFECTO DEL SECADO POR CONVECCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DEL FRUTO DE *Prunus serotina* PARA ESTANDARIZAR LA ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA Y DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LAS PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Presenta:

I.I.A. Alma Karen Chávez Meza

Dirigido por:

Dr. César Ibarra Alvarado

Codirección:

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez

Dr. César Ibarra Alvarado  
Presidente

Firma

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez  
Secretario

Firma

Dra. Alejandra Rojas Molina  
Vocal

Alejandra Rojas M

Firma

Dra. Juana Isela Rojas Molina  
Suplente

Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah  
Suplente

Firma

p.a.  
  
M.S.P. Sergio Pacheco  
Director de la Facultad

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2014  
México

## RESUMEN

Los frutos de *Prunus serotina* (capulín) son empleados en la medicina tradicional mexicana para tratar diversas afecciones. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que estos frutos contienen triterpenos y compuestos fenólicos que poseen efecto vasodilatador. Por esta razón, se propuso la elaboración de una forma farmacéutica a partir del fruto liofilizado de *P. serotina*. Sin embargo, considerando las propiedades higroscópicas del liofilizado, solo fue posible proponer la formulación para una tableta de gel que presenta poca estabilidad y varios problemas en su proceso de elaboración. Adicionalmente, el método de secado por liofilización resulta caro, tardado y poco práctico para la elaboración de grandes lotes de la forma farmacéutica. Considerando estos antecedentes, se planteó el presente estudio que tuvo como objetivo estudiar el efecto del secado por convección sobre las propiedades antioxidante y vasodilatadora presentes en el fruto fresco de *P. serotina*, con el fin de proponerlo como una alternativa al secado por liofilización. Se realizó el secado por convección a 4 temperaturas (60, 70, 80, y 90 °C), con la adición de maltodextrina o etanol como pre-tratamiento. De las muestras obtenidas se evaluó el contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides, así como la capacidad antioxidante y el efecto vasodilatador. Los resultados obtenidos de estas determinaciones, demostraron que el secado por convección no es un método adecuado para procesar el fruto fresco de *P. serotina*, ya que causa una disminución significativa de compuestos fenólicos y, por lo tanto, de las actividades antioxidante y vasodilatadora. De manera adicional, se determinó el compuesto marcador químico apropiado para las pruebas de control de calidad de productos que se elaboren a partir del fruto de *P. serotina*, eligiendo para este fin la quercetina, la cual es un compuesto que apareció de manera constante en las diferentes recolectas analizadas del fruto de *P. serotina*, además de que posee actividad vasodilatadora y es fácil de detectar por cromatografía líquida de alta eficiencia.

**Palabras Clave:** *Prunus serotina*, secado por convección, actividad vasodilatadora, marcador químico, HPLC

## ABSTRACT

*Prunus serotina* (capulin) fruits are used in Mexican traditional medicine to treat various diseases. Studies carried out by our research group have shown that these fruits contain triterpenes and phenolic compounds which possess a vasodilating effect. For this reason, the development of a pharmaceutical form from the lyophilized *P. serotina* fruit was proposed. However, considering the hygroscopic properties of the freeze-dried fruit, it was only possible to propose a gel tablet formulation with low stability and several problems in its manufacturing process. Additionally, the freeze-drying method is expensive, time consuming and impractical for making large batches of the pharmaceutical form. Considering this background, the present study aimed to evaluate the effect of convection drying on the antioxidant and vasodilatory properties present in the fresh *P. serotina* fruit, in order to propose it as an alternative to freeze drying. Drying was carried out by convection at 4 temperatures (60, 70, 80, and 90 ° C), with the addition of maltodextrin or ethanol as pretreatment. From the samples obtained, the content of total phenolic compounds and flavonoids, as well as antioxidant activity and vasorelaxing effect were assessed. The results obtained of these determinations showed that convection drying is not a suitable method for processing the fresh *P. serotina* fruit, because it causes a significant reduction of phenolic compounds and, therefore, of the antioxidant and vasorelaxant activities. Additionally, it was determined the suitable chemical marker for quality control testing of products manufactured from the *P. serotina* fruit, choosing for this purpose the quercetin, which is a compound that appeared consistently in the different harvests analyzed of *P. serotina* fruit, besides it possesses vasodilatory activity and is easily detected by high performance liquid chromatography

**Keywords:** *Prunus serotina*, convection drying, vasodilatory activity, chemical marker, HPLC

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres María de la Cruz Meza C. y José I. Chávez Ángeles y a mi hermano Luis Alberto que siempre me han brindado su apoyo y comprensión en todos los proyectos que he realizado.

A E. Efraín Rodríguez por entenderme y apoyarme cuando más lo he necesitado.

Al Dr. Francisco Javier Luna Vázquez, por su pericia, su perspicacia, paciencia y por ser un excelente mentor.

Al Dr. César Ibarra Alvarado y la Dra. Alejandra Rojas Molina, por invitarme a ser parte de la Maestría en Ciencias Químico-Biológicas; por su experiencia, su paciencia, y su interés en el desarrollo este trabajo de investigación.

A la Dra. Guadalupe García Alcocer, por su dinamismo y rapidez para resolver los problemas.

A mis compañeras de maestría: Abigaíl, Irasema, Norma y Sarahí, por brindarme su amistad y apoyo tanto en las clases, como fuera de ellas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los apoyos financieros otorgados para la realización de este trabajo de investigación:

Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT – Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) convocatoria 2012-01. “Fortalecimiento de la infraestructura del Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la UAQ para la formación de recursos humanos de alto nivel en las áreas de farmacia y salud”. Clave: QRO-2012-C01-192954

Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT – Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) convocatoria 2012-01. “Valor nutracéutico del fruto de *Prunus serotina* (capulín) y su aplicación para el desarrollo de un suplemento alimenticio útil para prevenir y/o tratar enfermedades cardiovasculares”. Clave: QRO-2012-C01-192964

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Enfermedades cardiovasculares .....	3
2.2. Hipertensión arterial .....	6
2.2.1. Incidencia de la hipertensión arterial en México .....	7
2.2.2. Fisiología de la hipertensión arterial .....	8
2.3. Medicina Tradicional: plantas medicinales .....	9
2.3.1. Compuestos encontrados en las plantas: compuestos fenólicos .....	10
2.4. <i>Prunus serotina</i> .....	11
2.4.1. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre <i>P. serotina</i> .....	13
2.5. Suplementos alimenticios y productos elaborados a partir de plantas .....	15
2.6. Formas farmacéuticas para los productos elaborados a base de plantas .....	17
2.6.1. Formas farmacéuticas sólidas de administración oral .....	18
2.6.1.1. Polvos .....	18
2.6.1.2. Granulados .....	19
2.6.1.3. Tabletas .....	19
2.6.1.4. Cápsulas.....	20
2.6.2. Formas farmacéuticas líquidas de administración oral .....	21
2.6.2.1. Disoluciones .....	21
2.6.2.2. Emulsiones .....	22
2.6.2.3. Suspensiones .....	22
2.7. Elaboración de polvos para formas farmacéuticas.....	22
2.7.1. Secado.....	23

2.7.1.1. Secado por liofilización .....	23
2.7.1.2. Secado por convección de aire.....	23
2.7.2. Utilización de aditivos .....	24
2.7.2.1. Maltodextrina .....	25
2.7.2.2. Etanol .....	25
2.8. Desarrollo por nuestro grupo de trabajo de una forma farmacéutica en forma de tableta de gel a partir del fruto liofilizado de <i>P. serotina</i> .....	26
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
5.1. Objetivo general .....	33
5.2. Objetivos específicos .....	33
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
6.1. Especímenes biológicos.....	34
6.1.1. Material vegetal.....	34
6.1.2. Animales .....	34
6.2. Secado del fruto fresco de <i>P. serotina</i> .....	34
6.2.1. Secado por liofilización .....	34
6.2.2. Tratamiento de los frutos frescos de <i>P. serotina</i> con la adición de maltodextrina o etanol para someterlos al proceso de secado por convección	35
6.2.2.1. Tratamiento de los frutos con maltodextrina .....	35
6.2.2.2. Tratamiento de los frutos con etanol.....	35
6.2.3. Secado por convección.....	35
6.3. Determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante .....	36
6.3.1. Preparación de los extractos.....	36
6.3.2. Determinación de fenoles totales .....	36
6.3.3. Determinación de flavonoides.....	37
6.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH	37
6.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP .....	38
6.3.6. Cálculo para la determinación de las concentraciones a partir de las curvas de calibración .....	38
6.4. Determinación del efecto vasodilatador .....	39
6.5. Determinación del compuesto marcador químico del fruto de <i>P. serotina</i> .....	40

6.5.1. Preparación de los estándares de los compuestos fenólicos.....	40
6.5.2. Preparación de las muestras del fruto de <i>P. serotina</i> para el análisis cromatográfico .....	41
6.5.3. Condiciones para el análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos.....	41
6.5.4. Selección del marcador químico .....	42
6.5.4.1. Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina .....	43
6.6. Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico.....	43
6.7. Validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico .....	45
6.7.1. Especificidad del método (selectividad) .....	45
6.7.2. Linealidad.....	46
6.7.2.1. Linealidad del sistema .....	46
6.7.2.2. Linealidad del método.....	46
6.7.3. Exactitud .....	46
6.7.4. Precisión .....	47
6.7.4.1. Precisión del método (Repetibilidad) .....	47
6.7.4.2. Precisión del sistema.....	47
6.7.5. Límite de detección y límite de cuantificación .....	47
6.7.6. Estabilidad de la muestra.....	48
6.8. Análisis estadístico.....	49
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
7.1. Selección del método de secado por convección y de aditivos para procesar el fruto fresco de <i>P. serotina</i> .....	50
7.2. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre el contenido de compuestos fenólicos del fruto de <i>P. serotina</i> .....	55
7.3. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre el contenido de flavonoides del fruto de <i>P. serotina</i> .....	59
7.4. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre la capacidad antioxidante del fruto de <i>P. serotina</i> .....	63
7.4.1. Capacidad antioxidante por el método DPPH.....	63
7.4.2. Capacidad antioxidante por el método FRAP .....	66

7.5. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre la actividad vasodilatadora inducida por el fruto de <i>P. serotina</i> .....	70
7.6. Determinación del compuesto marcador químico del fruto de <i>P. serotina</i> para las pruebas de control de calidad.....	74
7.6.1. Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos .....	74
7.6.2. Selección del compuesto marcador químico.....	76
7.6.2.1. Cuantificación de ácido clorogénico y de quercetina .....	79
7.6.2.2. Evaluación farmacológica del ácido clorogénico y de quercetina .....	82
7.7. Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del marcador químico .....	84
7.8. Validación del método analítico para la detección y cuantificación de quercetina como marcador químico del fruto del <i>P. serotina</i> .....	96
7.8.1. Especificidad del método (selectividad) .....	96
7.8.2. Linealidad del sistema.....	98
7.8.3. Linealidad del método .....	100
7.8.4. Exactitud .....	102
7.8.5. Precisión .....	102
7.8.6. Límite de detección y límite de cuantificación .....	103
7.8.7. Estabilidad de la muestra.....	104
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>109</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>110</b>
<b>11. ANEXO A.....</b>	<b>129</b>
11.1. Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos.....	129
11.2. Tabla de distribución t de student. ....	132
11.3. Tabla de distribución F de Fisher. ....	134

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de Página</b>
1	Elementos de clasificación de productos a base de plantas.	17
2	Gradiente utilizado para la detección de compuestos fenólicos.	42
3	Gradiente utilizado para la detección del marcador químico, método 3.	44
4	Condiciones para la detección del marcador químico	45
5	Condiciones para la evaluación de la estabilidad.	48
6	Muestras obtenidas del secado por convección y liofilización.	53
7	Compuestos fenólicos totales determinados en los frutos de <i>P. serotina</i> con los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	55
8	Contenido de flavonoides determinados en los frutos de <i>P. serotina</i> sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	60
9	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH de los frutos de <i>P. serotina</i> sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	64
10	Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP de los frutos de <i>P. serotina</i> sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	67
11	Concentración efectiva media (EC <sub>50</sub> ) y efecto máximo (E <sub>max</sub> ).	72
12	Compuestos fenólicos identificados en el fruto de <i>P. serotina</i> .	75
13	Resultados obtenidos del análisis cromatográfico para las curvas de calibración.	80
14	Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina en el fruto de <i>P. serotina</i> .	81
15	Concentración efectiva media (CE <sub>50</sub> ) y efecto máximo (E <sub>max</sub> ).	82
16	Resultados obtenidos de la curva de calibración de quercetina para evaluar la linealidad del sistema.	99

<b>Tabla No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de Página</b>
17	Parámetros estadísticos para la evaluación de la linealidad del sistema.	99
18	Resultados obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método.	100
19	Parámetros estadísticos para la evaluación de la linealidad del método.	101
20	Parámetros estadísticos para la evaluación de la exactitud del método.	102
21	Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método y del sistema.	103
22	Resultados obtenidos de la curva de calibración para la determinación de LD y LC.	104
23	Condiciones para la evaluación de la estabilidad.	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de Página</b>
1	Las 10 causas principales de defunción en el mundo – 2000 – 2012.	4
2	Mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares en América.	5
3	Causas principales de mortalidad en las Américas. México.	5
4	Mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Américas. México.	6
5	Prevalencia de hipertensión arterial por sexo y años de encuesta.	7
6	Estructura base de los flavonoides.	10
7	(a) Flores, (b) frutos y (c) semillas de <i>P. serotina</i> .	12
8	Ácido ursólico.	13
9	Compuestos fenólicos totales determinados en las muestras secas de <i>P. serotina</i> .	56
10	Morfologías de encapsulación: mononuclear (derecha) matriz (izquierda).	59
11	Contenido de flavonoides determinados en las muestras secas de <i>P. serotina</i> .	61
12	Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de los frutos de <i>P. serotina</i> sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	65
13	Determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP de los frutos de <i>P. serotina</i> sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.	68
14	Efecto de los métodos de secado (liofilización y convección) sobre la actividad vasodilatadora de las muestras pre-tratadas con etanol.	70
15	Efecto de los métodos de secado (liofilización y convección) sobre la actividad vasodilatadora de las muestras en presencia de maltodextrina (Malt).	71
16	Cromatograma del liofilizado del fruto de <i>P. serotina</i> sometido a hidrólisis ácida.	75

<b>Figura No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de Página</b>
17	Cromatograma obtenido de la piel del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2012).	76
18	Cromatograma obtenido de la pulpa del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2012).	77
19	Cromatograma obtenido del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2013).	77
20	Cromatograma del liofilizado del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2014).	78
21	(a) Co-elución de la muestra del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2014) con el ácido clorogénico. (b) Ampliación del pico del ácido clorogénico.	78
22	(a) Co-elución de la muestra del fruto de <i>P. serotina</i> (colecta de 2014) con quercetina. (b) Ampliación del pico de la quercetina.	79
23	Curva de calibración para la cuantificación de ácido clorogénico.	80
24	Curva de calibración para la cuantificación de quercetina.	81
25	Actividad vasodilatadora del ácido clorogénico y de la quercetina.	83
26	Detección de la quercetina (15 µg/ml). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.	85
27	Detección de ácido clorogénico (150 µg/ml). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.	86
28	Extracto hidrolizado de <i>P. serotina</i> (colecta 2014). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.	88
29	Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 1.	90
30	Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 2.	91
31	Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 3.	92
32	Cromatogramas de la matriz de trabajo (muestra del fruto de <i>P. serotina</i> ) obtenidos por los 3 métodos. (a) Métodos 1,2 y 3. (b) Métodos 1 y 3.	93

<b>Figura No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>No. de Página</b>
33	Cromatogramas de la quercetina a diferentes longitudes de onda.	95
34	Espectros de absorción. (a) Estándar de quercetina, (b) matriz de trabajo (extracto del fruto de <i>P. serotina</i> ), (c) co-elución (matriz de trabajo con el estándar).	97
35	Curva de calibración de quercetina para la evaluación de la linealidad del sistema.	98
36	Curva de calibración para evaluar la linealidad del método.	101

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, en nuestro país se ha dado un incremento significativo en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, lo cual ha propiciado que éstas se encuentren entre las principales causas de mortalidad. De estas enfermedades, la hipertensión arterial es una de las más importantes, ya que representa un factor de riesgo para contraer otras enfermedades degenerativas. Por este motivo es necesario tomar medidas para el control de este padecimiento. Sin embargo, menos de un tercio de los pacientes con hipertensión son tratados de forma exitosa; esto es debido a que los fármacos existentes para el tratamiento de esta enfermedad no siempre son efectivos y causan un gran número de efectos adversos, lo que produce una disminución en la calidad de vida de los enfermos.

Por estas razones, es importante la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y/o tratamiento de esta enfermedad. Dando seguimiento a esta necesidad, se han realizado diversas investigaciones a especies vegetales en busca de principios activos que ayuden a resolver estos problemas. De esta manera, nuestro grupo de investigación encontró una especie vegetal ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana: *Prunus serotina*, de la cual, su corteza, hojas, inflorescencias y frutos, ya eran utilizados por la población mexicana para tratar padecimientos cardíacos, pulmonares e intestinales.

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación han evidenciado que el fruto de *P. serotina* posee un gran potencial nutracéutico, debido principalmente a su actividad antioxidante y vasodilatadora que pueden ser utilizadas en el tratamiento de la hipertensión arterial. Tomando en cuenta estos resultados, se propuso la elaboración de una forma farmacéutica a partir del fruto liofilizado de *P. serotina* para utilizarlo como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión arterial. Sin embargo, considerando las propiedades fisicoquímicas y fisicomecánicas del liofilizado, solo fue posible proponer la formulación para una tableta de gel, la cual presentó poca estabilidad y varios problemas en su proceso de elaboración. Además, el secado por liofilización es un proceso de alto costo energético y financiero que difícilmente se encuentra en la industria.

Debido a estos problemas y considerando que los polvos son la forma de dosificación más simple y la base de otras formas farmacéuticas, se requiere de un método adecuado de secado que permita la obtención de un polvo que conserve las propiedades nutracéuticas del fruto fresco de *P. serotina*. Así, se planteó el presente trabajo de investigación que tiene como objetivo analizar el efecto del secado por convección sobre los efectos biológicos del fruto de *P. serotina*, tomando en cuenta la utilización de aditivos para mejorar las condiciones de secado y garantizar la obtención de un polvo que pueda ser utilizado para la elaboración de otras formas farmacéuticas.

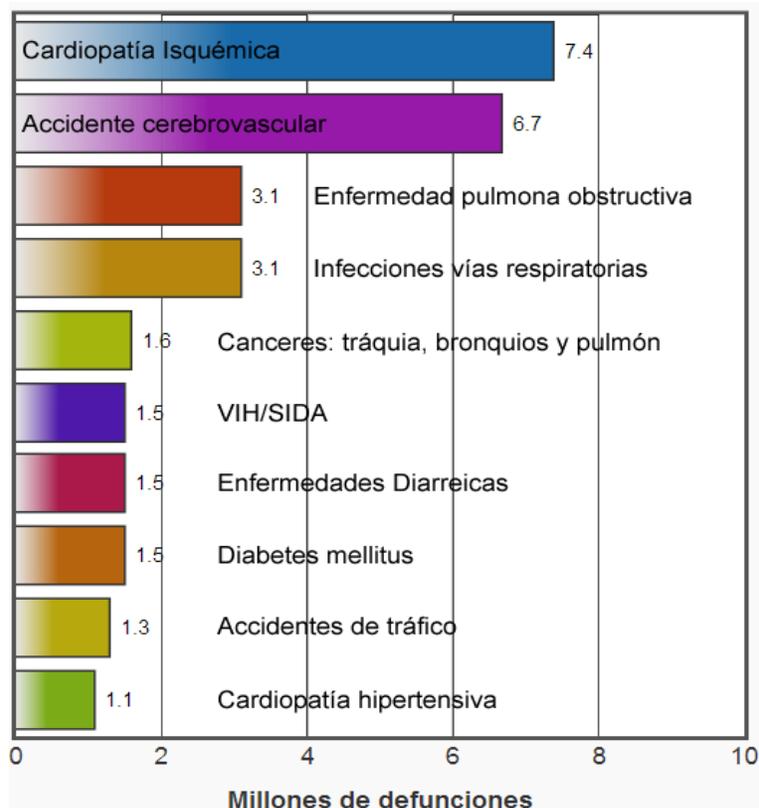
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades crónicas o incapacitantes, son aquellas que comúnmente se adquieren por medio de estilos de vidas inapropiados, aunque hay que considerar que existen factores genéticos de naturaleza hereditaria que conciernen a estas condiciones. Este tipo de enfermedades constituye un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuyen a la mortalidad mediante un pequeño número de desenlaces (diabetes, enfermedades cardiovasculares y enfermedad vascular cerebral). Los decesos son consecuencia de un proceso iniciado décadas antes (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de trastornos del corazón y los vasos sanguíneos y forman parte de las principales causas de muerte en todo el mundo, siendo la cardiopatía isquémica la que ocupa el primer lugar (Figura 1). Estas enfermedades se clasifican en: hipertensión arterial, enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, isquémica y congénita. Se calcula que en 2012 murieron 17.5 millones de personas por ECV, 2.6 millones más que en el año 2000, lo cual representa el 30% de las defunciones registradas en el mundo. Se prevé que en los próximos 20 años las ECV seguirán siendo la principal causa de defunción, provocando cerca de 23.3 millones de muertes (OMS, 2014).

Respecto al continente Americano, las principales causas de muerte prematura son las enfermedades isquémicas del corazón, la diabetes mellitus y las enfermedades cerebrovasculares que encabezan la lista; sin embargo, también se incluyen las enfermedades hipertensivas, la influenza y neumonía (OPS, 2012). Las ECV son uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, no sólo por ser de las principales causas de mortalidad sino también porque son las enfermedades más costosas, tanto por los tratamientos utilizados como por la pérdida de productividad que resulta de la morbilidad y la muerte prematura de los afectados (Go *et al.*, 2013).

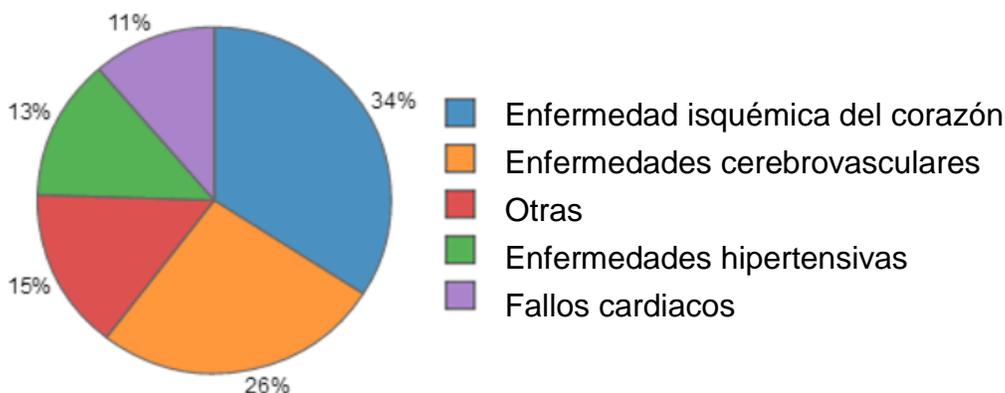


**Figura 1.** Las 10 causas principales de defunción en el mundo – 2000 – 2012.

Fuente: Modificado de: Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014).

En la Figura 2, se muestran las ECVs consideradas como las principales causas de muerte en América (OPS-OMS, 2014). La distribución porcentual de las muertes en el continente Americano por ECV del año 2000 al año 2012 fue dominada por enfermedad isquémica del corazón (34% de las muertes por ECV) y las enfermedades cerebrovasculares (26%), seguidas por fallos cardiacos y las enfermedades hipertensivas con 13%. El subgrupo de las ECV “Otras” representa el 15% de otro tipo de muerte causada por ECV (OPS-OMS, 2014).

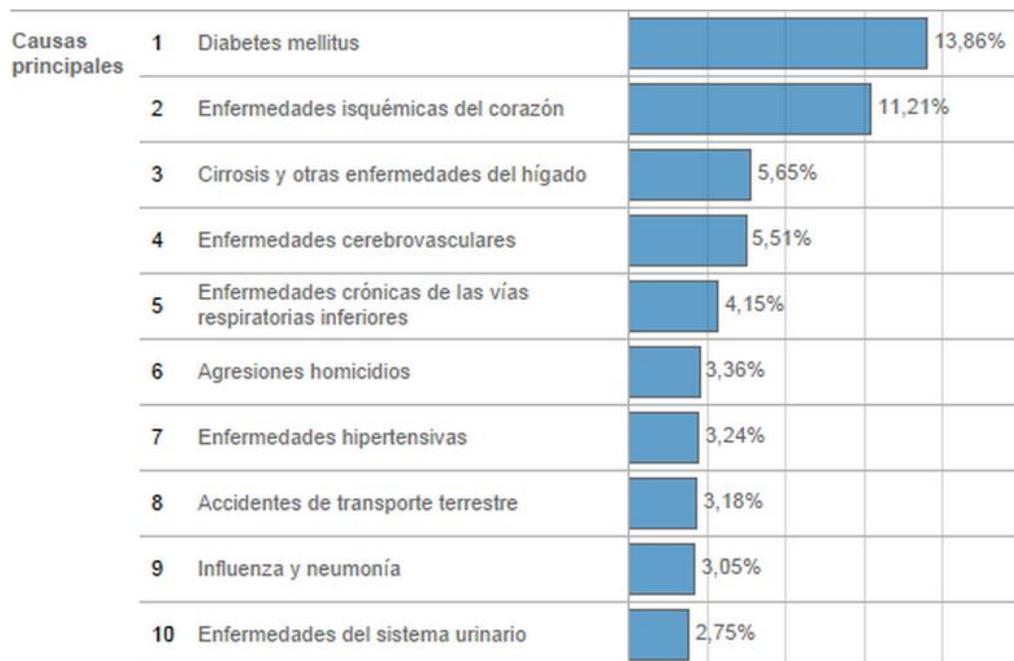
En lo que refiere a nuestro país, datos epidemiológicos realizados durante las últimas décadas indican que las enfermedades cardiovasculares también se encuentran entre las principales causas de muerte (Velázquez *et al.*, 2007), después de la diabetes mellitus que ha aumentado su prevalencia y en el año 2010 fue la enfermedad que produjo mayor número de defunciones (Figura 3) (OPS 2012; Romano *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares en América.

Fuente: Modificado de: Sistema de Información sobre Mortalidad Regional. Observatorio Regional de Salud. Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS, 2014).

Entre estas enfermedades destacan las enfermedades hipertensivas, las cuales tienen una incidencia creciente debido al aumento de factores de riesgo en nuestra sociedad (Meaney *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2010), tales como la obesidad, las concentraciones anormales de lípidos en la sangre, el tabaquismo, el alcoholismo, el sedentarismo, la dieta inadecuada y el síndrome metabólico (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

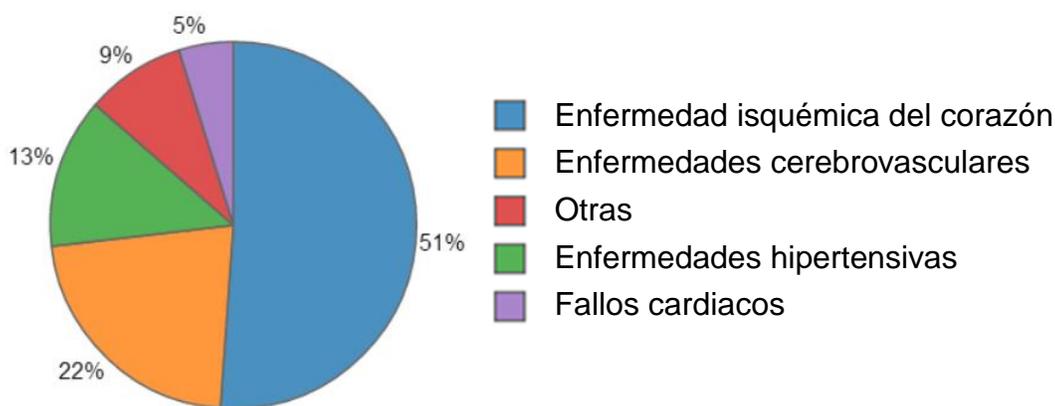


**Figura 3.** Causas principales de mortalidad en las Américas. México.

Fuente: Modificado de: Sistema Regional de Mortalidad. Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2012).

## 2.2. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) se sitúa entre las enfermedades de mayor relevancia debido a su gran magnitud y amplia distribución. Esta enfermedad representa uno de los principales factores de riesgo, que es modificable, para las ECV; y es considerado como uno de los mayores problemas de salud pública (Secretaría de Salud, 2001). En la Figura 4, se muestra que, en México, las enfermedades hipertensivas son la causa del 13% de las muertes producidas por ECV, después de las enfermedades isquémicas del corazón (51%) y las enfermedades cerebrovasculares (22%) (OPS-OMS, 2014).



**Figura 4.** Mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Américas. México.

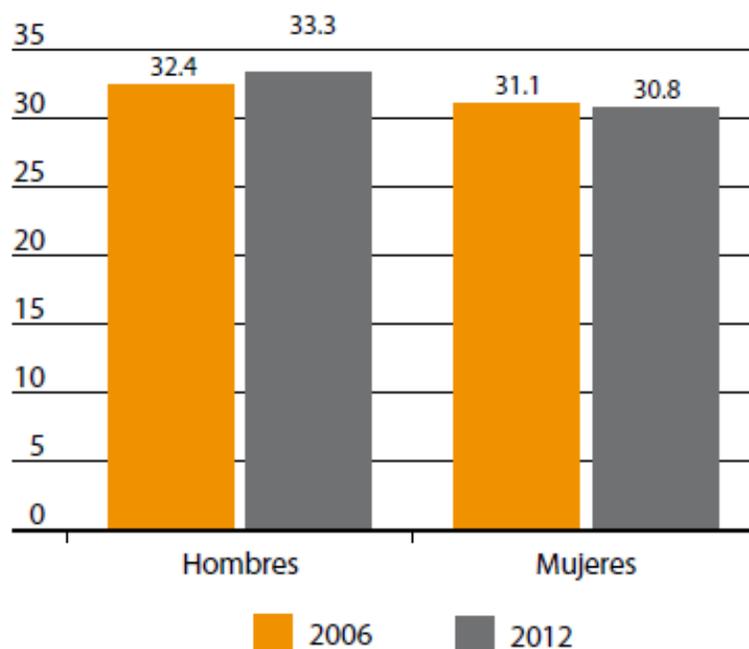
Fuente: Modificado de: Mortalidad Sistema Regional de Información. Observatorio Regional de Salud. Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS, 2014).

La HTA se define como la elevación de la presión arterial sistólica por arriba de los 140 mmHg y/o una presión arterial diastólica de 90 mmHg o superior, en personas que no están tomando medicamentos antihipertensivos. La hipertensión sistólica aislada se diagnostica si la presión arterial sistólica es mayor a 140 mmHg con una presión arterial diastólica menor a 90 mmHg. Adicionalmente, hay otra categoría denominada “prehipertensión” la cual se define como una presión arterial menor a 140/90 mmHg pero mayor que una presión arterial óptima de 120/80 (Chobanian, 2003). La prehipertensión también se asocia con riesgos elevados para contraer ECV en todo el espectro de edad (Go *et al.*, 2013).

### 2.2.1. Incidencia de la hipertensión arterial en México

La elevación de la presión arterial por encima de los valores normales es uno de los problemas de salud más frecuentemente en la población mexicana. En las últimas dos décadas, la prevalencia de pacientes hipertensos (HT) tuvo un aumento del 23.8% en 1993 al 30.7% en el año 2000 en México. La frecuencia de la hipertensión arterial se vincula principalmente con la edad y la obesidad (Melano-Carranza *et al.*, 2008).

En los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSAUT) del año 2006, se encontró que la prevalencia de HT aumentó a un 43,2% en 2006 (Barquera *et al.*, 2010). Esta prevalencia de HT se ha mantenido en los seis años posteriores de acuerdo con los resultados de la ENSANUT realizada en el año 2012. En la Figura 5 se observa la prevalencia de HTA de ambas encuestas (Gutierrez *et al.*, 2012). Por otra parte, las proyecciones indican que en el 2030, la prevalencia de HT aumentará 7.2%, si no se toman las medidas adecuadas para su control (Go *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Prevalencia de hipertensión arterial por sexo y años de encuesta.

Fuente: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012.

Debido a que la etapa inicial de la HTA (hipertensión leve), cuando aún no hay afectación de órganos, suele ser totalmente asintomática y su diagnóstico es casual (de ahí su connotación de “asesino silencioso”), el 62% de las personas con HTA no eran conscientes de su condición según los resultados obtenidos de la ENSANUT 2006 (Barquera *et al.*, 2010). Sin embargo, esta cifra ha disminuido a un 47.3% para la ENSANUT 2012, lo que refleja una mejoría en las actividades de detección de este padecimiento, evitando que se presenten complicaciones y daños en órganos blancos (Gutierrez *et al.*, 2012)

### **2.2.2. Fisiología de la hipertensión arterial**

La HTA es el producto del gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica. Cada uno de ellos depende de factores como son: el volumen sanguíneo, la contractilidad miocárdica y la frecuencia cardíaca para el gasto cardíaco. La vasoconstricción funcional de las arterias de mediano calibre (arterias de resistencia) determina el incremento de la resistencia periférica. El gasto cardiaco puede aumentar por aumento del volumen sanguíneo (precarga) y de la contractilidad del corazón por estimulación nerviosa. El aumento de la resistencia periférica, reside en el aumento del tono vascular de las arteriolas distales de resistencia de menos de 1 mm de diámetro (Maicas *et al.*, 2003).

El tono vascular juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y existen numerosas evidencias que sugieren que alteraciones en la función del endotelio vascular, el cual controla la relajación del músculo liso vascular, contribuyen a la patogénesis y a la expresión clínica de varias enfermedades cardiovasculares (Kang, 2006). El endotelio vascular (capa interna de las venas y arterias) sintetiza y libera un amplio espectro de sustancias vasoactivas y desempeña un papel fundamental en la regulación y mantenimiento de la homeostasis cardiovascular (Vita y Keaney, 2002). Entre los principales factores endoteliales relajantes se incluyen la prostaciclina ( $PGI_2$ ) y el óxido nítrico (NO) Estos dos factores están involucrados en la regulación, a corto y a largo plazo, del tono vascular (Herrera *et al.*, 2010).

El desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial involucra una producción deficiente de factores vasodilatadores derivados de endotelio, lo cual resulta en un aumento del tono vascular, lo que a su vez provoca un incremento en la resistencia vascular y, finalmente, contribuye a elevar la presión sanguínea. A su vez, las disfunciones endoteliales, caracterizadas por un desacoplamiento entre la liberación de factores endoteliales y la relajación del músculo liso vascular, se han asociado con enfermedades como la hipercolesterolemia (Brunner *et al.*, 2005). Por otro lado, varias enfermedades cardiovasculares como el vasoespasma coronario (Marijic *et al.*, 2001) y la isquemia cardiaca también se han asociado a la disminución en la expresión y la activación de diversos canales de potasio (Calderone *et al.*, 2004; Castro y Raji, 2013).

Considerando las numerosas evidencias que sugieren que alteraciones en la función endotelial contribuyen a la patogénesis y expresión clínica de varias enfermedades cardiovasculares, en la actualidad se están buscando nuevas estrategias terapéuticas que involucren efectos relajantes de la musculatura lisa vascular para la prevención y el tratamiento de estas afecciones.

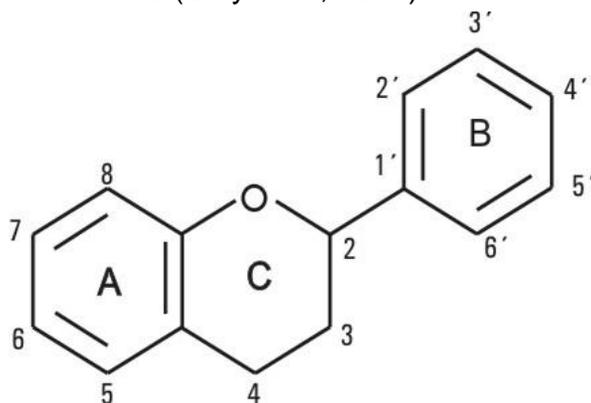
### **2.3. Medicina Tradicional: plantas medicinales**

El interés actual en la medicina herbolaria y la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas se debe principalmente a la creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades, como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrear (González *et al.*, 2004). La riqueza de la naturaleza de nuestro país y la necesidad de encontrar recursos accesibles para tratar diversos padecimientos, han dado como resultado que en México las plantas medicinales sean parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar las enfermedades cotidianas. Las plantas medicinales y algunos frutos de estas plantas constituyen un elemento muy importante en los sistemas médicos tradicionales de México y representan un legado cultural que se remonta desde tiempos prehispánicos y coloniales (Argueta *et al.*, 2009).

La evidencia científica ha demostrado el papel crucial de las plantas como fuentes potenciales de diversos compuestos, los cuales pueden ser utilizados en el tratamiento de distintas enfermedades (Brusotti *et al.*, 2013). Entre los compuestos bioactivos que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales están los compuestos fenólicos, los cuales han demostrado poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas, además de tener efecto sobre las enfermedades cardiovasculares (Fraga *et al.*, 2010).

### 2.3.1. Compuestos encontrados en las plantas: compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, comúnmente referidos como polifenoles, son sustancias que poseen un anillo aromático (núcleo bencénico) teniendo uno o más sustituyentes hidroxilo. En las plantas, algunos de los compuestos fenólicos más importantes que se pueden encontrar son: flavonoides (Figura 6), ácidos fenólicos, taninos, antocianinas, entre otros (Gil y Ruiz, 2010).



**Figura 6.** Estructura base de los flavonoides.

Varios estudios han sugerido que el consumo de alimentos ricos de compuestos fenólicos ejerce un efecto positivo sobre el tratamiento y prevención de varias enfermedades, entre ellas, la obesidad, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, ya que poseen actividad antiinflamatoria, antioxidante, antiplaquetaria y vasodilatadora (Del Rio *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2010; Mladěnka *et al.*, 2010). Los antioxidantes son sustancias que retrasan el proceso de oxidación, reduciendo el daño oxidativo celular, proporcionando protección contra las enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades oncológicas, neurodegenerativas y cardiovasculares (Céspedes *et al.*, 2008).

La actividad antitrombótica que los compuestos fenólicos tienen, se da a través de la reducción en la síntesis de sustancias protrombóticas y mediadores proinflamatorios; también por la disminución en la expresión de moléculas de adhesión, así como en la modulación de la producción de óxido nítrico por el endotelio (generando vasodilatación) y por suprimir la producción del anión superóxido, lo que también contribuye a la disminución de la presión arterial (Ramírez-Tortosa y Quiles Morales, 2005; Mladěnka *et al.*, 2010).

Los flavonoides en particular, exhiben una amplia gama de efectos biológicos incluyendo actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora (Paladino, 2007; Mladěnka *et al.*, 2010). La inhibición de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la agregación plaquetaria por los flavonoides sugiere que el consumo regular de alimentos que contienen este tipo de compuestos puede proteger contra la aterosclerosis, reduciendo el riesgo de morbilidad y mortalidad por cardiopatía coronaria (Fraga *et al.*, 2010).

#### **2.4. *Prunus serotina***

Un rastreo documental y etnomédico realizado por nuestro grupo de trabajo indicó que varias especies vegetales eran empleadas para tratar diversas afecciones cardiovasculares y entre las plantas más apreciadas por sus propiedades antihipertensoras destaca *Prunus serotina*, conocida popularmente como “capulín” (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010).

*P. serotina* es una especie originaria de América y se extiende actualmente desde Canadá hasta Guatemala. Crece en lugares templados o fríos de las regiones montañosas, a altitudes de 2,500 metros (Hough, 1965). Se caracteriza por ser un árbol de 5 a 15 m de altura, con un diámetro de 1.2 m y copa ancha de forma ovoide que produce una sombra densa; sus hojas son simples, ovaladas o lanceoladas, de 6 a 15 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho con margen aserrado (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Calderón y Rzedowski, 2005).

Las flores en este árbol se presentan en los meses de marzo y abril, son numerosas, pequeñas y blancas, generalmente agrupadas en racimos axilares colgantes y largos, de 10 a 15 cm. El fruto de *P. serotina* aparece en los meses de mayo y agosto, es una drupa de forma esférica con un diámetro de entre 6 y 8 mm; la piel del fruto es de color negro rojizo en la madurez y la carne es verde traslúcida; su sabor es agridulce y algo astringente y contiene sólo una semilla, rodeada por un endocarpio leñoso (almendra), que se caracteriza por ser esférica y de sabor amargo (Calderón y Rzedowski, 2005).

En la Figura 7 se muestran imágenes de las flores y fruto de *P. serotina*. Las diferentes partes (hojas, flores, frutos y semillas) que constituyen el árbol de *P. serotina* han desempeñado un papel central en nuestra cultura, no sólo como elementos alimenticios, en el caso de los frutos y las semillas, sino también como remedios para el tratamiento de diversas enfermedades entre las que destacan la diarrea y la tos (McVaugh, 1951; Martínez, 1991). Una investigación documental con criterio etnomédico del uso de plantas en la medicina tradicional mexicana reveló que *P. serotina* también es utilizada para el tratamiento de padecimientos cardiovasculares, incluyendo la enfermedad isquémica de corazón, la hipertensión arterial, entre otras (Díaz, 1976).

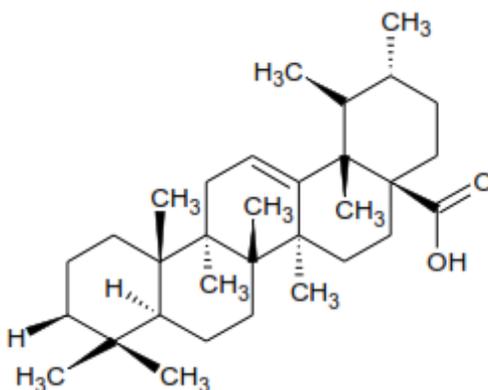


**Figura 7.** (a) Flores, (b) frutos y (c) semillas de *P. serotina*.

### 2.4.1. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sobre *P. serotina*

Hace algunos años, nuestro grupo de trabajo inició el estudio farmacológico, químico y nutricional del fruto de *P. serotina*. En primer término, se evaluó el efecto farmacológico inducido por extractos polares, no polares y aceites esenciales obtenidos a partir del capulín. La evaluación demostró que los extractos polares (acuosos y etanólicos) y no polares (de diclorometano) de los frutos de *P. serotina* inducen relajación de la musculatura lisa vascular. Estos experimentos evidenciaron que el extracto de diclorometano fue el que relajó la aorta con mayor eficacia (Villa-De la Torre *et al.*, 2010). Asimismo, el aceite esencial obtenido de los frutos también relajó significativamente el músculo liso arterial, de manera dependiente de la concentración. Estos resultados indicaron que los extractos y los aceites esenciales obtenidos de los frutos de *P. serotina* contienen metabolitos polares y no polares que poseen efecto vasodilatador (Villa-De la Torre *et al.*, 2010).

Considerando los resultados de estos experimentos, se inició el estudio fitoquímico biodirigido del extracto de diclorometano preparado a partir de frutos de *P. serotina* con el objeto de purificar los principales metabolitos no polares responsables del efecto farmacológico. A partir de este estudio se purificaron el  $\beta$ -sitosterol y 3 triterpenos de tipo ursano que fueron identificados, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, como el ácido ursólico, el aldehído ursólico y el uvaol. El ácido ursólico (Figura 8) presentó una relajación significativa de la aorta aislada de rata ( $CE_{50}$  de  $154.4 \pm 7.5 \mu\text{g/ml}$  y  $E_{m\acute{a}x}$  de  $94.1 \pm 5.9 \%$ ) (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).



**Figura 8.** Ácido ursólico.

Adicionalmente, se realizó el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial del fruto, el cual indicó que el aceite esencial contiene 58 componentes. Se identificaron siete productos mayoritarios que representan el 50.34 % del porcentaje total de componentes presentes en la esencia: el benzaldehído, el alcohol bencílico, el  $\alpha$ -metoxytolueno, el bencil-etil éter, el alcohol cinámico, el cinamaldehído y el bencil-butyl éter (Luna-Vázquez *et al.*, 2013). El alcohol bencílico, el benzaldehído, el cinamaldehído y el alcohol cinámico fueron evaluados para determinar su participación en el efecto vasodilatador del aceite esencial. Los resultados mostraron que los cuatro compuestos inducen una relajación, dependiente de la concentración, de la aorta aislada de rata, siendo el alcohol cinámico el compuesto que produjo el efecto vasodilatador más potente ( $CE_{50}$  de  $48.1 \pm 5.4 \mu\text{g/ml}$  y  $E_{\text{máx}}$  de  $98.7 \pm 0.8 \%$ ) (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

Los experimentos farmacológicos encaminados a determinar el mecanismo de acción del efecto vasodilatador de los componentes del aceite esencial han demostrado que el benzalehído y el alcohol bencílico inducen un efecto vasodilatador independiente de endotelio, el cual involucra una activación de canales de potasio. Por otra parte, el cinamaldehído produjo un efecto vasodilatador independiente de endotelio, mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). En tanto que el alcohol cinámico induce vasodilatación mediante mecanismos dependientes e independientes de endotelio (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

En otra serie de experimentos, se encontró que el fruto de *P. serotina* presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos y una mayor capacidad antioxidante que los valores respectivos para otros frutos, como la ciruela (*P. domestica*) (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). La determinación de la composición proximal de los frutos de *P. serotina* indicó que los componentes nutrimentales más abundantes en dichos frutos son carbohidratos, proteínas y fibra cruda. Asimismo, la determinación de minerales en estos frutos indicó este fruto es rico en microelementos tales como el potasio, el fósforo, el sodio y el magnesio (Bárcenas, 2011; Chávez-Meza, 2012; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

Se realizaron evaluaciones farmacológicas *in vivo*, en las cuales se administró por vía oral el extracto acuoso del fruto de *P. serotina*, a una dosis diaria de 300 mg/kg durante 4 semanas a ratas con hipertensión inducida con L-NAME. El extracto acuoso del fruto provocó una disminución significativa en la presión sanguínea de las ratas hipertensas, sin tener efecto alguno sobre las ratas normotensas (Uribe, 2011; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Después del tratamiento con L-NAME (dosis diaria: 30 mg/kg), se encontró que la vasodilatación de la aorta de las ratas hipertensas, en respuesta al carbacol, se inhibió casi por completo, indicando un daño vascular provocado por la hipertensión (Uribe, 2011). Sin embargo, las aortas provenientes de las ratas que habían recibido el extracto del fruto de *P. serotina* presentaron un incremento significativo en la vasodilatación, sugiriendo que el extracto proporcionó protección contra la disfunción vascular inducida por la hipertensión (Uribe, 2011; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

Se evaluó la toxicidad pre-clínica del extracto acuoso de los frutos del capulín, utilizando los ensayos de toxicidad aguda en ratones, mediante el método de Lorke ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg de extracto acuoso de *P. serotina*) y el ensayo de letalidad para *Artemia salina* Leach ( $CL_{50} > 1000$  µg/mL de extracto acuoso de *P. serotina*). Estos estudios mostraron que el extracto acuoso elaborado a partir de los frutos de *P. serotina* no es tóxico (Bárceñas, 2011). Adicionalmente, se realizaron estudios de las propiedades fisicoquímicas del fruto fresco de *P. serotina*, los cuales indicaron que el fruto posee un gran contenido de humedad (94%), un alto valor de actividad de agua ( $A_w$  0.997), así como un alto contenido de sólidos solubles (18° Brix).

## **2.5. Suplementos alimenticios y productos elaborados a partir de plantas**

El consumo de suplementos y productos elaborados a base de hierbas ha crecido en forma exponencial en los últimos años, en particular entre los adultos que recurren a este tipo de productos en aras de "complementar" su alimentación, "enfrentar los daños causados por la contaminación", "mantenerse saludables" o "prevenir problemas de salud", entre otros argumentos (Casanueva *et al.*, 2001). Por esta razón, en los últimos años se ha observado un significativo crecimiento del comercio de los productos elaborados a base de plantas en todo el mundo.

En el caso de las enfermedades cardiovasculares, algunos estudios han documentado que las altas dosis de suplementos de aceite de pescado pueden reducir la presión arterial en individuos hipertensos (Esquivel y Jiménez, 2010). Por otro lado, los suplementos antioxidantes se venden como sustancias aisladas o como mezclas, y numerosos estudios epidemiológicos y clínicos han vinculado el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, con una menor incidencia y mortalidad de enfermedades cardiovasculares (Almeida *et al.*, 2011).

La regulación sanitaria permite que los productos industrializados a base de plantas puedan ser medicamentos o suplementos alimenticios. Ambos productos se presentan en diferentes formas farmacéuticas y en combinación con vitaminas, minerales y otros compuestos (Fрати-Munari *et al.*, 2005). En la Tabla 1 se muestran los criterios empleados para definir las categorías de los productos que contienen derivados de plantas; la inclusión y definición de requisitos sanitarios se definen considerando su propósito o indicación, el contenido del producto, y en las evidencias de seguridad y eficacia (Fрати-Munari *et al.*, 2005).

De acuerdo a la Ley General de Salud (2013), los medicamentos herbolarios poseen evidencias científicas de su utilidad para el alivio, curación, prevención o recuperación de padecimientos; se formulan a base de preparados estandarizados con objeto de que se pueda confiar en que la concentración de la parte activa de la planta en el medicamento sea la misma en las distintas unidades y lotes de producción.

Por otra parte, los remedios herbolarios pueden o no tener extractos estandarizados y se emplean como auxiliares terapéuticos en el alivio sintomático de determinados padecimientos, tomando como base el conocimiento popular o tradicional. Del mismo modo, los suplementos alimenticios pueden o no tener extractos estandarizados, pero sólo complementan o incrementan la ingesta dietética total. De lo anterior, se desprende que: un medicamento herbolario no es alimento, un remedio no está dirigido a curar un padecimiento y un suplemento alimenticio no tiene acción terapéutica o rehabilitadora (Fрати-Munari *et al.*, 2005; Ley General de Salud, 2013).

**Tabla 1.** Elementos de clasificación de productos a base de plantas.

<b>Característica</b>	<b>Medicamento herbolario</b>	<b>Remedio herbolario</b>	<b>Suplemento alimenticio</b>
<b>Finalidad</b>	Prevención, terapéutica, rehabilitación	Auxiliar, terapéutico, alivio sintomático	Incrementar o suplementar algún componente de la dieta. Contribuir a la prevención. Efecto benéfico para la salud
<b>Plantas</b>	Derivados estandarizados de plantas medicinales.	Plantas medicinales o sus derivados *	Plantas o sus derivados *
<b>Vitaminas y minerales</b>	Vitaminas, Minerales †	-	Vitaminas, minerales**
<b>Otros nutrientes</b>	No	No	Si
<b>Fármacos</b>	No	No	No
<b>Evidencias de Seguridad</b>	Demostrada	Demostrada o con información suficiente (uso documentado)	Demostrada o con información suficiente
<b>Eficacia</b>	Demostrada	Uso documentado	No necesaria

\* Excepto plantas con toxicidad, efectos adversos o interacciones importantes.

\*\* Concentración según tablas publicadas por la Secretaría de Salud.

† El artículo 67 del *Reglamento de Insumos para la Salud* asienta que “No se consideran medicamentos herbolarios aquellos que estén asociados a principios activos aislados y químicamente definidos”, por lo tanto las vitaminas y minerales no podrían formar parte de ellos. Sin embargo, la evaluación de los productos que contienen tanto vitamínicos como herbolarios es más adecuada si se realiza como herbolarios.

Fuente: Frati-Munari *et al.*, 2005.

## 2.6. Formas farmacéuticas para los productos elaborados a base de plantas

De acuerdo con las definiciones descritas por la Ley General de Salud (2013), tanto un medicamento herbolario como un suplemento alimenticio, tienen que presentarse en una forma farmacéutica que permita su administración por vía oral, con la necesidad de que los pacientes sean conscientes de su consumo. Además, hay una tendencia creciente de demanda de productos a base de hierbas en múltiples formas y combinaciones de empaquetado que permiten su distribución y su aceptación (Vargas-Murga *et al.*, 2011).

Sin embargo, en la formulación farmacéutica de productos a base de plantas deben ser consideradas no solamente la solubilidad y la estabilidad de los principios activos, sino también las características de los componentes secundarios de los extractos, como, por ejemplo, la higroscopicidad o la baja solubilidad (Sharapin y Pinzón, 2000).

### **2.6.1. Formas farmacéuticas sólidas de administración oral**

Un medicamento se define como “toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tengan efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas” (Ley General de Salud, 2013).

Así mismo, una forma farmacéutica es la disposición individualizada a que se adaptan los fármacos y excipientes o vehículos para constituir un medicamento con la finalidad de facilitar su administración, donde el fármaco es la sustancia (natural o sintética) que posee actividad farmacológica; y los excipientes son los componentes que no tienen actividad farmacológica y cuya función es la de facilitar la administración del fármaco y brindarle estabilidad física, química y biológica. En el caso de los vehículos, éstos son soportes compuestos por uno o más excipientes, de las sustancias activas en una preparación líquida (Alpízar y Hernández, 2009).

#### **2.6.1.1. Polvos**

Entre las formas farmacéuticas sólidas, los polvos son la forma de dosificación más simple y también son la base de muchas otras formas farmacéuticas, como tabletas, cápsulas, etc. Muchos de los fármacos y excipientes se encuentran en forma de polvo antes de ser procesados. Los polvos son partículas finas resultado de la reducción de materiales secos, compuestos de partículas de 0.1 a 10 micras desde el punto de vista farmacéutico. Fueron originalmente diseñados como una forma conveniente de administrar fármacos de origen vegetal (raíces, hojas, maderas) (Alpízar y Hernández, 2009).

Los polvos para uso oral son preparaciones constituidas por partículas sólidas, libres, secas y más o menos finas. Contienen uno o más principios activos, con adición o no de excipientes (Real Farmacopea Española, 2002). La presentación en forma de polvo permite que los fármacos sean reducidos a un tamaño de partícula fino, lo cual, frecuentemente aumenta la actividad terapéutica por un incremento en su velocidad de disolución y/o absorción. (Alpízar y Hernández, 2009).

#### **2.6.1.2. Granulados**

Los granulados son preparaciones constituidas por agregados sólidos y secos de partículas de polvo, las cuales son suficientemente resistentes para permitir su manipulación. Los granulados pueden ingerirse como tales, formularse en preparaciones masticables, o pueden disolverse en agua o en otros líquidos apropiados antes de ser administrados. Los granulados contienen uno o más principios activos, con o sin excipientes (Real Farmacopea Española, 2002). Se pueden distinguir varios tipos de granulados: granulados efervescentes, que deben disolverse en agua antes de su administración; granulados recubiertos, que son constituidos por gránulos recubiertos de una o más capas de mezclas de excipientes; y granulados gastroresistentes, los cuales son de liberación retardada y resisten la acción del jugo gástrico para liberar el principio activo en el líquido intestinal (Real Farmacopea Española, 2002).

#### **2.6.1.3. Tabletas**

Las tabletas son formas farmacéuticas de dosificación única, preparadas por moldeo o compresión, y que contienen los principios activos y excipientes (Alpízar y Hernández, 2009). Poseen las ventajas de tener exactitud en la dosis administrada, son de fácil transporte y administración, además de fácil identificación. Sin embargo, también presentan desventajas como: la imposibilidad de administrarse a personas en estado de inconsciencia, se pueden presentar problemas de biodisponibilidad para algunos principios activos y se presentan dificultades al momento de preparar principios activos higroscópicos (Alpízar y Hernández, 2009).

Las tabletas se obtienen aglomerando por compresión un volumen constante de partículas, las cuales están constituidas por uno o más principios activos, a los que se les puede añadir excipientes tales como diluyentes, aglutinantes, disgregantes, deslizantes, lubricantes; sustancias capaces de modificar el comportamiento del preparado en el tracto digestivo (Real Farmacopea Española, 2002). En la fabricación de tabletas, se toman medidas para garantizar que posean una resistencia mecánica suficiente para permitir las diversas manipulaciones, sin desmenuzarse ni romperse. Además, se deben de tomar en cuenta medidas adecuadas para garantizar su calidad microbiológica (Alpízar y Hernández, 2009).

#### **2.6.1.4. Cápsulas**

Las cápsulas son formas farmacéuticas sólidas de dosificación única, versátiles, ya que permiten la administración de polvos, granulados, suspensiones, tabletas y soluciones; los cuales se encuentran contenidos en una cubierta de gelatina blanda o dura. Entre las ventajas de las cápsulas se encuentran su facilidad para ser transportadas y administradas, son atractivas a los consumidores, requieren un número reducido de excipientes, además de enmascarar los olores y sabores desagradables. Las cápsulas también poseen desventajas, ya que son sensibles a la humedad, son susceptibles a la contaminación microbiana y no pueden ser administradas a pacientes inconscientes ni a bebés (Alpízar y Hernández, 2009).

Las cubiertas de las cápsulas son de gelatina u otras sustancias, cuya consistencia puede adaptarse por adición de sustancias como glicerol o sorbitol. También pueden añadirse otros excipientes, tales como tensoactivos, conservantes antimicrobianos y edulcorantes. Las cápsulas duras son cápsulas de dos piezas, formadas por dos elementos, el de mayor tamaño llamada cuerpo que se desliza en el interior de la tapa o cabeza de menor tamaño. Por otro lado, las cápsulas de gelatina blanda, se forman por una cubierta de gelatina blanda y globulosa más gruesa que las cápsulas de gelatina dura. La diferencia esencial entre las cápsulas de gelatina dura y de gelatina blanda es que las segundas presentan una costura en el punto de cierre de las dos mitades y el contenido puede ser un líquido una pasta o un polvo (Alpízar y Hernández, 2009).

## **2.6.2. Formas farmacéuticas líquidas de administración oral**

Las preparaciones líquidas para uso oral son normalmente disoluciones, emulsiones o suspensiones que contienen uno o más principios activos en un vehículo apropiado. Algunas preparaciones para uso oral se elaboran por dilución de preparaciones líquidas concentradas, o a partir de polvos destinados a la preparación de disoluciones o suspensiones para uso oral, utilizando un vehículo apropiado. El vehículo empleado en las preparaciones líquidas se elige teniendo en cuenta la naturaleza del principio activo y las características organolépticas apropiadas para el uso al que se destina la preparación (Real Farmacopea Española, 2002).

Las preparaciones líquidas pueden contener conservantes antimicrobianos, agentes dispersantes, de suspensión, espesantes, emulsionantes, tampones, humectantes, solubilizantes, estabilizantes, aromatizantes y edulcorantes (Real Farmacopea Española, 2002). Una de las ventajas de las formas farmacéuticas líquidas es que son más fáciles de ingerir que las sólidas; además, el fármaco ya se encuentra disuelto y disponible para su absorción, logrando una respuesta terapéutica más rápida. La principal desventaja de estas formas de dosificación es que poseen menor estabilidad química, biológica, apartando el hecho de que son más susceptibles a la contaminación microbiana (Gennaro, 2003).

### **2.6.2.1. Disoluciones**

Son formas farmacéuticas constituidas por uno o más principios activos disueltos en un vehículo adecuado. La disolución consiste en dividir una sustancia al estado molecular en el seno de un líquido formando una fase única, homogénea, que se denomina “solución”; la cual se dosifica volumétricamente. Un factor importante a tomar en cuenta es la solubilidad del fármaco que se disolverá en el vehículo. Algunos tipos de soluciones empleadas como formas farmacéuticas son los jarabes y los elixires. Los primeros son soluciones con una alta concentración de sacarosa (entre 45 y 85% p/p) que se dosifican volumétricamente. Los elixires son soluciones que contienen azúcar en menor concentración y diferentes porcentajes de alcohol para favorecer la solubilidad de algunos principios activos (Remington, 2006).

### **2.6.2.2. Emulsiones**

Una emulsión consiste en un sistema de dos fases preparado por la combinación de dos líquidos inmiscibles, en que glóbulos pequeños de un líquido (principio activo) son dispersos uniformemente a través de otro líquido (vehículo). El líquido que es dispersado en pequeñas gotas es llamado fase discontinua. El otro líquido es llamado fase continua. Las emulsiones, como sistemas dispersos, son termodinámicamente inestables, por lo que en reposo las fases tienden a separarse, por lo que deben reconstituirse mediante agitación (Remington, 2006).

### **2.6.2.3. Suspensiones**

Las suspensiones son sistemas de dos fases constituidas por un material insoluble disperso en un vehículo apropiado de consistencia líquida y viscosidad variable. Las suspensiones pueden presentar un sedimento que es rápidamente dispersable por agitación, dando una suspensión lo bastante estable para permitir la administración de la dosis correcta. Así, si el principio activo es poco soluble, una suspensión puede ser la forma farmacéutica más adecuada. La consideración más importante para tomar en cuenta en la formulación de una suspensión es el tamaño de partícula del principio activo, la cual no debe sobrepasar los 50  $\mu\text{m}$  (Remington, 2006).

## **2.7. Elaboración de polvos para formas farmacéuticas**

Los polvos, como la forma de dosificación más simple, son la base de muchas otras formas farmacéuticas incluyendo tabletas, cápsulas y suspensiones (Alpizar y Hernández, 2009). Durante la fabricación de polvos para uso oral se deben tomar medidas para garantizar un tamaño de las partículas adecuado para el uso pretendido. Durante los procesos de fabricación, envasado, conservación y distribución de los polvos para uso oral es necesario verificar las medidas necesarias para asegurar su calidad microbiológica y su estabilidad fisicoquímica (Remington, 2006). Entre los procesos necesarios para la elaboración de polvos se encuentran los métodos de secado, los cuales determinan en gran medida las propiedades fisicoquímicas del polvo y de la forma farmacéutica final.

### **2.7.1. Secado**

Es la operación unitaria que tiene como objetivo la separación de un líquido de un gas, un líquido o un sólido. Es una operación en la que se retira un líquido contenido en diferentes materiales, para favorecer la estabilidad física, química y microbiológica. Para lograr un correcto secado es necesario tomar en cuenta las características del material que se va a secar y el equipo que se utilizará. La operación de secado se puede monitorear mediante la pérdida de peso del material, que se traduce en la pérdida de humedad del mismo. En términos generales, el secado pasará por diferentes etapas: una etapa de precalentamiento (corta), una segunda etapa donde la velocidad de secado es uniforme (a temperatura y velocidad de secado constante) que se conoce como secado primario y posteriormente se pasa a una etapa de velocidad de secado decreciente o secado secundario (Alpizar y Hernández, 2009).

#### **2.7.1.1. Secado por liofilización**

La liofilización es un método de desecación en el que se elimina agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío (Alpizar y Hernández, 2009). La principal ventaja de este método es la producción de sustancias con buena estabilidad de conservación, debido al uso de temperaturas bajas, lo que evita la degradación de compuestos susceptibles a la temperatura y, por tanto, su calidad sensorial y nutricional (Oetjen y Haseley, 2004; Mujumdar, 2007). Además, la humedad residual es baja impidiendo el desarrollo de microorganismos. Entre las desventajas de esta metodología encontramos su alto costo financiero y energético, además del elevado tiempo de proceso (Ramírez Navas, 2006; Domínguez, 2011).

#### **2.7.1.2. Secado por convección de aire**

El secado por convección se realiza mediante la utilización del calor sensible del fluido (aire) que está en contacto directo con el material a secar para proporcionar el calor de vaporización del líquido (Alpizar y Hernández, 2009; Domínguez, 2011).

Dentro del equipo de secado, el aire es movido por las diferencias de temperatura entre las distintas partes del equipo, lo cual promueve la convección térmica del aire (Alpizar y Hernández, 2009; Domínguez, 2011). La ventaja principal de este tipo de secado es el alto rendimiento que se obtiene del producto seco (Kaur y Chaudhuri, 2012); sin embargo, su principal desventaja es la falta de uniformidad durante el proceso de calentamiento, es decir, la temperatura no se distribuye de manera uniforme en el material a secar debido a las condiciones de flujo de aire (Marra *et al.*, 2010).

### **2.7.2. Utilización de aditivos**

El proceso de secado aplicado a materiales alimenticios, como los frutos, se enfrenta a retos importantes a causa de las bajas tasas de recuperación de los secadores. Esto es debido a que son materiales ricos en azúcares de bajo peso molecular, a los cuales se les atribuyen las propiedades higroscópicas y termoplásticas de la misma materia prima. Como resultado, cuando se eleva la temperatura de estos materiales sobre su temperatura de transición vítrea ( $t_g$  - temperatura a la que un sistema amorfo cambia desde el vítreo al estado gomoso) se vuelven pegajosos y forman aglomerados que se quedan adheridos a las paredes del equipo de secado (Bhandari y Howes, 1999; Adhikari *et al.*, 2003a; Adhikari *et al.*, 2004; Kurozawa *et al.*, 2009; Wang y Langrish, 2009).

Una de las opciones para evitar este problema de pegajosidad es la utilización de aditivos con alto peso molecular y una alta temperatura de transición vítrea, tales como maltodextrinas, gomas, pectinas, silicato de calcio, entre otros. Esto con el fin de elevar la temperatura de transición vítrea global de la materia prima y disminuir su pegajosidad (Gabas *et al.*, 2007; Kurozawa *et al.*, 2009; Wang y Langrish, 2009). Estos aditivos necesitan formar una película fina y suave en la superficie para ser eficaz, de manera que el componente con una alta temperatura de transición vítrea forma una capa protectora alrededor de los materiales con temperaturas de transición vítrea inferiores (Wang y Langrish, 2009).

### **2.7.2.1. Maltodextrina**

Las maltodextrinas son polímeros de glucosa obtenidos a partir del almidón mediante hidrólisis ácida o enzimática. Consisten en unidades  $\beta$ -D-glucosa unidas principalmente por enlaces glucosídicos (1 – 4) y, por lo general, se clasifican de acuerdo a su equivalente de dextrosa (DE). El DE se refiere al grado de polimerización de una maltodextrina, determina su capacidad de reducción y está inversamente relacionada con su peso molecular medio (Adhikari *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2007; Gabas *et al.*, 2009).

Una dextrina es un producto obtenido por despolimerización de un polisacárido; maltodextrina es un prefijo utilizado con productos derivados de almidón (Bemiller y Whistler, 2003). Las maltodextrinas son ampliamente utilizadas en materiales que son difíciles de secar (tales como zumos de frutas, endulzantes, aromas), para reducir la pegajosidad y los problemas de aglomeración, mejorando así la estabilidad del producto; además de la solubilidad y las propiedades organolépticas de los mismos (Gabas *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007).

### **2.7.2.2. Etanol**

El etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) es un compuesto alifático de bajo peso molecular que es ligeramente soluble en lípidos y totalmente miscible en agua (Oliveira *et al.*, 2010). Este compuesto es bien aceptado en la industria alimentaria y es reconocido como seguro por la FDA (Food and Drug Administration, 2013). Estudios recientes han demostrado que la adición de etanol a los procesos de secado disminuye en gran medida el tiempo de secado, esto debido a que el etanol promueve que la evaporación del agua sea más intensa (Braga *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012); ya sea implementándolo al proceso de secado o utilizándolo como un pre-tratamiento de las muestras a secar (Funebo *et al.*, 2002; Wuttipalakorn *et al.*, 2009). Se ha observado que el uso de una atmósfera modificada con etanol en el secado convectivo da como resultado un producto de mejor calidad con una mayor retención de compuestos volátiles (Braga *et al.*, 2010).

## **2.8. Desarrollo por nuestro grupo de trabajo de una forma farmacéutica en forma de tableta de gel a partir del fruto liofilizado de *P. serotina***

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se propuso el desarrollo de un suplemento alimenticio con efectos vasodilatador y antioxidante a partir del fruto liofilizado de *P. serotina*. En primer término, se determinaron las características fisicoquímicas, microbiológicas y nutricionales del fruto fresco a fin de establecer las condiciones óptimas para el proceso de secado. En ese proyecto se eligió el secado por liofilización, con el objeto de evitar la aplicación de calor al fruto de *P. serotina*, lo cual permitiría garantizar la estabilidad química de los compuestos responsables de los efectos antioxidante y vasodilatador. Las propiedades fisicoquímicas y fisicomecánicas del liofilizado determinarían la mejor forma farmacéutica para el producto. Las posibles formas farmacéuticas que se consideraron fueron: a) comprimidos, elaborados mediante compresión directa de una mezcla del liofilizado con excipientes adecuados y b) cápsulas de gelatina blanda, llenadas con una formulación que contuviera el liofilizado del fruto.

Se evaluaron experimentalmente las características fisicomecánicas y de humedad del fruto liofilizado de *P. serotina* y los parámetros determinados fueron: densidad a granel, densidad de empaçado, índice de compresibilidad, relación de Hausner e higroscopicidad. En estos análisis se obtuvieron valores de  $0.173 \pm 0.04$  g/mL para la densidad a granel y de  $0.266 \pm 0.671$  g/mL para la densidad de empaçado. Se obtuvo un valor de 34.9 para el índice de compresibilidad, lo cual es un valor que se califica como “Muy pobre”. Para la relación de Hausner se obtuvo un valor de 1.53, el cual es un valor “Alto” tomando como referencia que el índice de compresibilidad mínimo en un polvo compresible debe ser menor a 1.25 (Zea *et al.*, 2012). Por otra parte, la absorción máxima de humedad del liofilizado de *P. serotina* a temperatura ambiente fue del 4.4 % en 3 días y presentó una ganancia de humedad del 2.9 % en tan solo un día; esta ganancia de humedad es muy alta, lo que revela que el liofilizado de *P. serotina* posee una alta higroscopicidad. Los resultados obtenidos respecto a los parámetros fisicomecánicos del fruto liofilizado de *P. serotina* indicaron que éste no presenta las características adecuadas para someterse a procesos de compresión, razón por la cual se descartó el desarrollo de una tableta.

Adicionalmente, debido a la alta higroscopicidad del liofilizado, su incorporación en cápsulas blandas resultaba poco recomendable, ya que la capacidad higroscópica del material puede acarrear la pérdida de la integridad de la cápsula, considerando que ésta es de gelatina, la cual es susceptible de perder sus propiedades físicas originales.

Dados estos resultados, fue necesario buscar una nueva forma farmacéutica que se adaptara a las condiciones fisicomecánicas y de humedad del liofilizado de *P. serotina*. Por esta razón se planteó la elaboración de una forma farmacéutica de tableta de gel, ya que esta formulación presenta ventajas apropiadas para materias primas altamente higroscópicas, entre las cuales están: el uso de agua como ingrediente principal, lo cual posibilita una mayor estabilidad y el empleo de un número limitado de excipientes. La formulación propuesta para una tableta de gel de 3.5 g fue la siguiente: agua (46.2%), glicerina (23.8%) grenetina (30%), sorbato de potasio (0.01%) y liofilizado del fruto de *P. serotina* (1.75 mg). Se preparó un lote control de 20 tabletas de gel y se llevaron a cabo algunas pruebas de control de calidad, que incluyeron: acortamiento, variación de peso, contenido de humedad y apariencia.

Sin embargo, la elaboración de la tableta de gel a partir del fruto liofilizado de *P. serotina* presentó varias desventajas. Por una parte, el empleo de un método de secado que resulta caro, tardado y poco práctico para la elaboración de grandes lotes de la forma farmacéutica, ya que se requiere de un equipo que no se encuentra fácilmente disponible en laboratorios o industrias que elaboran suplementos alimenticios. Por otra parte, el proceso de elaboración es relativamente complicado, ya que la mezcla de los ingredientes requiere de una agitación continua, durante la cual es necesario que se mantenga una temperatura constante de 40 °C. Más aún, el vaciado de la mezcla en los respectivos moldes también debe realizarse a la misma temperatura, ya que una disminución térmica provoca la solidificación prematura, lo cual dificulta el llenado de los moldes y no permite una distribución homogénea. Esto repercute significativamente en una variación en el peso de la tableta. Finalmente, las tabletas de gel, debido a su alto contenido de humedad tienen la tendencia a presentar poca estabilidad y requieren la adición de conservadores y el uso de empaques herméticos que impidan la contaminación microbiana.

Por estos motivos es recomendable buscar métodos alternativos de secado para el fruto fresco de *P. serotina* y excipientes que ayuden a mejorar las propiedades fisicomecánicas del fruto seco a fin de proponer una forma farmacéutica sólida que garantice la estabilidad química, farmacológica y nutricional de los compuestos nutraceuticos contenidos en este fruto.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el incremento descontrolado de la densidad demográfica y los malos hábitos alimenticios, aunados al ritmo de vida estresante de las sociedades modernas han contribuido en gran medida al incremento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas. En el caso particular de México, datos epidemiológicos realizados durante las últimas décadas indican que las enfermedades cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de muerte (Velázquez *et al.*, 2007; Romano *et al.*, 2013). Entre estas enfermedades destaca la hipertensión, la cual tiene una incidencia creciente debido al aumento de factores de riesgo en nuestra sociedad (Meaney *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2010).

Actualmente, aunque existen en el mercado más de 200 fármacos para tratar la hipertensión arterial, menos de un tercio de los casos clínicos son tratados exitosamente, debido a que dichos fármacos presentan una baja efectividad y diversos efectos adversos (Cogolludo *et al.*, 2005). En este contexto, resulta evidente la necesidad de buscar nuevas fuentes naturales de compuestos bioactivos, que puedan utilizarse en la prevención o como coadyuvantes para los tratamientos de esta enfermedad, mejorando el desempeño fisiológico del organismo.

Una de las especies vegetales, cuyo uso en la medicina tradicional y consumo de sus frutos por la población mexicana indican su gran potencial nutracéutico es *Prunus serotina*. Su corteza, hojas, inflorescencias y frutos se utilizan para tratar padecimientos cardíacos, pulmonares e intestinales. Por otra parte, los frutos se consumen crudos, en conserva, como ingrediente de tamales, o en licores y bebidas frescas (Martínez, 1991). En el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales se inició el estudio nutrimental y la caracterización química y farmacológica de los compuestos bioactivos presentes en los frutos del capulín (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2010; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Se encontró que estos frutos son una fuente relativamente rica de carbohidratos, fibra, potasio y proteínas (Bárceñas, 2011). Se demostró también que los frutos de *P. serotina* contienen metabolitos secundarios que poseen una elevada capacidad antioxidante y un significativo efecto vasodilatador (Villa-De la Torre *et al.*, 2010; Chávez, 2012; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

La capacidad antioxidante se atribuye en gran medida a la presencia de compuestos fenólicos, tales como el ácido clorogénico, el ácido gálico, el ácido caféico, la catequina, la epicatequina y glucósidos de quercetina y kaempferol. En tanto que entre los metabolitos responsables del efecto vasodilatador se encuentran flavonoides, compuestos aromáticos sencillos y terpenos (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2009; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Adicionalmente, en experimentos realizados *in vivo*, se encontró que la administración por vía oral del extracto acuoso preparado a partir de los frutos de *P. serotina* provoca una disminución significativa en la presión arterial sistólica de ratas hipertensas. Sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre la presión arterial de ratas normotensas (Uribe, 2011). Finalmente, ensayos pre-clínicos de toxicidad indicaron que el extracto acuoso de los frutos de *P. serotina* no es tóxico (Bárcenas, 2011; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo han indicado que los frutos de *P. serotina* poseen un gran valor nutracéutico, cuyo consumo es seguro y aporta una importante cantidad de compuestos antioxidantes y vasodilatadores que pueden ser utilizados en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión arterial. Desafortunadamente, la temporada en que fructifica el árbol de *P. serotina* es muy corta y sólo comprende los meses entre mayo y agosto (Calderón y Rzedowski, 2005). Por este motivo sólo se puede contar con un abasto limitado del fruto, el cual se comercializa principalmente en mercados urbanos del Distrito Federal, el Estado de México, Puebla y Michoacán.

Con base en los antecedentes planteados, nuestro laboratorio se propuso el desarrollo de una forma farmacéutica elaborada a partir del fruto liofilizado de *P. serotina*, cuyas propiedades benéficas en el tratamiento y/o prevención de enfermedades cardiovasculares han sido demostradas científicamente por nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, considerando las propiedades fisicoquímicas y fisicomecánicas del liofilizado, solo fue posible proponer la formulación para una tableta de gel que presenta poca estabilidad y varios problemas en el proceso de su elaboración, incluyendo el alto costo del proceso de liofilización.

Considerando estos antecedentes, en esta tesis se evaluó el efecto del secado por convección de aire a diferentes temperaturas sobre las actividades antioxidante y vasodilatadoras del fruto de *P. serotina* adicionado con maltodextrina y etanol. Los resultados de estos análisis servirán para proponer una metodología para la obtención de una materia prima adecuada para la elaboración de una forma farmacéutica sólida. Adicionalmente, se determinó un marcador químico adecuado y se desarrolló un método analítico para su identificación y cuantificación, el cual podrá emplearse en las pruebas de control de calidad de los productos elaborados a partir del fruto de *P. serotina*.

#### **4. HIPÓTESIS**

El método de secado por convección no afecta la composición química, ni los efectos antioxidante y vasodilatador del fruto de *P. serotina*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Analizar el efecto de diferentes temperaturas de secado por convección sobre la composición química y los efectos antioxidante y vasodilatador del fruto de *P. serotina* y desarrollar un método analítico para la cuantificación del marcador químico del mismo fruto.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto del proceso de liofilizado sobre el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y las actividades antioxidantes y vasodilatadoras del fruto de *P. serotina*.
2. Analizar el efecto de diferentes temperaturas de secado por convección sobre el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides del fruto de *P. serotina* adicionado con maltodextrina o etanol.
3. Determinar el efecto de diferentes temperaturas de secado por convección sobre las actividades antioxidante y vasodilatadora inducidas por el fruto de *P. serotina* adicionado con maltodextrina o etanol.
4. Determinar el compuesto marcador químico del fruto de *P. serotina*.
5. Desarrollar el método analítico para cuantificar el compuesto marcador químico del fruto de *P. serotina*, que será utilizado en las pruebas de control de calidad de productos elaborados a partir de este fruto.
6. Validar el método analítico desarrollado para la cuantificación del compuesto marcador químico del fruto de *P. serotina*.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Especímenes biológicos**

#### **6.1.1. Material vegetal**

El fruto de *P. serotina* fue recolectado en estado maduro directamente de huertos localizados en Santa María Atexcac, municipio de Huejotzingo, Puebla. El fruto se lavó con agua destilada para posteriormente secarse con papel absorbente y guardarse en bolsas de plástico de cierre hermético, las cuales fueron etiquetadas y almacenadas en congelación a -70 °C hasta el momento de su utilización. Se realizaron dos recolectas del fruto durante los meses de mayo y junio: la primera en el año 2013 y la segunda en el año 2014.

#### **6.1.2. Animales**

Para los ensayos farmacológicos, se utilizaron ratas de la cepa Wistar, machos, de entre 250 y 300 g de peso, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

### **6.2. Secado del fruto fresco de *P. serotina***

Se prepararon diferentes muestras del fruto fresco de *P. serotina* recolectado en el 2013 para ser sometidas al proceso de secado por dos métodos: liofilización y secado por convección.

#### **6.2.1. Secado por liofilización**

Los frutos frescos de *P. serotina* se fragmentaron para extraerles las semillas; luego, se pesó la piel y la pulpa del fruto, las cuales se congelaron durante un tiempo de 48 horas. Posteriormente, éstas se colocaron en la liofilizadora (Labconco 7522900), a una temperatura de  $-47 \pm 2$  °C y a un vacío de  $168 \times 10^{-3}$  mbar. El periodo de liofilización duró 10 días aproximadamente.

## **6.2.2. Tratamiento de los frutos frescos de *P. serotina* con la adición de maltodextrina o etanol para someterlos al proceso de secado por convección**

### **6.2.2.1. Tratamiento de los frutos con maltodextrina**

Se preparó una muestra de 100 g del fruto de *P. serotina*, conteniendo 10 % (p/p) de maltodextrina con un Equivalente de Dextrosa de 4-7 (DE). Adicionalmente, se preparó una muestra de 100 g de este fruto con un contenido del 20 % (p/p) de maltodextrina con el mismo DE. Para homogenizar ambas muestras (por separado), éstas fueron sometidas a molienda por 2 minutos en un procesador de cizalla (BLENDA modelo BL-200).

### **6.2.2.2. Tratamiento de los frutos con etanol**

A 100 g del fruto de *P. serotina*, se les adicionaron 200 ml de etanol grado 96% con una relación 1:2 (p/v). A otra muestra de 100 g de fruto, se le adicionaron 100 ml de etanol para tener una relación 1:1 (p/v). Ambas muestras se trituraron en un molino de cuchillas (Osterizer modelo ZGL-2) durante 3 minutos. Este material se vertió en charolas de teflón y se deshidrató por arrastre de aire a una velocidad de 2.14 m/s con un ventilador (MASTER CRAFT modelo MU-16) en un cuarto oscuro hasta eliminar el alcohol.

### **6.2.3. Secado por convección**

Las muestras de fruto preparadas con los aditivos se deshidrataron en un horno por convección a diferentes temperaturas (60, 70, 80 y 90 °C), de manera independiente, hasta que alcanzaron una humedad de  $6 \pm 0.12$  %.

Todas las muestras obtenidas del secado por convección y por liofilización fueron guardadas en tubos Falcon de 45 ml, los cuales se sellaron con parafilm y se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación a causa de la luz. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

### **6.3. Determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante**

#### **6.3.1. Preparación de los extractos**

Los extractos utilizados para la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante se elaboraron siguiendo el método de Kähkönen *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de cada una de las muestras obtenidas a partir de los procesos de secado, y se les añadieron (por separado) 10 ml de una solución conteniendo 80% de metanol y 2% de ácido fórmico (solución de extracción). Se homogenizó la muestra durante 30 segundos en un vortex, para luego ser sometidas a un baño ultrasónico durante 30 minutos.

Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 12,300 rpm con una temperatura de 4 °C en una centrífuga Hermle modelo Z323 K (Labortechnik Technologies, Germany). Pasado este tiempo, se colocó el sobrenadante en otro recipiente y se guardó en refrigeración. A la pastilla sobrante, se le añadieron 10 ml de la solución de extracción y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones durante 15 minutos. Se juntaron los sobrenadantes obtenidos y se filtraron; se registró el volumen final obtenido de cada una de las muestras.

#### **6.3.2. Determinación de fenoles totales**

La determinación de los compuestos fenólicos totales se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu (modificado de Singleton y Rossi, 1965). Las muestras se analizaron en microplacas de 96 pocitos; a los pocitos se les agregaron 150 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 en agua destilada, 30 µl de los extractos de las muestras problema y 120 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico en las siguientes concentraciones (mg/ml): 0.00, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 y 0.24. Las muestras se dejaron incubar durante 2 horas en oscuridad. Pasado ese tiempo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-RAD, Benchmark Plus). Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por gramo de peso seco (g dps).

### **6.3.3. Determinación de flavonoides**

La determinación de los flavonoides se realizó mediante el método de Zhishen (1999) modificado por Xu y Chang (2007). Las muestras se prepararon en tubos Eppendorf, a los cuales se les agregaron 100  $\mu$ l de los extractos de las muestras problema, 400  $\mu$ l de agua destilada y 30  $\mu$ l de NaNO<sub>2</sub> al 5%, dejando reposar por 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 30  $\mu$ l de AlCl<sub>3</sub> al 10% y se dejó reposar por 1 minuto más. Enseguida se agregaron 200  $\mu$ l de NaOH 1 M y 240  $\mu$ l de agua destilada. Se realizó una curva de calibración con ( $\pm$ )-catequina en las concentraciones siguientes (mg/ml): 0.018, 0.037, 0.075, 0.150, 0.300, 0.600 y 1.200. De las muestras preparadas, se depositaron 300  $\mu$ l en los pocitos de una microplaca de 96 pozos. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-RAD, Benchmark Plus). Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de ( $\pm$ )-catequina (mg CAT) por gramo de peso seco (g dps).

### **6.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH**

Para la realización del ensayo DPPH, se empleó el método descrito por Kuskoski *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) a una concentración de 100  $\mu$ M en metanol. Esta solución se estandarizó a una absorbancia de 1.0 (diluyendo con metanol). Las muestras se analizaron en una microplaca de 96 pocitos: en cada pocito se agregaron 280  $\mu$ l de la solución del reactivo DPPH (absorbancia = 1.0) y 20  $\mu$ l de los extractos de las muestras problema. Se realizó una curva de calibración con Trolox, empleando las concentraciones siguientes (mg/ml): 0.00, 0.05, 0.08, 0.11, 0.14, 0.17, 0.20 y 0.23. Las muestras se dejaron incubar durante 30 minutos en la oscuridad. Pasado ese tiempo, se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-RAD, Benchmark Plus). Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de Trolox (mg Eq de Trolox) por gramo de peso seco (g dps).

### 6.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo FRAP

El ensayo FRAP se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo FRAP mediante la combinación de una solución buffer (acetato de sodio y ácido acético [0.2 M], con pH de 3.7), una solución de 20 mM FeCl<sub>3</sub> y una solución de reactivo TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM. Las muestras se analizaron en una microplaca de 96 pocitos: a los pocitos se les agregaron 280 µl de la solución del reactivo FRAP y 20 µl de los extractos de las muestras problema. Se realizó una curva de calibración con Trolox con las concentraciones siguientes (mg/ml): 0.000, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800 y 1.600. Las muestras se dejaron incubar durante 30 minutos en oscuridad. Pasado ese tiempo, se leyó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-RAD, Benchmark Plus). Los resultados obtenidos se expresaron en miligramos equivalentes de Trolox (mg Eq de Trolox) por gramo de peso seco (g dps).

### 6.3.6. Cálculo para la determinación de las concentraciones a partir de las curvas de calibración

La determinación del contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y la capacidad antioxidante se realizó con base en la ecuación de la recta que se obtuvo en cada una de las curvas de calibración obtenidas para cada análisis, empleando la siguiente ecuación:

$$Y = mX + b$$

Donde:

Y = Absorbancia de la muestra procesada

m = Pendiente de la recta en la curva de calibración (coeficiente de absortividad)

b = Ordenada al origen

X = Concentración de la muestra procesada

Se despeja la X en la ecuación para obtener el resultado de la determinación en mg/ml de extracto preparado. Este resultado se convierte a mg/g de muestra a través de la siguiente fórmula:

$$\text{mg/g} = \frac{(\text{mg/ml}) (\text{Volumen del extracto})}{\text{g de muestra}}$$

#### 6.4. Determinación del efecto vasodilatador

Todos los experimentos farmacológicos fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de entre 250 y 300 g de peso, las cuales fueron sacrificadas por decapitación.

La evaluación farmacológica de las muestras secas del fruto de *P. serotina* se llevó a cabo mediante el ensayo de aorta aislada de rata descrito por Ibarra-Alvarado *et al.* (2010). Se extrajo la aorta torácica y se colocó en una solución fría de Krebs-Henseleit con la siguiente composición: 5 mM D-glucosa, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 126.8 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> y manteniendo un pH de 7.4. Posteriormente, se hizo pasar por la aorta solución de Krebs-Henseleit para evitar la formación de coágulos. Se procedió a remover el tejido adiposo y conectivo de la aorta para finalmente cortarla en anillos de 3-5 mm. Los anillos de aorta fueron montados en cámaras de incubación de 7 ml con solución Krebs-Henseleit a 37 °C y burbujeo constante de una mezcla de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Los tejidos se sometieron a una tensión de reposo (basal) de 1.5 g y se dejaron estabilizar durante un periodo aproximado de 60 minutos. Durante este período, el medio del baño se cambió cada 10 minutos. Después del ajuste final a la tensión basal de 1.5 g, los segmentos de aorta se contrajeron con 150 µl de cloruro de potasio (KCl) 100 mM para sensibilizar el tejido. Se dejó estabilizar el tejido durante 30 minutos, realizando lavados cada 10 minutos. Después de restablecer la tensión basal, los tejidos se contrajeron con 50 µl de fenilefrina 1 µM. Esta contracción se definió como el 100% de la contracción provocada en el tejido analizado.

A partir de cada una de las muestras obtenidas por el secado de los frutos de *P. serotina*, se preparó un stock de 16.67 mg/ml en agua destilada para evaluarlo en un rango de concentraciones de 1 µg/ml hasta 10,000 µg/ml (1, 3, 10, 31.6, 100, 316, 1.000, 3162, 10000 µg/ml).

Transcurridos 20 minutos después de haber agregado la fenilefrina, se añadió la muestra problema a las cámaras con el tejido de aorta, iniciando con la concentración más pequeña y aumentando la concentración en intervalos de 10 minutos entre cada adición. Los cambios en la tensión del tejido de aorta se midieron por medio de un transductor de fuerza Grass Modelo FT03 unido a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7D (Grass Instrument CO. QUINCY MASS., U.S.A.). La información registrada por el polígrafo se analizó con el programa PRISMA 5.0 GraphPad Software para construir la curva concentración-respuesta, graficando el logaritmo de la concentración contra el porcentaje de relajación.

### **6.5. Determinación del compuesto marcador químico del fruto de *P. serotina***

Para la determinación del marcador químico del fruto de *P. serotina* que será utilizado en el desarrollo del método analítico para las pruebas de control de calidad, se procedió a realizar un análisis del perfil de compuestos fenólicos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector UV-visible.

#### **6.5.1. Preparación de los estándares de los compuestos fenólicos**

Se pesó 1 mg de cada uno de los estándares seleccionados para el análisis del perfil de compuestos fenólicos, los cuales fueron disueltos (por separado) en la solución de extracción empleada para la determinación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante (metanol 80% y ácido fórmico 2%), obteniendo soluciones con una concentración inicial de 1 mg/ml para cada estándar. A partir de estas soluciones se prepararon diluciones para mejorar la resolución de los cromatogramas de cada estándar. Se emplearon disolventes grado HPLC para preparar la solución de extracción. Todas las soluciones se filtraron en acrodiscos con tamaño de poro de 45 µm y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies) y fueron guardadas en viales color ámbar. Los estándares empleados fueron: ácido gálico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, ácido vainílico, procianidina B2, (-)-epicatequina, galato de epicatequina, galato de catequina, (+)-catequina, quercetina, rutina y kaemferol, todos ellos grado HPLC obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **6.5.2. Preparación de las muestras del fruto de *P. serotina* para el análisis cromatográfico**

A partir de los liofilizados obtenidos de los frutos de *P. serotina* recolectados en los años 2013 y 2014, se prepararon extractos de la misma manera que para la determinación de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante (Sección 6.3.1), empleando disolventes grado HPLC. Se realizó una hidrólisis ácida colocando 2 ml de los extractos obtenidos a partir de los frutos liofilizados de *P. serotina* en viales color ámbar, a los cuales se les adicionaron 2 ml de HCl 4 N. Las mezclas se dejaron incubar por un tiempo de 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, los extractos hidrolizados se filtraron en un acrodisco con tamaño de poro de 45  $\mu\text{m}$  y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies) para luego ser inyectados en el equipo de HPLC.

### **6.5.3. Condiciones para el análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos**

El análisis de los compuestos fenólicos se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca WATERS 600E equipado con un detector Ultravioleta-Visible (UV-VIS) de arreglo de fotodiodos (WATERS modelo 2998), con un rango de detección de 190 a 800 nm. Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (fase reversa) con un tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$  (150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno). El volumen de inyección tanto de los estándares como de las muestras problema fue de 20  $\mu\text{l}$ . La elución se realizó con un gradiente de ácido fórmico (2%) y acetonitrilo (100%) (Tabla 2) con flujo de 0.8 ml/min y un tiempo de corrida de 40 minutos, registrando la detección a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm, con una resolución de 1.2 nm. Todos los disolventes utilizados en el análisis fueron grado HPLC.

La identificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención ( $T_r$ ) y los espectros de absorción UV-VIS de cada uno de los picos generados por los estándares con los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras del fruto de *P. serotina*.

**Tabla 2.** Gradiente utilizado para la detección de compuestos fenólicos.

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Flujo (ml/min)</i>	<i>Composición de la fase móvil</i>	
		<i>Acetonitrilo 100%</i>	<i>Ácido fórmico 2%</i>
0	0.80	5%	95 %
5	0.80	5 %	95 %
10	0.80	15 %	85 %
20	0.80	50 %	50 %
30	0.80	15 %	85 %
40	0.80	5 %	95 %

De manera adicional, se corroboró la presencia de algunos compuestos fenólicos realizando co-eluciones de las muestras analizadas (matriz de trabajo) con los estándares de referencia en una proporción 9:1 (matriz:estándar v/v).

#### **6.5.4. Selección del marcador químico**

Para la selección del marcador químico apropiado para el desarrollo del método analítico que será empleado en las pruebas de control de calidad, se consideraron los siguientes criterios: a) presencia constante del compuesto en especímenes de la especie vegetal provenientes de diferentes recolectas; b) abundancia del compuesto; c) actividad biológica del compuesto y d) contar con un método de detección y cuantificación sencillo, específico y sensible (Xin-Yue *et al.*, 2013).

A fin de obtener resultados que sirvieran como base para efectuar la determinación del compuesto marcador, se realizó el análisis del perfil de compuestos fenólicos en los extractos preparados a partir de los frutos liofilizados de *P. serotina* recolectados en los años 2013 y 2014, y se compararon estos resultados con los obtenidos a partir del análisis de frutos de *P. serotina* recolectados en el año 2012 (Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Así mismo, se evaluó la actividad vasodilatadora de dos compuestos que fueron propuestos como marcadores químicos para el fruto de *P. serotina*; siguiendo la metodología descrita en la Sección 6.4.

#### **6.5.4.1. Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina**

Se elaboró una curva de calibración para cada estándar, para esto, se pesaron 10 mg de cada estándar, los cuales se colocaron (por separado) en un matraz volumétrico de 10 ml y se disolvieron con 10 ml de la solución de extracción (metanol 80% y ácido fórmico 2%). A partir de esta solución con concentración inicial de 1 mg/ml, se realizaron las disoluciones necesarias para obtener los puntos de ambas curvas de calibración. Para la curva de quercetina, se emplearon las concentraciones siguientes: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml; en el caso del ácido clorogénico, las concentraciones utilizadas fueron: 50, 150, 300, 450 y 600 µg/ml. Dichas soluciones se analizaron empleando las condiciones de elución para el análisis del perfil de compuestos fenólicos (Sección 6.5.3). Las curvas de calibración se obtuvieron graficando el área de pico correspondiente al pico del estándar con respecto a la concentración del mismo estándar. A partir de estas curvas de calibración, se realizó la cuantificación de ambos compuestos en el extracto analizado.

#### **6.6. Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico**

Se emplearon tres metodologías para establecer las condiciones más adecuadas para la detección del marcador químico mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. En las tres metodologías se empleó la misma fase estacionaria: columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 con un tamaño de partícula de 3.5 µm (150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno). En la primera metodología, se utilizaron las mismas condiciones de elución que las empleadas para el análisis del perfil de compuestos fenólicos descrito en la Sección 6.5.3 (Tabla 2). En la segunda metodología, la elución se realizó empleando un sistema isocrático, en el que la fase móvil fue una mezcla binaria constituida por metanol: buffer de acetatos en una proporción 35:65 (v/v) (Rivero-Cruz, 2014). El buffer se preparó con acetato de sodio 0.01 M y ácido acético glacial en una proporción de 94:6 (v/v); se estandarizó el pH del buffer a un pH = 2.60. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.8 ml/min.

Para la tercera metodología, la elución se realizó con un gradiente, donde el solvente A se constituyó de ácido fórmico (0.1%) y el solvente B fue una mezcla de metanol y ácido fórmico en una concentración de 0.1% (v/v) (Tabla 3) (Colon y Nerin, 2012). Se utilizó un flujo de 0.5 ml/min y un tiempo de corrida de 40 minutos.

**Tabla 3.** Gradiente utilizado para la detección del marcador químico, método 3.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo (ml/min)</b>	<b>Composición de la fase móvil</b>	
		<b>Solvente A (Ácido fórmico 0.1%)</b>	<b>Solvente B (Metanol + Ácido fórmico 0.1%)</b>
0	0.80	90 %	10%
15	0.80	90 %	10 %
20	0.80	80 %	20 %
25	0.80	50 %	50 %
30	0.80	10 %	90 %
35	0.80	50 %	50 %
40	0.80	90 %	10 %

En los tres métodos se registró la detección a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm, con una resolución de 1.2 nm. Las tres metodologías utilizadas se resumen en la Tabla 4. El ácido clorogénico, la quercetina y el extracto hidrolizado obtenido a partir del fruto liofilizado de *P. serotina* recolectado en 2014 (Sección 6.5.2) se analizaron mediante las tres estrategias propuestas. Adicionalmente, se realizó el análisis de co-eluciones del extracto (matriz de trabajo) con el estándar del marcador químico.

Después de establecer las condiciones más adecuadas para la elución, se procedió a elegir la longitud de onda apropiada para la detección y cuantificación del ácido clorogénico y de la quercetina. Para esto se realizó la detección de ambos compuestos en las siguientes longitudes de onda: 254, 280 y 360 nm, utilizando la metodología con las mejores condiciones de elución.

**Tabla 4.** Condiciones para la detección del marcador químico.

	<b>Método 1</b>	<b>Método 2</b>	<b>Método 3</b>
<b>Tipo de flujo</b>	Gradiente	Isocrático	Gradiente
<b>Composición de la fase móvil</b>	Ácido fórmico 2% Acetonitrilo 100% (95:5)	Metanol 100%: Buffer de acetatos (pH = 2.66) (35:65)	Ácido fórmico 0.1%: Metanol + Ácido fórmico 0.1% (v/v) (90:10)
<b>Velocidad de flujo</b>	0.8 ml/min	0.8 ml/min	0.5 ml/min
<b>Tiempo de corrida</b>	40 minutos	20 minutos	40 minutos
<b>Volumen de inyección</b>	20 µl	20 µl	20 µl

### 6.7. Validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico

Una vez seleccionado el marcador químico y las condiciones para realizar el análisis cromatográfico, se procedió a realizar la validación del método analítico para la detección y cuantificación del compuesto marcador químico, con base en los criterios establecidos por la guía Eurachem “Guía de laboratorio para los métodos de validación y temas relacionados” (Magnusson y Örnemark, 2014). El equipo utilizado para la validación fue el mismo que para el análisis de compuestos fenólicos descrito en la Sección 6.5.3.

#### 6.7.1. Especificidad del método (selectividad)

La especificidad del método analítico se realizó mediante el registro de los espectros de absorción, en el rango de longitudes de onda ( $\lambda$ ) del ultravioleta - visible (UV-VIS, 210 – 520 nm), del estándar de quercetina (0.1 mg/ml), de la matriz de trabajo (extracto preparado a partir de los frutos liofilizados de *P. serotina* de la colecta realizada en el año 2014) y de la co-elución del estándar con la matriz de trabajo en una proporción 9:1 (matriz: estándar v/v). El criterio de aceptación de este parámetro es que la respuesta del método debe ser únicamente debida al analito de interés.

## 6.7.2. Linealidad

### 6.7.2.1. Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración utilizando 6 niveles de concentración del estándar de quercetina. Para esto, 10 mg del estándar se disolvieron en 10 ml de la solución de extracción. A partir de esta solución, se prepararon diluciones que contenían entre 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$  del estándar. El área de pico correspondiente al pico del estándar de 6 réplicas, se graficó con respecto a la concentración del mismo estándar en cada dilución. Mediante un análisis de regresión lineal simple se determinó: la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza ( $IC \beta_1$ ). Los criterios de aceptación de este parámetro son:  $r^2 \geq 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $b_0 = 0$  y el  $IC (\beta_1)$  no incluye al cero (fórmulas en ANEXO A).

### 6.7.2.2. Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método se elaboró una curva de calibración de la matriz de trabajo enriquecida con tres diferentes concentraciones del estándar de quercetina (7.5, 15 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ), cada concentración se evaluó por triplicado. El área de pico correspondiente al pico de la quercetina en la co-elución, se graficó con respecto a la concentración de la cantidad del estándar añadido a la matriz de trabajo. Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs. cantidad recuperada) fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal simple calculando los siguientes parámetros: la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de variación (CV). Los criterios de aceptación son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.99$ ,  $b_1 \neq 0$  y  $b_0 = 0$  y  $CV_{x/y} \leq 3\%$  (fórmulas en ANEXO A).

## 6.7.3. Exactitud

La exactitud del método se determinó a partir de los valores obtenidos por la curva de calibración elaborada para evaluar la linealidad del método.

Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se expresaron en términos de porcentaje de cantidad recuperada del estándar de quercetina (% de recobro). Los parámetros estadísticos evaluados fueron: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza ( $IC \beta_1$ ) del % de recobro. El criterio de aceptación es que el %e de recobro debe encontrarse entre el 98 % y el 102 %; el  $IC \beta_1$  para la media poblacional debe de incluir el 100% y el coeficiente de variación deberá ser menor del 3% (fórmulas en ANEXO A).

#### **6.7.4. Precisión**

##### **6.7.4.1. Precisión del sistema (Repetibilidad)**

La repetibilidad del sistema se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución de quercetina preparada a una concentración de 80  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados obtenidos de las áreas de pico se expresaron en términos de promedio ( $\bar{y}$ ) desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación es que el coeficiente de variación debe ser menor a 3%

##### **6.7.4.2. Precisión del método**

La precisión del método, se evaluó con el análisis de 6 réplicas de la matriz de trabajo enriquecida con el estándar de quercetina a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados obtenidos se expresaron en términos de coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación de este parámetro indica que el CV debe ser menor de 3% para considerar que el método es preciso.

##### **6.7.5. Límite de detección y límite de cuantificación**

Para determinar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), se construyó una curva de calibración utilizando 6 niveles de concentración del estándar de quercetina. Para esto, 10 mg del estándar se disolvieron en 10 ml de la solución de extracción. A partir de esta solución, se prepararon diluciones que contenían entre 10

y 100 µg/ml del estándar. El área de pico correspondiente al pico del estándar de 3 réplicas, se graficó con respecto a la concentración del mismo estándar en cada dilución. Mediante un análisis de regresión lineal simple se determinó: la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). La determinación de LD y LC se realizó de acuerdo con las fórmulas mostradas en el ANEXO A.

#### 6.7.6. Estabilidad de la muestra

Para la evaluación de la estabilidad de la muestra, se registraron las áreas de pico obtenidas del estándar de quercetina (100 µg/ml) antes y después de someterlas a las condiciones experimentales descritas en la Tabla 5. El criterio de aceptación es que la respuesta obtenida será únicamente debida al analito.

**Tabla 5.** Condiciones para la evaluación de la estabilidad.

<b><i>Factor a evaluar</i></b>	<b><i>Quercetina 1 mg/ml</i></b>	<b><i>Reactivo</i></b>	<b><i>Condición</i></b>
<b><i>Basicidad</i></b>	100 µl	900 µl NaOH 0.1M	Incubación a 40 °C Agitación 300 rpm
<b><i>Acidez</i></b>	100 µl	900 µl HCl 0.1M	Incubación a 40 °C Agitación 300 rpm
<b><i>Oxidación</i></b>	100 µl	900 µl ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Incubación a 40 °C Agitación 300 rpm
<b><i>Luz UV largo</i></b>	1 ml	UV visible largo	Exposición por 10 min

Adicionalmente, se evaluó el % de quercetina contenida en una solución preparada de estándar con una concentración de 100 µg/ml en diferentes condiciones de almacenamiento. Las condiciones de almacenaje fueron: temperatura ambiente (TA), refrigeración a 4°C y congelación a – 20 °C. En cada condición se evaluó una muestra por duplicado. Las evaluaciones se realizaron el día inicial, a las 24 horas y a las 48 horas de almacenamiento.

Los resultados se expresan en términos de diferencias absolutas ( $|d_i|$ ) de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto a la media aritmética del análisis inicial. El criterio de aceptación es que el valor de  $|d_i|$  sea  $\leq 2\%$ .

## 6.8. Análisis estadístico

En la determinación de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro de microplaca por triplicado para cada uno de las muestras analizadas. Para cada caso se calculó el promedio, la desviación estándar (SD) así como la significancia estadística con un análisis de varianza de 2 vías (ANADEVA de 2 vías) y un post hoc Bonferroni para comparaciones múltiples. La prueba se realizó con un índice de confianza del 95%.

Para el análisis de los resultados obtenidos a partir de la evaluación farmacológica, se realizó un ensayo con aorta de rata aislada para cada uno de las muestras obtenidas mediante el método de secado por convección y por liofilización. En cada ensayo se tomó la lectura de 4 canales del polígrafo, teniendo una  $n = 4$ , por lo que en cada caso, se calcularon los promedios y la desviación estándar de la media (S.D.).

Se elaboraron las curvas concentración-respuesta mediante el análisis de los datos experimentales con un programa de ajuste no lineal, ajustando los datos a una ecuación sigmoideal (PRISMA 5.0 GraphPad Software). Para cada ensayo, se calculó la concentración efectiva media  $CE_{50}$  (concentración a la que se obtiene el 50% del efecto máximo) y el efecto máximo ( $E_{max}$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Selección del método de secado por convección y de aditivos para procesar el fruto fresco de *P. serotina*

El secado es una operación unitaria asociada con la eliminación de agua de materias primas o procesadas. Se emplea para la conservación de alimentos y muestras biológicas, así como para la elaboración de productos en polvo (Domínguez, 2011). En este trabajo, se emplearon los métodos de secado por convección y liofilización para procesar el fruto fresco de *P. serotina*. Se ha demostrado que a partir del proceso de liofilización, se obtienen los productos alimenticios de la calidad más alta, esto es debido a que utiliza temperaturas bajas, lo cual evita la degradación de compuestos termolábiles y, por tanto, la pérdida de la calidad sensorial y nutricional (Oetjen y Haseley, 2004; Mujumdar, 2007). Por estas razones, el proceso de liofilización es principalmente utilizado en la investigación como un estándar de control para comparar diferentes métodos de secado (Singh *et al.*, 2013). En el presente estudio, la liofilización se utilizó para comparar los efectos del secado por convección sobre las propiedades farmacológicas del fruto de *P. serotina*.

Históricamente, el secado con aire caliente por convección y el secado solar han sido los métodos de secado de alimentos más empleados (Zotarelli *et al.*, 2012). El secado por convección es un método directo de secado que implica la utilización de una corriente de aire caliente que fluye sobre el producto a secar; de esta manera, el calor para la evaporación es suministrado a la superficie expuesta del material y la humedad evaporada es arrastrada por el medio de secado, que es el aire (Mujumdar, 2007).

Las temperaturas utilizadas en el presente trabajo para el secado por convección fueron 60, 70, 80 y 90 °C. Es importante mencionar que en este proceso de secado, el uso de temperaturas altas ( $\geq 100$  °C) debe realizarse por periodos de tiempo muy cortos, ya que se pueden promover reacciones que afectan las propiedades organolépticas y biológicas del material a secar, incluyendo la degradación de los compuestos bioactivos (De-Paepe *et al.*, 2014).

Por otro lado, las temperaturas habitualmente utilizadas en el secado por convección son de entre 50 y 90 °C (Suvarnakuta *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Zotarelli *et al.*, 2012; Rahimmalek y Hossein, 2013; Li *et al.*, 2015).

Una de las principales razones para estudiar los efectos del secado por convección sobre el fruto de *P. serotina*, fue la poca estabilidad en las propiedades fisicoquímicas del liofilizado, lo cual dificultó en gran medida la elaboración de una forma farmacéutica. El fruto liofilizado de *P. serotina* presenta una alta higroscopicidad y se transforma en un material sumamente pegajoso y muy difícil de manipular. El comportamiento pegajoso de algunos materiales, como los frutos, se debe a que son ricos en azúcares de bajo peso molecular (tales como la fructosa, glucosa, sacarosa) y en ácidos orgánicos como el cítrico, málico y ácido tartárico. A su vez, esta tendencia es uno de los principales problemas encontrados en el secado de alimentos (Bhandari y Howes, 1999; Adhikari *et al.*, 2003b).

La higroscopicidad de los azúcares transforma la materia prima en una masa plástica que conduce a la pegajosidad, ocasionando que la misma materia prima forme aglomerados pegajosos y sea más difícil de manipular (Adhikari *et al.*, 2003b). Cuando la humedad se evapora durante el proceso de secado, el producto se vuelve poroso, y la estructura sólida del material debe ser capaz de mantener esta estructura porosa; sin embargo, cuando la temperatura del producto poroso es mayor a la temperatura de transición vítrea, hay un colapso de la estructura que causa una contracción estructural y, en consecuencia, la pegajosidad (Bhandari y Howes, 1999; Adhikari *et al.*, 2003a; Oliveira *et al.*, 2010). La temperatura de transición vítrea está directamente relacionada con la actividad de agua del producto; disminuye cuando se incrementa el contenido de humedad (Kurozawa *et al.*, 2009; Tonon *et al.*, 2009).

Una forma de contrarrestar este problema es mediante el empleo de aditivos que tengan la capacidad de aumentar la temperatura de transición vítrea y disminuir la higroscopicidad de los productos mientras son sometidos al proceso de secado (Bhandari y Howes, 1999; Tonon *et al.*, 2009). En este sentido, se ha demostrado que los polímeros de alto peso molecular, como la maltodextrina, tienen la capacidad de aumentar la temperatura de transición vítrea y disminuir la higroscopicidad de los

productos secos, por lo que son ampliamente utilizados para el secado de estos productos (Adhikari *et al.*, 2003b; Gabas *et al.*, 2007; Kurozawa *et al.*, 2009; Tonon *et al.*, 2009; Wang y Langrish, 2009; Caparino *et al.*, 2012; Fang y Bhandari, 2012; Valenzuela y Aguilera, 2015). Se ha comprobado que la maltodextrina tiende a disminuir la higroscopicidad de los materiales y se ha propuesto que influye en la organización estructural de la matriz del alimento, controlando las propiedades mecánicas del mismo y aumentando su temperatura de transición vítrea (Tonon *et al.*, 2009; Caparino *et al.*, 2012).

Otra posible solución para disminuir la higroscopicidad de los alimentos es la adición de disolventes orgánicos, tales como los alcoholes, antes del proceso de secado. Estos solventes pueden reducir la higroscopicidad de los azúcares y promover su cristalización, evitando la plastificación a través de la sobresaturación del sistema (Oliveira *et al.*, 2010). El etanol es totalmente miscible con agua debido a que sus interacciones intermoleculares son similares a las del agua y por tanto, puede competir con las moléculas de azúcar para la interacción (Nose y Hojo, 2006; Oliveira *et al.*, 2010). Por otra parte, la utilización de etanol como pre-tratamiento de secado disminuye en gran medida el tiempo de secado, ya que promueve que la evaporación del agua sea más rápida (Braga *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012).

En el presente estudio, los frutos de *P. serotina* se sometieron a dos tratamientos previos al proceso de secado, los cuales consistieron en la adición, por separado, de etanol en proporciones fruto: etanol 1:1 y 1:2 (p/v) y de maltodextrina en dos diferentes concentraciones (10 y 20 % p/p). Es importante mencionar que en este trabajo no fue posible obtener una muestra de secado por convección sin la adición de aditivos al fruto de *P. serotina*, ya que éste presentó un alto grado de higroscopicidad, lo cual impidió su secado en el periodo de tiempo y a las temperaturas utilizadas para procesar las otras muestras. El fruto secado sin aditivos podría haberse empleado como un control para comparar el efecto de éstos sobre las actividades farmacológicas del fruto. Sin embargo, este hecho confirma la efectividad de los aditivos como un pre-tratamiento efectivo para disminuir la higroscopicidad de las muestras y por lo tanto, facilitar el proceso de secado y favorecer la estabilidad de los productos. Las muestras obtenidas se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Muestras obtenidas del secado por convección y liofilización.

<b>Muestra</b>	<b>Capulín +Maltodextrina</b>	<b>Capulín + Etanol</b>
60 °C	10% 	1:1 
	20% 	1:2 
70 °C	10% 	1:1 
	20% 	1:2 
80 °C	10% 	1:1 

**Tabla 6.** Muestras obtenidas del secado por convección y liofilización (continuación).

<b>Muestra</b>	<b>Capulín + Maltodextrina</b>	<b>Capulín + Etanol</b>
80 °C	20% 	1:2 
90 °C	10% 	1:1 
	20% 	1:2 
Liofilizado		

## 7.2. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre el contenido de compuestos fenólicos del fruto de *P. serotina*

Algunos de los parámetros evaluados para determinar los efectos provocados por el secado por convección sobre el fruto de *P. serotina* fue la cuantificación de fenoles totales utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. En la Tabla 7 y en la Figura 9 se muestran los resultados de la determinación de fenoles totales en las muestras analizadas. Se encontró que la mayoría de los tratamientos térmicos provocó una disminución significativa en la cantidad de compuestos fenólicos totales respecto a la cantidad encontrada en el fruto liofilizado ( $6.841 \pm 0.404$  mg EAG/g dps) (Tabla 7), con excepción de algunas muestras a las que se les añadió el etanol como pre-tratamiento.

**Tabla 7.** Compuestos fenólicos totales determinados en los frutos de *P. serotina* con los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección (mg EAG/g dps<sup>^</sup>).

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura de secado por convección (°C)</b>			
	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:1)	$4.498 \pm 0.384^*$	$4.183 \pm 0.831^*$	$6.581 \pm 0.538$ a1,2	$4.997 \pm 0.653^*$ a2,3
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:2)	$5.899 \pm 0.795^*$ b1	$6.789 \pm 0.901$ a1 b1	$6.836 \pm 0.496$ a1	$6.638 \pm 0.960$ a1 b1
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (10%)	$4.571 \pm 0.924^*$ b2	$5.041 \pm 0.817^*$ b1,2	$5.165 \pm 0.530^*$ b1,2	$5.750 \pm 0.664$ a1,2 b1,2
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (20%)	$3.373 \pm 0.591^*$ b1,2,3	$4.093 \pm 0.572^*$ a1 b2,3	$4.828 \pm 0.694^*$ a1,2 b1,2	$4.160 \pm 0.595^*$ a1,3 b1,2,3
<i>P. serotina</i> Liofilizado	$6.841 \pm 0.404$			

<sup>^</sup> Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco.

\* Diferencia significativa (ANADEVA de 2 vías, post hoc Bonferroni,  $p < 0.05$ ) comparando con el liofilizado.

a1 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando las temperaturas de secado vs 60 °C (en el mismo tratamiento).

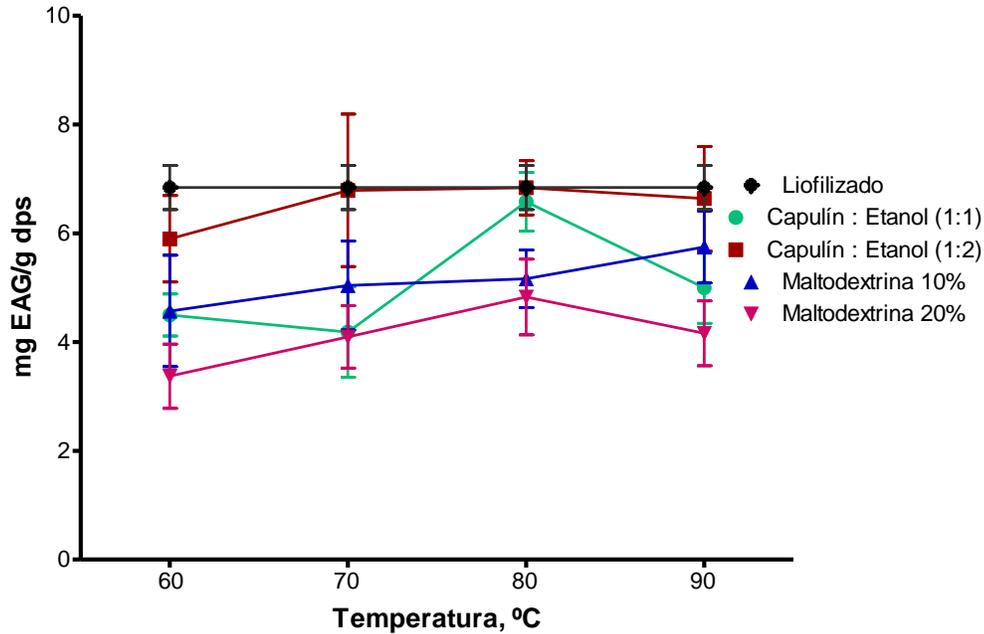
a2 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando las temperaturas de secado vs 70 °C.

a3 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando las temperaturas de secado vs 80 °C.

b1 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:1) (en la misma temperatura).

b2 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:2).

b3 Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparando los aditivos utilizados vs Maltodextrina (10%).



**Figura 9.** Compuestos fenólicos totales determinados en las muestras secas de *P. serotina*.

La cantidad de compuestos fenólicos totales determinada en este estudio para el fruto liofilizado de *P. serotina* (Tabla 7) es comparable con la cantidad determinada por Luna-Vázquez *et al.* (2013), en el fruto de *P. serotina* recolectado en el año 2012. La cantidad de compuestos fenólicos presentes en el fruto de esta especie vegetal es mayor que la que se encuentra en otros frutos como la uva (*V. vinicola*) y la ciruela (*P. domestica*). La disminución de estos compuestos observada en las muestras secadas por convección representa un efecto negativo del proceso de secado que ha sido reportado con anterioridad (Sagar y Suresh, 2010; Domínguez, 2011).

El secado por convección es un proceso en el que la temperatura del producto aumenta durante el proceso de secado, lo cual causa una reducción en la eficiencia de transferencia de calor y, en consecuencia, un aumento en el tiempo de secado. De esta manera, se requieren periodos de secado más largos cuando se emplean temperaturas más bajas, mientras que las temperaturas más altas promueven tiempos de secado más cortos (Garau *et al.*, 2007). Adicionalmente, la exposición de la muestra al calor durante periodos largos de tiempo provoca la degradación de los compuestos presentes (Mujumdar, 2007; Rawson *et al.*, 2011; Zotarelli *et al.*, 2012).

La reducción en el contenido de compuestos fenólicos de las muestras secadas por convección está acorde con los resultados obtenidos por otros investigadores, quienes han propuesto que los compuestos fenólicos son termolábiles y que el tratamiento térmico prolongado provoca cambios químicos sobre estos compuestos (Garau *et al.*, 2007; Mejia-Meza *et al.*, 2008; Rawson *et al.*, 2011). Sin embargo, las muestras pre-tratadas con etanol en una proporción 1:2 a las temperaturas de 70, 80 y 90 °C, no presentaron una diferencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos respecto a la cantidad determinada en el liofilizado del fruto; lo mismo que la muestra pre-tratada con etanol (1:1) y secada a 80 °C. De acuerdo con Ignat *et al.* (2011) y Gomes *et al.* (2012), el etanol se utiliza generalmente para la extracción de sustancias que presentan afinidad con él como los compuestos fenólicos y flavonoides; además, la mezcla de etanol-agua presenta menor calor de vaporización que el agua sola, lo que promueve una rápida deshidratación. Tomando en cuenta estas observaciones, se puede hipotetizar que la presencia de etanol reduce la temperatura de eliminación de humedad y provoca la retención de los compuestos (Braga *et al.*, 2010). Estudios realizados por Oliveira *et al.* (2010) demostraron que la utilización de etanol fue capaz de reducir la pérdida de carotenoides durante la liofilización de pequi (*Caryocar brasiliense*), presentándose una mayor preservación cuando se emplearon concentraciones elevadas de etanol.

Comparando las temperaturas del proceso de secado por convección utilizadas en este trabajo, se observó que la pérdida de compuestos fenólicos totales fue menor a la temperatura de 80 °C, en comparación con los resultados obtenidos a 60 °C (con excepción de la muestra con 10% de maltodextrina que mostró mayor contenido a los 90 °C) (diferencia significativa  $p < 0.05$ ). El mismo comportamiento se encontró en un estudio realizado por Vega-Gálvez *et al.* (2012), en el cual se reportó que un aumento en la temperatura de secado por convección de aire caliente en muestras de manzana, causó una degradación de fenoles totales con respecto al contenido encontrado en muestras frescas. Sin embargo, también se observó que la degradación de fenoles totales es menor a la temperatura de 80 °C que a las temperaturas bajas de 40 y 60 °C. A su vez, Djendoubi *et al.* (2012) reportó que el secado continuo produce una mayor degradación de los compuestos fenólicos a una temperatura de 45 °C en muestras de manzana. Esto se debe, probablemente, a las

diferencias en el tiempo de exposición a la temperatura, dado que a mayores temperaturas el tiempo de secado es menor y por tanto, también lo es la exposición de los compuestos termolábiles a la misma temperatura. Otra explicación probable puede atribuirse a la producción de melanoidinas a través de la reacción de Maillard, ya que ésta es favorecida por las altas temperaturas y el bajo contenido de agua (Boudhrioua *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2009). Además, se debe tomar en consideración que el reactivo de Folin-Ciocalteu no sólo determina los compuestos fenólicos, sino que también evalúa la reducción de otros compuestos químicos no fenólicos como los productos de la reacción de Maillard (Pérez-Martínez *et al.*, 2010).

En lo que respecta a la utilización de diferentes aditivos como tratamiento previo al secado por convección de los frutos de *P. serotina*, se encontró una diferencia significativa entre la utilización de etanol y la utilización de maltodextrina, siendo las muestras con maltodextrina las que presentaron un menor contenido de compuestos fenólicos (diferencia significativa  $p < 0.01$ ). Entre estas muestras, aquellas a las que se les adicionó el 10 % de maltodextrina contuvieron una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales que las muestras a las que se les añadió el 20% (diferencia significativa  $p < 0.05$ ). La maltodextrina es un polisacárido que se obtiene de la hidrólisis ácida o enzimática del almidón, y es ampliamente utilizada como aditivo de alimentos ya que proporciona estabilidad a los productos. Se utiliza en el secado de alimentos difíciles de procesar, dado que tiene la capacidad de aumentar la temperatura de transición vítrea global del producto para evitar la pegajosidad del mismo (Gabas *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Kha *et al.* (2010) sobre el fruto de gac (*Momordica cochinchinensis*), se encontró que la adición de maltodextrina puede causar una disminución en el contenido de compuestos fenólicos totales debido a un efecto de dilución propiciado por la cantidad añadida del polisacárido. El mismo comportamiento se reportó en estudios hechos por Caliskan y Nur Dirim (2013), quienes utilizaron concentraciones del 5 al 25 % de maltodextrina. Estos investigadores concluyeron que la cantidad de maltodextrina más apropiada fue del 10% p/p.

En otros estudios, se ha propuesto la utilización del 6% de maltodextrina (Tonon *et al.*, 2010) y del 7% (p/p) (Mishra *et al.*, 2014). Los aditivos utilizados en el secado de alimentos, tales como la maltodextrina, necesitan formar una película fina y suave en la superficie de los productos para ser eficaz, de tal manera que se forme una capa protectora alrededor de los materiales con problemas de pegajosidad (Wang y Langrish, 2009). De acuerdo con Adhikari *et al.* (2003b), la maltodextrina es capaz de formar una capa gruesa cuando es secada, de manera que puede proteger a la muestra de la humedad, evitando que se vuelva pegajosa. Esta morfología de encapsulación es llamada mononuclear y es más común cuando las muestras son sometidas a procesos de secado rápido como es el caso del secado por aspersion (Fang y Bhandari, 2010). Existe otra morfología de encapsulación, en la cual la maltodextrina forma una matriz (Figura 10) que es compatible a nivel molecular con la muestra, de tal forma que le proporciona estabilidad durante y después del secado (Fang y Bhandari, 2012). Estas morfologías están influenciadas por las tecnologías del proceso de secado, por los materiales que se van a secar y por los aditivos añadidos.



**Figura 10.** Morfologías de encapsulación: mononuclear (derecha) matriz (izquierda).

Modificado de Fang y Bhandari (2010).

### 7.3. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre el contenido de flavonoides del fruto de *P. serotina*

Los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides a través de la formación de complejos con  $AlCl_3$  (Zhishen *et al.*, 1999) se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 11, en las cuales se puede observar que se presentó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del contenido de flavonoides en las muestras sometidas al secado por convección, en las diferentes temperaturas y con diferentes aditivos con respecto a la cantidad cuantificada para el fruto liofilizado de *P. serotina* ( $13.969 \pm 2.645$  mg de CAT/g dps).

**Tabla 8.** Contenido de flavonoides determinados en los frutos de *P. serotina* sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección (mg CAT/g dps<sup>^</sup>).

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura de secado por convección (°C)</b>			
	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:1)	4.613 ± 0.621*	4.517 ± 0.763*	5.124 ± 0.468* a1,2	5.608 ± 0.478* a1,2,3
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:2)	2.482 ± 0.404* b1	4.211 ± 0.150* a1	3.766 ± 0.353* a1 b1	2.529 ± 0.737* a2,3 b1
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (10%)	1.737 ± 0.154* b1	1.715 ± 0.268* b1,2	1.590 ± 0.215* b1,2	2.019 ± 0.041* a3 b1
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (20%)	1.561 ± 0.203* b1,2	1.539 ± 0.299* b1,2	1.779 ± 0.099* b1,2	1.814 ± 0.265* b1
<i>P. serotina</i> Liofilizado	13.969 ± 2.645			

<sup>^</sup> Miligramos equivalentes de catequina por gramo de peso seco.

\* Diferencia significativa (ANAEVA de 2 vías, post hoc Bonferroni, p<0.05) comparando con el liofilizado.

a1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 60 °C (en el mismo tratamiento).

a2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 70 °C.

a3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 80 °C.

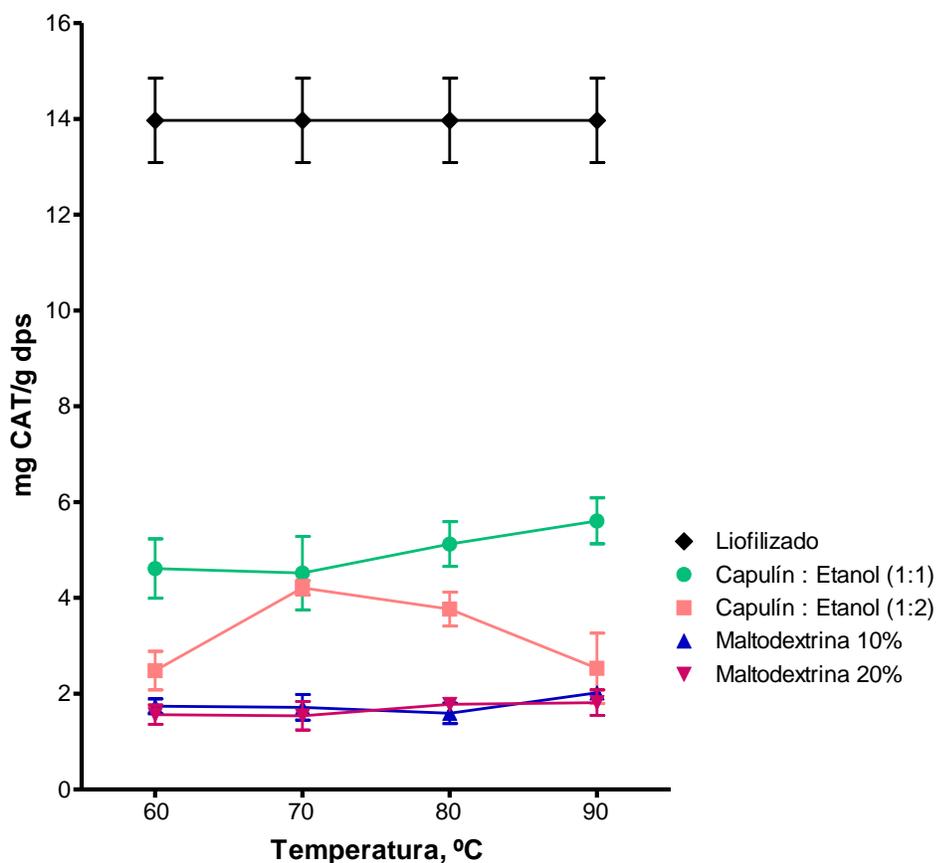
b1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:1) (en la misma temperatura).

b2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:2).

b3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Maltodextrina (10%).

En estudios previos realizados con los frutos de *P. serotina*, se ha encontrado que éstos contienen diferentes flavonoides, entre los que destacan: el 3-O rutinósido de cianidina, el 3-O-glucósido de cianidina, el hiperósido, un pentósido de quercetina, la rutina, la procianidina B, la (-)-epicatequina, la (+)- catequina, un hexóxido de kaemferol y un pentósido de kaemferol (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Vasco *et al.*, 2009; Rodríguez, 2011; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). La disminución de estos compuestos observada en las muestras secadas por convección puede atribuirse al prolongado tiempo de exposición a temperaturas elevadas a las que fueron sometidas las muestras (Mujumdar, 2007; Mejia-Meza *et al.*, 2008; Rahimmalek y Hossein, 2013).

Los procesos térmicos tienen una gran influencia sobre el contenido de flavonoides, el cual depende de la temperatura empleada y del tiempo de exposición.



**Figura 11.** Contenido de flavonoides determinados en las muestras secas de *P. serotina*.

Particularmente, los tratamientos térmicos prolongados pueden promover la degradación de estos compuestos, causando pérdidas de hasta el 60% del contenido total de flavonoides (Djendoubi *et al.*, 2012; Iannou *et al.*, 2012). Además de la temperatura, la presencia de oxígeno durante el secado induce una importante degradación de la quercetina y la rutina (Iannou *et al.*, 2012). Con temperaturas altas, la descomposición de los glucósidos de flavonoides es más rápida, especialmente en lo que se refiere a las antocianinas (Rohn *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2011; Rawson *et al.*, 2011). Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en muchas plantas y frutas, proporcionando colores que varían entre naranja, rojo, violeta y azul. Estos flavonoides son altamente inestables y son susceptibles a la degradación, ya sea por temperatura, pH, enzimas o luz (Tonon *et al.*, 2010; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Se ha reportado que las antocianinas presentes en la papaya disminuyen de manera importante cuando se someten a secado por aire caliente a 65 °C durante un periodo de tiempo de entre 5 y 6 horas (Rawson *et al.*, 2011).

Los resultados encontrados en el presente trabajo en lo referente al contenido de flavonoides muestran que hay una diferencia significativa entre las muestras a las que se les adicionó maltodextrina y las muestras que fueron pre-tratadas con etanol, siendo mayor el contenido de flavonoides en éstas últimas. Con respecto a las muestras que fueron adicionadas con maltodextrina, no se observó una diferencia significativa en el contenido de flavonoides entre las muestras a las que se les añadió este polisacárido en las dos concentraciones. Tampoco se observó una diferencia significativa en el contenido de flavonoides entre las muestras pre-tratadas con maltodextrina sometidas a las diferentes temperaturas de secado. Esto puede ser explicado por el efecto encapsulante que posee la maltodextrina, ya sea por la formación de una capa protectora o por la formación de una matriz capaz de proteger a los flavonoides de las altas temperaturas, evitando su degradación (Cavalcanti *et al.*, 2011; Djendoubi *et al.*, 2012; Fang y Bhandari, 2012).

En contraste, en las muestras pre-tratadas con etanol, se observó un comportamiento diferente entre las muestras sometidas a las cuatro temperaturas de prueba. Las muestras pre-tratadas con una proporción 1:1 de etanol mostraron un aumento en cuanto a su contenido de flavonoides a las temperaturas más altas (80, 90 °C), mientras que las muestras pre-tratadas con una proporción 1:2, mostraron una disminución significativa de estos compuestos a las mismas temperaturas.

De acuerdo con estudios realizados por Jeevani *et al.* (2011) sobre la elaboración de extractos con disolventes orgánicos, al aumentar la concentración de los disolventes, se presentó una disminución significativa en la cuantificación de flavonoides totales, indicando que el contenido de estos compuestos depende de la polaridad del disolvente utilizado (Ignat *et al.*, 2011), además de otros componentes presentes en la muestra (Herrero *et al.*, 2012).

## **7.4. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre la capacidad antioxidante del fruto de *P. serotina***

Otro parámetro evaluado para determinar los efectos del secado por convección sobre los frutos de *P. serotina*, fue la determinación de la capacidad antioxidante de todas las muestras obtenidas. Esto se realizó a través de la utilización de dos métodos con mecanismos diferentes: la inhibición del radical DPPH y la reducción del complejo TPTZ-Fe<sup>3+</sup> por los compuestos antioxidantes. La utilización de al menos dos métodos para la determinación de la capacidad antioxidante ha sido recomendada por varios autores (Kuskoski *et al.*, 2005; Thaipong *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2013), dado que, en las plantas, y en particular en frutos, son varios los componentes que pueden presentar dicha actividad; dichos componentes incluyen los compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitaminas, entre otros (Corral-Aguayo *et al.*, 2008). Tanto el método FRAP como el DPPH han mostrado ser reproducibles, simples, rápidos y confiables (Thaipong *et al.*, 2006).

### **7.4.1. Capacidad antioxidante por el método DPPH**

El método DPPH es el ensayo *in vitro* para la determinación de la capacidad antioxidante más utilizado y se fundamenta en la molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), la cual es un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre dentro de la molécula. Esta deslocalización de electrones da lugar a un color violeta profundo, caracterizado por una banda de absorción máxima en aproximadamente 517 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de un sustrato (AH) que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta (Alam *et al.*, 2013).

En la Tabla 9 y la Figura 12 se presentan los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante por la inhibición del radical DPPH. Al igual que en la determinación de flavonoides, se observó una disminución significativa de la capacidad antioxidante en todas las muestras obtenidas por el secado por convección en comparación con la actividad registrada en el fruto liofilizado de *P. serotina* (8.198 ± 0.844 mg Eq Trolox/gps).

**Tabla 9.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método DPPH de los frutos de *P. serotina* sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección (mg Eq Trolox/g dps<sup>^</sup>).

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura de secado por convección (°C)</b>			
	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:1)	3.289 ± 0.313*	2.869 ± 0.204* a1	3.082 ± 0.352*	2.920 ± 0.134* a1
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:2)	3.225 ± 0.488*	3.335 ± 0.548* b1	2.837 ± 0.404* a1,2	2.683 ± 0.287* a1,2
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (10%)	1.835 ± 0.569* b1,2	2.047 ± 0.512* b1,2	1.972 ± 0.525* b1,2	2.050 ± 0.227* b1,2
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (20%)	1.624 ± 0.446* b1,2	2.284 ± 0.327* a1 b1,2	2.109 ± 0.392* a1 b1,2	1.998 ± 0.316* a1 b1,2
<i>P. serotina</i> Liofilizado	8.198 ± 0.844			

<sup>^</sup> Miligramos equivalentes de trolox por gramo de peso seco.

\* Diferencia significativa (ANADEVA de 2 vías, post hoc Bonferroni, p<0.05) comparando con el liofilizado.

a1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 60 °C (en el mismo tratamiento).

a2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 70 °C.

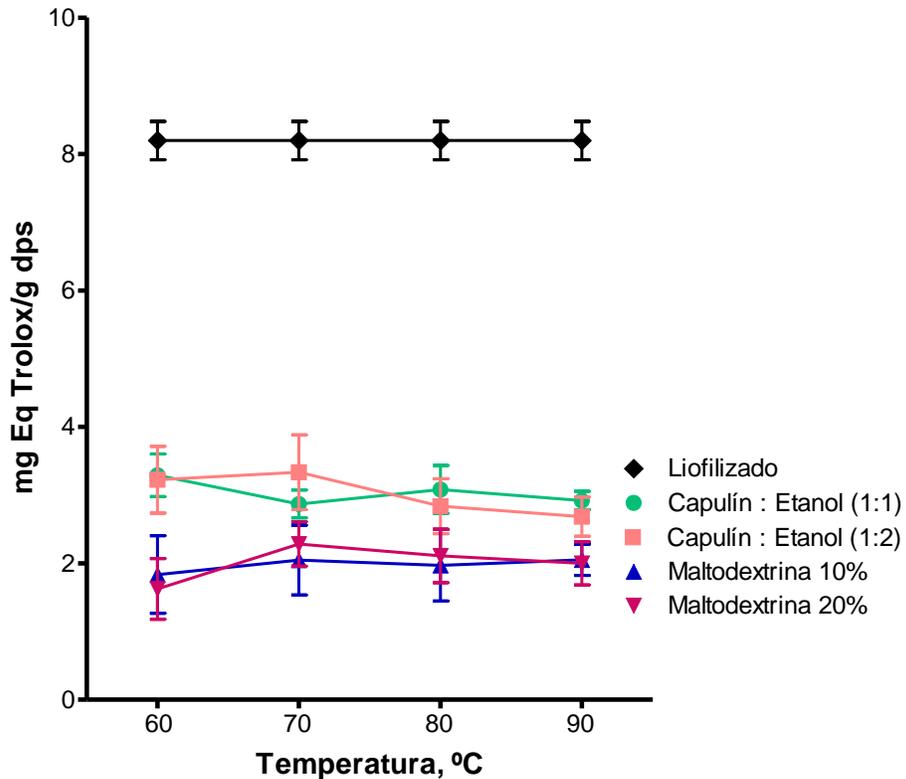
a3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 80 °C.

b1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:1) (en la misma temperatura).

b2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:2).

b3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Maltodextrina (10%).

En diversos estudios se ha demostrado que el secado por convección de aire ejerce los efectos negativos en comparación con otros métodos. Esto incluye una gran pérdida de la actividad antioxidante de las muestras procesadas (Kha *et al.*, 2010; Sagar y Suresh 2010; Vega-Gálvez *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha observado que el contenido de compuestos fenólicos posee una relación directa con la capacidad antioxidante de la muestra analizada, con un alto grado de correlación (Moon y Shibamoto, 2009; Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Por lo tanto, si se presenta una pérdida en el contenido de compuestos fenólicos, también se observará una disminución en la capacidad antioxidante, tal cual como fue observado en el presente trabajo.



**Figura 12.** Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de los frutos de *P. serotina* sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.

Los datos obtenidos de las muestras sometidas al secado por convección de aire que fueron pre-tratadas con etanol muestran una disminución de la capacidad antioxidante conforme se aumenta la temperatura, siendo más evidente en las muestras pre-tratadas con etanol en una proporción 1:2. Las muestras pre-tratadas con etanol secadas a 60 y 70 °C fueron significativamente diferentes a las muestras secadas a 80 y 90 °C. Esta misma tendencia se observó en muestras de manzanas secadas por convección (Vega-Gálvez *et al.*, 2012), en muestras de mango (Singh *et al.*, 2013) y en muestras de gel de Aloe vera secadas por el mismo método (Miranda *et al.*, 2009).

Por el contrario, las muestras que fueron adicionadas con maltodextrina se comportaron de manera inversa con el aumento de temperatura, puesto que la capacidad antioxidante fue mayor en las muestras secadas a 80 y 90 °C que en la muestra secada a 60 °C. Sin embargo, este aumento es significativo sólo para las muestras a las que se les adicionó el 20 % de maltodextrina.

De acuerdo con algunos autores, los tiempos de secado largos asociados a una baja temperatura pueden promover una disminución de la actividad antioxidante (Garau *et al.*, 2007; Tonon *et al.*, 2010). También se ha reportado que la temperatura puede aumentar la capacidad antioxidante por la formación de productos de la reacción de Maillard, los cuales también poseen actividad antioxidante (Vega-Gálvez *et al.*, 2009; Pérez-Martínez *et al.*, 2010). Cabe mencionar que no se presentó una diferencia significativa entre las muestras a las que se les adicionó maltodextrina en las dos concentraciones (10 % y 20 % p/p). Esto también ha sido reportado por Kha *et al.* (2010).

Comparando la utilización de los dos aditivos en las muestras sometidas al secado por convección, las muestras pre-tratadas con etanol (en las dos proporciones) mostraron una mayor capacidad antioxidante que todas las muestras con maltodextrina. Esta diferencia entre tratamientos se observó también en la determinación de flavonoides, por lo que la actividad antioxidante medida a través de la inhibición del radical DPPH puede estar estrechamente relacionada con estos compuestos. Los flavonoides han sido reconocidos como compuestos antioxidantes, principalmente por su capacidad de donar átomos de hidrógeno para la neutralización de radicales libres (Ignat *et al.*, 2011).

#### **7.4.2. Capacidad antioxidante por el método FRAP**

El ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$ . Se basa en la reducción del complejo de  $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) a la forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en un pH bajo. Esta reducción se controla midiendo el cambio en la absorción a 593 nm (Moon y Shibamoto *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2013). En la Tabla 10 y la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante por reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ, los cuales confirman una disminución significativa de la capacidad antioxidante en las muestras obtenidas por el secado por convección de aire en comparación con la actividad registrada en el fruto liofilizado de *P. serotina* por este mismo método ( $28.135 \pm 2.662$  mg Eq Trolox/gps).

**Tabla 10.** Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP de los frutos de *P. serotina* sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección (mg Eq Trolox/g dps<sup>^</sup>).

<b>Muestra</b>	<b>Temperatura de secado por convección (°C)</b>			
	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>	<b>90</b>
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:1)	6.717 ± 0.943*	6.995 ± 0.686*	12.892 ± 1.229* a1,2	9.776 ± 1.343* a1,2,3
<i>P. serotina</i> + Etanol (1:2)	12.142 ± 1.459* b1	11.241 ± 1.205* b1	11.959 ± 1.198*	11.017 ± 0.801* a1 b1
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (10%)	6.842 ± 1.334* b2	6.842 ± 1.035* b2	5.984 ± 1.088* b1,2	9.165 ± 1.386* a1,2,3 b2
<i>P. serotina</i> + Maltodextrina (20%)	4.166 ± 1.263* b1,2,3	5.554 ± 1.219* a1 b1,2	6.220 ± 1.253* a1 b1,2	4.570 ± 0.795* a3 b1,2,3
<i>P. serotina</i> Liofilizado	28.135 ± 2.662			

<sup>^</sup> Miligramos equivalentes de Trolox por gramo de peso seco.

\* Diferencia significativa (ANADEVA de 2 vías, post hoc Bonferroni, p<0.05) comparando con el liofilizado.

a1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 60 °C (en el mismo tratamiento).

a2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 70 °C.

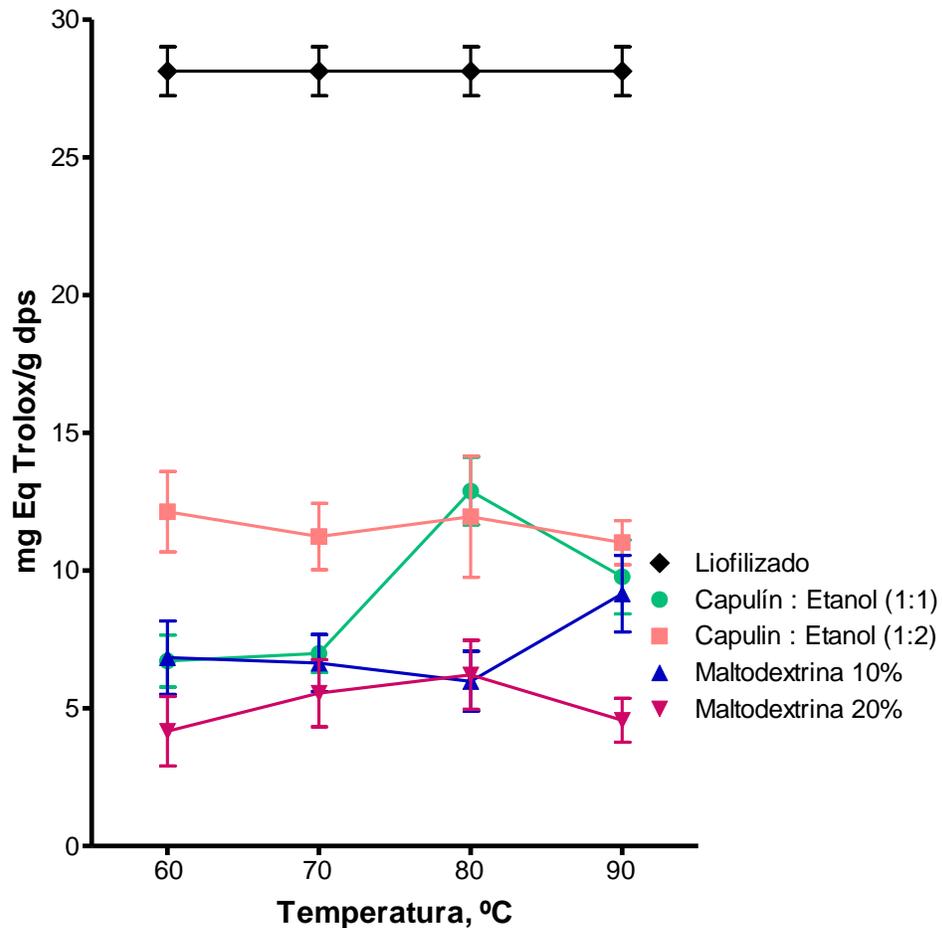
a3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando las temperaturas de secado vs 80 °C.

b1 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:1) (en la misma temperatura).

b2 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Etanol (1:2).

b3 Diferencia significativa (p<0.05) comparando los aditivos utilizados vs Maltodextrina (10%).

Tanto en el ensayo FRAP como en el ensayo DPPH para la determinación de la capacidad antioxidante, los resultados se muestran como mg Equivalentes de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), el cual es un análogo de la vitamina E. Sin embargo, dado que estos métodos miden mecanismos distintos de capacidad antioxidante, los valores entre los resultados obtenidos por uno y otro método pueden ser muy variables (Moon y Shibamoto *et al.*, 2009). En este trabajo, los resultados obtenidos por el método FRAP para todas las muestras sometidas al secado por convección presentaron valores mayores a los obtenidos por el método DPPH, contrario a lo que ha sucedido en otros estudios de capacidad antioxidante, donde se empleó la misma metodología (Luna-Vázquez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013).



**Figura 13.** Determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP de los frutos de *P. serotina* sometidos a los diferentes pre-tratamientos y temperaturas de secado por convección.

De los resultados obtenidos de las muestras sometidas al secado por convección, la muestra que fue pre-tratada con etanol en una proporción 1:1, presentó un aumento significativo de la capacidad antioxidante conforme se aumenta la temperatura, siendo mayor a los 80 °C. Por otra parte, en la muestra pre-tratada con etanol en una proporción 1:2 se observó una disminución de la capacidad antioxidante con la elevación de la temperatura, siendo significativamente diferente al comparar la muestra secada a 60 °C con la muestra secada a 90 °C.

Al comparar la utilización de los dos tratamiento realizados sobre los frutos de *P. serotina* antes de someterlos al secado por convección, la muestra pre-tratada con etanol en una proporción 1:2 mostró una capacidad antioxidante significativamente

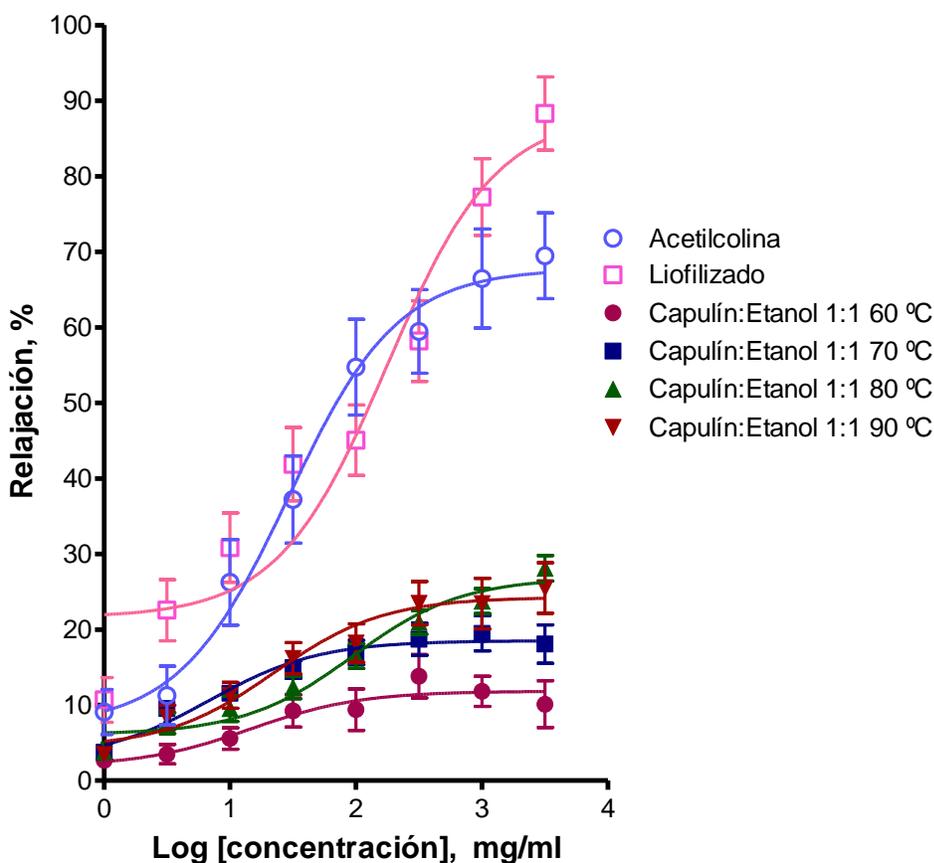
mayor que la presentada por todas las muestras con maltodextrina, así como sucedió con la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH. Esta tendencia se relaciona con el hecho de que las muestras a las que se les adicionó maltodextrina presentan también un menor contenido de compuestos fenólicos. Resultados similares se encontraron en estudios realizados por Kha *et al.* (2010) sobre el fruto de gac (*Momordica cochinchinensis*) y Caliskan y Nur Dirim (2013) en extractos de zumaque. Respecto a las muestras que fueron adicionadas con 10 % de maltodextrina, se encontró una mayor capacidad antioxidante en la muestra que fue secada a 90 °C en comparación con la muestra que contenía el 20 % de maltodextrina a la misma temperatura. La misma tendencia se observó en un trabajo realizado por Vidović *et al.* (2014) sobre polvos de ajedrea (*Satureja montana*).

La técnica más sencilla y económica entre los diferentes métodos de secado es el secado por convección de aire caliente. Sin embargo, se ha demostrado que este método afecta de manera considerable la calidad del producto final, debido a la pérdida, degradación o transformación de los compuestos presentes en la muestra (Sagar *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2013; Forero *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a la evaluación en el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y la capacidad antioxidante en las muestras del fruto de *P. serotina* procesadas por el secado por convección de aire caliente confirman estos efectos negativos.

Por otro lado, la utilización de aditivos como la maltodextrina y el etanol, puede afectar las propiedades químicas y físicas de las muestras, facilitando el proceso de secado y proporcionar cierto grado de protección a los compuestos presentes en las mismas muestras (Gabas *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Fang y Bhandari, 2012; Gomes *et al.*, 2012). Sin embargo, la protección que puedan brindar estos aditivos depende del método de secado utilizado; en este estudio, se constató que el secado por convección es un método muy agresivo y que, por lo tanto, causa una pérdida importante de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante del fruto de *P. serotina*, a pesar de la utilización de etanol y maltodextrina.

## 7.5. Efecto de los métodos de secado por liofilización y por convección sobre la actividad vasodilatadora inducida por el fruto de *P. serotina*

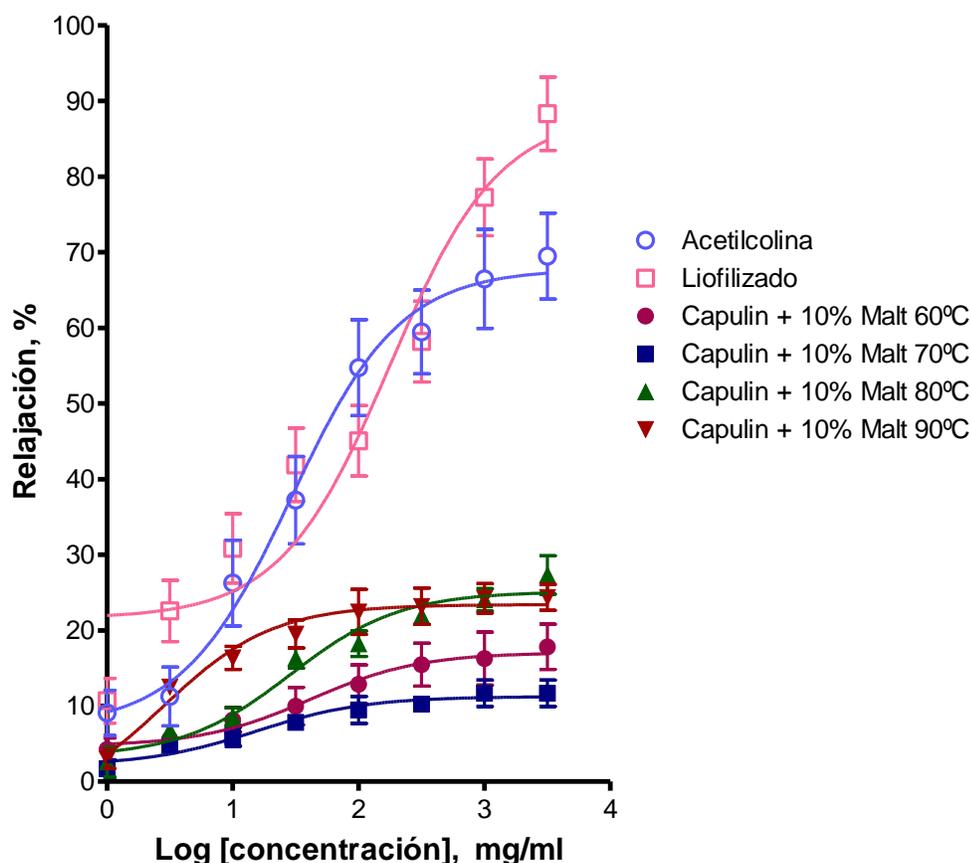
La evaluación del efecto de los métodos de secado (liofilización y por convección a diferentes temperaturas) sobre la actividad vasodilatadora se realizó empleando el modelo de aorta aislada de rata. Mediante este modelo se evaluaron 8 de las 16 muestras procesadas por el secado por convección: cuatro muestras con el pre-tratamiento de etanol en una proporción 1:1 (Figura 14) y cuatro muestras con la adición del 10% de maltodextrina (Figura 15).



**Figura 14.** Efecto de los métodos de secado (liofilización y convección) sobre la actividad vasodilatadora de las muestras pre-tratadas con etanol.

Puesto que todas las muestras sometidas al secado por convección presentaron una disminución significativa de los compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante, en comparación con los resultados obtenidos por el fruto

liofilizado de *P. serotina*, se decidió descartar las muestras pre-tratadas con etanol en una proporción de 1:2 y las muestras a las que se les añadió el 20 % de maltodextrina para la evaluación farmacológica. Las 8 muestras restantes se eligieron con el fin de poder evaluar las cuatro temperaturas utilizadas durante el proceso de secado con los dos aditivos empleados para el secado (maltodextrina y etanol). Se incluyó la evaluación farmacológica del liofilizado obtenido del fruto de *P. serotina*, así como de la acetilcolina, que se utilizó como control positivo.



**Figura 15.** Efecto de los métodos de secado (liofilización y convección) sobre la actividad vasodilatadora de las muestras en presencia de maltodextrina (Malt).

En la Tabla 11 se presentan la concentración efectiva media ( $CE_{50}$  concentración a la que se obtiene el 50 % del efecto) y el efecto máximo ( $E_{max}$ ) obtenido para cada una de las evaluaciones.

**Tabla 11.** Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{max}$ ).

<b>Muestra</b>	<b><math>CE_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b><math>E_{max}</math> (%)*</b>
<b>60 °C</b>		
Etanol (1:1)	14.65 $\pm$ 2.63	11.84 $\pm$ 1.22
Maltodextrina (10%)	41.33 $\pm$ 1.50	17.06 $\pm$ 0.84
<b>70 °C</b>		
Etanol (1:1)	6.87 $\pm$ 1.72	18.52 $\pm$ 0.86
Maltodextrina (10%)	15.41 $\pm$ 1.43	11.24 $\pm$ 0.42
<b>80 °C</b>		
Etanol (1:1)	94.38 $\pm$ 1.40	26.86 $\pm$ 1.34
Maltodextrina (10%)	28.83 $\pm$ 1.28	25.13 $\pm$ 0.81
<b>90 °C</b>		
Etanol (1:1)	22.42 $\pm$ 1.67	24.27 $\pm$ 1.44
Maltodextrina (10%)	2.82 $\pm$ 1.34	23.41 $\pm$ 0.52
<b>Controles</b>		
Liofilizado	177.10 $\pm$ 1.31	88.35 $\pm$ 3.96
Acetilcolina	29.02 $\pm$ 1.22	67.78 $\pm$ 1.77

\* Los resultados son directos de un software de ajuste no lineal para una ecuación sigmoideal.

Todas las muestras del fruto de *P. serotina* evaluadas presentaron una vasodilatación del músculo liso vascular que fue dependiente de la concentración. Al igual que en los estudios previos del fruto de *P. serotina*, el liofilizado del fruto presentó un importante efecto vasodilatador, llegando a un efecto máximo del 88.35  $\pm$  3.96 %, el cual fue mayor que el efecto vasodilatador presentado por la acetilcolina ( $E_{max}$  = 67.78  $\pm$  1.77 %;  $CE_{50}$  = 29.02  $\pm$  1.22  $\mu\text{g/mL}$ ) e incluso mayor que el determinado por Luna-Vázquez *et al.* (2013) para el mismo fruto ( $E_{max}$  = 59.0%  $\pm$  5.9%;  $CE_{50}$  = 101.8  $\pm$  7.5  $\mu\text{g/mL}$ ). De manera adicional, la  $CE_{50}$  del liofilizado evaluado en este estudio también fue mayor: 177.10  $\pm$  1.31  $\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, las muestras que fueron sometidas al secado por convección mostraron un efecto máximo menor al 30 % y una  $CE_{50}$  inferior a la determinada para el fruto liofilizado de *P. serotina*.

Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que el secado por convección a las cuatro temperaturas evaluadas y utilizando maltodextrina o un pre-tratamiento con etanol reduce drásticamente el efecto vasodilatador del fruto de *P. serotina*. Esto indica que los compuestos vasodilatadores contenidos en este fruto son susceptibles a las temperaturas utilizadas en su procesamiento y que tanto el pre-tratamiento con etanol como la adición de maltodextrina fueron insuficientes para proteger dichos compuestos activos. Se ha reportado en varios estudios que diferentes compuestos fenólicos, incluyendo los flavonoides producen un efecto vasodilatador (Magos *et al.*, 2008; Mladěnka *et al.*, 2010; Kawakami *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2012). En el presente trabajo, se determinó que el secado por convección reduce significativamente los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides, lo cual explica la disminución en el efecto vasodilatador de *P. serotina*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación, en donde los niveles de compuestos fenólicos disminuyeron de manera significativa en muestras de manzana (Djendoubi *et al.*, 2012) y de papaya (Rawson *et al.*, 2011), después de ser sometidos a un secado por convección.

Por otro lado, tanto las muestras pre-tratadas con etanol como las muestras adicionadas con 10 % de maltodextrina, presentaron una vasodilatación dependiente de la concentración con efectos máximos similares. De este modo, el efecto vasodilatador máximo se presentó a la temperatura de 80 °C para ambas muestras:  $E_{\max} = 26.86 \pm 1.34 \%$ ,  $CE_{50} = 94.38 \pm 1.40 \mu\text{g/mL}$  para la muestra pre-tratada con etanol y  $E_{\max} = 25.13 \pm 0.81 \%$ ,  $CE_{50} = 28.83 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$  para la muestra con 10 % de maltodextrina. La diferencia entre estas muestras se encontró en la  $CE_{50}$ , la cual es menor en la muestra con maltodextrina. La  $CE_{50}$  está relacionada con la potencia de la muestra analizada, por lo que se deduce que la muestra con maltodextrina posee una mayor potencia que la muestra pre-tratada con etanol. Sin embargo, esto sólo se observó en las muestras tratadas a las temperaturas de 80 y 90 °C, ya que en las temperaturas de 60 y 70 °C se observó un comportamiento contrario ( $CE_{50} = 14.65 \pm 1.40 \mu\text{g/mL}$  y  $6.87 \pm 1.72 \mu\text{g/mL}$  para las muestras pre-tratadas con etanol y  $CE_{50} = 41.33 \pm 1.50 \mu\text{g/mL}$  y  $15.41 \pm 1.43 \mu\text{g/mL}$  para la muestra con 10 % de maltodextrina). Con estos resultados, se confirma el efecto negativo que produce el secado por convección de aire caliente sobre la actividad vasodilatadora del fruto de *P. serotina*.

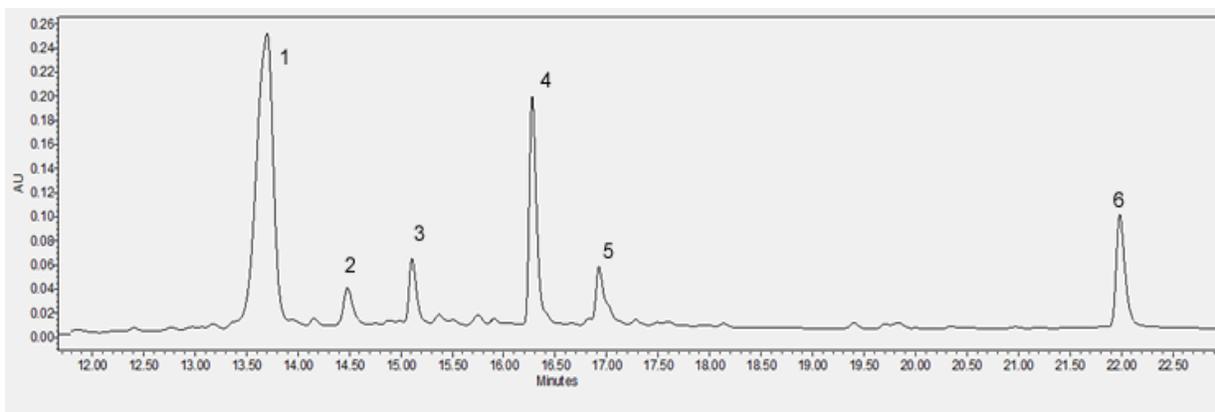
## **7.6. Determinación del compuesto marcador químico del fruto de *P. serotina* para las pruebas de control de calidad**

Un marcador químico es un componente característico que está relacionado con el efecto biológico, e incluso terapéutico, de plantas medicinales. Son compuestos que pueden ser utilizados como un control de calidad de las plantas medicinales, incluyendo la autenticación de las especies vegetales, determinación de la calidad de la materia prima, la evaluación de los productos intermedios y de los productos acabados, de manera que aseguran la calidad de los productos a base de plantas (Li *et al.*, 2008; Xin-Yue *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que están distribuidos ampliamente en las plantas y se ha demostrado que son capaces de ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana (Del Rio *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2010; Mladěnka *et al.*, 2010), por lo que se ha propuesto que compuestos como los ácidos fenólicos y algunos flavonoides se utilicen como posibles marcadores químicos (Capuano *et al.*, 2012; Jasicka-Misiak *et al.*, 2012).

### **7.6.1. Análisis cromatográfico del perfil de compuestos fenólicos**

Se realizó el análisis del perfil de compuestos fenólicos a partir del fruto liofilizado de *P. serotina* por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con la finalidad de seleccionar el compuesto que será utilizado como un marcador químico en futuras pruebas de control de calidad de los productos que se elaboren a partir de este fruto.

El cromatograma obtenido a partir de la hidrólisis ácida del extracto del fruto de *P. serotina* se presenta en la Figura 16; en la Tabla 12 se muestran los compuestos fenólicos identificados a partir de este análisis. La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de los espectros de absorción UV-VIS de cada uno de los picos obtenidos del extracto del fruto de *P. serotina*, con los espectros de absorción de los estándares utilizados en este estudio. De forma adicional, se realizaron co-eluciones de la muestra con el estándar, para la confirmación de algunos de los compuestos presentes. De esta manera, se identificaron 4 compuestos: el ácido clorogénico, la procianidina B2, la (-)-epicatequina y la quercetina.



**Figura 16.** Cromatograma del fruto de *P. serotina* sometido a hidrólisis ácida.

(Columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Fase móvil: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo. Flujo: 0.8 ml/min.)

En el cromatograma obtenido, se observaron un total de 6 picos definidos, sin embargo sólo se identificaron 4 de estos picos. En lo que respecta a los dos picos faltantes (4 y 5), su identificación no fue completada debido a la falta de los estándares; sin embargo, es posible que se trate de antocianinas, tales como la 3-O-glucósido de cianidina, que ya ha sido identificada con anterioridad en el fruto de *P. serotina* (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

**Tabla 12.** Compuestos fenólicos identificados en el fruto de *P. serotina*.

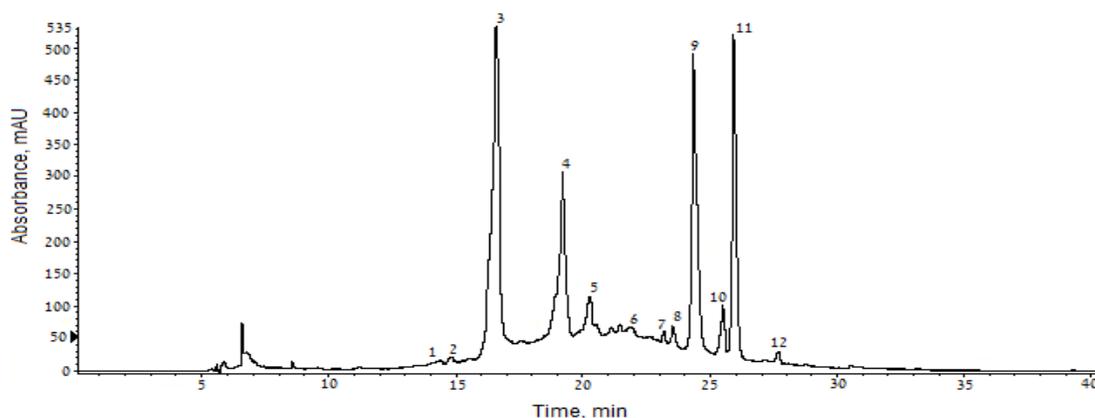
<i>Pico</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>	$\lambda_{max}$ (nm)	<i>Compuesto</i>
1	13.66	240 y 326	Ácido clorogénico
2	14.49	242 y 276	Procianidina B2
3	15.33	237 y 278	(-)-Epicatequina
6	21.69	254 y 364	Quercetina

Este perfil de compuestos fenólicos fue similar a los obtenidos por Vasco *et al.* (2009), Rodríguez (2011), y Luna-Vázquez *et al.* (2013) para esta especie; sin embargo, estos autores también identificaron ácido gálico, glucosidos de kaemferol, proantocianidinas, hiperósido, (+)- catequina y rutina.

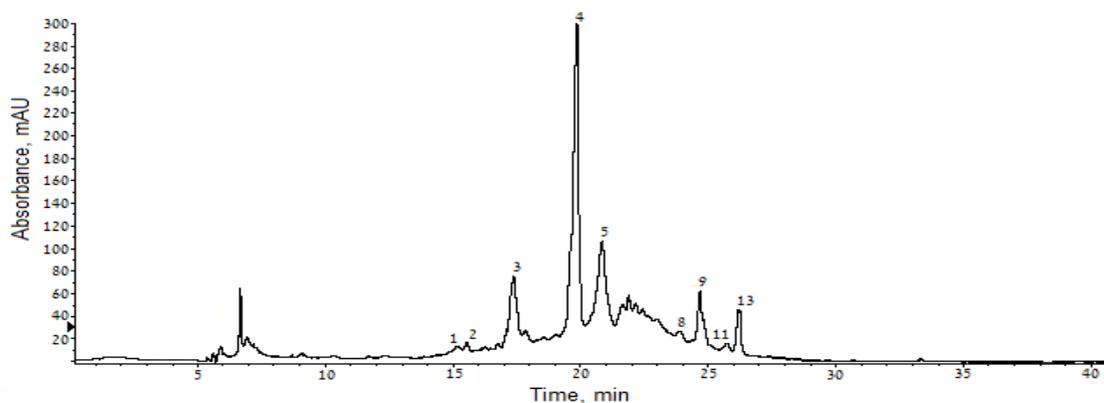
### 7.6.2. Selección del compuesto marcador químico

Dado que sólo algunos componentes bioactivos de muchas plantas medicinales se han identificado, los marcadores químicos pueden ser aquellos compuestos que se encuentren entre los metabolitos característicos de la planta y que presenten una actividad biológica; ya que deben estar relacionadas con la seguridad de las plantas medicinales y ser responsables de sus efectos terapéuticos o dañinos (Xin-Yue *et al.*, 2013). Adicionalmente, la detección del marcador químico debe ser realizada mediante un método de detección sencillo, sensible y eficaz (Capuano *et al.*, 2012).

De acuerdo con estudios anteriores realizados sobre la especie de *P. serotina*, dos de los compuestos que son constantes tanto en las hojas como en los frutos, son el ácido clorogénico y la quercetina, aun tomando en cuenta los años y las regiones en que se hicieron estos estudios (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Vasco *et al.*, 2009; Rodríguez, 2011; Luna-Vázquez *et al.*, 2013; Rivero-Cruz, 2014). En las Figuras 17 y 18, se presentan los cromatogramas obtenidos por Luna-Vázquez *et al.* (2013) del perfil de compuestos fenólicos del fruto de *P. serotina* colectado en el año 2012. El primer cromatograma corresponde al estudio realizado sobre la piel del fruto, mientras que el segundo cromatograma detalla el análisis realizado en la pulpa del fruto de *P. serotina*. En ambos cromatogramas, el pico número 4 es el correspondiente al ácido clorogénico, mientras que el número 11 pertenece a la quercetina, mostrando que estos dos compuestos son de los metabolitos mayoritarios del fruto.

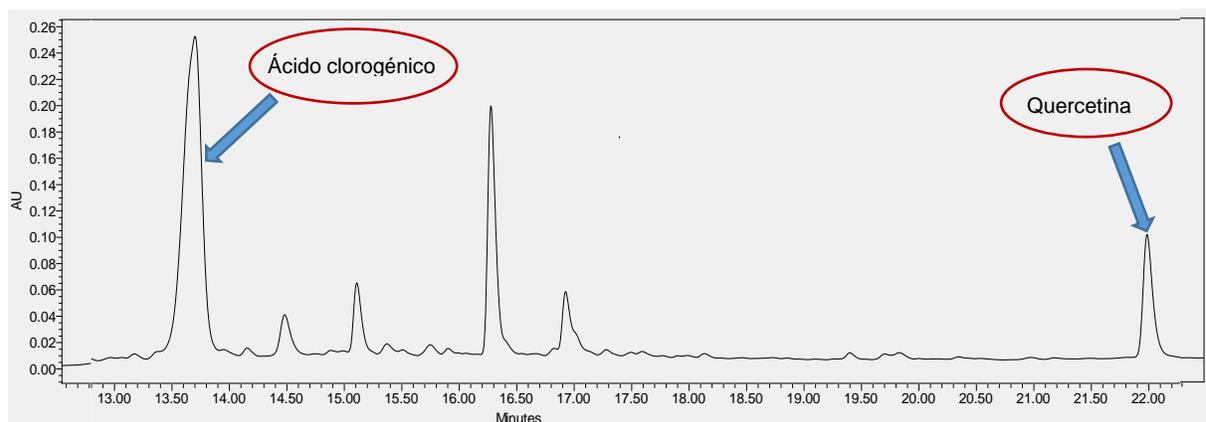


**Figura 17.** Cromatograma obtenido de la piel del fruto de *P. serotina* (colecta de 2012) (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).



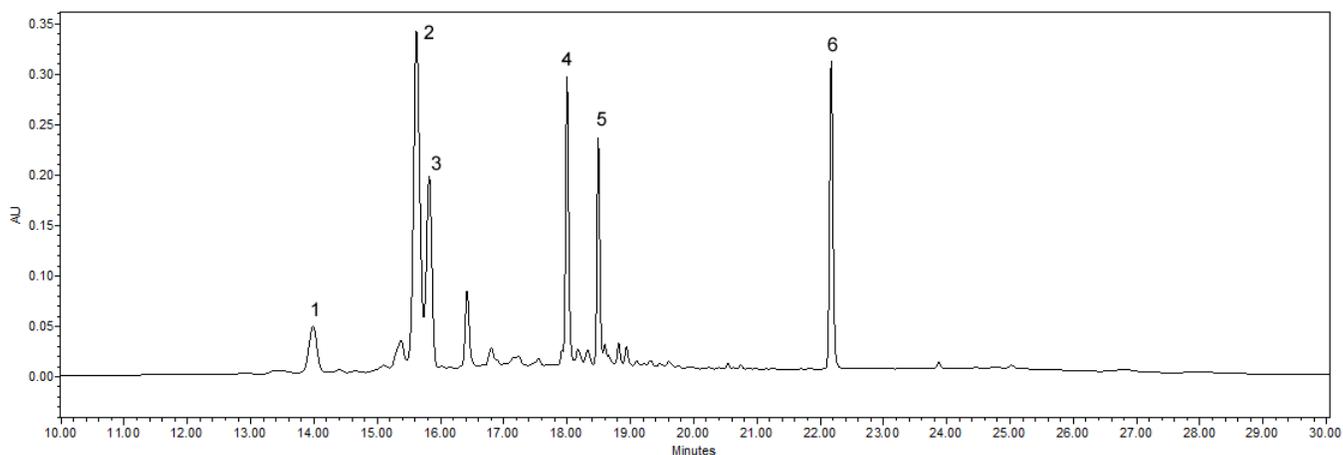
**Figura 18.** Cromatograma obtenido de la pulpa del fruto de *P. serotina* (colecta de 2012) (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, el análisis del perfil de compuestos fenólicos se realizó con los frutos colectados en el año 2013, en el cual se encontró la presencia del ácido clorogénico y la quercetina como parte de los componentes mayoritarios (Figura 19).

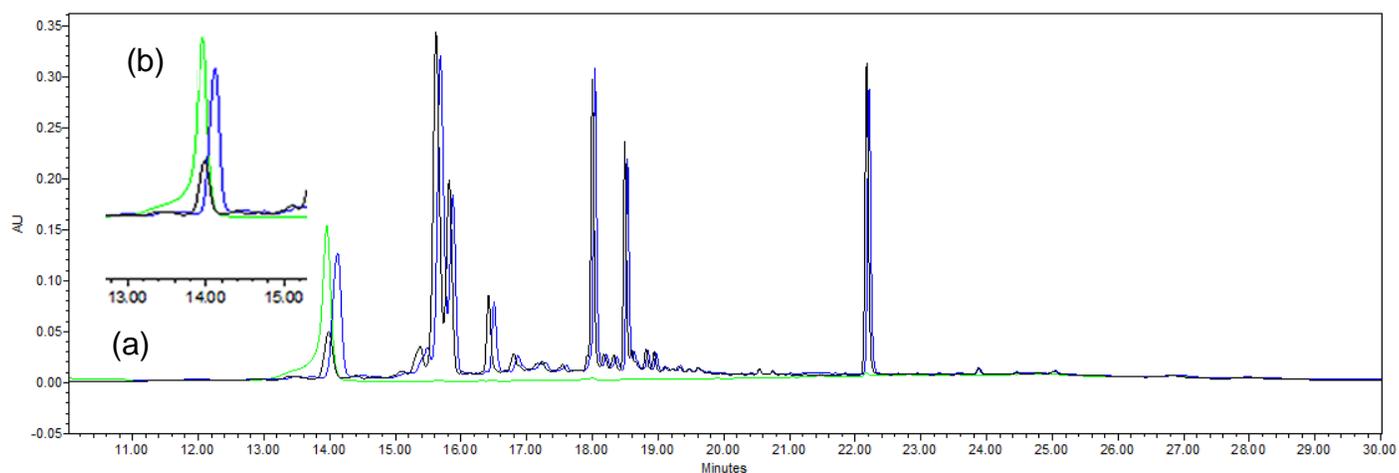


**Figura 19.** Cromatograma obtenido del fruto de *P. serotina* (colecta de 2013). (Columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Fase móvil: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo. Flujo: 0.8 ml/min.)

Para corroborar que el ácido clorogénico y la quercetina están siempre presentes en el fruto de *P. serotina*, se realizó, de manera adicional, un análisis del perfil de compuestos fenólicos con una colecta del fruto realizada en el año 2014 (Figura 20). El pico número 1 de este cromatograma corresponde al del ácido clorogénico, mientras que el número 6 es el perteneciente a la quercetina; esto se confirmó realizando las co-eluciones de la muestra con los estándares de estos compuestos fenólicos. (Figuras 21 y 22).

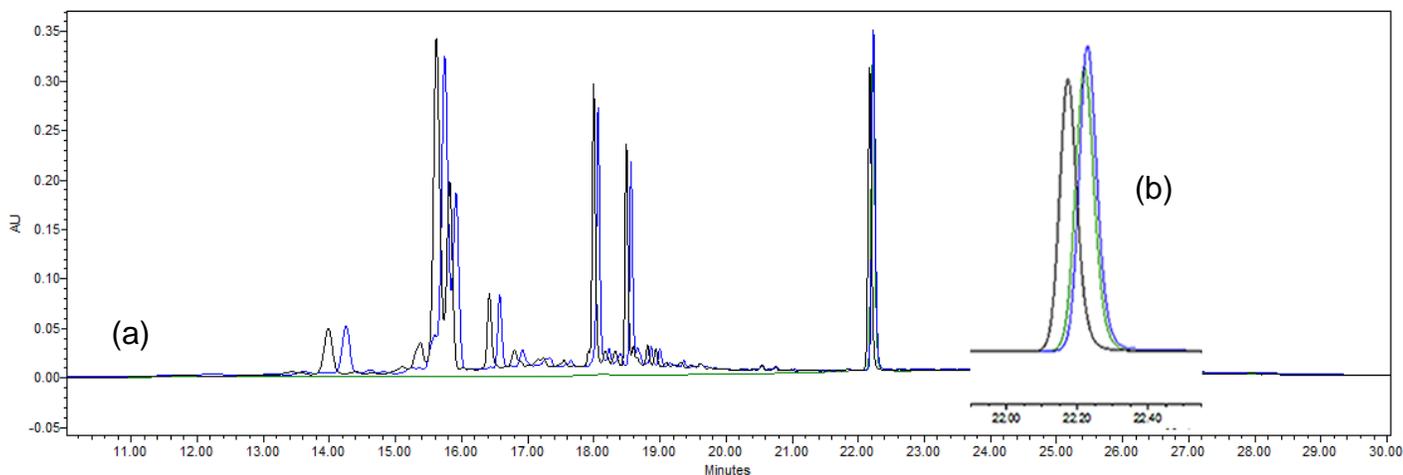


**Figura 20.** Cromatograma del liofilizado del fruto de *P. serotina* (colecta de 2014).  
(Columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Fase móvil: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo. Flujo: 0.8 ml/min.)



**Figura 21.** (a) Co-elución de la muestra del fruto de *P. serotina* (colecta de 2014) con el ácido clorogénico. (b) Ampliación del pico del ácido clorogénico.  
(Columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Fase móvil: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo. Flujo: 0.8 ml/min.)

En las Figuras 21 y 22, la línea verde representa el cromatograma del estándar (ácido clorogénico en la primera y quercetina en la segunda); la negra, es la muestra sin el estándar y la azul es la co-elución que confirma la identificación de estos compuestos. Estos análisis señalan que tanto el ácido clorogénico como la quercetina son de los compuestos mayoritarios de la especie *P. serotina* y que son constantes respecto a las diferentes recolectas del fruto, lo cual nos proporciona una razón importante para considerar a estos compuestos como posibles marcadores químicos del fruto de *P. serotina* para las pruebas de control de calidad.



**Figura 22.** (a) Co-elución de la muestra del fruto de *P. serotina* (colecta de 2014) con quercetina. (b) Ampliación del pico de la quercetina.

(Columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Fase móvil: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo. Flujo: 0.8 ml/min.)

A pesar de que los cromatogramas del fruto de *P. serotina* de las colectas del 2013 y del 2014 presentan la misma cantidad de picos, se observó una variación en el tamaño de éstos, lo cual está relacionado con un cambio en la concentración de cada uno de los compuestos presentes en el fruto. Para corroborar estos cambios, se procedió a realizar la cuantificación del ácido clorogénico y de la quercetina en las dos recolectas realizadas del fruto de *P. serotina*.

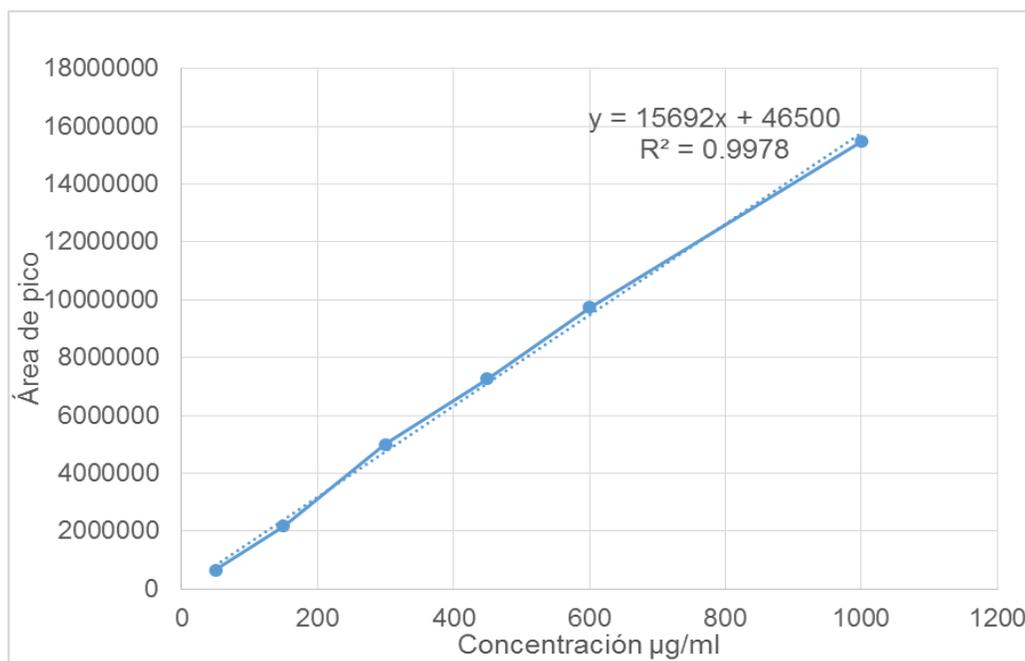
#### 7.6.2.1. Cuantificación de ácido clorogénico y de quercetina

Para realizar la cuantificación del ácido clorogénico y de la quercetina en las muestras del fruto de *P. serotina*, fue necesario elaborar una curva de calibración para cada compuesto. La obtención de los datos necesarios para la elaboración de estas curvas de calibración se realizó siguiendo las mismas condiciones de elución que para el análisis del perfil de compuestos fenólicos. En la Tabla 13, se muestran los datos obtenidos para la elaboración de ambas curvas de calibración y en las Figuras 23 y 24, se muestran los gráficos obtenidos de dichos datos. Para la elaboración de las curvas de calibración, se graficó el área de pico con respecto a las concentraciones correspondientes utilizadas de cada uno de los estándares.

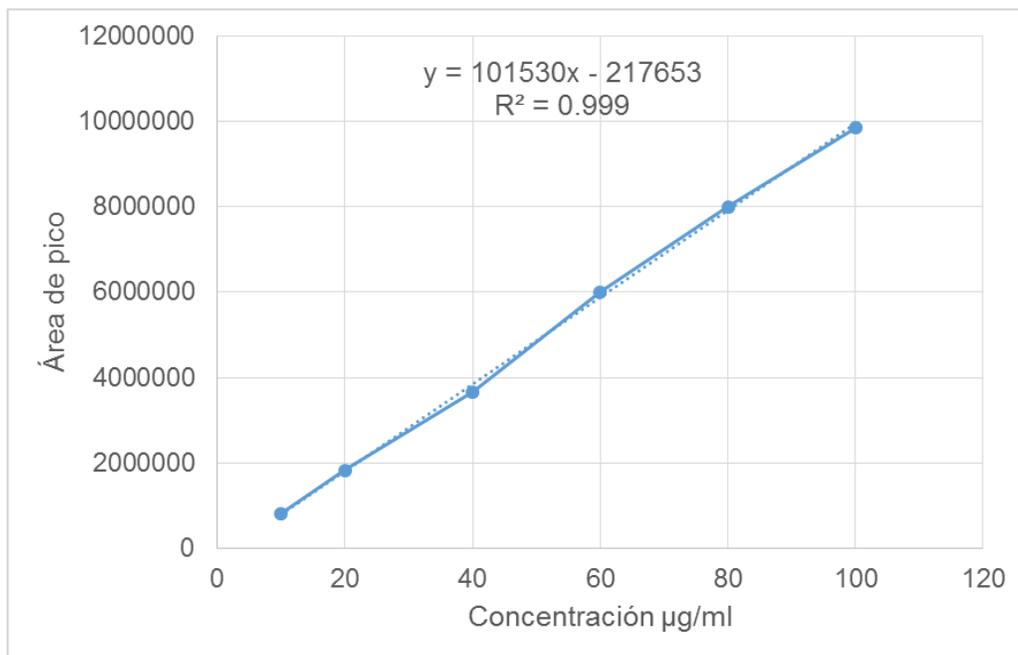
**Tabla 13.** Resultados obtenidos del análisis cromatográfico para las curvas de calibración.

<b>Punto</b>	<b>Ácido clorogénico</b>		<b>Quercetina</b>	
	Concentración (µg/ml)	Área de pico (µV*sec)	Concentración (µg/ml)	Área de pico (µV*sec)
<b>1</b>	50	649568	10	817314
<b>2</b>	150	2165682	20	1835831
<b>3</b>	300	5000990	40	3666914
<b>4</b>	450	7272254	60	6003535
<b>5</b>	600	9733643	80	7995932
<b>6</b>	1000	15471796	100	9848926

De cada curva de calibración se realizó un análisis de regresión lineal simple para la obtención de las ecuaciones lineales que permitieron los cálculos necesarios para la cuantificación de ácido clorogénico y quercetina en las muestras liofilizadas del fruto de *P. serotina* de las dos recolectas realizadas en el presente trabajo. Se emplearon las fórmulas mostradas en la Sección 6.3.6. Los resultados se muestran en la Tabla 14.



**Figura 23.** Curva de calibración para la cuantificación de ácido clorogénico.



**Figura 24.** Curva de calibración para la cuantificación de quercetina.

**Tabla 14.** Cuantificación de ácido clorogénico y quercetina en el fruto de *P. serotina*.

	<b>Recolecta 2013</b>		<b>Recolecta 2014</b>	
	<i>Ácido clorogénico</i>	<i>Quercetina</i>	<i>Ácido clorogénico</i>	<i>Quercetina</i>
<b>Área de pico</b>	3021778	607938	462946	1105533
	3311285	682886	494460	1388958
	3153090	666814	504748	1236400
<b>Promedio</b>	3162051	652546	487384.7	1243630
<b>Concentración µg/ml</b>	198.544	8.571	28.096	14.393
<b>Muestra inicial</b>	1.0285 g		1.0167 g	
<b>Volumen del extracto</b>	16 ml		19 ml	
<b>mg/g de liofilizado</b>	<b>3.0887</b>	<b>0.1336</b>	<b>0.5251</b>	<b>0.2686</b>

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ácido clorogénico son comparables con los obtenidos por Luna-Vázquez *et al.* (2013), para la recolecta realizada en el año 2013. Sin embargo, hay una disminución considerable de este metabolito en la recolecta del año 2014, lo cual se ve reflejado en los cromatogramas

de las Figuras 19 y 20. El cambio contrario sucede en el caso de la quercetina, ya que ésta se ve aumentada en la recoleta del fruto del año 2014. Estas variaciones se deben a que la cantidad de compuestos fenólicos en las plantas varía en función del cultivar, el clima, el suelo, las condiciones de crecimiento y el estado de madurez de la misma planta (Capuano *et al.*, 2012). Además se deben de tomar en cuenta otros factores como las plagas, las infecciones y la fertilización (Herrero *et al.*, 2012).

### 7.6.2.2. Evaluación farmacológica del ácido clorogénico y de quercetina

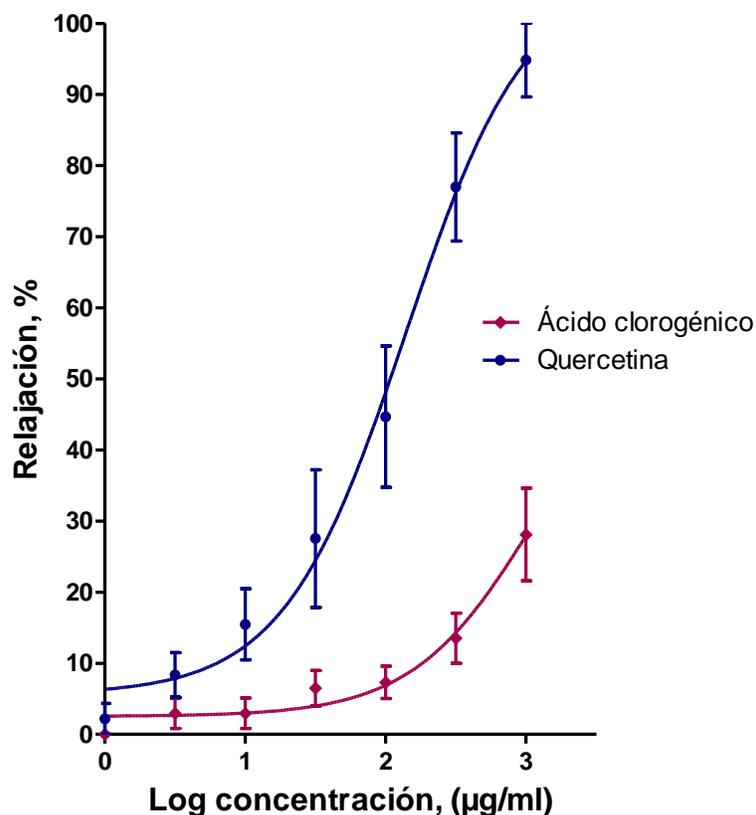
Una de las características importantes que debe tener un marcador químico es su actividad biológica. Se ha demostrado que el ácido clorogénico posee actividad antimicrobiana, principalmente antifúngica (Zhu *et al.*, 2004), actividad ansiolítica (Bouayed *et al.*, 2007), además de una importante actividad antioxidante (60% de inhibición del radical DPPH) (Sato *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2011). Por otro lado, la quercetina ha demostrado poseer actividad inhibidora de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de quelación de metales (Mladěnka *et al.*, 2010), actividad antiinflamatoria y antihipertensiva por mejoramiento de la función endotelial (Larson *et al.*, 2012), además de que inhibe la peroxidación lipídica (Del Rio *et al.*, 2013),

En el caso del fruto de *P. serotina*, la actividad biológica que debe tener el compuesto marcador químico, es un efecto vasodilatador que confirme el uso terapéutico del fruto. Por esta razón, se realizó la evaluación farmacológica tanto del ácido clorogénico como de la quercetina sobre el tejido de aorta aislada de rata. En la Tabla 15 y en la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos de estas evaluaciones, donde se observa que la quercetina posee un efecto vasodilatador considerablemente mayor que el ácido clorogénico, así como una menor  $CE_{50}$ .

**Tabla 15.** Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{max}$ ).

<b>Muestra</b>	<b><math>CE_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)*</b>	<b><math>E_{max}</math> (%)*</b>
Ácido clorogénico	1156 $\pm$ 3.13	57.38 $\pm$ 5.98
Quercetina	138.9 $\pm$ 1.41	107.10 $\pm$ 9.53

\* Los resultados son directos de un software de ajuste no lineal para una ecuación sigmoideal.



**Figura 25.** Actividad vasodilatadora del ácido clorogénico y de la quercetina.

Estos resultados indican que la quercetina es uno de los metabolitos secundarios que contribuyen al efecto terapéutico del fruto de *P. serotina*, al igual que el ácido ursólico y el alcohol cinámico que forman parte de los compuestos mayoritarios de este fruto (Luna-Vázquez *et al.*, 2013).

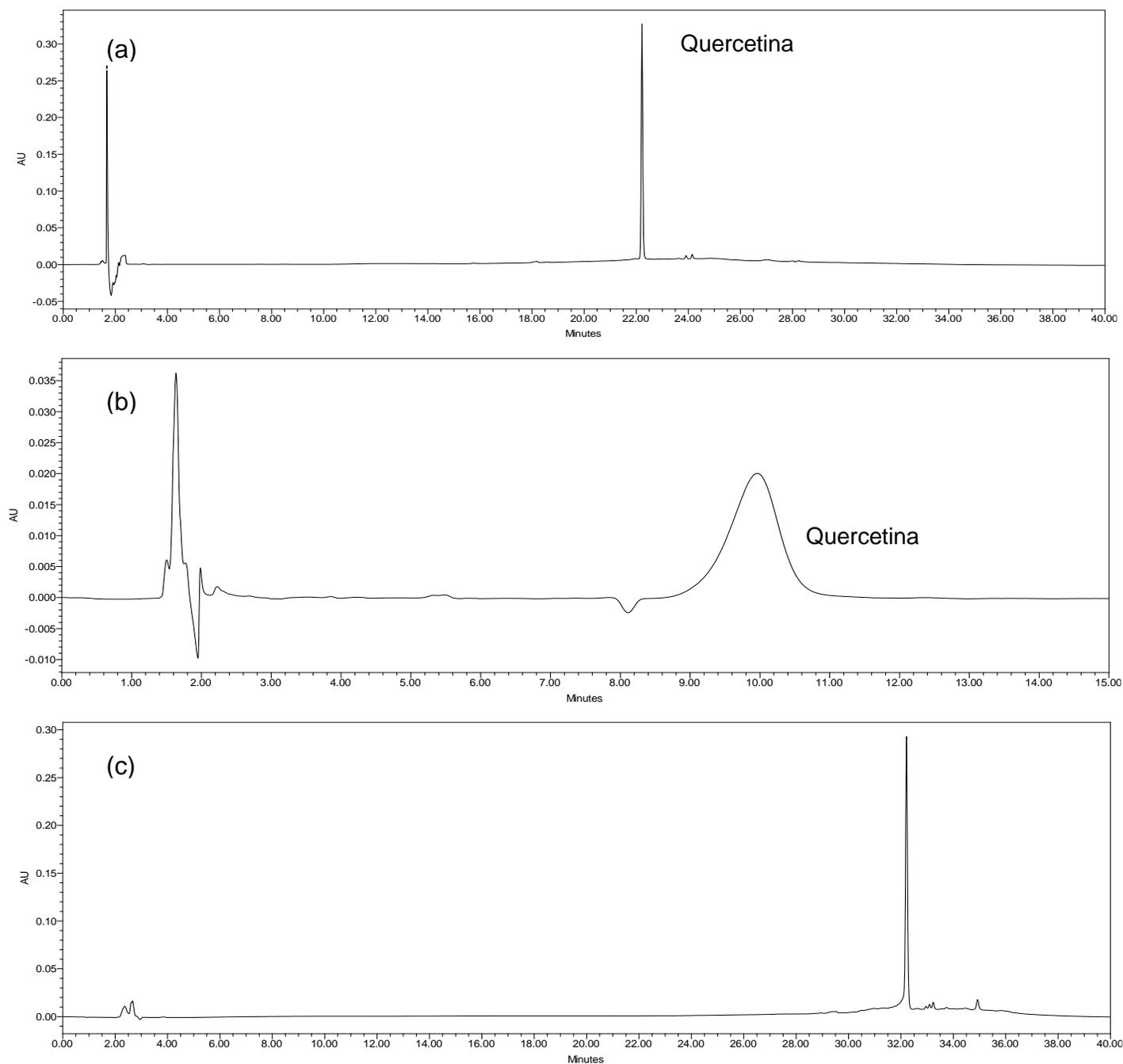
Dados estos resultados, se observa que la quercetina es una mejor opción como marcador químico en comparación con el ácido clorogénico, ya que la actividad vasodilatadora demostrada por el este último es muy pobre. Por otro lado, la presencia constante de la quercetina como uno de los compuestos mayoritarios en el fruto de *P. serotina* en las diferentes recoletas (las cuales se realizaron cada año entre los meses de mayo y junio), así como su fácil detección por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), hacen de este compuesto un excelente candidato para ser un marcador químico efectivo del fruto de *P. serotina* que puede ser utilizado en las pruebas de control de calidad de los productos elaborados a partir de este fruto.

## 7.7. Estandarización de las condiciones del método analítico para la detección y cuantificación del marcador químico

Una vez elegida la quercetina como marcador químico del fruto de *P. serotina*, se procedió a estandarizar el método de detección de este compuesto por HPLC. El propósito de la estandarización fue analizar las mejores condiciones para la detección y cuantificación de la quercetina como un marcador químico, además de la detección y cuantificación del ácido clorogénico como segunda propuesta de marcador químico. De esta manera, se propuso la utilización de tres metodologías, que en estudios previos han demostrado ser sensibles y confiables para la detección y cuantificación de compuestos fenólicos.

El primero de los métodos (método 1) consistió en las mismas condiciones utilizadas para el análisis del perfil de compuestos fenólicos, es decir, la utilización de la misma fase estacionaria y las mismas condiciones de elución: gradiente de ácido fórmico (2 %): acetonitrilo en una proporción inicial de 95:5 v/v, con una velocidad de flujo de 0.8 ml/min y un tiempo de corrida de 40 minutos. La razón para utilizar este método es porque tanto la quercetina como el ácido clorogénico son compuestos fenólicos y, en estas condiciones de trabajo, ha sido fácilmente detectables, tanto en el presente estudio como en algunos anteriores (Luna-Vázquez *et al.*, 2013). El segundo método propuesto (método 2) se eligió en base al trabajo realizado por Rivero-Cruz (2014), en el cual se validó un método analítico para la detección y cuantificación del ácido clorogénico, el hiperósido y el benzaldehído en la infusión de las hojas de *P. serotina*. En este método, la elución se realizó empleando un sistema isocrático, en el que la fase móvil fue una mezcla binaria constituida por metanol: buffer de acetatos en una proporción 35:65 (v/v); la velocidad de flujo utilizada fue de 0.8 ml/min y cada inyección duró 15 minutos. El tercer método (método 3) fue seleccionado en base al trabajo realizado por Colon y Nerin (2012), quienes desarrollaron un método para la detección de flavonoides, específicamente catequinas. Las condiciones de elución consisten en un gradiente de solvente A (ácido fórmico 0.1% v/v) y solvente B (metanol + ácido fórmico 0.1% v/v) en una proporción inicial 90:10 (v/v). El flujo utilizado fue de 0.5 ml/min y cada inyección tuvo una duración de 40 minutos.

Para analizar cada método, en primera instancia se inyectó el estándar de la quercetina en una concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$ . En la Figura 26 se muestran los cromatogramas obtenidos por cada uno de los métodos en respuesta a la quercetina.



**Figura 26.** Detección de la quercetina (15  $\mu\text{g/ml}$ ). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.

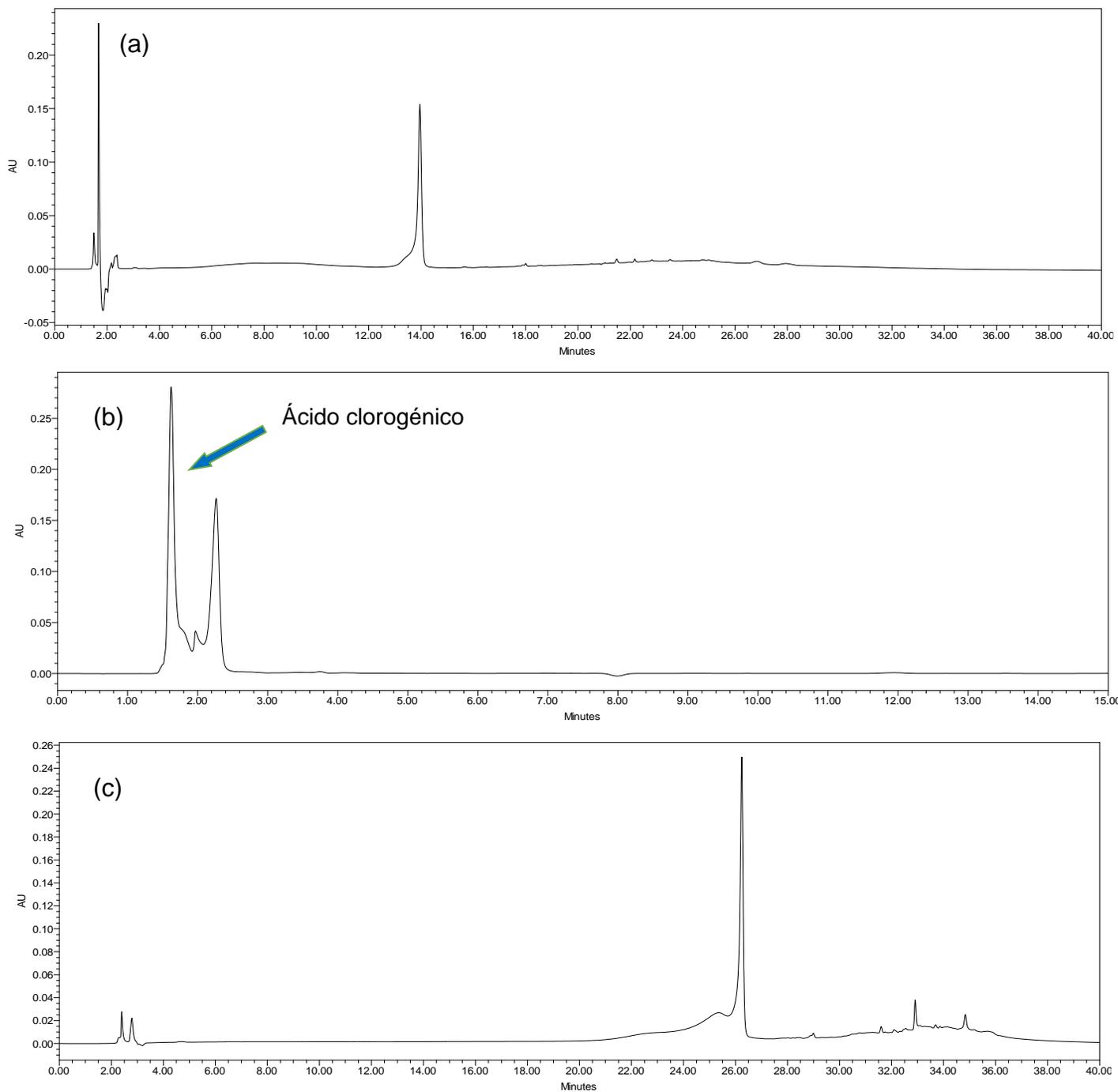
Columna ZORBAX XDB C18. Detección a 245 nm.

Método 1, gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

Método 2, isocrático metanol: buffer, flujo 0.8 ml/min.

Método 3, gradiente ácido fórmico: metanol, flujo 0.5 ml/min.

A su vez, se inyectó el ácido clorogénico en una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ . En la Figura 27 se presentan los cromatogramas obtenidos de este análisis.



**Figura 27. Detección de ácido clorogénico (150  $\mu\text{g/ml}$ ). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.**

Columna ZORBAX XDB C18. Detección a 245 nm.

Método 1, gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

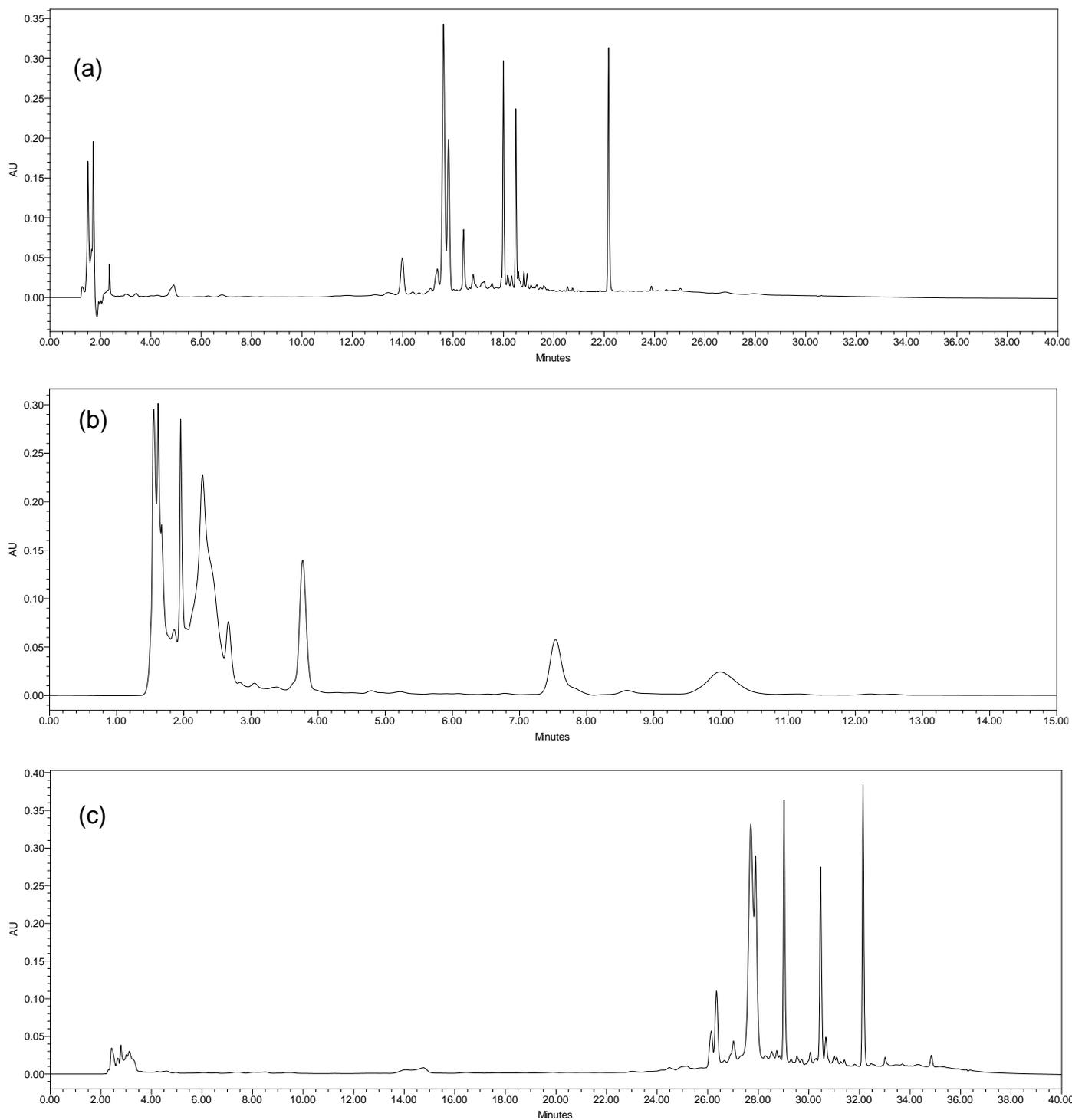
Método 2, isocrático metanol: buffer, flujo 0.8 ml/min.

Método 3, gradiente ácido fórmico: metanol, flujo 0.5 ml/min.

En el método 1, el tiempo de retención ( $T_r$ ) para la quercetina fue de 22.226 minutos, mientras que para el ácido clorogénico fue de 13.78 minutos. En el método 2, el  $T_r$  para el flavonol fue de 9.98 minutos y para el ácido clorogénico fue de 1.64 minutos. Para la metodología 3, la quercetina tuvo un  $T_r$  de 32.15 minutos, y el ácido clorogénico se detectó a los 26 minutos. Desde esta primera parte del análisis, tanto en el método 1 como en el 3, se observa una mejor definición para los picos de ambos estándares. Por el contrario, en el método 2, el pico de la quercetina es casi indetectable ( $AU = 0.020$ ) (Figura 26 (b)) mientras que el pico del ácido clorogénico apareció poco antes del frente del solvente (Figura 27 (b)), esto implica una desventaja para la cuantificación del estándar, puesto que el área del pico de éste estará asociada con el del disolvente.

En el trabajo realizado por Rivero-Cruz (2014), el tiempo de retención para el ácido clorogénico fue de 4.179 minutos, lo cual es muy diferente a la detección encontrada en el presente estudio para el ácido clorogénico. La cromatografía líquida de alta eficiencia es una metodología muy sensible y, cualquier cambio, ya sea instrumental o metodológico puede afectar los tiempos de retención de las muestras. En este trabajo se utilizó un cromatógrafo de líquidos de una marca diferente al utilizado en el estudio realizado por Rivero-Cruz (2014), así como una columna cromatográfica también de distinta marca. Es posible que éstas sean algunas de las razones por las que se observó una diferencia significativamente grande en el tiempo de retención del ácido clorogénico, entre uno y otro trabajo, utilizando las mismas condiciones metodológicas. En lo que refiere a la detección de quercetina, una forma de mejorar la resolución del pico es realizar la detección a una longitud de onda ( $\lambda$ ) diferente, ya que los flavonoides pueden ser detectados en un rango de  $\lambda$  de entre 250 y 360 nm (Lamuela-Raventós *et al.*, 2014).

En la segunda parte del análisis de las tres metodologías propuestas para la determinación del marcador químico, se inyectó la matriz de trabajo, es decir, el extracto hidrolizado obtenido del liofilizado del fruto de *P. serotina* de la colecta realizada en el año 2014. Los cromatogramas se muestran en la Figuras 28 para los 3 métodos.



**Figura 28.** Extracto hidrolizado de *P. serotina* (colecta 2014). (a) Método 1, (b) Método 2, (c) Método 3.

Columna ZORBAX XDB C18. Detección a 245 nm.

Método 1, gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

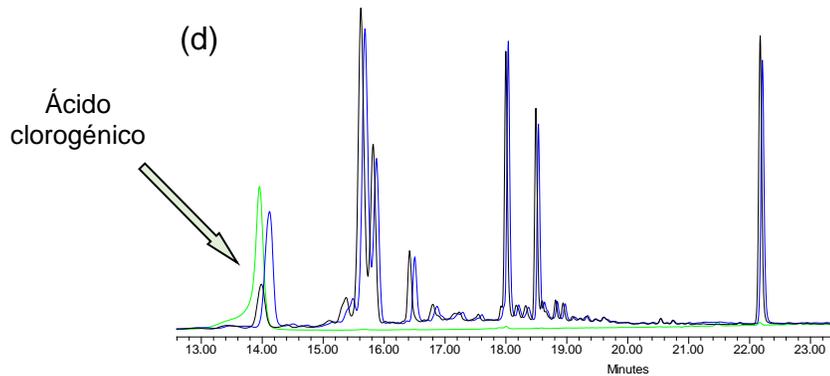
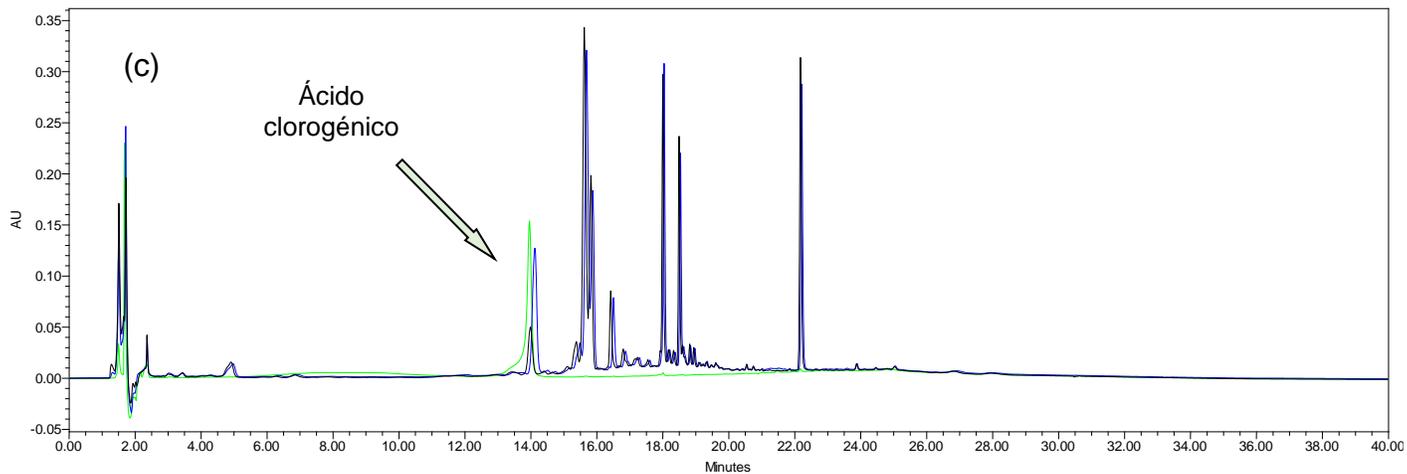
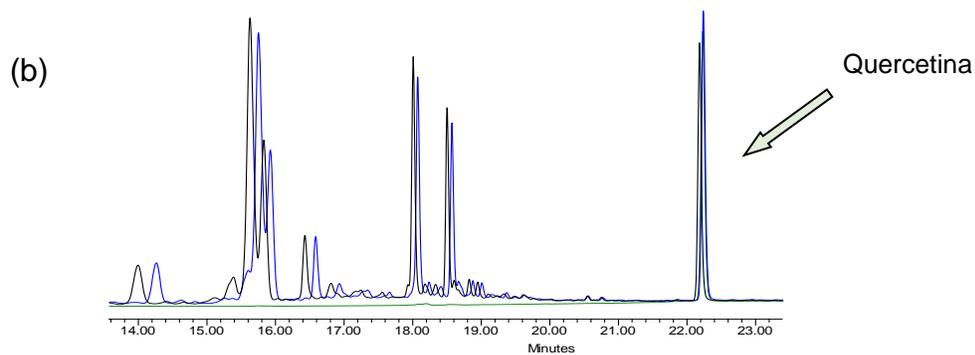
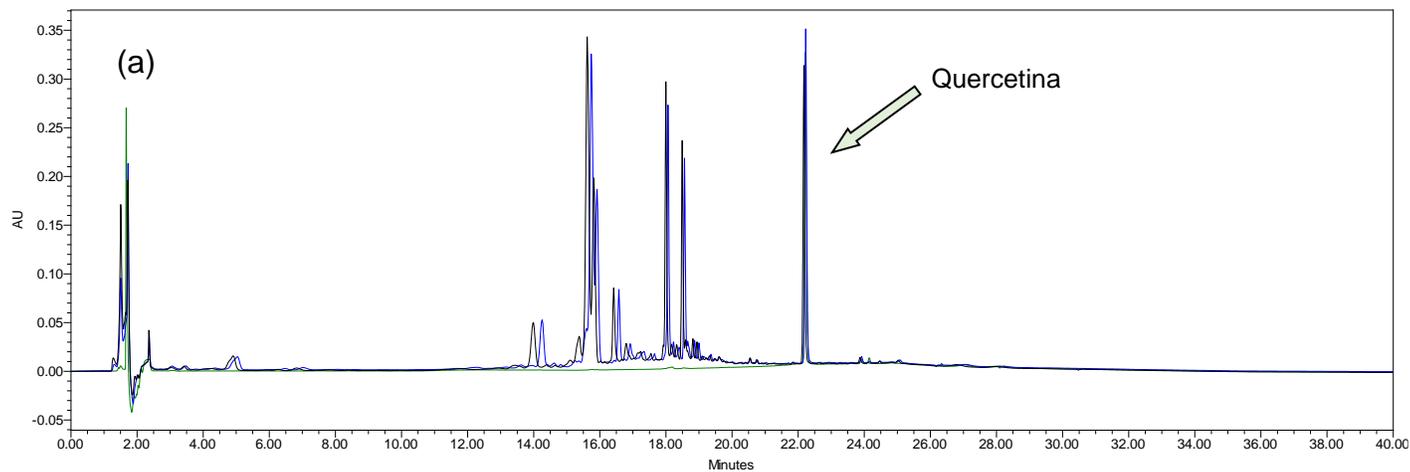
Método 2, isocrático metanol: buffer, flujo 0.8 ml/min.

Método 3, gradiente ácido fórmico: metanol, flujo 0.5 ml/min.

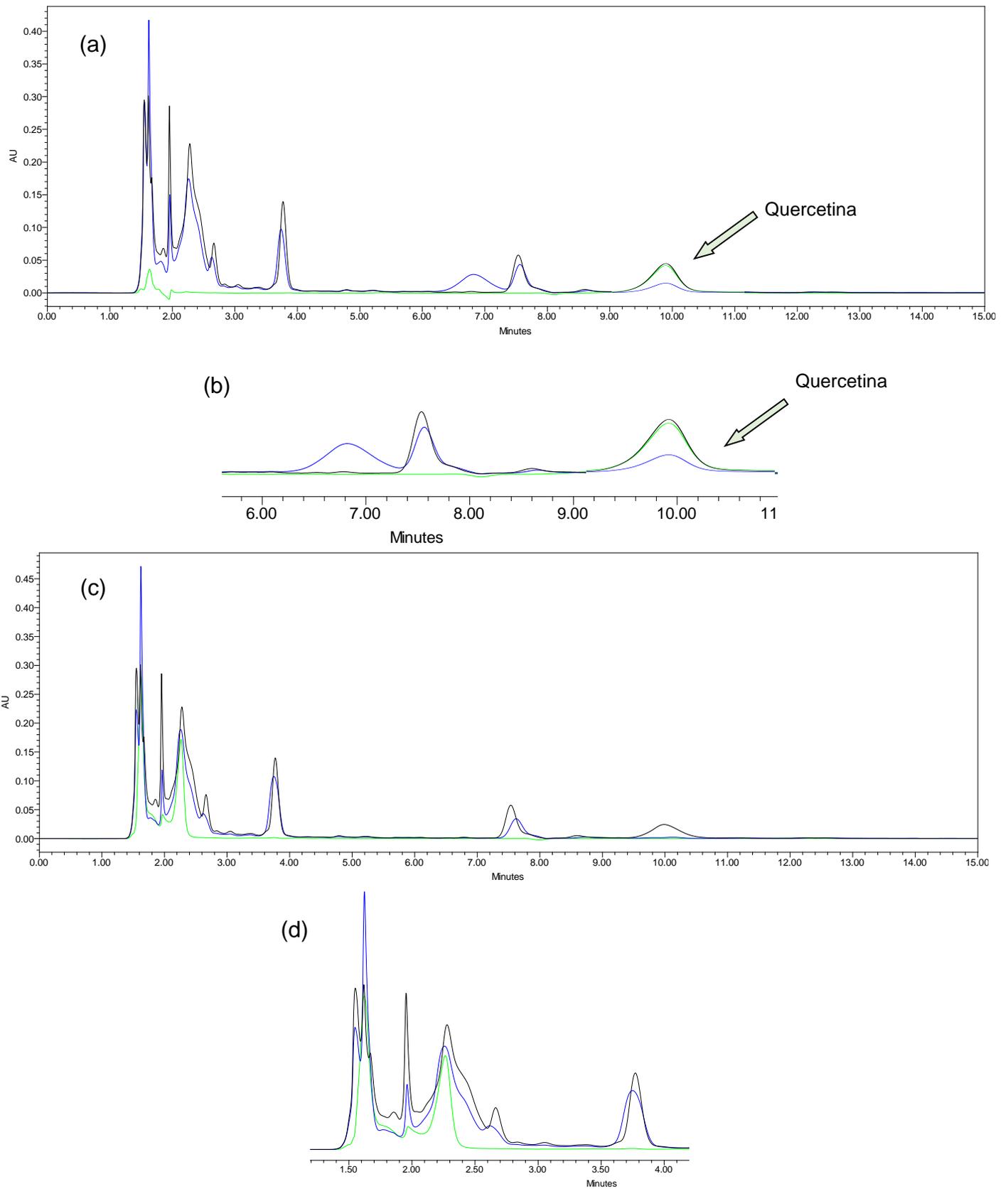
En el cromatograma del método 1, se observó que los constituyentes individuales de la muestra se detectan después de un tiempo de elución de 13 minutos y termina de eluir pasados los 23 minutos (Figura 28 (a)), lo que implica que la muestra se eluye en un tiempo aproximado de 10 minutos, mostrando una buena resolución de los picos de cada uno de los compuestos que componen la matriz. En cambio, en el método 2, se presentó el mismo problema que cuando se inyectó el estándar del ácido clorogénico: la muestra se detecta junto con el frente del disolvente en un tiempo que no sobrepasa los 4 minutos (Figura 28 (b)). Además sólo se observaron dos picos con buena resolución después de los 3 minutos de corrida, a diferencia de los 6 picos que se detectaron por el método 1. En lo que refiere al método 3, la muestra se detecta de manera similar que en el método 1, con la diferencia de que la detección inicia a los 25 minutos de elución y termina a los 34 minutos (Figura 28 (c)). De igual manera, este método tiene buena resolución de los picos de los compuestos presentes en la muestra, sólo que estos picos aparecen un poco más juntos, es decir, tienen menor tiempo de separación entre ellos.

Finalmente se realizó la co-elución (por separado) de la matriz de trabajo (extracto hidrolizado de *P. serotina*) con los estándares de quercetina (30 µg/ml) y de ácido clorogénico (300 µg/ml), en una proporción 50:50 (v/v). Los cromatogramas obtenidos en cada uno de los 3 métodos se muestran en las Figuras 29, 30 y 31. Para estos cromatogramas, la línea verde corresponde a la detección del estándar, la línea negra es el cromatograma de la matriz de trabajo y la línea azul es la correspondiente a la co-elución.

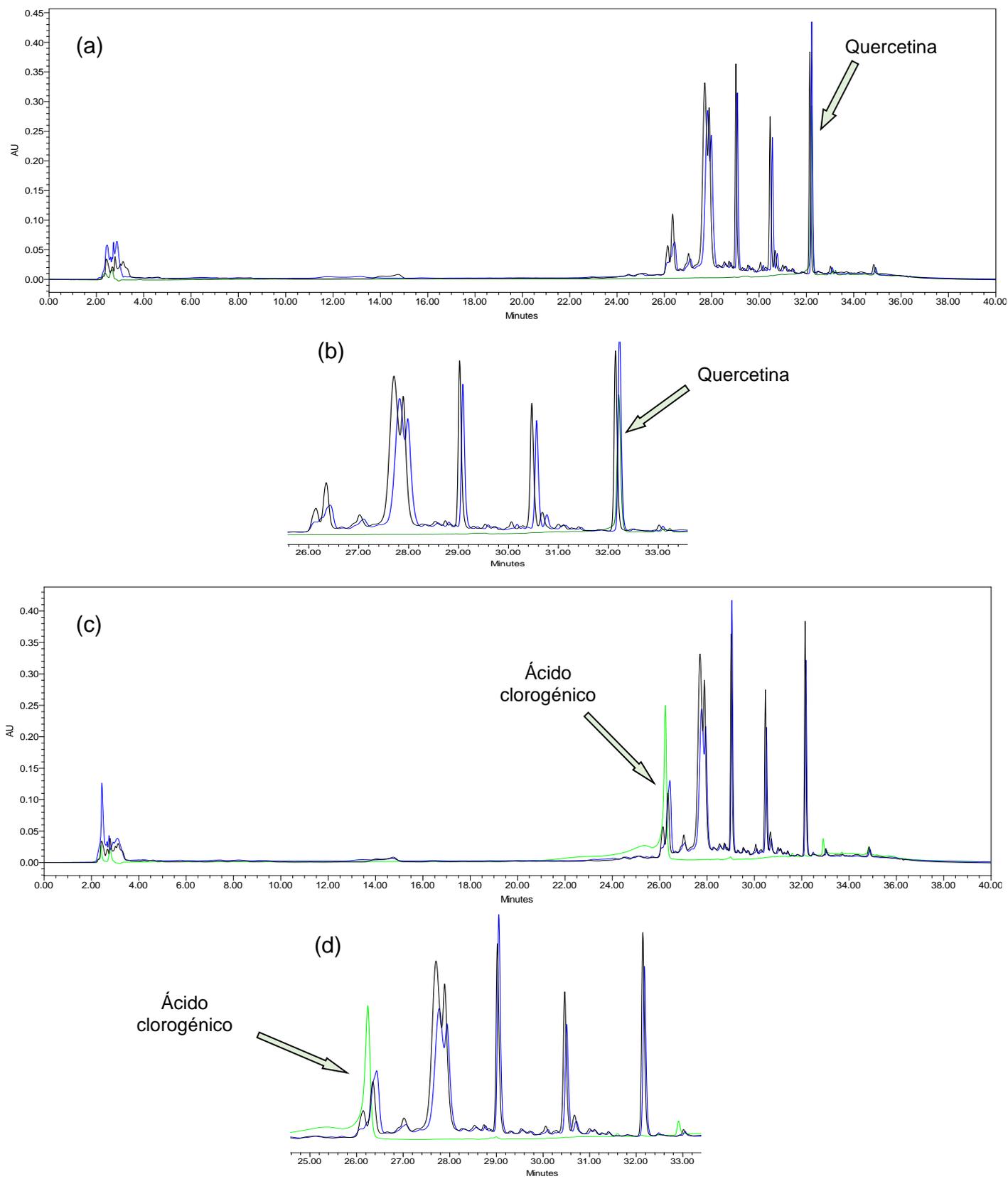
Nuevamente, el método 1 presentó una mejor resolución y una fácil identificación de ambos compuestos (ácido clorogénico y quercetina) en la matriz de trabajo. En el método dos, no fue posible identificar el pico correspondiente al estándar de ácido clorogénico, puesto que, tanto la matriz de trabajo como el mismo estándar se confunden con el frente del solvente, apareciendo dos picos en el cromatograma del estándar y varios picos poco definidos en el cromatograma de la muestra. Por otro lado, si fue posible la identificación de la quercetina, la cual aparece aproximadamente a los 10 minutos, sin embargo, es un pico muy pequeño y poco definido en comparación con los cromatogramas del método 1.



**Figura 29.** Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 1: gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

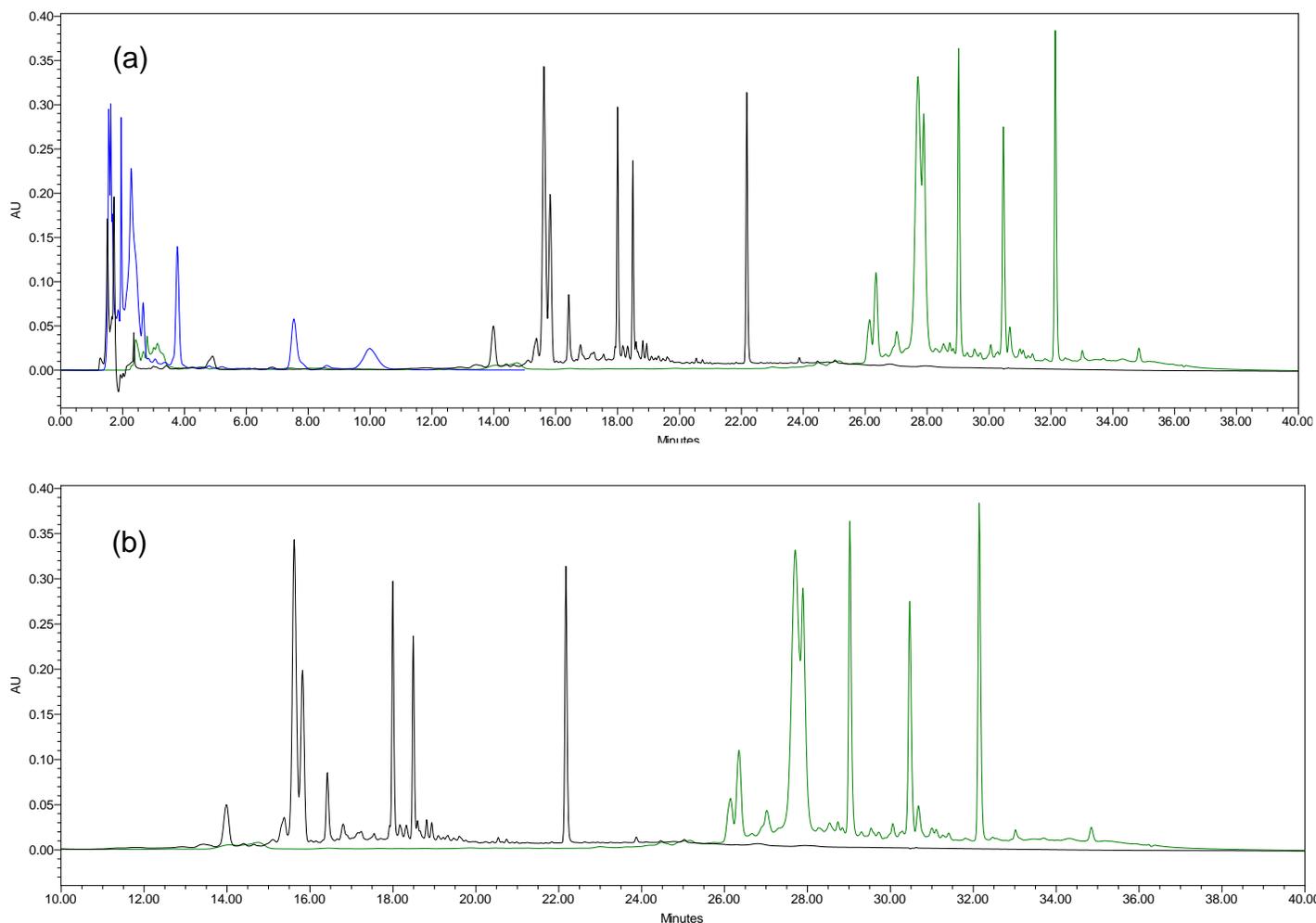


**Figura 30.** Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 2: isocrático, metanol: buffer, flujo: 0.8 ml/min.



**Figura 31.** Co-eluciones. (a,b) muestra + quercetina. (c,d) muestra + ácido clorogénico. Método 3: gradiente ácido fórmico: metanol, flujo: 0.5 ml/min.

En el método 3, la identificación tanto del ácido clorogénico como de la quercetina fue sencilla, al igual que en el método 1. Sin embargo, los picos de la matriz de trabajo obtenidos por el método 3 tienen una menor separación y menor resolución que los adquiridos por el método 1. Esto se observa de forma más evidente en la Figura 32, en la cual muestran los cromatogramas de la matriz de trabajo obtenidos por los 3 métodos. La línea negra corresponde al método 1, la azul pertenece al cromatograma del método 2 y la verde es del cromatograma del método 3.



**Figura 32.** Cromatogramas de la matriz de trabajo (muestra del fruto de *P. serotina*) obtenidos por los 3 métodos. (a) Métodos 1,2 y 3. (b) Métodos 1 y 3.

Método 1, gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

Método 2, isocrático metanol: buffer, flujo 0.8 ml/min.

Método 3, gradiente ácido fórmico: metanol, flujo 0.5 ml/min.

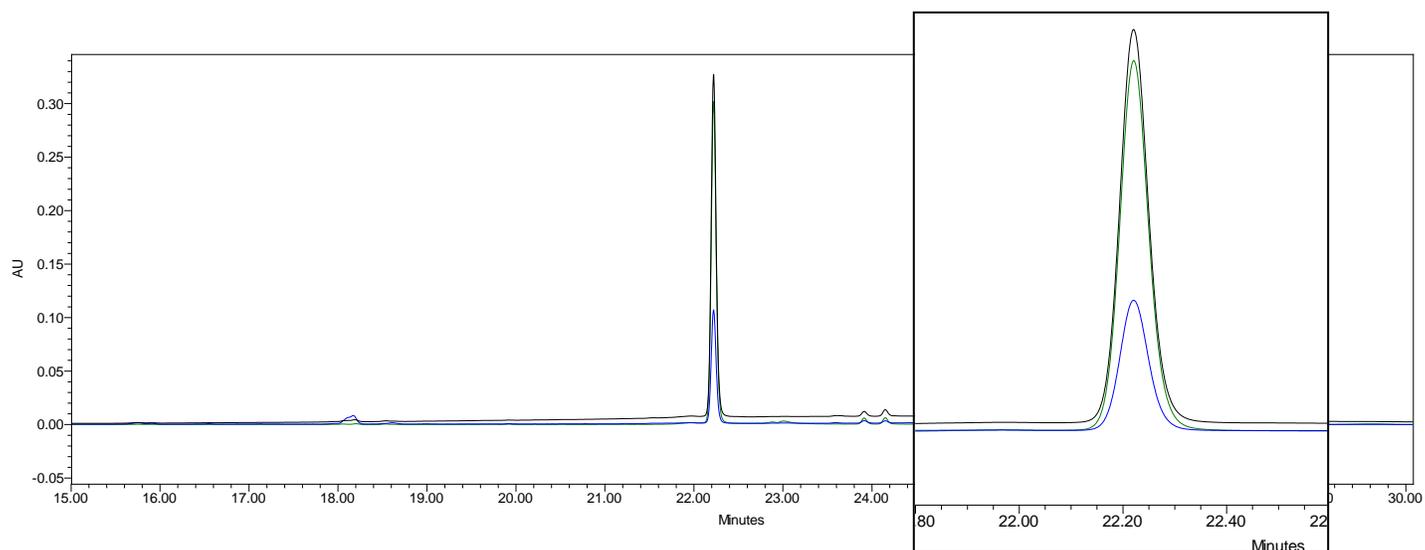
Columna ZORBAX XDB C18. Detección a 245 nm.

Además, en el método 3, la detección de la matriz de trabajo es más tardada que en el método 1, con una diferencia aproximada de 13 minutos. En estos dos métodos, se utilizan dos de los principales solventes orgánicos más utilizados en los métodos cromatográficos para la detección, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos: el acetonitrilo (método 1) y el metanol (método 3) (Khoddami *et al.*, 2013). Las diferencias observadas en los cromatogramas obtenidos de estos métodos pueden deberse a que el acetonitrilo generalmente conduce a una mejor resolución en un tiempo de análisis más corto que en el caso del metanol, además ayuda a la formación de picos más nítidos. Por otra parte, la acidificación de los disolventes, utilizando ácidos como el acético, fórmico, y fosfórico, es una estrategia común para suprimir la ionización de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos, dando como resultado picos más nítidos y reproducibles (Khoddami *et al.*, 2013; Kontogianni, 2014)

Dados estos resultados, se concluye que el método 1, es la mejor opción para la detección del marcador químico en las muestras del fruto de *P. serotina*, ya que genera los cromatogramas con mejor resolución de los picos, lo cual facilita la cuantificación de los mismos. Así mismo, estos resultados justifican la utilización de este método para el análisis del perfil de compuestos fenólicos, tanto en este trabajo, como en los realizados por (Luna-Vázquez *et al.*, 2013). Por otra parte, la modificación de la fase móvil en el método 2 podría ser una alternativa para mejorar la detección del ácido clorogénico y de la quercetina, así como para aumentar la separación de los compuestos en la matriz de trabajo. De la misma forma, la modificación de la velocidad del flujo y del gradiente de la fase móvil en el método 3 podría mejorar la separación de los picos y reducir el tiempo de retención de la matriz de trabajo.

Un parámetro importante para la detección y cuantificación de la quercetina es la longitud de onda a la cual se registra la detección. De acuerdo con la longitud de onda, la complejidad de un cromatograma puede incrementarse o disminuir, mostrando la importancia de la selección adecuada del valor máximo de absorbancia de cada uno de compuestos cuando se realiza la cuantificación (Fontana y Bottini, 2014). La detección de flavonoides en general se lleva a cabo usualmente a 250, 265, 290, 350, 360, y/o 400 nm, con una longitud de onda añadida en el rango 500 – 525

nm si se incluyen las antocianinas (Liu *et al.*, 2008; Kontogianni, 2014). La detección a 280 nm es más comúnmente utilizado para la separación simultánea de mezclas de ácidos fenólicos (Kontogianni, 2014). Dado que en este estudio se realizó el análisis del perfil de compuestos fenólicos a una  $\lambda$  de 254 nm, se decidió realizar el análisis de la detección del estándar de quercetina a las longitudes de onda de 254, 280 y 360 nm, para incluir las longitudes de onda recomendadas tanto para ácidos fenólicos como para flavonoides. En la Figura 33 se muestran los cromatogramas de la quercetina a las diferentes longitudes de onda.



**Figura 33.** Cromatogramas de la quercetina a diferentes longitudes de onda.

Negro: 254 nm, azul: 280 nm, verde: 360 nm.

Columna ZORBAX XDB C18. Gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

A pesar de que la longitud de onda recomendada para la detección de la quercetina por HPLC está entre 360 y 370 nm (Fontana y Bottini, 2014; Kontogianni, 2014; Pardo *et al.*, 2014), en el presente trabajo, la mejor resolución del pico correspondiente a la quercetina se obtuvo a una  $\lambda$  de 254 nm; sin embargo, no se observa una diferencia importante entre las longitudes de onda de 254 y 360 nm. Con este resultado, y tomando en cuenta que la longitud de onda de 254 nm se encuentra en el rango donde se detectan la mayoría de los compuestos fenólicos, se decidió establecer esta longitud de onda como la apropiada para el método analítico para la detección y cuantificación de la quercetina como marcador químico.

## **7.8. Validación del método analítico para la detección y cuantificación de quercetina como marcador químico del fruto del *P. serotina***

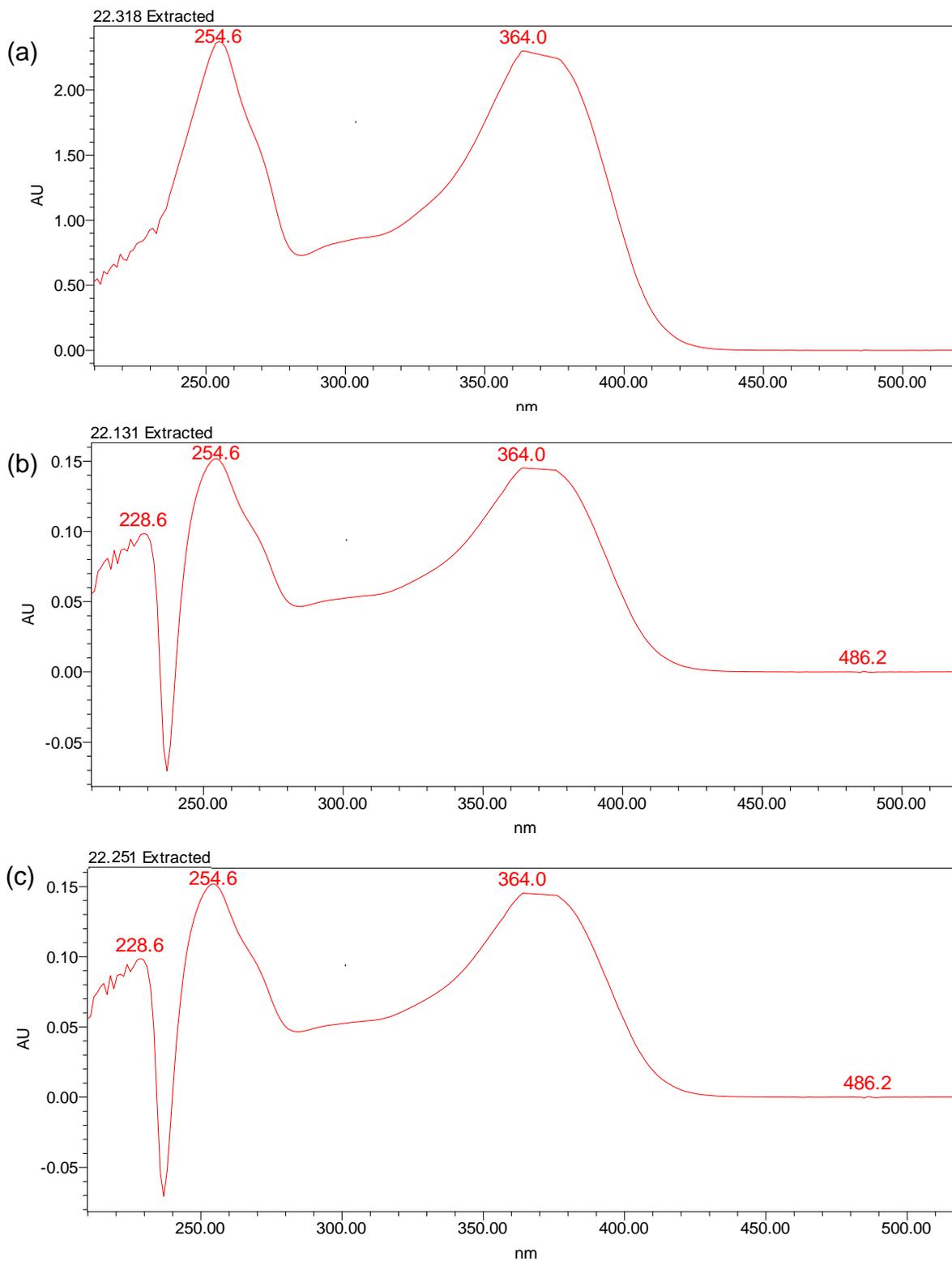
Una vez que se hubo seleccionado la quercetina como marcador químico del fruto de *P. serotina*, así como las condiciones de elución para el análisis cromatográfico (columna ZORBAX XDB C18, fase móvil: gradiente de ácido fórmico (2%): acetonitrilo, velocidad de flujo: 0.8 ml/min), se procedió a realizar la validación del método analítico de acuerdo a los criterios establecidos por la guía Eurachem para la validación de métodos analíticos (Magnusson y Örnemark, 2014).

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual queda establecido por estudios experimentales, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende (Magnusson y Örnemark, 2014). Los parámetros evaluados en este trabajo para la validación del método analítico son: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y de cuantificación y estabilidad.

### **7.8.1. Especificidad del método (selectividad)**

En un método analítico, la especificidad se da cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se debe únicamente al analito de interés y no a otros componentes presentes en la matriz de trabajo. La selectividad del método se realizó mediante la comparación de los espectros de absorción obtenidos de tres muestras analizadas: el estándar de quercetina (0.1 mg/ml), la matriz de trabajo (extracto hidrolizado preparado a partir de los frutos liofilizados de *P. serotina*) y la co-elución del estándar (30 µg/ml) con la matriz de trabajo en una proporción 9:1 (matriz: estándar v/v).

En la Figura 34 se muestran los espectros de absorción obtenidos de las 3 muestras, en donde se pueden apreciar los máximos de absorción de la quercetina:  $\lambda_{max} = 254.6$  y  $364.0$  (Figura 34 (a)). En las Figuras (b) y (c) se observan los mismos máximos de absorción confirmando la identidad de la quercetina en la matriz de trabajo. Estos espectros demuestran la selectividad del método.

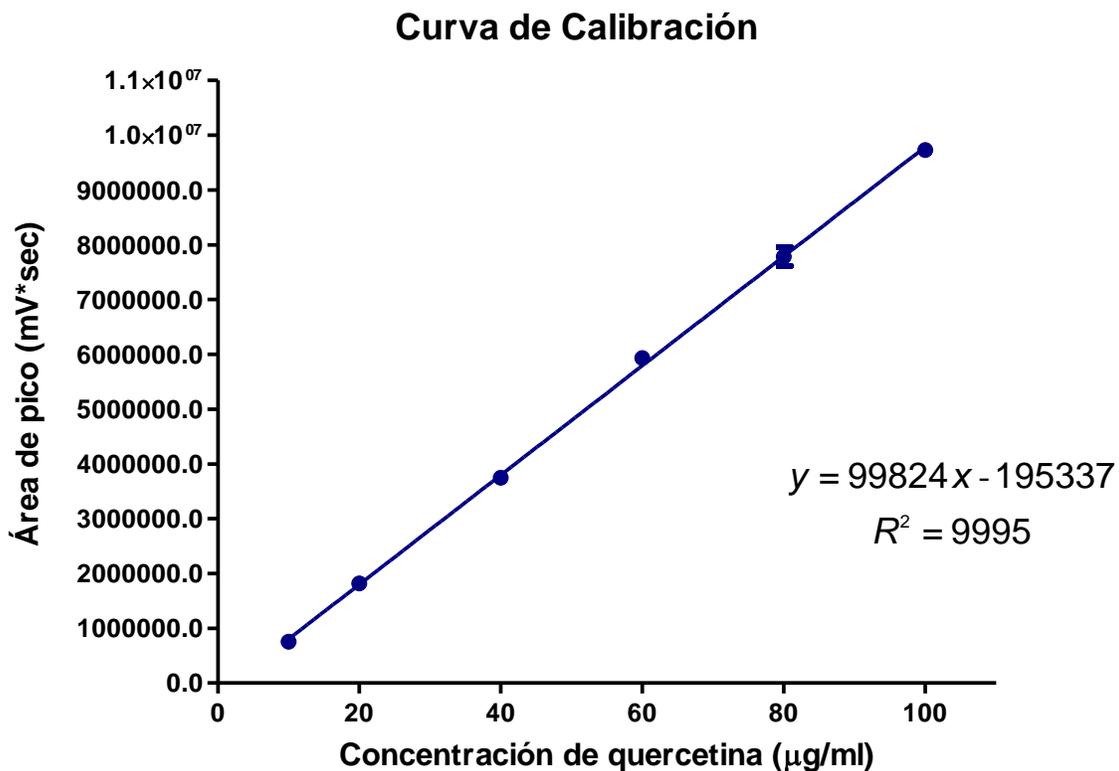


**Figura 34.** Espectros de absorción. (a) Estándar de quercetina, (b) matriz de trabajo (extracto del fruto de *P. serotina*), (c) co-elución (matriz de trabajo con el estándar).

Columna ZORBAX XDB C18. Gradiente ácido fórmico: acetonitrilo, flujo: 0.8 ml/min.

### 7.8.2. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema es la capacidad de un método analítico para generar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito de interés. Para evaluar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración graficando 6 niveles de concentración del estándar de quercetina de entre 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , y el área de pico ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) correspondiente a cada concentración. El gráfico obtenido de este análisis se presenta en la Figura 35. En la Tabla 16 se muestran los resultados de 6 réplicas de cada punto de la curva de calibración.



**Figura 35.** Curva de calibración de quercetina para la evaluación de la linealidad del sistema.

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple, a partir del cual se calcularon los parámetros estadísticos necesarios para evaluar la linealidad del sistema.

**Tabla 16.** Resultados obtenidos de la curva de calibración de quercetina para evaluar la linealidad del sistema.

<b>Punto</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Área de pico (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>) Réplicas</b>					
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	10	728561	817314	738859	759527	720768	779298
<b>2</b>	20	1864936	1835831	1804981	1927285	1737732	1757441
<b>3</b>	40	3833390	3666914	3741540	3836742	3624672	3783224
<b>4</b>	60	6005981	6003535	5780018	6041240	5943456	5828218
<b>5</b>	80	7578536	7995932	7744478	7958950	7810070	7619799
<b>6</b>	100	9749780	9848926	9750040	9775697	9751062	9494840

Los resultados obtenidos de este estudio se resumen en la Tabla 17 y demuestran que el método analítico desarrollado es lineal en el rango de concentraciones analizadas, ya que cumple con los criterios de aceptación descritos en la guía de validación de procedimientos analíticos ICH Q2(R1) (International Conference on Harmonization, 2005). Así, se obtuvo una  $r^2$  mayor a 0.98 ( $r^2 = 0.9995$ ) y el intervalo de confianza de la pendiente no incluyó al cero ( $IC(\beta_1)$ ).

**Tabla 17.** Parámetros estadísticos para la evaluación de la linealidad del sistema.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Pendiente de la recta	$b_1 = 99824$	$b_1 \neq 0$
Ordenada al origen	$b_0 = -195337$	$b_0 = 0$
Coefficiente de correlación	$r = 0.9997$	$r \geq 0.99$
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0.9995$	$r^2 \geq 0.98$
Intervalo de confianza ( $t_{0.975,34} = 2.03$ )	$IC(\beta_1) = 98517.86 -$ 101129.15	$IC(\beta_1)$ no incluye el cero

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) de la regresión lineal para evaluar si la ecuación obtenida de ésta describe adecuadamente la relación lineal entre las variables. Las hipótesis planteadas para dicho análisis fueron las siguientes:

**H<sub>0</sub>: El modelo estadístico propuesto no describe una relación lineal.**

**H<sub>1</sub>: El modelo estadístico propuesto describe una relación lineal.**

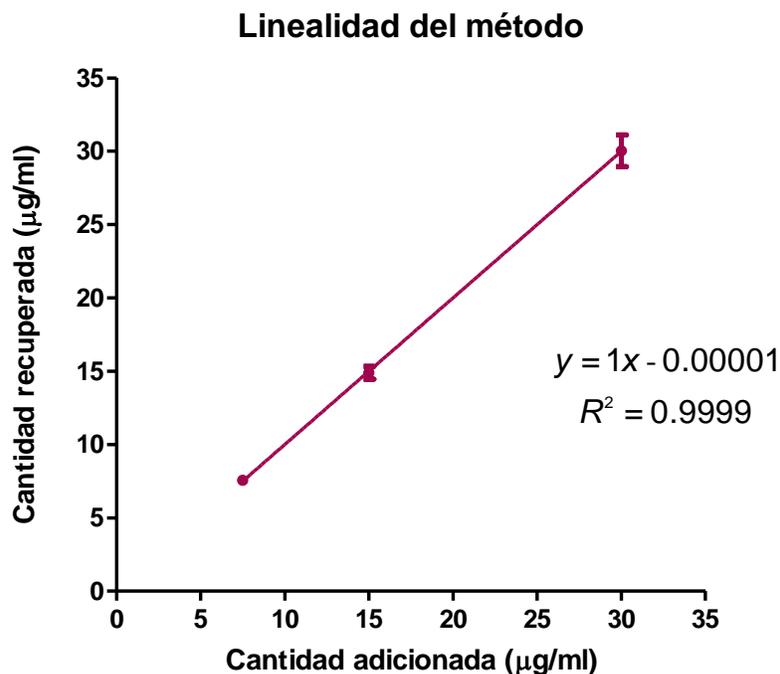
Para probar estas hipótesis se utilizó el estadístico F de Fisher para una  $n = 36$  y  $\alpha = 0.05\%$ , el cual muestra un valor de  $F_{0.05,1,34} = 24088.40$  que supera el valor crítico de  $F_{0.05,1,34} = 4.171$  encontrado en las tablas de distribución de Fisher. De este resultado se concluye el rechazo de la hipótesis nula ( $H_0$ ) y, por lo tanto, el análisis de regresión lineal es adecuado, confirmando la linealidad del sistema.

### 7.8.3. Linealidad del método

Un método es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito adicionado en la matriz de trabajo que es objeto de análisis (OMS, 2007). La linealidad del método se evaluó a partir de la curva de calibración construida a partir de las soluciones de la matriz de trabajo enriquecida con tres diferentes concentraciones del estándar de quercetina (7.5, 15 y 30  $\mu\text{g/ml}$ ). En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de este estudio. Los datos de cantidad recuperada y cantidad adicionada se ajustaron a un análisis de regresión lineal simple para obtener la curva de linealidad del método (Figura 36).

**Tabla 18.** Resultados obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método.

<b><i>Cantidad adicionada de quercetina (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i></b>	<b><i>Área de pico (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</i></b>	<b><i>Cantidad recuperada (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</i></b>	<b><i>% de Recobro</i></b>
7.5	650328	7.449	99.319
7.5	662425	7.726	103.012
7.5	653719	7.527	100.354
15	956033	14.447	96.316
15	993688	15.309	102.063
15	977624	14.942	99.611
30	1680592	31.034	103.448
30	1586628	28.883	96.278
30	1643414	30.183	100.611



**Figura 36.** Curva de calibración para evaluar la linealidad del método.

Los parámetros estadísticos necesarios para evaluar la linealidad del método se muestran en la Tabla 19 con sus respectivos criterios de aceptación.

**Tabla 19.** Parámetros estadísticos para la evaluación de la linealidad del método.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
Pendiente de la recta	$b_1 = 1$	$b_1 \neq 0$
Ordenada al origen	$b_0 = -0.00001$	$b_0 = 0$
Coeficiente de correlación	$r = 0.9999$	$r \geq 0.99$
Coeficiente de determinación	$r^2 = 0.9999$	$r^2 \geq 0.98$
Coeficiente de variación	$CV_{x/y} = 2.54\%$	$CV_{x/y} \leq 3\%$
Intervalo de confianza de la pendiente ( $t_{0.975,7} = 2.03$ )	$IC(\beta_1) = 0.947 - 1.053$	$IC(\beta_1)$ no incluye el cero
Intervalo de confianza de la ordenada ( $t_{0.975,7} = 2.365$ )	$IC(\beta_0) = -1.059 - 1.059$	$IC(\beta_0)$ incluye el cero

Los resultados obtenidos (Tabla 19) demuestran la linealidad del método ya que cumple con los criterios de aceptación descritos en la guía de validación de procedimientos analíticos ICH Q2(R1) (2005).

#### 7.8.4. Exactitud

La exactitud de un método es la proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mesurando (valor de referencia) (Magnusson y Örnemark, 2014). En este trabajo, el valor de referencia corresponde a la cantidad adicionada del estándar de quercetina a la matriz de trabajo. La exactitud se determinó mediante el análisis de los % de recobro mostrados en la Tabla 19 (fórmula del ANEXO A). Los parámetros estadísticos para evaluar la exactitud del método se describen en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Parámetros estadísticos para la evaluación de la exactitud del método.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Criterio de aceptación</b>
% de Recobro (promedio)	$\bar{y} = 100.113\%$	$\bar{y} = 98 - 102\%$
Desviación estándar	$S = - 2.589$	---
Coefficiente de variación	$CV = 2.586\%$	$CV \leq 3\%$
Intervalo de confianza del % de recobro ( $t_{0.975,7} = 2.365$ )	$IC (\%R) = 95.891 - 105.116$	$IC (\beta_1)$ incluye el 100%

Estos resultados indican que el método analítico desarrollado para la detección y cuantificación de quercetina es exacto en el rango de las concentraciones ensayadas.

#### 7.8.5. Precisión

La precisión del sistema se mide en términos de repetibilidad, la cual se define como la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes sucesivas bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo (Magnusson y Örnemark, 2014). La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución de quercetina preparada a una concentración de 80  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21. El parámetro estadístico evaluado para la repetibilidad fue el coeficiente de variación cuyo criterio de aceptación es que debe ser menor a 3%.

**Tabla 21.** Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método y del sistema.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Área de pico (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>	<b>Muestra enriquecida con quercetina (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Área de pico (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>
<b>1</b>	80	7503933	30	1680592
<b>2</b>	80	7469018	30	1577075
<b>3</b>	80	7493352	30	1602549
<b>4</b>	80	7494502	30	1586628
<b>5</b>	80	7379512	30	1591546
<b>6</b>	80	7578536	30	1643414
	<b><math>\bar{y}</math></b>	<b>7486475.500</b>	<b><math>\bar{y}</math></b>	<b>1613634</b>
	<b>S</b>	<b>64245.724</b>	<b>S</b>	<b>40116.988</b>
	<b>CV</b>	<b>0.858</b>	<b>CV</b>	<b>2.486</b>

La precisión del método, se evaluó con el análisis de 6 soluciones de la matriz de trabajo enriquecida con el estándar de quercetina a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$ . De igual forma que con la repetibilidad, el parámetro estadístico evaluado fue el coeficiente de variación cuyo criterio de aceptación es que debe ser menor a 3% para considerar que el método es preciso.

#### **7.8.6. Límite de detección y límite de cuantificación**

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada pero no cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (OMS, 2007). Ambos límites (LD y LC se determinaron a partir de una curva de calibración con 6 niveles de concentración del estándar comprendidos entre 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizó un análisis de regresión lineal simple y utilizando las fórmulas indicadas en el ANEXO A, se determinaron los siguientes parámetros: la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el límite de detección y el límite de cuantificación. Los resultados obtenidos de estos análisis se presentan en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Resultados obtenidos de la curva de calibración para la determinación de LD y LC.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Valor obtenido</b>
Pendiente de la recta	$b_1 = 100433.855$
Ordenada al origen	$b_0 = - 219798$
Coeficiente de correlación	$r = 0.9995$
Coeficiente de determinación	$r^2 = 0.9990$
Límite de detección	$LD = 3.454 \mu\text{g/ml}$
Límite de cuantificación	$LC = 10.467 \mu\text{g/ml}$

### 7.8.7. Estabilidad de la muestra

El objetivo del estudio de estabilidad de la muestra es establecer las posibles variaciones que puede sufrir una muestra bajo diferentes condiciones, tanto físicas como químicas. Para la evaluación de la estabilidad de la muestra, se registraron las áreas de pico obtenidas por el estándar de quercetina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) después de someterlas a diferentes condiciones experimentales: basicidad, acidez, oxidación y luz UV. Con los datos obtenidos, se evaluó el % de quercetina (en base al área de pico) para calcular la diferencia absoluta ( $|d_i|$ ) después de someter el estándar a las condiciones antes descritas. El criterio de aceptación es que la respuesta obtenida será únicamente debida al analito.

De igual manera, se evaluó el % de quercetina contenida en una solución preparada de estándar con una concentración inicial de 100  $\mu\text{g/ml}$  en diferentes condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente (TA), refrigeración a 4°C y congelación a – 20 °C. Las evaluaciones se realizaron el día inicial, a las 24 horas y a las 48 horas de almacenamiento. Los resultados obtenidos de los diferentes parámetros de estabilidad evaluados se presentan en la Tabla 23 y se expresan en términos de diferencias absolutas ( $|d_i|$ ) de la media aritmética de cada condición de con respecto a la media aritmética del análisis inicial ( $\bar{y}_i = 8704935.75 = 100\%$ ). El criterio de aceptación es que el valor de  $|d_i|$  sea  $\leq 2\%$ .

**Tabla 23.** Condiciones para la evaluación de la estabilidad.

<b>Factor evaluado</b>	<b>Quercetina 100</b>		$\bar{Y}_0$	$ \bar{Y}_1 - \bar{Y}_0 $			<b><math> di </math> %</b>	
	<b><math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Área de pico</b> <b>(<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>					<b>24 hrs</b>	<b>48 hrs</b>
<b>Basicidad</b>	---		---	---	---	---	---	---
	---							
<b>Acidez</b>	8158001		7702470.5		1002425.25		11.52	
	7246940							
<b>Oxidación</b>	1715895		1866129.5		6838806.25		78.56	
	2016364							
<b>Luz UV</b>	8849716		8734494		29558.25		0.34	
	8619272							
	<b>24 hrs</b>	<b><math>\bar{Y}_0</math></b>	<b>48 hrs</b>	<b><math>\bar{Y}_0</math></b>	<b>24 hrs</b>	<b>48 hrs</b>	<b>24 hrs</b>	<b>48 hrs</b>
<b>Almacenamiento</b> <b>TA</b>	8805704	8354116	5991797	6472323	359819	2232612	4.13	25.65
	7884529		6952849					
<b>Almacenamiento</b> <b>4 °C</b>	8775464	8751154	7709122	7842037	46218.2	862898	0.53	9.91
	8726844		7974952					
<b>Almacenamiento</b> <b>-20 °C</b>	8915149	8770451	8364046	8578978	65515.7	125957	0.75	1.45
	8805704		8793910					

Analizando los datos obtenidos por la detección de la quercetina después de someterla a distintas condiciones de evaluación, se constató que este compuesto presenta una degradación en condiciones de acidez, oxidación y basicidad, siendo este último el parámetro que más descomposición causó sobre el estándar, ya que en el cromatograma de basicidad presentó varios picos a distintos tiempo de retención, los cuales fueron distintos al tiempo de retención observado para la quercetina. Cabe mencionar, que la degradación de la quercetina causada por oxidación puede explicarse por la actividad antioxidante que posee este compuesto frente a las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (Mladěnka *et al.*, 2010). En lo que refiere al tratamiento con luz UV, la quercetina es estable, ya que presentó un valor de  $|di|$  inferior al 2%.

Por otra parte, los resultados obtenidos de las condiciones de almacenamiento indican que la quercetina no es estable cuando se almacena a temperatura ambiente y en refrigeración a 4 °C, por lo que es recomendable que el estándar se guarde en congelación a -20 °C.

De acuerdo a los resultados obtenidos de todos los parámetros evaluados durante la validación, el método analítico para la detección y cuantificación de la quercetina en los extractos elaborados a partir de los frutos de *P. serotina*, es un método lineal, preciso y exacto.

## 8. CONCLUSIONES

- El método de secado por convección de aire causa una pérdida significativa de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el fruto de *P. serotina*, así como de la capacidad antioxidante que está estrechamente relacionada con estos compuestos.
- El secado por convección, independientemente de la temperatura utilizada, disminuyó significativamente el efecto vasodilatador producido por el fruto de *P. serotina*, en comparación con el efecto inducido por el fruto liofilizado.
- La utilización de maltodextrina y el pre-tratamiento con etanol fueron insuficientes para proteger los compuestos bioactivos responsables de la actividad vasodilatadora del fruto de *P. serotina*.
- El secado por convección de aire es uno de los métodos más agresivos, debido a que produce una reducción considerable de la calidad de los productos procesados, al promover la pérdida, la degradación o la transformación de varios compuestos presentes en las muestras.
- Es necesario buscar otras alternativas de secado para procesar el fruto de *P. serotina*.
- La quercetina es un compuesto más apropiado que el ácido clorogénico para ser utilizado como un marcador químico en las pruebas de control de calidad de los productos que se elaboren a partir del fruto de *P. serotina*, debido a su presencia constante en este fruto, a su fácil identificación y a que posee mayor actividad vasodilatadora.

- La metodología utilizada para realizar el análisis del perfil de compuestos fenólicos constituye una opción metodológica óptima para la detección y la cuantificación del marcador químico (quercetina) del fruto de *P. serotina*.
  
- De acuerdo a la validación realizada en el presente trabajo, el método para la detección y la cuantificación del marcador químico (quercetina) del fruto de *P. serotina* es lineal, preciso y exacto.

## 9. PERSPECTIVAS

El secado por convección de aire resultó ser un método desfavorable para procesar el fruto fresco de *P. serotina*, puesto que redujo significativamente las propiedades biológicas del fruto. Por esta razón, es necesario continuar con la investigación de métodos alternativos de secado que puedan proporcionar muestras secas fáciles de manipular y con un efecto farmacológico similar al producido por el liofilizado del fruto fresco de *P. serotina*.

Existen muchos estudios respecto al secado por aspersion, en los cuales destacan su velocidad para el proceso de secado y el relativamente bajo deterioro de los compuestos activos de las muestras secas, el cual es considerablemente menor que los daños causados por el secado por convección de aire. Adicionalmente, la nueva tendencia es la utilización de métodos de secado combinados que permitan un aumento en la velocidad de secado y un menor tiempo de exposición a las altas temperaturas. Se han publicado varios estudios en los cuales se utilizan las microondas como un pre-tratamiento al secado al vacío o por convección, sí mismo hay estudios donde se emplea la metodología intermitente para procesar las muestras. Este proceso consiste en utilizar el secado por convección de manera intermitente, intercalándolo con la utilización de microondas o con la deshidratación osmótica ultrasónica, de manera tal, que se reduce el tiempo de secado y la exposición a las altas temperaturas.

Por otro lado, es importante continuar con el proceso de validación del método analítico para la detección y cuantificación del marcador químico (quercetina), para asegurar que este método es reproducible por otros analistas y en otros laboratorios y que será preciso y exacto al momento de determinar la calidad de los productos que sean elaborados a partir del fruto de *P. serotina*.

## 10. LITERATURA CITADA

Adhikari B, Howes T, Troung V. (2003a). In situ characterization of stickiness of sugar-rich foods using a linear actuator driven stickiness testing device. *Journal of Food Engineering*. **58**(5): 11 – 22.

Adhikari B, Howes T, Troung V. (2003b). Surface stickiness of drops of carbohydrates and organic acid solutions during convective drying: Experiments and modelling. *Drying Technology*. **21**(5): 839–873.

Adhikari B, Howes T, Troung V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*. **62**: 53 – 68.

Alam N, Jahan Bristi N, Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **21**: 143 – 152.

Almeida I, Barreira J, Oliveira B. (2011). Dietary antioxidant supplements: Benefits of their combined use. *Food and Chemical Toxicology*. **49**: 3232 – 3237.

Alpizar Ramos MS, Hernández Baltazar E. (2009). *Formas farmacéuticas sólidas*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 2ª Ed. México, D.F.

Argueta A, Cano A, Rodarate ME. (2009). *Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana*. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F.

[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro\\_atlas.html](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/intro_atlas.html)

Bárceñas N. (2011). Determinación del valor nutrimental, la actividad antioxidante y la toxicidad preclínica del fruto de *Prunus serotina* (capulín). Tesis para obtener el título de Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.

Barquera S, Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Villalpando S, Rodríguez-Gilaber C, Aguilar-Salinas CA. (2010). Hipertensión en adultos mexicanos: Encuesta Nacional de Nutrición y Salud 2006. *Salud Pública Mex.* **52**: supl 1: S63 - S71.

Bemiller JN, Whistler RL. (2003). Carbohydrate chemistry for food scientists. American Association of Cereal Chemists. 2<sup>nd</sup> ED. St. Paul, Minn.

Benzie FF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry.* **239**: 70 – 76.

Bhandari BR, Howes T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering.* **40**(1-2): 71 – 79.

Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. (2007). Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *Journal of the Neurological Sciences.* **262**: 77 – 84.

Boudhrioua N, Giampaoli P, Bonazzi C. (2003). Changes in aromatic components of banana during ripening and air-drying. *Food Science and Technology.* **36**: 633 – 642.

Braga AM, Silva MA, Augusto F, Barata LE. (2010). Volatile composition changes of pineapple during drying in modified and controlled atmosphere. *International Journal of Food Engineering.* **6**(1): Art. 12.

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J. (2005). Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension.* **23**: 233 – 246.

Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini. (2013). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* Article in press. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.03.007

Calderón de Rzedowski G, Rzedowski J. (2005). *Rosaceae. En Flora del bajo y de regiones adyacentes*. Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Calderone V, Chericoni S, Martinelli C, Testai L, Nardi A, Morelli I, Breschi MC, Martinotti E. (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. **370**(4): 290 – 298.

Caliskan G, Nur Dirim S. (2013). The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food and Bioproducts Processing*. **91**: 539 – 548.

Caparino OA, Tang J, Nindo CI, Sablani SS, Powers JR, Fellman JK. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine “Carabao” var.) powder. *Journal of Food Engineering*. **111**: 135-148.

Capuano E, Boerrigter-Eenling R, Veer G, M van Ruth S. (2012). Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of food and Agriculture*. **93**: 12 – 28.

Casanueva E, Kaufer Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, (2001) *Nutriología Médica*. Fundación Mexicana para la Salud/Editorial Médica Panamericana. 2ª Ed. México

Castro H, Raij L. (2013). Potassium in hypertension and cardiovascular disease. *Seminars in Nephrology*. **33**(3): 277 – 289.

Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MA. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – an overview. *Food Research International*. **44**: 499 – 509.

Céspedes C, El-Hafidi M, Pavon N, Alarcon J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*. **107**: 820 – 829.

Chávez-Meza AK. (2012). Determinación del valor nutracéutico del fruto de *Prunus serotina* (capulín) y análisis comparativo con los frutos *Vitis vinícola* (uva) y *Prunus domestica* (ciruela). Tesis para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Santiago Papasquiaro. Santiago Papasquiaro, Dgo.

Chobanian AV. (2003). The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *Jama*. **289**: 2560 – 2571.

Cogolludo A, Pérez-Vizcaíno F, Tamargo J. (2005). New insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. **14**: 423 – 427.

Colon M, Nerin C. (2012). Role of catechins in the antioxidant capacity of an active film containing green tea, green coffee, and grapefruit extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **60**: 9842 – 9849.

Córdova-Villalobos JA. (2009). Sobrepeso y obesidad, problemas de salud pública en México. *Cirugía y Cirujanos*. **77**: 421 – 422.

Corral-Aguayo R, Yahia E, Carrillo-López A, González-Aguilar G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**(22): 10498 – 10504.

De-Paepe D, Valkenburg D, Coudijzer K, Noten B, Servaes K, De Loose M, Voorspoels S, Diels L, Van Droogenbroeck B. (2014). Thermal degradation of cloudy apple juice phenolic constituents. *Food Chemistry*. Accepted manuscript.  
doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.005

Díaz JL. (1976). *Usos de las Plantas Medicinales de México*. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C. 17 – 18.

Del Rio D, Borges G, Crozier A. (2010). Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*. **104**: S67-S90.

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. **18**(14): 1818 – 1892.

Djendoubi N, Boudhrioua N, Kechaou N, Courtois F, Bonazzai C. (2012). Influence of air drying temperature on kinetics physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*. **90**: 43 – 441.

Domínguez JM. (2011). *Drying*. Comprehensive Biotechnology. 2nd Ed. Newnes. 727 – 735.

Esquivel Solís V, Jiménez Fernández M. (2010). Aspectos nutricionales en la prevención y tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Costarricense Salud Pública*. **19**: 42 – 47.

Fang Z, Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*. **24**: 510 – 523.

Fang Z, Bhandari B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*. **48**: 478 – 483.

Fang Z, Wu D, Yü D, Ye X, Liu D, Chen J. (2011). Phenolic compounds in Chinese purple yam and changes during vacuum frying. *Food Chemistry*. **128**: 943 – 948.

Fontana AR, Bottini R. (2014). High-throughput method based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe followed by liquid chromatography-multi-wavelength detection for the quantification of multiclass polyphenols in wines. *Journal of Chromatography A*. **1342**: 44 – 53.

Food and Drug Administration (FDA). (2013). Food additive status List. <http://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm> (Consultado en septiembre, 2014)

Forero DP, Orrego CE, Peterson DG, Osorio C. (2015). Chemical and sensory comparison of fresh and dried lulo (*Solanum quitoense* Lam.) fruit aroma. *Food Chemistry*. **169**: 85 – 91.

Fraga C, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*. **31**: 435 – 445.

Frati-Munari AC, Ocampo RA, Martínez-Valdés E. (2005). Consideraciones acerca de la regulación sanitaria de productos herbolarios y vitamínicos. *COFEPRIS Sistema Federal Sanitaria*. **1**(3): 3 – 11.

Funebo T, Ahrné L, Prothon F, Kidman S, Langton M, Skjöldebrand C. (2002). Microwave and convective dehydration of ethanol treated and frozen apple – physical properties and drying kinetics. *International Journal of Food Science and Technology*. **37**: 603 – 614.

Gabas AL, Telis VRN, Sobral PJA, Telis-Romero J. (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*. **82**: 246 – 252.

Gabas AL, Telis VRN, Giraldo-Gómez GI, Telis-Romero J. (2009). Propiedades termodinámicas de sorción de agua de la pulpa de lulo en polvo con encapsulantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **29**(4): 911 – 918.

Garau MC, Simal S, Rosselló C, Femenia A. (2007). Effect of air drying temperature on physic-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food chemistry*. **104**: 1014 – 1024.

Gennaro AR. (2003). *Farmacología*. Editorial. Panamericana. 20ª Ed. Uruguay.

Gil A, Ruiz MD. (2010) *Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal*. Tratado de nutrición. Tomo II. Editorial Médica Panamericana. 2ª Ed. Madrid. 397 – 414.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; on behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2013). Executive summary: heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. **127**: e6 - e245.

Gomes JL, Pinheiro-Braga AM, Hochheim M, Aparecida M. (2012). The influence of ethanol on the convective drying of unripe, ripe, and overripe bananas. *Drying Technology: An International Journal*. **30**(8): 817 – 826.

González EM, López E, González MS, Tena JA. (2004). *Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas*. Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR Unidad Durango, México.

Gutierrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martinez M, Hernandez-Avila M. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez M. (2010). Endothelial dysfunction and aging:an update. *Ageing Research Reviews*. **9**: 142 – 152.

Herrero M, Plaza M, Cifuentes A, Ibáñez E. (2012). *Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food*. Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists. Volumen 4. Extraction Techniques and Applications: Food and Beverage. Elsevier. 159 – 180.

Hough AF. (1965). Black cherry (*Prunus serótina* Ehrh). Silvics of forest trees of the United States. Fowells AH, comp. *Agriculture Handbook*. **271**: 539 – 545.

Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Luna F, Rojas JI, Rivero-Cruz B, Rivero-Cruz JF. (2009). Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus serotina* “capulín”. *Revista Latinoamericana de Química*. **37**: 164-173.

Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez DM, Hernández Sandoval L, Martínez M. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmaceutical Biology*. **48**(7): 732 – 739.

Iannou I, Hafsa I, Hamdi S, Charbonnel C, Ghoul M. (2012). Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. *Journal of Food Engineering*. **111**: 208 – 217.

Ignat I, Volf I, Popa VI. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. **126**: 1821 – 1835.

International Conference on Harmonization (ICH). (2005). Guideline Q2(R1) - Validation of analytical procedures: text and methodology.

Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Deren M, Kafarski P. (2012). Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chemistry*. **131**: 1149 – 1156.

Jeevani MM, Wijekoon O, Bhat R, Karim AA. (2011). Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etilingera elatior* Jack.) inflorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*. **24**: 615 – 619.

Kähkönen MP, Hopia AI, Heikki JV, Jussi-Pekka R, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonene M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **47**: 3954 – 3962.

Kang DG, Cao LH, Lee JK, Choi DH, Kim SJ, Lee H, Kim SJ, Lee HS. (2006). Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by butanol extract of *Phellinus igniarius* in isolated rat aorta. *American Journal of Chinese Medicine*. **34**(4): 655 – 665.

Kaur Sahni E, Chaudhuri B. (2012). Contact drying: A review of experimental and mechanistic modeling approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. **434**: 334 – 348.

Kawakami K, Aketa S, Sakai H, Watanabe Y, Nishida H, Hirayama M. (2011) Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from *Persimom* leaf tea in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **75**: 1435 – 1439.

Kha TC, Nguyen MH, Roach PD. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*. **98**: 385 – 392.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. **18**: 2328 – 2375.

Kim SH, Choi YJ, Lee H, Lee SH, Bong-Soo JBA, Min SC. (2012). Physicochemical properties of jujube powder from air, vacuum, and freeze drying and their correlations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. **55**: 271 – 279.

Kontogianni VG. (2014). *Chapter 8: Novel techniques towards the identification of different classes of polyphenols*. Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. 1<sup>st</sup> Ed. Arizona, USA. 159 – 186.

Kurozawa LE, Park KJ, Hubinger MD. (2009). Effect of maltodextrin and gum arabic on water sorption and glass transition temperature of spray dried chicken meat hydrolysate protein. *Journal of Food Engineering*. **91**: 287 – 296.

Kuskoski EM, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. **25**: 726 – 732.

Lamuela-Raventós RM, Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Martínez-Huélamo M, Quifer-Rada P. (2014). *Chapter 14: Improved characterization of polyphenols using liquid chromatography*. Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. 1<sup>st</sup> Ed. Arizona, USA. 261 - 292

Larson AJ, Symons JD, Jalili T. (2012). Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. **3**: 39 – 46.

Ley General de Salud. (2013). Cámara de diputados del H. congreso de la unión. Secretaría General. Dirección General de Servicios de Documentación, Información y Análisis Última Reforma DOF 25-01-2013.

Li S, Han Q, Qiao C, Song J, Lung C, Xu H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*. **3**(1): 7 – 16.

Li X, Feng T, Zhou F, Zhou S, Liu Y, Li W, Ye R, Yang Y. (2015). Effects of drying methods on the tasty compounds of *Pleurotus eryngii*. *Food Chemistry*. **166**: 358 – 364.

Liu EH, Qi LW, Cao J, Li P, Li CY, Peng YB. (2008). Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. **13**: 2521 – 2544.

Luna-Vázquez F, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina JI, Yahia EM, Rivera-Pastrana DM, Rojas-Molina A, Zavala-Sánchez MA. (2013). Nutraceutical value of black cherry (*Prunus serotina*) fruits: their antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules*. **18**: 14597 – 14612.

Magnusson B, Örnemark U. (2014). Eurachem Guide: *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. 2<sup>nd</sup> Ed.

Magos GA, Mateos JC, Páez E, Fernández G, Lobato C, Márquez C, Enríquez RG. (2008) Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **117**: 58 – 68.

Maicas Bellido C, Lázaro Fernández E, Alcalá López J, Hernández Simón P, Rodríguez Padial L. (2003). Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio No.3*. **5**: 141 – 160.

Marijic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. (2001). Decreased expression of voltage- and Ca(2+)-activated K(+) channels in coronary smooth muscle during aging. *Circulation Research*. **88**(2): 210 – 216.

Marra F, Valeria De Bonis M, Ruocco G. (2010). Combined microwaves and convection heating: A conjugate approach. *Journal of Food Engineering*. **97**: 31 – 39.

Martínez M. (1991). *Las plantas Medicinales de México*. Ediciones Botas V. 6<sup>a</sup> Ed. México, D.F. 61 – 62.

McVaugh, R. (1951). A revision of the North American Black cherries (*Prunus serotina* Ehrh, and relatives). *Brittonia*. Vol. **7**(4): 279 – 315.

Meaney E, Lara-Esqueda A, Ceballos-Reyes G, Asbun J, Vela A, Martínez-Marroquín Y, López V, Meaney A, de la Cabada-Tamez E, Velázquez-Monroy O, Tapia-Conyer R. (2007). Cardiovascular risk factors in the urban Mexican population: the FRIMEX study. *Public Health*. **121**: 378 – 384.

Mejia-Meza EI, Yanez JA, Davies NM, Rasco B, Younce F, Remsberg CM, Clary C. (2008). Improving nutritional value of dried blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) combining microwave-vacuum, hot-air drying and freeze drying technologies. *International Journal of Food Engineering*. **4**(5): article 5.

Melano-Carranza E, Lasses Ojeda LA, Ávila-Funes JA. (2008). Factores asociados con la hipertensión no tratada en los adultos mayores: resultados del Estudio Nacional sobre Salud y Envejecimiento en México. *Revista Panamericana de Salud Pública*. **23**(5): 295 – 302.

Miranda M, Maureira H, Rodríguez K, Vega-Gálvez A. (2009). Influence of temperature on the drying kinetics, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Aloe Vera (*Aloe Barbadosensis* Miller) gel. *Journal of Food Engineering*. **91**: 297 – 304.

Mishra P, Mishra S, Lata Mahanta C. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*. **92**: 252 – 258.

Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine*. **49**: 963 – 975.

Moon JK, Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*. **57**(5): 1655-66.

Mujumdar AS. (2007). *Handbook of Industrial Drying*. Boca Raton. 3<sup>rd</sup> Ed. Florida. USA.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.

Nose A, Hojo M. (2006). Review.- Hydrogen bonding of water-ethanol in alcoholic beverages. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **102**(4): 269 – 280.

Oetjen GW, Haseley P. (2004). *Freeze-drying. Second, completely revised and extended edition*. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. Weinheim ISBN. Federal Republic of Germany.

Oliveira CC, Resende JV, Torres ME, Ribeiro RS. (2010). The effects of added sugars and alcohol on the induction of crystallization and the stability of the freeze-dried peki (*Caryocar brasiliense*) fruit pulps. *Food Science and Technology*. **43**: 934 – 941.

Ordaz-Galindo A, Wesche-Ebeling P, Wrolstad RE, Rodríguez-Saona L, Argaiiz-Jamet A. (1999). Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*. **65**: 201 – 206.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2007). Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. Good manufacturing practices and inspection. 2<sup>nd</sup> Ed. OMS. 101 - 169

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>

Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2012). *Causas principales de mortalidad en las Américas*. Sistema Regional de Mortalidad.  
[http://ais.paho.org/hip/viz/mort\\_causasprincipales\\_lt\\_oms.asp](http://ais.paho.org/hip/viz/mort_causasprincipales_lt_oms.asp)

Organización Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014). *Cardiovascular diseases mortality by major groups of causes*. Regional Mortality Information System. [http://www.paho.org/hipertension/?page\\_id=298](http://www.paho.org/hipertension/?page_id=298)

Paladino SC. (2007). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de vid (*Vitis vinífera* L.). Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidades Nacionales del Cuyo Larioja, San Juan y San Luis.

Pardo A, Mespouille L, Blankert B, Trouillas P, Surin M, Dubois P, Duez P. (2014). Quercetin-imprinted chromatographic sorbents revisited: Optimization of synthesis and rebinding protocols for application to natural resources. *Journal of Chromatography A*. **1364**: 128 – 139.

Pérez-Martínez M, Caemmerer B, Paz de Peña M, Cid C, Kroh LW. (2010). Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**: 2958 – 2965.

Rahimmalek M, Hossein Goli SA. (2013). Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. *Industrial Crops and Products*. **42**: 613 – 619.

Ramírez-Navas JS. (2006). *Liofilización de alimentos*. ReCiTeLA. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

Ramírez-Tortosa MC, Quiles Morales JL. (2005). *Vitamina C, vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario*. Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Tomo I: Antioxidantes. 2ª Ed. Madrid. 483 – 500

Rawson A, Patras A, Tiwari BK, Noci F, Koutchma T, Brunton N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*. **44**: 1875 – 1887.

Real Farmacopea Española. (2002). *Formas Farmacéuticas*. Agencia Española del Medicamento. Mº de Sanidad y Consumo. 2ª Ed. España.

Remington JP. (2006). Remington: *The science and practice of pharmacy*. Troy D, Hauber MJ. Lippincott Williams & Wilkins. 21<sup>st</sup> Ed. USA.

Rivero-Cruz B. (2014) Simultaneous quantification by HPLC of the phenolic compounds for the crude drug of *Prunus serotina* subsp. Capuli. *Pharmaceutical Biology*. **52**(8): 1015 – 1020.

Rodríguez E. (2011). Determinación de la actividad antioxidante del fruto sin semilla del capulín mexicano (*Prunus serótina*) e identificación de sus fenoles marcadores mediante clear-em. Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro

Rohn S, Buchner N, Driemel G, Rauser M, Kroh LW. (2007). Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 1568 – 1573.

Romano JG, Arauz A, Koch S, Dong C, Marquez JM, Artigas C, Merlos M, Hernandez B, Roa LF, Rundek T, Sacco RL. (2013). Disparities in stroke type and vascular risk factors between 2 Hispanic populations in Miami and Mexico City. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. **22**: 828 – 833.

Sagar VR, Suresh K. (2010). Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*. **47**(1): 15 – 26.

Sánchez RA, Ayala M, Baglivo H, Velázquez C, Burlando G, Kohlmann O, Jiménez J, López P, Brandao A. (2010). Guías latinoamericanas de hipertensión arterial. *Revista Chilena de Cardiología*. **29**. 117 – 144.c

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. **403**(1 - 2): 136 – 138.

Secretaría de Salud; Subsecretaría de prevención y protección de la salud (2001). *Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial 2000 - 2006*. México, D.F.

Shao P, Hong T, Liu QM, He JZ, Sun PL. (2011). Microwave extraction and HSCCC isolation and identification of chlorogenic acid in *Eucommia ulmoides* leaves. *Acta Agriculture Nucleatae Sinica*. **25**: 760 – 767.

Sharapin N, Pinzón R. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. 1ª Ed. Colombia.

Singh Sogi D, Siddiq M, Greiby I, Dolan KD. (2013). Total phenolics, antioxidant activity, and functional properties of 'Tomy Atkins' mango peel and kernel as affected by drying methods. *Food Chemistry*. **141**: 2649 – 2655.

Singleton VL, Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. **16**: 144 – 158.

Suvarnakuta P, Chaweerungrat C, Devahastin S. (2011). Effects of drying methods on assay and antioxidant activity of xanthenes in mangosteen rind. *Food Chemistry*. **125**: 240 – 247.

Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. **19**: 669 – 675.

Tonon RV, Baroni AF, Brabet C, Gibert O, Pallet D, Hubinger MD. (2009). Water sorption and glass transition temperature of spray dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. *Journal of Food Engineering*. **94**: 215 – 221.

Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried acai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*. **43**: 907 – 914.

Uribe G. (2011). Estudio farmacológico del fruto de *Prunus serotina* (capulín). Tesis para obtener el título de Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.

Valenzuela C, Aguilera JM. (2015). Effects of maltodextrin on hygroscopicity and crispness of apple leathers. *Journal of Food Engineering*. **144**: 1 – 9.

Vargas-Murga L, García-Álvarez A, Roman-Vinas B, Ribas-Barba L. (2011). Plant food supplement (PFS) market structure in EC Member States, methods and techniques for the assessment of individual PFS intake. *Food & Function*. **2**: 731 – 739.

Vasco C, Riihinen K, Ruales J, Kamal-Eldin A. (2009). Phenolic compounds in *Rosaceae* fruits from Ecuador. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 1204 – 1212.

Vega-Gálvez A, Di-Scala K, Rodríguez K, Lemus-Mondaca R, Miranda M, López J, Perez-Won M. (2009). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, color and total phenolic content of red pepper. *Food Chemistry*. **117**: 647 – 653.

Vega-Gálvez A, Ah-Hen K, Chacana M, Vergara J, Martínez-Monzó J, García-Segovia P, Lemus-Mondaca R, Di-Scala K. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*. **132**: 51 – 59.

Velázquez O, Barinagarrementería F, Rubio A, Verdejo J, Méndez M, Violante R, Pavía A, Alvarado-Ruiz R, Lara A. (2007). Morbidity and mortality by ischemic heart disease and stroke in Mexico. *Archivos de Cardiología Mexicana*. **77**: 31 – 39.

Vidović SS, Vladić JZ, Vaštag ŽG, Zeković ZP, Popović LM. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology*. **258**: 209 – 215.

Villa-De la Torre F, Luna-Vázquez F, Ibarra-Alvarado C, Rivero-Cruz JF, Rojas-Molina JI, Rojas-Molina A. (2010). *Fruits of “capulín” (Prunus serotina) as a potential source of bioactive compounds*. In: Innovations in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Regalado C, García BE (editors). Editorial Asociación Mexicana de Ciencias de los Alimentos. México. 13 – 25.

Vita J, Keaney J. (2002) Endotelial function: a barometer for cardiovascular risk. *Circulation*. **106**: 640 – 642.

Wang S, Langrish T. (2009). A review of process simulations and the use of additives in spray drying. *Food Research International*. **42**: 13 – 25.

Wuttipalakorn P, Srichumpuang W, Chiewchan N. (2009). Effects of pretreatment and drying on composition and bitterness of high-dietary-fiber powder from lime residues. *Drying Technology*. **27**: 133 – 142.

Xin-Yue S, Ying-Dong L, Yan-Ping S, Ling J, Juan C. (2013). Quality control of traditional Chinese medicines: a review. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **11**(6): 596 – 607.

Xu BJ, Chang SKC. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*. **72**(2): 159 – 166.

Zea LP, Yusof YA, Aziz MG, Ling CN, Amin M. (2012). Compressibility and dissolution characteristics of mixed fruit tablets made from guava and pitaya fruit powders. *Powder Technology*. **247**: 112 – 119.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. **64**: 555 – 559.

Zotarelli MF, Almeida BD, Borges J. (2012). A convective multi-flash drying process for producing dehydrated crispy fruits. *Journal of Food Engineering*. **108**: 523 – 531.

Zheng M, Jin Z, Zhang Y. (2007). Effect of cross-linking and esterification on hygroscopicity and surface activity of cassava maltodextrins. *Food Chemistry*. **103**(4): 1375 – 1379.

Zhu XF, Zhang HX, Lo R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**(24): 7272 – 7278.

## 11. ANEXO A

### 11.1. Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos.

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Ecuación</b>
Coeficiente de correlación	$r$	$r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$
Coeficiente de determinación	$r^2$	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}$
Coeficiente de variación	$CV$	$CV = \frac{S}{y} * 100$
Coeficiente de variación de la regresión	$CV_{y/x}$	$CV_{y/x} = \left( \frac{S_{y/x}}{y} \right) * 100$
Desviación estándar	$S$	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada	$S_{b0}$	$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la pendiente	$S_{b1}$	$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x}$	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
Diferencia absoluta de medias	$ di $	$ di  =  \bar{y}_i - \bar{y}_0 $

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Ecuación</b>
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu)$	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-2} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	$IC(\beta_0)$	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S b_0$
Intervalo de confianza para la pendiente	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S b_1$
Límite de cuantificación	$LC$	$LC = \frac{(10)(S_{y/x})}{b_1}$
Límite de detección	$LD$	$LD = \frac{(3.3)(S_{y/x})}{b_1}$
Media aritmética	$\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_i$	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$
Ordenada al origen	$b_0$	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente	$b_1$	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x$	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$
Suma de y	$\sum y$	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2$	$(\sum x)^2 = (\sum_{i=1}^n x_i)^2$
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2$	$(\sum y)^2 = (\sum_{i=1}^n y_i)^2$

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Ecuación</b>
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2$	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2$	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$
Suma de x por y	$\sum xy$	$\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por suma de y	$\sum x \sum y$	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$
% de Recobro	$\%R$	$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} * 100$

## 11.2. Tabla de distribución t de student.

Valores de $T_{\alpha, v}$		$1 - \alpha = P ( T \leq t_{\alpha, v} )$						
$v \backslash 1-\alpha$	0.8	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.999	
1	1.376	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289	
2	1.061	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.328	
3	0.978	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	
4	0.941	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	
5	0.920	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894	
6	0.906	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	
7	0.896	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	
8	0.889	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	
9	0.883	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	
10	0.879	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	
11	0.876	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	
12	0.873	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	
13	0.870	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	
14	0.868	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	
15	0.866	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	
16	0.865	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	
17	0.863	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	
18	0.862	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	
19	0.861	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	
20	0.860	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	
21	0.859	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	
22	0.858	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	
23	0.858	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	
24	0.857	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	
25	0.856	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	
26	0.856	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	
27	0.855	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	
28	0.855	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	
29	0.854	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	
30	0.854	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	
31	0.853	1.309	1.696	2.040	2.453	2.744	3.375	
32	0.853	1.309	1.694	2.037	2.449	2.738	3.365	
33	0.853	1.308	1.692	2.035	2.445	2.733	3.356	
34	0.852	1.307	1.691	2.032	2.441	2.728	3.348	
35	0.852	1.306	1.690	2.030	2.438	2.724	3.340	
36	0.852	1.306	1.688	2.028	2.434	2.719	3.333	
37	0.851	1.305	1.687	2.026	2.431	2.715	3.326	
38	0.851	1.304	1.686	2.024	2.429	2.712	3.319	
39	0.851	1.304	1.685	2.023	2.426	2.708	3.313	
40	0.851	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	
41	0.850	1.303	1.683	2.020	2.421	2.701	3.301	
42	0.850	1.302	1.682	2.018	2.418	2.698	3.296	
43	0.850	1.302	1.681	2.017	2.416	2.695	3.291	
44	0.850	1.301	1.680	2.015	2.414	2.692	3.286	
45	0.850	1.301	1.679	2.014	2.412	2.690	3.281	
46	0.850	1.300	1.679	2.013	2.410	2.687	3.277	
47	0.849	1.300	1.678	2.012	2.408	2.685	3.273	
48	0.849	1.299	1.677	2.011	2.407	2.682	3.269	
49	0.849	1.299	1.677	2.010	2.405	2.680	3.265	
50	0.849	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	
51	0.849	1.298	1.675	2.008	2.402	2.676	3.258	
52	0.849	1.298	1.675	2.007	2.400	2.674	3.255	
53	0.848	1.298	1.674	2.006	2.399	2.672	3.251	
54	0.848	1.297	1.674	2.005	2.397	2.670	3.248	
55	0.848	1.297	1.673	2.004	2.396	2.668	3.245	
56	0.848	1.297	1.673	2.003	2.395	2.667	3.242	
57	0.848	1.297	1.672	2.002	2.394	2.665	3.239	
58	0.848	1.296	1.672	2.002	2.392	2.663	3.237	
59	0.848	1.296	1.671	2.001	2.391	2.662	3.234	
60	0.848	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	

Valores de  $T_{\alpha, v}$

$1 - \alpha = P ( T \leq t_{\alpha, v} )$

$v \backslash 1-\alpha$	0.8	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.999
61	0.848	1.296	1.670	2.000	2.389	2.659	3.229
62	0.847	1.295	1.670	1.999	2.388	2.657	3.227
63	0.847	1.295	1.669	1.998	2.387	2.656	3.225
64	0.847	1.295	1.669	1.998	2.386	2.655	3.223
65	0.847	1.295	1.669	1.997	2.385	2.654	3.220
66	0.847	1.295	1.668	1.997	2.384	2.652	3.218
67	0.847	1.294	1.668	1.996	2.383	2.651	3.216
68	0.847	1.294	1.668	1.995	2.382	2.650	3.214
69	0.847	1.294	1.667	1.995	2.382	2.649	3.213
70	0.847	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211
71	0.847	1.294	1.667	1.994	2.380	2.647	3.209
72	0.847	1.293	1.666	1.993	2.379	2.646	3.207
73	0.847	1.293	1.666	1.993	2.379	2.645	3.206
74	0.847	1.293	1.666	1.993	2.378	2.644	3.204
75	0.846	1.293	1.665	1.992	2.377	2.643	3.202
76	0.846	1.293	1.665	1.992	2.376	2.642	3.201
77	0.846	1.293	1.665	1.991	2.376	2.641	3.199
78	0.846	1.292	1.665	1.991	2.375	2.640	3.198
79	0.846	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.197
80	0.846	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195
81	0.846	1.292	1.664	1.990	2.373	2.638	3.194
82	0.846	1.292	1.664	1.989	2.373	2.637	3.193
83	0.846	1.292	1.663	1.989	2.372	2.636	3.191
84	0.846	1.292	1.663	1.989	2.372	2.636	3.190
85	0.846	1.292	1.663	1.988	2.371	2.635	3.189
86	0.846	1.291	1.663	1.988	2.370	2.634	3.188
87	0.846	1.291	1.663	1.988	2.370	2.634	3.187
88	0.846	1.291	1.662	1.987	2.369	2.633	3.185
89	0.846	1.291	1.662	1.987	2.369	2.632	3.184
90	0.846	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183
91	0.846	1.291	1.662	1.986	2.368	2.631	3.182
92	0.846	1.291	1.662	1.986	2.368	2.630	3.181
93	0.846	1.291	1.661	1.986	2.367	2.630	3.180
94	0.845	1.291	1.661	1.986	2.367	2.629	3.179
95	0.845	1.291	1.661	1.985	2.366	2.629	3.178
96	0.845	1.290	1.661	1.985	2.366	2.628	3.177
97	0.845	1.290	1.661	1.985	2.365	2.627	3.176
98	0.845	1.290	1.661	1.984	2.365	2.627	3.176
99	0.845	1.290	1.660	1.984	2.365	2.626	3.175
100	0.845	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174
150	0.844	1.287	1.655	1.976	2.351	2.609	3.145
200	0.843	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.131
250	0.843	1.285	1.651	1.969	2.341	2.596	3.123
300	0.843	1.284	1.650	1.968	2.339	2.592	3.118
350	0.843	1.284	1.649	1.967	2.337	2.590	3.114
400	0.843	1.284	1.649	1.966	2.336	2.588	3.111
450	0.842	1.283	1.648	1.965	2.335	2.587	3.108
500	0.842	1.283	1.648	1.965	2.334	2.586	3.107
550	0.842	1.283	1.648	1.964	2.333	2.585	3.105
600	0.842	1.283	1.647	1.964	2.333	2.584	3.104
650	0.842	1.283	1.647	1.964	2.332	2.583	3.103
700	0.842	1.283	1.647	1.963	2.332	2.583	3.102
750	0.842	1.283	1.647	1.963	2.331	2.582	3.101
800	0.842	1.283	1.647	1.963	2.331	2.582	3.100
850	0.842	1.283	1.647	1.963	2.331	2.582	3.100
900	0.842	1.282	1.647	1.963	2.330	2.581	3.099
950	0.842	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.099
1000	0.842	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098

### 11.3. Tabla de distribución F de Fisher.

$1 - \alpha = 0.95$   
 $1 - \alpha = P ( F \leq f_{\alpha, v_1, v_2} )$

$v_1$  = grados de libertad del numerador  
 $v_2$  = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767	238.884	240.543	241.882	242.981	243.905	244.690	245.363	245.949	246.466	246.917	247.324	247.688	248.016
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419	19.424	19.429	19.433	19.437	19.440	19.443	19.446
3	10.128	9.562	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729	8.715	8.703	8.692	8.683	8.675	8.667	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891	5.873	5.858	5.844	5.832	5.821	5.811	5.803
5	6.808	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655	4.636	4.619	4.604	4.590	4.579	4.568	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976	3.956	3.938	3.922	3.908	3.896	3.884	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550	3.529	3.511	3.494	3.480	3.467	3.455	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259	3.237	3.218	3.202	3.187	3.173	3.161	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048	3.025	3.006	2.989	2.974	2.960	2.948	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887	2.865	2.845	2.828	2.812	2.798	2.785	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761	2.739	2.719	2.701	2.685	2.671	2.658	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660	2.637	2.617	2.599	2.583	2.568	2.555	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577	2.554	2.533	2.515	2.499	2.484	2.471	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507	2.484	2.463	2.445	2.428	2.413	2.400	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448	2.424	2.403	2.385	2.368	2.353	2.340	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397	2.373	2.352	2.333	2.317	2.302	2.288	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.411	2.381	2.353	2.329	2.308	2.289	2.272	2.257	2.243	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314	2.290	2.269	2.250	2.233	2.217	2.203	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.340	2.308	2.280	2.256	2.234	2.215	2.198	2.182	2.168	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.310	2.278	2.250	2.225	2.203	2.184	2.167	2.151	2.137	2.124
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321	2.283	2.250	2.222	2.197	2.176	2.156	2.139	2.123	2.109	2.096
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.259	2.226	2.198	2.173	2.151	2.131	2.114	2.098	2.084	2.071
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275	2.236	2.204	2.175	2.150	2.128	2.109	2.091	2.075	2.061	2.048
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255	2.216	2.183	2.155	2.130	2.108	2.088	2.070	2.054	2.040	2.027
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.198	2.165	2.136	2.111	2.089	2.069	2.051	2.035	2.021	2.007
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220	2.181	2.148	2.119	2.094	2.072	2.052	2.034	2.018	2.003	1.990
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204	2.166	2.132	2.103	2.078	2.056	2.036	2.018	2.002	1.987	1.974
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190	2.151	2.118	2.089	2.064	2.041	2.021	2.003	1.987	1.972	1.959
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177	2.138	2.104	2.075	2.050	2.027	2.007	1.989	1.973	1.958	1.945
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.126	2.092	2.063	2.037	2.015	1.995	1.977	1.960	1.945	1.932
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077	2.038	2.003	1.974	1.948	1.924	1.904	1.885	1.868	1.853	1.839
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.288	2.199	2.130	2.073	2.026	1.986	1.952	1.921	1.895	1.871	1.850	1.831	1.814	1.798	1.784
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.256	2.167	2.097	2.040	1.993	1.952	1.917	1.887	1.860	1.836	1.815	1.796	1.778	1.763	1.748
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.233	2.143	2.074	2.017	1.969	1.928	1.893	1.863	1.836	1.812	1.790	1.771	1.753	1.737	1.722
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.124	2.055	1.999	1.951	1.910	1.875	1.845	1.817	1.793	1.772	1.752	1.734	1.718	1.703
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.111	2.043	1.986	1.938	1.897	1.861	1.830	1.803	1.779	1.757	1.737	1.720	1.703	1.688
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.101	2.032	1.975	1.927	1.886	1.850	1.819	1.792	1.768	1.746	1.726	1.708	1.691	1.676
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.054	1.985	1.927	1.878	1.837	1.801	1.769	1.742	1.717	1.694	1.674	1.656	1.639	1.623
500	3.860	3.014	2.623	2.390	2.232	2.117	2.028	1.957	1.899	1.850	1.808	1.772	1.740	1.712	1.686	1.664	1.643	1.625	1.607	1.592
1000	3.851	3.005	2.614	2.381	2.223	2.108	2.019	1.948	1.889	1.840	1.798	1.762	1.730	1.702	1.676	1.654	1.633	1.614	1.597	1.581

1 -  $\alpha = 0.95$   
 1 -  $\alpha = P(F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

$v_2 \backslash v_1$	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	40	50	60	70	80	90	100	200	500	1000
1	248.307	248.579	248.823	249.052	249.260	249.453	249.631	249.798	249.951	250.096	251.144	251.774	252.196	252.498	252.723	252.898	253.043	253.676	254.062	254.186
2	19.448	19.450	19.452	19.454	19.456	19.457	19.459	19.460	19.461	19.463	19.471	19.476	19.479	19.481	19.483	19.485	19.486	19.491	19.494	19.495
3	8.654	8.648	8.643	8.638	8.634	8.630	8.626	8.623	8.620	8.617	8.594	8.581	8.572	8.566	8.561	8.557	8.554	8.540	8.532	8.529
4	5.795	5.787	5.781	5.774	5.769	5.763	5.759	5.754	5.750	5.746	5.717	5.699	5.688	5.679	5.673	5.668	5.664	5.646	5.635	5.632
5	4.549	4.541	4.534	4.527	4.521	4.515	4.510	4.505	4.500	4.496	4.464	4.444	4.431	4.422	4.415	4.409	4.405	4.385	4.373	4.369
6	3.885	3.856	3.849	3.841	3.835	3.829	3.823	3.818	3.813	3.808	3.774	3.754	3.740	3.730	3.722	3.716	3.712	3.690	3.678	3.673
7	3.435	3.426	3.418	3.410	3.404	3.397	3.391	3.386	3.381	3.376	3.340	3.319	3.304	3.294	3.286	3.280	3.275	3.252	3.239	3.234
8	3.140	3.131	3.123	3.115	3.108	3.102	3.095	3.090	3.084	3.079	3.043	3.020	3.005	2.994	2.986	2.980	2.975	2.951	2.937	2.932
9	2.926	2.917	2.908	2.900	2.893	2.886	2.880	2.874	2.869	2.864	2.826	2.803	2.787	2.776	2.768	2.761	2.756	2.731	2.717	2.712
10	2.784	2.754	2.745	2.737	2.730	2.723	2.716	2.710	2.705	2.700	2.661	2.637	2.621	2.609	2.601	2.594	2.588	2.563	2.548	2.543
11	2.636	2.626	2.617	2.609	2.601	2.594	2.588	2.582	2.576	2.570	2.531	2.507	2.490	2.478	2.469	2.462	2.457	2.431	2.415	2.410
12	2.533	2.523	2.514	2.505	2.498	2.491	2.484	2.478	2.472	2.466	2.426	2.401	2.384	2.372	2.363	2.356	2.350	2.323	2.307	2.302
13	2.448	2.438	2.429	2.420	2.412	2.405	2.398	2.392	2.386	2.380	2.339	2.314	2.297	2.284	2.275	2.267	2.261	2.234	2.218	2.212
14	2.377	2.367	2.357	2.349	2.341	2.333	2.326	2.320	2.314	2.308	2.266	2.241	2.223	2.210	2.201	2.193	2.187	2.159	2.142	2.136
15	2.316	2.306	2.297	2.288	2.280	2.272	2.265	2.259	2.253	2.247	2.204	2.178	2.160	2.147	2.137	2.130	2.123	2.095	2.078	2.072
16	2.264	2.254	2.244	2.235	2.227	2.220	2.212	2.206	2.200	2.194	2.151	2.124	2.106	2.093	2.083	2.075	2.068	2.039	2.022	2.016
17	2.219	2.208	2.199	2.190	2.181	2.174	2.167	2.160	2.154	2.148	2.104	2.077	2.058	2.045	2.035	2.027	2.020	1.991	1.973	1.967
18	2.179	2.168	2.159	2.150	2.141	2.134	2.126	2.119	2.113	2.107	2.063	2.035	2.017	2.003	1.993	1.985	1.978	1.948	1.929	1.923
19	2.144	2.133	2.123	2.114	2.106	2.098	2.090	2.084	2.077	2.071	2.026	1.999	1.980	1.966	1.955	1.947	1.940	1.910	1.891	1.884
20	2.112	2.102	2.092	2.082	2.074	2.066	2.059	2.052	2.045	2.039	1.994	1.966	1.946	1.932	1.922	1.913	1.907	1.875	1.856	1.850
21	2.084	2.073	2.063	2.054	2.045	2.037	2.030	2.023	2.016	2.010	1.965	1.936	1.916	1.902	1.891	1.883	1.876	1.845	1.825	1.818
22	2.059	2.048	2.038	2.028	2.020	2.012	2.004	1.997	1.990	1.984	1.938	1.909	1.889	1.875	1.864	1.856	1.849	1.817	1.797	1.790
23	2.036	2.025	2.014	2.005	1.996	1.988	1.981	1.973	1.967	1.961	1.914	1.885	1.865	1.850	1.839	1.830	1.823	1.791	1.771	1.764
24	2.015	2.003	1.993	1.984	1.975	1.967	1.959	1.952	1.945	1.939	1.892	1.863	1.842	1.828	1.816	1.808	1.800	1.768	1.747	1.740
25	1.995	1.984	1.974	1.964	1.955	1.947	1.939	1.932	1.926	1.919	1.872	1.842	1.822	1.807	1.796	1.787	1.779	1.746	1.725	1.718
26	1.978	1.966	1.956	1.946	1.938	1.929	1.921	1.914	1.907	1.901	1.853	1.823	1.803	1.788	1.776	1.767	1.760	1.726	1.705	1.698
27	1.961	1.950	1.940	1.930	1.921	1.913	1.905	1.898	1.891	1.884	1.836	1.806	1.785	1.770	1.758	1.749	1.742	1.708	1.686	1.679
28	1.946	1.935	1.924	1.915	1.906	1.897	1.889	1.882	1.875	1.869	1.820	1.790	1.769	1.754	1.742	1.733	1.725	1.691	1.669	1.662
29	1.932	1.921	1.910	1.901	1.891	1.883	1.875	1.868	1.861	1.854	1.806	1.775	1.754	1.738	1.726	1.717	1.710	1.675	1.653	1.645
30	1.919	1.908	1.897	1.887	1.878	1.870	1.862	1.854	1.847	1.841	1.792	1.761	1.740	1.724	1.712	1.703	1.695	1.660	1.637	1.630
40	1.826	1.814	1.803	1.793	1.783	1.775	1.766	1.759	1.751	1.744	1.693	1.660	1.637	1.621	1.608	1.597	1.589	1.551	1.526	1.517
50	1.771	1.759	1.748	1.737	1.727	1.718	1.710	1.702	1.694	1.687	1.634	1.599	1.576	1.558	1.544	1.534	1.525	1.484	1.457	1.448
60	1.735	1.722	1.711	1.700	1.690	1.681	1.672	1.664	1.656	1.649	1.594	1.559	1.534	1.516	1.502	1.491	1.481	1.438	1.409	1.399
70	1.709	1.696	1.685	1.674	1.664	1.654	1.646	1.637	1.629	1.622	1.566	1.530	1.505	1.486	1.471	1.459	1.450	1.404	1.374	1.364
80	1.689	1.677	1.665	1.654	1.644	1.634	1.626	1.617	1.609	1.602	1.545	1.508	1.482	1.463	1.448	1.436	1.426	1.379	1.347	1.336
90	1.675	1.662	1.650	1.639	1.629	1.619	1.610	1.601	1.593	1.586	1.528	1.491	1.465	1.445	1.429	1.417	1.407	1.358	1.326	1.314
100	1.663	1.650	1.638	1.627	1.616	1.607	1.598	1.589	1.581	1.573	1.515	1.477	1.450	1.430	1.415	1.402	1.392	1.342	1.308	1.296
200	1.609	1.596	1.583	1.572	1.561	1.551	1.542	1.533	1.524	1.516	1.456	1.415	1.386	1.364	1.346	1.332	1.321	1.263	1.221	1.205
500	1.577	1.563	1.551	1.539	1.528	1.518	1.508	1.499	1.490	1.482	1.419	1.376	1.345	1.322	1.303	1.288	1.275	1.210	1.159	1.138
1000	1.566	1.553	1.540	1.528	1.517	1.507	1.497	1.488	1.479	1.471	1.406	1.363	1.332	1.308	1.289	1.273	1.260	1.190	1.134	1.110

$1 - \alpha = 0.975$

$1 - \alpha = P(F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

$v_1$  = grados de libertad del numerador

$v_2$  = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	647.793	799.482	864.151	899.599	921.835	937.114	948.203	956.643	963.279	968.634	973.028	976.725	979.839	982.545	984.874	986.911	988.715	990.345	991.800	993.081
2	38.506	39.000	39.166	39.248	39.298	39.331	39.356	39.373	39.387	39.398	39.407	39.415	39.421	39.427	39.431	39.436	39.439	39.442	39.446	39.448
3	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624	14.540	14.473	14.419	14.374	14.337	14.305	14.277	14.253	14.232	14.213	14.196	14.181	14.167
4	12.218	10.649	9.979	9.604	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.794	8.751	8.715	8.684	8.657	8.633	8.611	8.592	8.575	8.560
5	10.007	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.568	6.525	6.488	6.456	6.428	6.403	6.381	6.362	6.344	6.329
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.410	5.366	5.329	5.297	5.269	5.244	5.222	5.202	5.184	5.168
7	8.073	6.542	5.880	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.709	4.666	4.628	4.596	4.568	4.543	4.521	4.501	4.483	4.467
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.243	4.200	4.162	4.130	4.101	4.076	4.054	4.034	4.016	3.999
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.912	3.868	3.831	3.798	3.769	3.744	3.722	3.701	3.683	3.667
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.665	3.621	3.583	3.550	3.522	3.496	3.474	3.453	3.435	3.419
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.474	3.430	3.392	3.359	3.330	3.304	3.282	3.261	3.243	3.226
12	6.564	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.321	3.277	3.239	3.206	3.177	3.152	3.129	3.108	3.090	3.073
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.197	3.153	3.115	3.082	3.053	3.027	3.004	2.983	2.965	2.948
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.095	3.050	3.012	2.979	2.949	2.923	2.900	2.879	2.861	2.844
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	3.008	2.963	2.925	2.891	2.862	2.836	2.813	2.792	2.773	2.756
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.934	2.889	2.851	2.817	2.788	2.761	2.738	2.717	2.698	2.681
17	6.042	4.619	4.011	3.663	3.436	3.275	3.153	3.060	2.984	2.921	2.869	2.824	2.786	2.752	2.723	2.697	2.673	2.652	2.633	2.616
18	5.978	4.560	3.954	3.606	3.380	3.219	3.100	3.005	2.929	2.866	2.814	2.769	2.730	2.696	2.667	2.640	2.617	2.596	2.576	2.559
19	5.922	4.508	3.903	3.555	3.330	3.170	3.051	2.956	2.880	2.817	2.765	2.720	2.681	2.647	2.617	2.591	2.567	2.546	2.526	2.509
20	5.871	4.461	3.856	3.508	3.283	3.123	3.004	2.909	2.833	2.770	2.718	2.673	2.634	2.600	2.570	2.544	2.520	2.500	2.482	2.464
21	5.827	4.420	3.815	3.467	3.242	3.082	2.963	2.868	2.792	2.729	2.677	2.632	2.593	2.559	2.529	2.503	2.480	2.460	2.442	2.425
22	5.786	4.383	3.778	3.430	3.205	3.045	2.926	2.831	2.755	2.692	2.640	2.601	2.562	2.528	2.498	2.472	2.448	2.428	2.410	2.393
23	5.750	4.349	3.744	3.396	3.171	3.011	2.892	2.797	2.721	2.658	2.606	2.567	2.528	2.494	2.464	2.438	2.414	2.394	2.376	2.359
24	5.717	4.319	3.714	3.366	3.141	2.981	2.862	2.767	2.691	2.628	2.576	2.537	2.498	2.464	2.434	2.408	2.384	2.364	2.346	2.329
25	5.686	4.291	3.686	3.338	3.113	2.953	2.834	2.739	2.663	2.600	2.548	2.509	2.470	2.436	2.406	2.380	2.356	2.336	2.318	2.301
26	5.659	4.265	3.660	3.312	3.087	2.927	2.808	2.713	2.637	2.574	2.522	2.483	2.444	2.410	2.380	2.354	2.330	2.310	2.292	2.275
27	5.633	4.242	3.637	3.289	3.064	2.904	2.785	2.690	2.614	2.551	2.499	2.460	2.421	2.387	2.357	2.331	2.307	2.287	2.269	2.252
28	5.610	4.221	3.616	3.268	3.043	2.883	2.764	2.669	2.593	2.530	2.478	2.439	2.400	2.366	2.336	2.310	2.286	2.266	2.248	2.231
29	5.588	4.201	3.607	3.259	3.034	2.874	2.755	2.660	2.584	2.521	2.469	2.430	2.391	2.357	2.327	2.301	2.277	2.257	2.239	2.222
30	5.568	4.182	3.589	3.241	3.016	2.856	2.737	2.642	2.566	2.503	2.451	2.412	2.373	2.339	2.309	2.283	2.259	2.239	2.221	2.199
40	5.424	4.051	3.463	3.115	2.890	2.730	2.611	2.516	2.440	2.377	2.325	2.286	2.247	2.213	2.183	2.157	2.133	2.113	2.095	2.078
50	5.340	3.975	3.390	3.042	2.817	2.657	2.538	2.443	2.367	2.304	2.252	2.213	2.174	2.140	2.110	2.084	2.060	2.040	2.022	1.999
60	5.286	3.925	3.343	3.000	2.780	2.620	2.501	2.406	2.330	2.267	2.215	2.176	2.137	2.103	2.073	2.047	2.023	2.003	1.985	1.964
70	5.247	3.890	3.309	2.975	2.755	2.595	2.476	2.381	2.305	2.242	2.190	2.151	2.112	2.078	2.048	2.022	2.000	1.982	1.964	1.944
80	5.218	3.864	3.284	2.950	2.730	2.570	2.451	2.356	2.280	2.217	2.165	2.126	2.087	2.053	2.023	1.997	1.975	1.957	1.939	1.919
90	5.196	3.844	3.265	2.932	2.711	2.551	2.432	2.337	2.261	2.198	2.146	2.107	2.068	2.034	2.004	1.978	1.956	1.938	1.920	1.900
100	5.179	3.828	3.250	2.917	2.696	2.536	2.417	2.322	2.246	2.183	2.131	2.092	2.053	2.019	1.989	1.963	1.941	1.923	1.905	1.884
200	5.100	3.758	3.182	2.850	2.630	2.470	2.351	2.256	2.180	2.117	2.065	2.026	1.987	1.953	1.923	1.897	1.875	1.857	1.839	1.818
500	5.054	3.716	3.142	2.811	2.592	2.432	2.313	2.218	2.142	2.079	2.027	1.988	1.949	1.915	1.885	1.859	1.837	1.819	1.801	1.780
1000	5.039	3.703	3.129	2.799	2.579	2.419	2.300	2.205	2.129	2.066	2.014	1.975	1.936	1.902	1.872	1.846	1.824	1.806	1.788	1.767

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.

1 -  $\alpha = 0.975$   
 1 -  $\alpha = P(F \leq f_{\alpha, v_1, v_2})$

$v_2 \backslash v_1$	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	40	50	60	70	80	90	100	200	500	1000
1	994.303	995.351	996.341	997.272	998.087	998.843	999.542	1000.240	1000.823	1001.405	1005.596	1008.098	1009.787	1011.009	1011.911	1012.610	1013.163	1015.724	1017.237	1017.761
2	39.450	39.452	39.455	39.457	39.458	39.459	39.461	39.462	39.463	39.465	39.473	39.478	39.481	39.484	39.486	39.487	39.488	39.493	39.496	39.497
3	14.155	14.144	14.134	14.124	14.115	14.107	14.100	14.093	14.086	14.081	14.036	14.010	13.992	13.979	13.970	13.962	13.956	13.929	13.913	13.908
4	8.546	8.533	8.522	8.511	8.501	8.492	8.483	8.475	8.468	8.461	8.411	8.381	8.360	8.346	8.335	8.326	8.319	8.288	8.270	8.264
5	6.314	6.301	6.289	6.278	6.268	6.258	6.250	6.242	6.234	6.227	6.175	6.144	6.123	6.107	6.096	6.087	6.080	6.048	6.028	6.022
6	5.154	5.141	5.128	5.117	5.107	5.097	5.088	5.080	5.072	5.065	5.012	4.980	4.959	4.943	4.932	4.923	4.915	4.882	4.862	4.856
7	4.452	4.439	4.426	4.415	4.405	4.395	4.386	4.378	4.370	4.362	4.309	4.276	4.254	4.239	4.227	4.218	4.210	4.176	4.156	4.149
8	3.985	3.971	3.959	3.947	3.937	3.927	3.918	3.909	3.901	3.894	3.840	3.807	3.784	3.768	3.756	3.747	3.739	3.705	3.684	3.677
9	3.652	3.638	3.626	3.614	3.604	3.594	3.584	3.576	3.568	3.560	3.505	3.472	3.449	3.433	3.421	3.411	3.403	3.368	3.347	3.340
10	3.403	3.390	3.377	3.365	3.355	3.345	3.335	3.327	3.319	3.311	3.255	3.221	3.198	3.182	3.169	3.160	3.152	3.116	3.094	3.087
11	3.211	3.197	3.184	3.173	3.162	3.152	3.142	3.133	3.125	3.118	3.061	3.027	3.004	2.987	2.974	2.964	2.956	2.920	2.898	2.890
12	3.057	3.043	3.031	3.019	3.008	2.998	2.988	2.979	2.971	2.963	2.906	2.871	2.848	2.831	2.818	2.808	2.800	2.763	2.740	2.733
13	2.932	2.918	2.905	2.893	2.882	2.872	2.862	2.853	2.845	2.837	2.780	2.744	2.720	2.703	2.690	2.680	2.671	2.634	2.611	2.603
14	2.828	2.814	2.801	2.789	2.778	2.767	2.758	2.749	2.740	2.732	2.674	2.638	2.614	2.597	2.583	2.573	2.565	2.528	2.503	2.495
15	2.740	2.726	2.713	2.701	2.689	2.679	2.669	2.660	2.652	2.644	2.585	2.549	2.524	2.506	2.493	2.482	2.474	2.435	2.411	2.403
16	2.665	2.651	2.637	2.625	2.614	2.603	2.594	2.584	2.576	2.568	2.509	2.472	2.447	2.429	2.415	2.405	2.396	2.357	2.333	2.324
17	2.600	2.585	2.572	2.560	2.548	2.538	2.528	2.519	2.510	2.502	2.442	2.405	2.380	2.362	2.348	2.337	2.329	2.289	2.264	2.256
18	2.543	2.529	2.515	2.503	2.491	2.481	2.471	2.461	2.453	2.445	2.384	2.347	2.321	2.303	2.289	2.278	2.269	2.229	2.204	2.195
19	2.493	2.478	2.465	2.452	2.441	2.430	2.420	2.411	2.402	2.394	2.333	2.296	2.270	2.251	2.237	2.226	2.217	2.176	2.150	2.142
20	2.448	2.434	2.420	2.408	2.396	2.385	2.375	2.366	2.357	2.349	2.287	2.249	2.223	2.205	2.190	2.179	2.170	2.128	2.103	2.094
21	2.409	2.394	2.380	2.368	2.356	2.345	2.335	2.325	2.317	2.308	2.246	2.208	2.182	2.163	2.148	2.137	2.128	2.086	2.060	2.051
22	2.373	2.358	2.344	2.332	2.320	2.309	2.299	2.289	2.280	2.272	2.210	2.171	2.145	2.125	2.111	2.099	2.090	2.047	2.021	2.012
23	2.340	2.325	2.312	2.299	2.287	2.276	2.266	2.256	2.247	2.239	2.176	2.137	2.111	2.091	2.077	2.065	2.056	2.013	1.986	1.977
24	2.311	2.296	2.282	2.269	2.257	2.246	2.236	2.226	2.217	2.209	2.146	2.107	2.080	2.060	2.045	2.034	2.024	1.981	1.954	1.945
25	2.284	2.269	2.255	2.242	2.230	2.219	2.209	2.199	2.190	2.182	2.118	2.079	2.052	2.032	2.017	2.005	1.996	1.952	1.924	1.915
26	2.259	2.244	2.230	2.217	2.205	2.194	2.184	2.174	2.165	2.157	2.093	2.053	2.026	2.006	1.991	1.979	1.969	1.925	1.897	1.888
27	2.237	2.222	2.208	2.195	2.183	2.171	2.161	2.151	2.142	2.133	2.069	2.029	2.002	1.982	1.966	1.954	1.945	1.900	1.872	1.862
28	2.216	2.201	2.187	2.174	2.161	2.150	2.140	2.130	2.121	2.112	2.048	2.007	1.980	1.960	1.944	1.932	1.922	1.877	1.848	1.839
29	2.196	2.181	2.167	2.154	2.142	2.131	2.120	2.110	2.101	2.092	2.028	1.987	1.959	1.939	1.923	1.911	1.901	1.855	1.827	1.817
30	2.178	2.163	2.149	2.136	2.124	2.112	2.102	2.092	2.083	2.074	2.009	1.968	1.940	1.920	1.904	1.892	1.882	1.835	1.806	1.797
40	2.051	2.035	2.020	2.007	1.994	1.983	1.972	1.962	1.952	1.943	1.875	1.832	1.803	1.781	1.764	1.751	1.741	1.691	1.659	1.648
50	1.976	1.960	1.945	1.931	1.919	1.907	1.895	1.885	1.875	1.866	1.796	1.752	1.721	1.698	1.681	1.667	1.656	1.603	1.569	1.557
60	1.927	1.911	1.896	1.882	1.869	1.857	1.845	1.835	1.825	1.815	1.744	1.699	1.667	1.643	1.625	1.611	1.599	1.543	1.507	1.495
70	1.892	1.876	1.861	1.847	1.833	1.821	1.810	1.799	1.789	1.779	1.707	1.660	1.628	1.604	1.585	1.570	1.558	1.500	1.463	1.449
80	1.866	1.850	1.835	1.820	1.807	1.795	1.783	1.772	1.762	1.752	1.679	1.632	1.599	1.574	1.555	1.540	1.527	1.467	1.428	1.414
90	1.846	1.830	1.814	1.800	1.787	1.774	1.763	1.752	1.741	1.731	1.657	1.610	1.576	1.551	1.531	1.516	1.503	1.441	1.401	1.386
100	1.830	1.814	1.798	1.784	1.770	1.758	1.746	1.735	1.725	1.715	1.640	1.592	1.558	1.532	1.512	1.496	1.483	1.420	1.378	1.363
200	1.759	1.742	1.726	1.712	1.698	1.685	1.673	1.661	1.650	1.640	1.562	1.511	1.474	1.447	1.425	1.407	1.393	1.320	1.269	1.250
500	1.717	1.700	1.684	1.669	1.655	1.641	1.629	1.617	1.606	1.596	1.515	1.462	1.423	1.394	1.370	1.351	1.336	1.254	1.192	1.166
1000	1.703	1.686	1.670	1.654	1.640	1.627	1.614	1.603	1.591	1.581	1.499	1.445	1.406	1.376	1.352	1.332	1.316	1.230	1.162	1.132

Elaborada por Irene Patricia Valdez y Alfaro.