

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
FRUTO SIN SEMILLA DEL CAPULÍN MEXICANO (*Prunus
serotina*) E IDENTIFICACIÓN DE SUS FENOLES
MARCADORES MEDIANTE CLAR-EM”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL
FRUTO SIN SEMILLA DEL CAPULÍN MEXICANO (*Prunus
serotina*) E IDENTIFICACIÓN DE SUS FENOLES
MARCADORES MEDIANTE CLAR-EM”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

DIRIGIDA POR

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

DIRECTOR

Dra. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SINODAL

Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

SINODAL

Dra. DULCE MARÍA RIVERA PASTRANA

SINODAL SUPLENTE

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades sobre <i>Prunus serotina</i> subsp. capulí (Cav.) McVaugh	3
II.1.1 Distribución de <i>Prunus serotina</i> en el territorio mexicano	3
II.1.2 Nombres comunes de <i>Prunus serotina</i> en México	3
II.1.3 Usos tradicionales en México	3
II.1.4 Descripción del fruto	3
II.2 Importancia biológica de los compuestos fenólicos	4
II.2.1 Estudios epidemiológicos	4
II.2.2 Actividades farmacológicas de algunos compuestos fenólicos	5
II.2.3 Estudios de los efectos farmacológicos de <i>P. serotina</i>	6
II.3 Generalidades sobre los compuestos fenólicos	7
II.3.1 Los flavonoides	7
II.3.2 Variedad estructural de los flavonoides	8
II.4 Ensayo de capacidad antioxidante	10
II.4.1 Antioxidantes	10
II.4.2 Ensayo FRAP	10
II.4.3 Ensayo DPPH	10
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVOS	13
IV.1 General	13

Contenido	Página
IV.2 Específicos	13
V. METODOLOGÍA	14
V.1 Materiales	14
V.1.1 Material de estudio	14
V.1.2 Equipos que se emplearán para la realización del proyecto	14
V.2. Métodos	15
V.2.1 Preparación del extracto	15
V.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante	
V.2.2.1 Ensayo FRAP	15
V.2.2.2 Ensayo DPPH	16
V.2.3 Cuantificación de fenoles totales	16
V.2.4 Cuantificación de flavonoides totales	17
V.2.5 Preparación de las muestras para análisis de compuestos fenólicos	17
V.2.6 Hidrólisis ácida de los extractos	17
V.2.7 Implementación de condiciones en la CLAR	18
V.2.8 Identificación de los compuestos fenólicos	18
V.2.9 Cuantificación de los fenoles individuales identificados mediante CLAR	18
VI. RESULTADOS	20
VI.1 Actividad antioxidante de la decocción acuosa	20
VI.1.1 Ensayo FRAP	20
VI.1.2 Ensayo DPPH	20
VI.2 Cuantificación de fenoles totales	21
VI.3 Cuantificación de flavonoides totales	21
VI.4 Identificación de los compuestos fenólicos marcadores	22
VI.4.1 CLAR-DAD de las muestras	23
VI.4.1.1. Compuestos identificados en el extracto crudo	23

VI.4.1.2	Compuestos identificados en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N y 4 N	25
VI.4.2.	Identificación de fenoles en el extracto crudo mediante CLAR-EM	26
VI.4.2.1.	Espectro de masas del extracto crudo	26
VI.4.2.2.	Identificación de ácido clorogénico y (-)-epicatequina	27
VI.4.2.3	Identificación del hiperósido y de un pentósido de quercetina	28
VI.4.3	Identificación de fenoles en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N	29
VI.4.3.1	Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N	29
VI.4.3.2	Confirmación de la identidad de los compuestos	30
VI.4.4	Identificación de fenoles en el extracto hidrolizado con HCl 4 N	32
VI.5	Cuantificación de los compuestos encontrados en la CLAR	34
VII.	DISCUSIÓN	36
VII.1	Actividad antioxidante y fenoles totales	36
VII.2	Compuestos identificados en la CLAR-DAD	36
VII.3	Compuestos confirmados e identificados en la CLAR-DAD-EM	37
VIII.	CONCLUSIONES	39
IX.	BIBLIOGRAFÍA	40
	ANEXO	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Gradiente utilizado durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de <i>Prunus serotina</i>	18
2	Valores determinados de fenoles totales en nueve réplicas	21
3	Valores determinados de flavonoides totales	22
4	Resumen de los resultados de la capacidad antioxidante, fenoles totales y flavonoides totales	22
5	Tiempo de retención y λ_{\max} de los estándares utilizados	23
6	Resumen de los compuestos fenólicos detectados mediante la CLAR-DAD	26
7	Compuestos fenólicos identificados mediante EM	33
8	Resumen de los compuestos fenólicos cuantificados	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía del fruto del capulín (<i>Prunus serotina</i>)	4
2	Estructura del hiperósido	7
3	Estructuras y nombres genéricos de los principales flavonoides	9
4	Estructura del radical 2,2-difenil-1picril-hidracilo	11
5	Curva de calibración para FRAP	20
6	Cromatogramas del extracto crudo registrados a tres λ distintas	24
7	Picos identificados en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N	25
8	Cromatograma del extracto hidrolizado con HCl 4 N	25
9	Espectro de masas del extracto crudo	27
10	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 minutos en la Figura 9	27
11	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 minutos en la Figura 9	28
12	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 25 minutos en la Figura 9	28
13	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 26.1 minutos en la Figura 9	29
14	Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N	30
15	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 minutos en la Figura 14	30
16	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 minutos en la Figura 14	31
17	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 33.3 minutos en la Figura 14	31
18	Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 4 N	32
19	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 minutos en la Figura 18	32

20	Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 minutos en la Figura 18	33
21	Curva de calibración para DPPH	47
22	Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales	47
23	Curva de calibración para flavonoides totales	48
24	Cromatograma del ácido gálico usado como estándar	48
25	Cromatograma del ácido clorogénico usado como estándar	49
26	Cromatograma del estándar de (+)-catequina	49
27	Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina	50
28	Cromatograma del estándar de ácido vanílico	50
29	Cromatograma del estándar de ácido protocatéquico	51
30	Cromatograma del estándar de quercetina	51
31	Cromatograma del estándar de isoramnetina	52
32	Cromatograma generado por kamferol puro	52
33	Cromatogramas del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N	53
34	Cromatogramas del extracto hidrolizado con HCl 4 N	53
35	Curva de calibración para la cuantificación del ácido clorogénico	54
36	Curva de calibración para la cuantificación de quercetina	54
37	Comparación de los valores de los ensayos de DPPH y FRAP	55

RESUMEN

La correlación directa observada en estudios de tipo epidemiológico entre el consumo de ácidos fenólicos y flavonoides contenidos en los alimentos de origen vegetal y de consumo diario por una parte y la prevención de varias enfermedades degenerativas como el cáncer, la diabetes, la hipertensión y la inflamación por otra, ha despertado e incrementado cada vez más el interés por la investigación de los productos naturales. El desarrollo de esas enfermedades se ha atribuido en gran parte a los efectos oxidativos de diversas sustancias químicas ingeridas, de manera consciente o inconsciente, de la alimentación. Es por ello que resulta importante estudiar los alimentos desde el punto de vista químico y farmacológico para conocer su potencial antioxidante y terapéutico o preventivo. En México, el capulín (*Prunus serotina*) se consume de diversas formas, siendo las más comunes la forma cruda y en decocción. El presente trabajo se enfocó a la evaluación de la actividad antioxidante de la decocción obtenida a partir del fruto sin semilla del capulín y la determinación de sus fenoles marcadores. El potencial antioxidante de la decocción resultó ser superior al reportado para otros frutos mexicanos como el aguacate, la tuna y la papaya. La identificación de los fenoles marcadores de la decocción del fruto sin semilla se realizó a través de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplada a la espectrometría de masas (EM). Esta metodología permitió identificar el ácido clorogénico, la quercetina, el hiperósido y un pentósido de la quercetina como los compuestos mayoritarios, los cuales han de contribuir en gran medida a la buena actividad antioxidante de la decocción.

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el estudio de los productos naturales, principalmente aquellos con potencial capacidad antioxidante, ha estado en auge a partir del descubrimiento de que el llamado “milagro francés” se debía principalmente al compuesto fenólico resveratrol contenido en las bebidas preparadas con uva. Este descubrimiento fue el punto de partida para profundizar en el estudio de los componentes y de las propiedades que poseen alimentos de consumo diario como son las frutas y verduras, entre otros. Es así como se han identificado una serie de compuestos capaces de prevenir la oxidación. Estos descubrimientos han marcado el papel preponderante que juegan estas moléculas dentro de la dieta humana.

Estos compuestos, conocidos actualmente como ácidos fenólicos y flavonoides, están presentes como pigmentos en una gran cantidad de vegetales y poseen varias actividades biológicas benéficas para la salud, siendo las más destacadas sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antibacterianas. Los flavonoides en particular poseen excelentes propiedades de quelación del hierro, lo que les confiere parte de su capacidad antioxidante. El capulín (*Prunus serotina*) en particular, fruto con una amplia distribución en México, es una fuente de compuestos vasodilatadores de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios farmacológicos realizados en aorta aislada de rata, al evaluar en este modelo extractos acuosos obtenidos de sus hojas y frutos, así como algunos de sus constituyentes; estos resultados indican evidentemente que esta especie vegetal puede presentar actividad antihipertensiva.

Hoy en día, la hipertensión es uno de los padecimientos más comunes en México y una de las principales causas de mortalidad en el mundo, lo que convierte este padecimiento en un tema de investigación muy relevante para la búsqueda de compuestos que puedan contrarrestar estos efectos adversos.

En el marco de ese objetivo, el presente trabajo se realizó para determinar la capacidad antioxidante de la decocción del fruto sin semilla del capulín e identificar algunos los compuestos fenólicos mayoritarios presentes en ella. Como resultado, la decocción produjo una actividad antioxidante superior a la reportada para otros frutos mexicanos como el aguacate, la tuna y la papaya. En cuanto al estudio fitoquímico del extracto, éste se realizó con tres preparaciones distintas: la decocción obtenida del fruto sin semilla y sin más tratamiento adicional y la decocción hidrolizada con dos concentraciones distintas de ácido clorhídrico. Las tres muestras fueron analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD) y mediante CLAR acoplada a espectrometría de masas (EM). Esos estudios permitieron identificar el ácido clorogénico, la quercetina, el hiperósido y un pentósido de la quercetina como los compuestos mayoritarios, los cuales han de contribuir en gran medida a la buena actividad antioxidante de la decocción.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades sobre *Prunus serotina* subsp. capulí (Cav.) McVaugh

II.1.1 Distribución de *Prunus serotina* en el territorio mexicano

Prunus serotina se encuentra en las regiones montañosas, con una altitud de 2,500 m o más y posee una gran distribución en el territorio nacional, encontrándose en los estados de Chihuahua, Chiapas, Coahuila, Durango, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz. También es una planta que se cultiva. Sus sinonimias son: *Prunus salicifolia* Kunth y *Prunus serotina* var. *salicifolia* (Kunth) Koehne (CONABIO, 2010).

II.1.2 Nombres comunes de *Prunus serotina* en México

En la mayoría de los estados de la república mexicana se le conoce como capulín; en algunas zonas de Michoacán como cerezo; cusabi en las comunidades tarahumaras de Chihuahua; Xeugua y Detze en algunas comunidades Otomís y T-nundaya por la comunidad mixteca de Oaxaca (Comisión Nacional Forestal, 2010).

II.1.3 Usos tradicionales en México

El fruto de *P. serotina* es muy apreciado como alimento por su agradable sabor. Se come crudo o en conserva (jalea y mermelada); en los mercados se suelen vender tamales de capulín (Comisión Nacional Forestal, 2010). La corteza del árbol del capulín, así como las hojas, se prepara en infusión para usarse como expectorante, febrífugo, antiespasmódico, sedante y para combatir las diarreas (Calderón de Rzedowski y Rzedowsky, 2001; Martínez, 1991).

II.1.4 Descripción del fruto

Es una drupa globosa, de color negro rojizo en la madurez (Figura 1), de 12 a 20 mm de diámetro, con sabor agridulce y algo astringente; contiene una sola semilla (Comisión Nacional Forestal, 2010).



Figura 1. Fotografía del fruto del capulín (*Prunus serotina*) (Caronni, 2008).

II.2 Importancia biológica de los compuestos fenólicos

II.2.1 Estudios epidemiológicos

Numerosos estudios han corroborado la relación directa existente entre el contenido en compuestos fenólicos de plantas alimenticias y la capacidad de éstas para prevenir las enfermedades degenerativas como el cáncer, la diabetes, los padecimientos cardiovasculares y la obesidad (Kris-Etherton y col., 2002; Chin-Lin y Gow-Chin, 2008; Oomah y col., 2010). Por ejemplo, en base a estudios científicos, se ha sugerido que una ingesta diaria de 400-600 g de frutas y verduras reduce el riesgo de padecer cáncer de próstata (Shukla y Gupta, 2005). Se han identificado las rutas mediante las cuales los compuestos fenólicos contenidos en los alimentos intervienen para controlar la tumorigénesis prostática. Se ha establecido que su actividad antioxidante, la cual ejercen a través del secuestro y la formación de quelatos con metales, capturando los excesos de radicales libres, es la principal responsable de sus efectos farmacológicos preventivos (Soobrattee y col., 2005).

II.2.2 Actividades farmacológicas de algunos compuestos fenólicos

El estudio de las actividades biológicas de las plantas medicinales y alimenticias y sus constituyentes químicos tiene gran auge en la actualidad, debido a los estudios epidemiológicos antes mencionados. Los compuestos fenólicos contenidos en esos remedios comparten la propiedad de ser agentes antioxidantes que demuestran actividades antiinflamatorias, antimutagénicas, antitrombóticas, anticancerosas y antivirales (Chin-Lin y Gow-Chin, 2008; Srivastava y col., 2010; Graef y col., 2010). Se ha descrito la actividad farmacológica de algunos compuestos fenólicos individuales. Por ejemplo, el ácido caféico inhibe la proliferación de las células musculares lisas, la cual es inducida por la angiotensina II en ratas hipertensas (Peng-Gao y col., 2005). Más recientemente, se ha comprobado que los ácidos fenólicos en general, incluyendo los producidos en el colon durante el metabolismo, ejercen su actividad antiinflamatoria, actuando como agentes antiglicantes, los cuales son compuestos que impiden la glicosilación no enzimática que se lleva a cabo entre proteínas y azúcares reductores (reacción de Maillard) y como modificadores de algunas rutas metabólicas, protegiendo a los consumidores contra la diabetes (Chi-Hao y col., 2010; Del Rio y col., 2010). Cabe mencionar que el metabolismo de esos glicósidos genera otros productos finales que desencadenan una cascada de respuestas que complican la diabetes. Por lo tanto, los inhibidores de la glicación tienen gran potencial como agentes terapéuticos en el tratamiento de la diabetes y del envejecimiento prematuro (Singh y col., 2001; Aronson, 2003).

Por otra parte, se han obtenido recientemente datos sobre el mecanismo de acción del ácido protocatéquico como agente anti-invasivo en células cancerígenas con potencial metastático (Lin y col., 2010). También se le han atribuido a este ácido propiedades antiinflamatorias (Jiang y col., 2010; Min y col., 2010).

Al ácido clorogénico, se le han atribuido varias funciones biológicas importantes, entre ellas, como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral y antiviral,

mientras que como medicamento, se usa para tratar la diabetes, la hiperlipidemia y la hepatitis (Chen y col., 2008).

El ácido gálico por su parte está involucrado en la prevención y el tratamiento del cáncer (Chen y col., 2009; Kaur y col., 2009; Cirillo y col., 2010; Ho y col., 2010) y la inflamación (Kroes y col., 2009; Pal y col., 2010).

Se ha reportado que la quercetina ejerce efectos antihipertensivos y reduce la hipertrofia ventricular izquierda, la disfunción endotelial y el nivel oxidativo plasmático y hepático en ratas hipertensas (Duarte y col., 1993a; Duarte y col., 1993b). En otros estudios, se ha observado que la quercetina y varios análogos (isorramnetina, tamarixetina y kamferol) relajan el músculo liso arterial por medio de un mecanismo independiente de endotelio (Perez-Vizcaino y col., 2002). Otros grupos de investigación reportaron que el efecto vasodilatador de la quercetina y varios de sus ésteres metílicos disminuía significativamente cuando se eliminaba el endotelio de la aorta o si se incubaba la aorta intacta con inhibidores de las enzimas sGC (guanilato ciclasa soluble) y NOS (óxido nítrico sintasa). Estos resultados sugirieron que el efecto relajante de la quercetina y de varios de sus ésteres metílicos causaban su efecto mediante una estimulación de la vía del óxido nítrico (NO)/GMPc (Guerrero y col., 2002).

Además de los efectos cardiovasculares, los flavonoides presentan otros efectos farmacológicos, como por ejemplo efectos antiinflamatorios (García-Lafuente y col., 2009), anticancerígenos, antidiabéticos y antineurodegenerativos (Mojzisoova y Mojzis, 2008; Atmani y col., 2009; García-Lafuente y col., 2009).

II.2.3 Estudios de los efectos farmacológicos de *P. serotina*

Se ha reportado un intenso efecto vasodilatador de algunos de los componentes del aceite esencial, así como de diferentes extractos (acuoso, alcohólico y diclorometánico) de las hojas y los frutos de *P. serotina*. En el estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas, se aislaron y caracterizaron tres

compuestos mayoritarios: hiperósido (Figura 2), prunina y ácido ursólico. Al probarse éstos en el ensayo de aorta aislada de rata, también presentaron efecto vasodilatador (Ibarra y col., 2009).

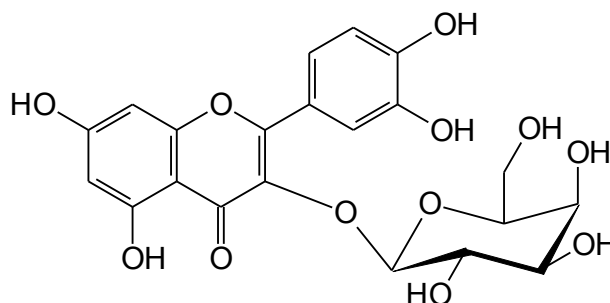


Figura 2. Estructura del hiperósido.

II.3 Generalidades sobre los compuestos fenólicos

II.3.1 Los flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana y son los metabolitos secundarios biológicamente activos más ubicuos en el reino vegetal. Se han identificado más de 5,000 flavonoides diferentes. Los flavonoides forman parte de los pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Martínez y col., 2002). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

Entre los más comunes, se encuentran las catequinas, la quercetina, el kamferol, la apigenina, la naringenina y la luteolina y sus correspondientes C- y O-glicósidos. Las catequinas, que tienen dos centros quirales (C-2 y C-3) y por lo

tanto cuatro isómeros, forman polímeros difícilmente hidrolizables llamados taninos condensados, los cuales, junto con los taninos hidrolizables, imparten la astringencia a los alimentos y bebidas. La (+)-catequina y la (-)-epicatequina son los isómeros ópticos más comunes en la naturaleza (Weyant y col., 2001; Abd El-Hady, 2007; Grace y col., 2009).

II.3.2 Variedad estructural de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), el cual está integrado por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran del 2 al 10, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Figura 3). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Martínez y col., 2002). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

En función de sus características estructurales, los flavonoides se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como las catequinas, que tienen un grupo -OH en posición 3 del anillo C (Figura 3).
2. Flavonoles, representados por la quercetina (o quercitina), que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace en las posiciones 1(2) y 3 y una carga positiva sobre el oxígeno de la posición 1.

Tres características estructurales son importantes para su función biológica:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura de catecol u o-dihidroxi.

- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5.

La quercetina presenta las tres características, mientras que las catequinas presentan la primera y la tercera y la diosmetina la primera (Figura 3).

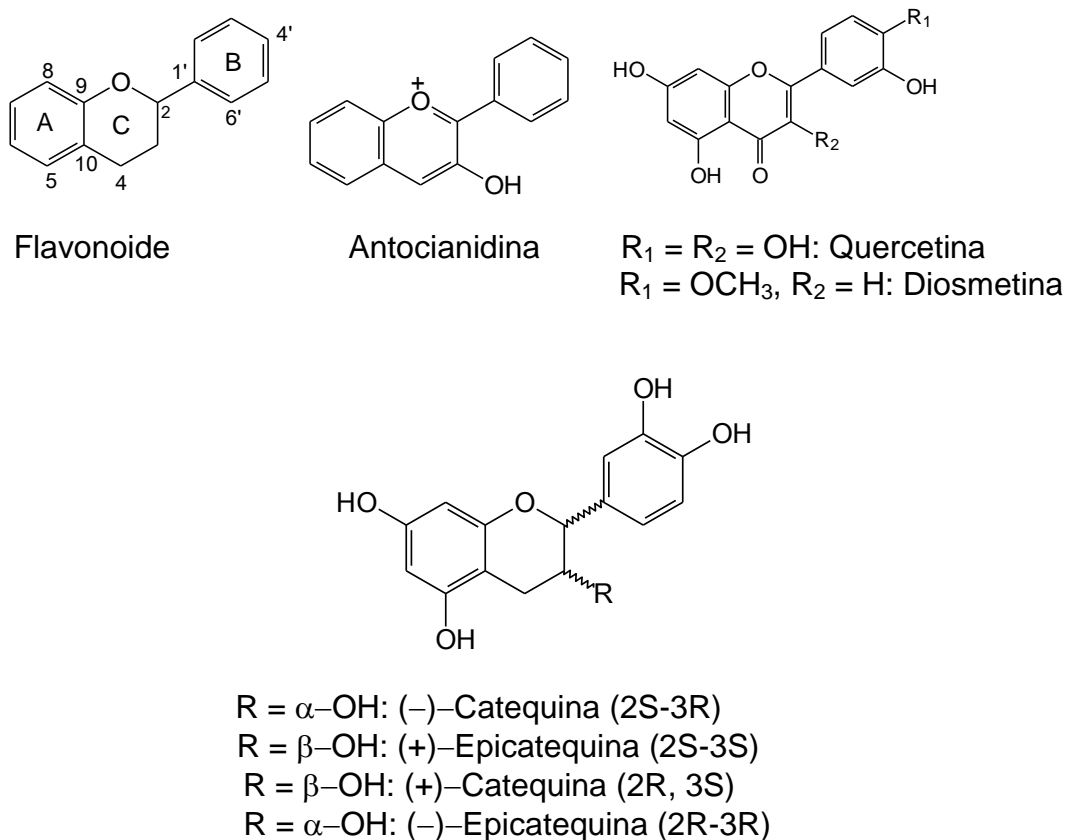


Figura 3. Estructuras y nombres genéricos de los principales flavonoides.

Los flavonoles y las flavonas se encuentran comúnmente como O-glicósidos y menos frecuentemente como C-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico.

La parte sin azúcares de la molécula de flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo.

II.4 Ensayo de capacidad antioxidante

II.4.1 Antioxidantes

La definición del diccionario de antioxidantes es bastante sencilla y se define tradicionalmente como: "una sustancia que se opone a la oxidación o inhibe las reacciones estimuladas por el oxígeno".

En la bioquímica y la medicina, antioxidantes son enzimas u otras sustancias orgánicas, tales como vitamina C o β -caroteno, que son capaces de contrarrestar los efectos dañinos de la oxidación en los tejidos animales (Huang y col., 2005).

Los ensayos de capacidad antioxidante utilizan diversas reacciones químicas que se pueden dividir en dos categorías: (1) ensayos basados en la reacción de la transferencia del átomo de hidrógeno y (2) ensayos basados en la reacción de la transferencia de electrones (Huang y col., 2005; Prior y col., 2005).

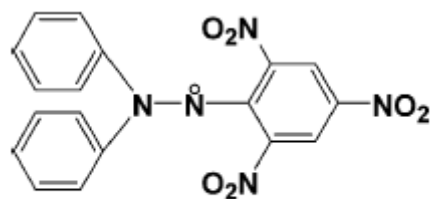
II.4.2 Ensayo FRAP

El ensayo FRAP (de sus siglas en inglés: Ferric Reducing Antioxidant Power) (poder antioxidante por reducción férrica) también se aprovecha de las reacciones de transferencia de electrones. Aquí, una sal férrica, Fe (III) (TPTZ)₂Cl₃ (siendo TPTZ: 2,4,6-tripiridil-triazina), se utiliza como oxidante (Huang y col., 2005). El método se fundamenta en la capacidad de una muestra para reducir el hierro férrico (Fe³⁺) presente en el (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe²⁺) (Benzie y Strain, 1996).

II.4.3 Ensayo DPPH

Este método se basa en la utilización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Figura 4). La reducción del radical DPPH se monitorea por la

disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica; la desaparición del radical DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad de un compuesto para atrapar radicales (Huang y col., 2005).



DPPH

Figura 4. Estructura del radical 2,2-difenil picril hidracilo.

III. HIPÓTESIS

El extracto acuoso obtenido por decocción del fruto sin semilla del capulín mexicano (*Prunus serotina*) posee actividad antioxidante y conserva sus fenoles marcadores después del tratamiento térmico.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Determinar la capacidad antioxidante y los fenoles marcadores del extracto acuoso obtenido por decocción del fruto sin semilla del capulín mexicano (*Prunus serotina*).

IV.2 Específicos

- Determinar la capacidad antioxidante de la decocción acuosa del fruto sin semilla del capulín.
- Cuantificar los fenoles y flavonoides totales presentes en la decocción acuosa del fruto sin semilla del capulín.
- Identificar los compuestos fenólicos presentes en la decocción acuosa del fruto sin semilla del capulín (*Prunus serotina*).
- Cuantificar los compuestos fenólicos identificados.

V. METODOLOGÍA

V.1 Materiales

V.1.1 Material de estudio

El extracto acuoso se obtuvo mediante decocción del fruto sin semilla de *Prunus serotina*.

Los frutos utilizados en este trabajo fueron recolectados en huertos localizados en el municipio de Huejotzingo, Estado de Puebla. Una vez recolectados, los frutos se colocaron en bolsas de plástico con cierre hermético debidamente etiquetadas con la fecha y lugar de recolección. Posteriormente a su recepción en la Facultad de Química, se lavaron con abundante agua destilada y se secaron con papel secante, a fin de que no quedaran residuos de humedad. Los frutos limpios y secos se colocaron en bolsas con cierre hermético y se conservaron a -70 °C hasta su análisis.

V.1.2 Equipos que se emplearon para la realización del proyecto

Ultracongelador marca REVCO.

Espectrofotómetro UV/VIS marca Dynex para la determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de fenoles totales y flavonoides totales.

Balanza analítica marca OHAUS (0.0001 g).

Un sistema cromatográfico marca HP serie 1100 Agilent (Palo Alto California), integrado por una bomba cuaternaria modelo G1311, acoplada a un degasificador modelo G1322A y un sistema de detección. Como detector, se dispone de un aparato de absorción en el ultravioleta-visible de arreglo de diodos, modelo G1315A. La adquisición y el procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el programa ChemStation.

Un espectrómetro de masas, marca Agilent (Palo Alto California), con interfase electro spray de ionización negativa (EM/IEE⁻) que utiliza nitrógeno como gas acarreador, en un rango de flujo de 9 mL/min a 350 °C, con el nebulizador a 45

psi y un voltaje de ionización de 4.0 KV.

V.2 Métodos

V.2.1 Preparación del extracto

Se utilizó un cuchillo y una tabla para retirar la semilla del fruto congelado. Para la preparación del extracto, se siguió la siguiente metodología: en un vaso de precipitado, se pesaron 30.11 g de fruto congelado sin semilla, se agregaron 30 mL de agua destilada. La mezcla se sometió a calentamiento, cuidando que no hubiera una ebullición. El tiempo de calentamiento fue de aproximadamente 15 minutos, todos estos pasos en condiciones de poca luz. Una vez transcurrido el tiempo de calentamiento, la mezcla se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se colocó en tubos sellados y cubiertos con papel aluminio para evitar efectos fotosensibles de la muestra. Finalmente, se midió el volumen obtenido de esta preparación.

V.2.2 Determinación de la capacidad antioxidante

V.2.2.1 Ensayo FRAP

Para preparar la solución FRAP, se tomaron 10 mL de buffer de acetato 300 mM y se ajustó el pH a 3.6 con ácido acético. Se mezcló con 1 mL de cloruro férrico hexahidratado 20 mM previamente disuelto en agua destilada y 1 mL de 2,4,6-Tris(2-piridil)-triazina (TPTZ) 10 mM disuelto en HCl 40 mM. La solución FRAP se preparó en el momento y a una temperatura no mayor de 37 °C. El ensayo se realizó en microplacas donde el blanco consistió en una mezcla de solución FRAP y metanol. Por su parte, el extracto (25 μ L) se mezcló con 75 μ L de la solución FRAP. Se analizaron 9 réplicas del extracto. Los cálculos de concentración se realizaron mediante una curva de calibración hecha con Trolox y los resultados se expresaron como μ mol equivalente de Trolox/g de extracto (Firuzi y col., 2005).

V.2.2.2 Ensayo DPPH

Para la realización de este ensayo, se siguió el procedimiento descrito por Fukumoto y Mazza (2000). Brevemente, se pesaron 0.0019 g de DPPH y se adicionaron 50 mL de agua destilada. En la placa de 96 pozos, se colocaron 280 μ L del reactivo de DPPH y se adicionaron 20 μ L del extracto. Se cubrieron los pozos con papel parafilm y papel aluminio para evitar la evaporación del metanol y la acción de la luz. Se dejaron reposar durante 30 min para estabilizar la reacción de captación del radical libre o el compuesto antioxidante y se determinó la absorbancia a 490 nm después de transcurrido ese tiempo.

V.2.3 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, para lo cual se preparó una curva de calibración con ácido gálico, debido a que los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. La curva se realizó con las siguientes concentraciones de ácido gálico: 0.04 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.16 mg/mL y 0.2 mg/mL. Para la reacción colorida, se agregaron 150 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu 1 N a cada una de las concentraciones y se agitó la solución durante 5 minutos. Finalmente, se añadieron 120 μ L de una solución de carbonato de sodio al 7.5% y se dejaron reposar por dos horas. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

Para obtener el contenido de fenoles de la decocción acuosa del fruto sin semilla del capulín de *P. serotina*, se tomaron 30 μ L de la decocción acuosa del fruto sin semilla del capulín previamente preparado. Posteriormente, se le adicionaron el reactivo Folin Ciocalteu y la solución de carbonato de sodio del mismo modo descrito para la obtención de la curva de calibración.

La concentración de fenoles totales en la muestra se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Para calcular el contenido de fenoles en la muestra, se extrapolaron las absorbancias en la curva de calibración y así se obtuvo el equivalente de ácido gálico por gramo de muestra.

V.2.4 Cuantificación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales, primero se preparó una curva de calibración con catequina. La curva se realizó con las siguientes concentraciones de catequina: 0.018 mg/mL, 0.037 mg/mL, 0.075 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.3 mg/mL. Para realizar la reacción colorida, a 200 μ L de la muestra, se adicionaron 800 μ L de agua destilada y 60 μ L de NaNO_2 ; se consideró éste como el tiempo inicial ($t=0$). Cinco minutos después, se agregaron 60 μ L de AlCl_3 . A los 6 min, se adicionan 400 μ L de NaOH 1 M y la mezcla se diluyó con 480 μ L de agua destilada. Finalmente, se leyó la absorbancia a 510 nm y el valor obtenido se extrapoló en la curva de calibración para obtener el contenido de flavonoides totales por gramo de muestra.

V.2.5 Preparación de las muestras para el análisis de compuestos fenólicos

Para el análisis cualitativo de los compuestos fenólicos, se tomó una alícuota de 1.5 mL que se filtró en acrodiscos de nylon con tamaño de poro de 45 μ m y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies). Dicha preparación se mantuvo en viales cubiertos con papel aluminio para proteger de la luz componentes eventualmente fotosensibles en solución. Se obtuvieron curvas de calibración la cuantificación de para cada uno de los estándares detectados, preparando cuatro o cinco diluciones, cuyas absorbancias se determinaron a dos distintas longitudes de onda: 280 nm y 320 nm.

V.2.6 Hidrólisis ácida de los extractos

Se llevaron a cabo hidrólisis independientes de la muestra a dos distintas concentraciones de ácido clorhídrico, de acuerdo al siguiente procedimiento. En un vial de color ámbar de 30 mL, se colocaron alrededor de 2.5 mL de extracto. Posteriormente, se agregaron 2.5 mL de HCl 2.5 N y la solución se sometió a un baño con agitación a 80 °C durante 2 horas. Para la hidrólisis a una concentración de ácido 4 N, se siguieron los mismos pasos, variando sólo la concentración de ácido.

V.2.7. Implementación de condiciones en la CLAR

Los cromatogramas se obtuvieron utilizando una columna X-terra RP18, 5 μm , 4.6 x 250 mm (Waters). La detección se realizó de manera simultánea a tres distintas λ de detección: 280 nm, 320 nm y 520 nm. Se mantuvo la temperatura de la columna constante durante la elución para una buena reproducibilidad de los tiempos de retención. En el cuadro 1, se muestra la composición del gradiente que proporcionó la mejor resolución durante los análisis. Una vez obtenidas esas condiciones, se determinaron los perfiles cualitativos y cuantitativos de las muestras.

Cuadro 1. Gradiente utilizado durante los análisis y la identificación de compuestos fenólicos en los extractos de *Prunus serotina*.

Tiempo de elución (min)	% H ₂ O-HCOOH 0.01 N	% CH ₃ CN
0	98	2
60	0	100
70	0	100
75	98	2

V.2.8 Identificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos fueron identificados mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos en los extractos con los de los estándares, sus máximos de absorción en el UV-visible y el estudio de los patrones de fragmentación en sus espectros de masas.

V.2.9. Cuantificación de los fenoles individuales identificados mediante CLAR

Para la cuantificación de los compuestos encontrados en los diferentes extractos mediante la CLAR, se obtuvieron curvas de calibración, utilizando las siguientes concentraciones de estándar: 0.01 mg/mL, 0.0125 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL. De esas curvas, se dedujeron las ecuaciones lineales

correspondientes ($y = ax + b$) que permitieron calcular el contenido de compuestos fenólicos.

VI. RESULTADOS

VI.1 Actividad antioxidante de la decocción acuosa

VI.1.1 Ensayo FRAP

Para medir el poder antioxidante mediante el ensayo FRAP, se analizaron 9 réplicas del extracto crudo. Utilizando las absorbancias leídas para cada réplica, se determinó la concentración de Trolox mediante la curva de calibración (Figura 5). El valor de la capacidad antioxidante se calculó promediando las 9 concentraciones, dando como resultado $1087.39 \pm 69.52 \mu\text{M Eq. Trolox/g}$ de fruto fresco sin semilla.

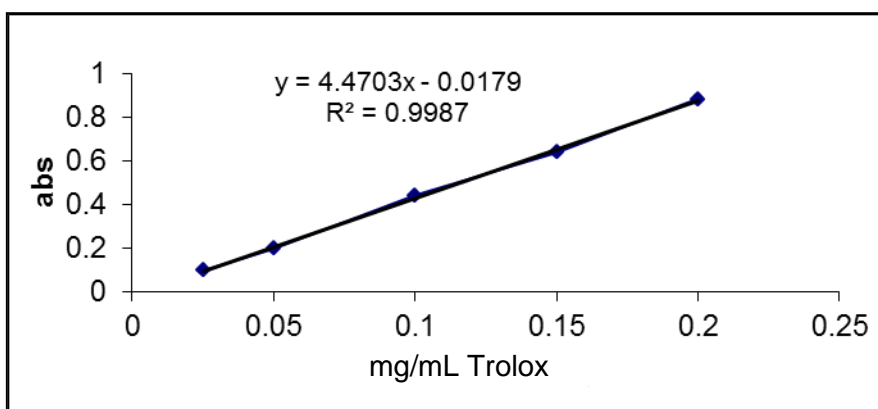


Figura 5. Curva de calibración para FRAP.

VI.1.2 Ensayo DPPH

Para medir el poder antioxidante mediante el ensayo con el DPPH, se analizaron 9 réplicas del extracto crudo. Utilizando los porcentajes de inhibición calculados para cada réplica, se determinó la concentración de Trolox mediante la curva de calibración (Figura 21, ANEXO). La actividad antirradical de la decocción evaluada, expresada en % de inhibición del cambio de color del radical DPPH, el cual representa al mismo tiempo el poder antioxidante de la decocción, arrojó el

siguiente resultado convertido a $\mu\text{M Eq. Trolox}$: $509.25 \pm 113.42 \mu\text{M Eq. Trolox/g}$ de fruto fresco.

VI.2 Cuantificación de fenoles totales

En la cuantificación de fenoles totales mediante el uso de la curva de calibración (Figura 22, ANEXO), se obtuvieron los siguientes valores de concentración (Cuadro 2). El valor de fenoles totales se calculó promediando las 9 concentraciones, dando como resultado $2.401 \text{ mg Eq de ácido gálico/g}$ de fruto fresco.

Cuadro 2. Valores determinados de fenoles totales en nueve réplicas.

Fenoles totales (mg/g fruto)	Media (mg/g fruto)	S ¹
2.252	2.401	0.0032
2.385		
2.360		
2.555		
2.575		
2.382		
2.477		
2.347		
2.275		

¹S = desviación estándar

VI.3 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales mediante una curva de calibración (Figura 23, ANEXO) proporcionó los resultados indicados en el Cuadro 3 para ocho réplicas efectuadas.

Cuadro 3. Valores determinados de flavonoides totales.

Flavonoides totales (mg/g fruto)	Media (mg/g fruto)	S ¹
0.856	0.889	0.0294
0.856		
0.881		
0.872		
0.938		
0.905		
0.930		
0.881		

¹S = desviación estándar

De igual forma que en el caso anterior, se calculó la cantidad de flavonoides totales, dando como resultado 0.889 mg Eq. catequina/g de fruto fresco.

En el Cuadro 4, se resumen los resultados obtenidos de estos experimentos.

Cuadro 4. Resumen de los resultados de la capacidad antioxidante, fenoles totales y flavonoides totales.

PRUEBA	RESULTADO
FRAP	1087.39 ± 69.52 μM Eq. Trolox/g de fruto fresco
DPPH	509.25 ± 113.42 μM Eq. Trolox/g de fruto fresco
Fenoles totales	2.4 mg Eq. ácido gálico/g de fruto fresco
Flavonoides totales	0.889 mg Eq. de catequina/g de fruto fresco

VI.4 Identificación de los compuestos fenólicos marcadores

Los cromatogramas obtenidos para los diferentes estándares empleados se indican en las Figuras 24-32 (ANEXO). En el Cuadro 5 se muestran el tiempo de retención y el máximo de absorción obtenidos para cada estándar.

Cuadro 5. Tiempo de retención y λ_{\max} de los estándares utilizados*.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	λ_{\max} de absorción (nm) en su espectro UV
Ácido gálico	13.7	260 y 294
Ácido cinámico	17.5	278
Ácido clorogénico	19.5	326 y 320
Catequina	19.9	280
Epicatequina	20.8	280
Ácido vanílico	21.9	260 y 294
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzoico	22.0	280 y 320
Ácido caféico	22.4	324 y 296
Ácido sinápico	25.4	324
Ácido ferúlico	26.2	324 y 296
Ácido <i>p</i> -cumárico	26.6	310
Ác. 2-Hidroxicinámico	28.8	280 y 320
Miricetina	30.5	256 y 374
Ác. Protocatéquico	32.3	260 y 294
Quercetina	35.2	256
Isorramnetina	39.7	280 y 320
Kamferol	39.8	266 y 366

* Condiciones de análisis: ver Figuras 24-32, ANEXO.

VI.4.1. CLAR-DAD de las muestras

Los siguientes cromatogramas (Figuras 6–8) obtenidos mediante la CLAR acoplada a un detector de arreglo de diodos (DAD) muestran los picos de los probables compuestos presentes en cada uno de los extractos (crudo e hidrolizados) con su tentativa identificación basada en la comparación de sus tiempos de retención y sus máximos de absorción con los de los estándares (Cuadro 5).

VI.4.1.1 Compuestos identificados en el extracto crudo

Los tres cromatogramas de la Figura 6 se obtuvieron con la finalidad de determinar a qué longitud de onda se observa el mejor perfil del extracto. Como

puede apreciarse, el análisis a 280 nm proporcionó el mejor resultado. De esta forma, en base a los tiempos de retención y los espectros UV de los picos, se determinó la presencia del ácido clorogénico y la (-)-epicatequina.

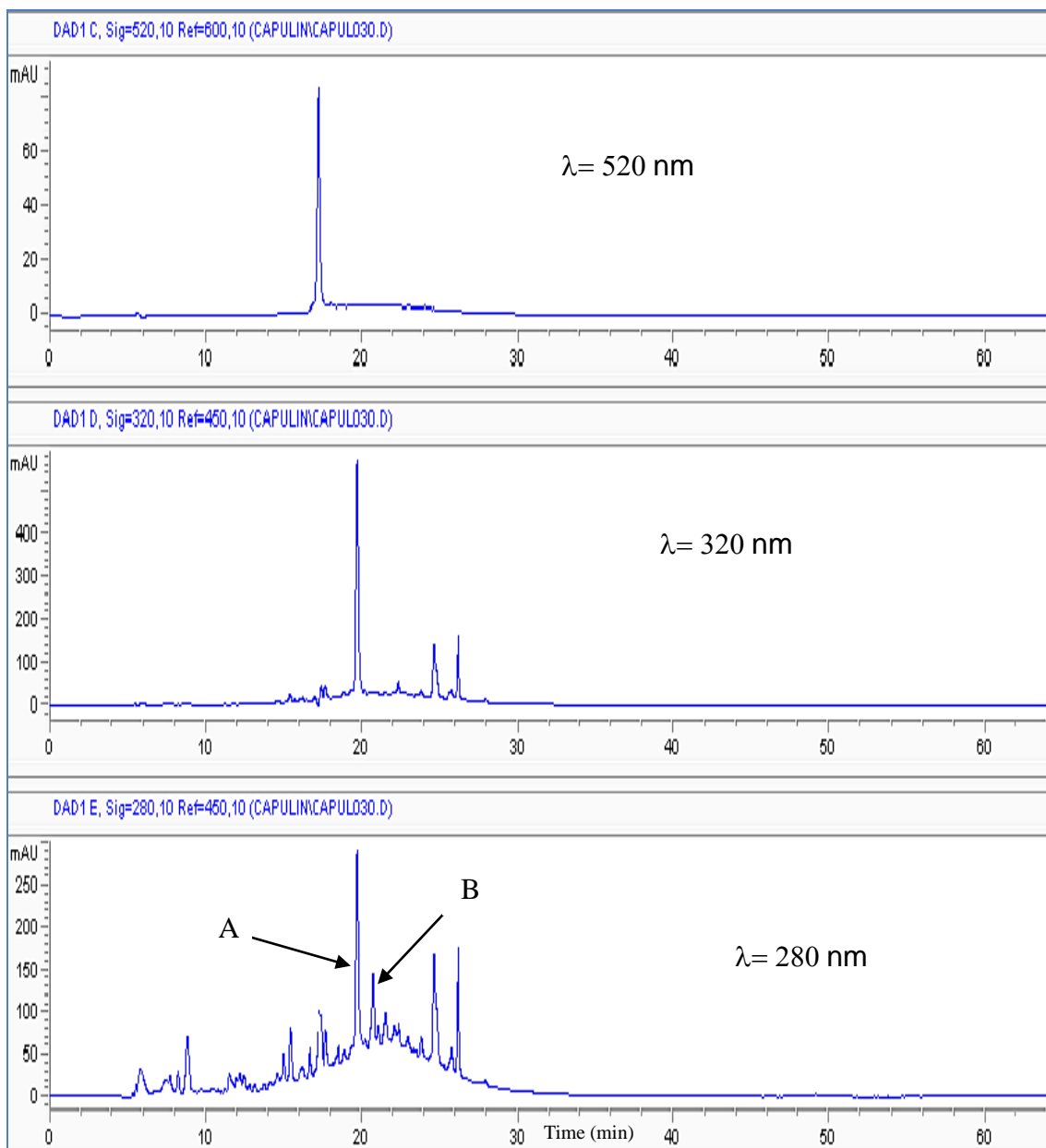


Figura 6. Cromatogramas del extracto crudo registrados a tres λ distintas (280 nm, 320 nm, 520 nm). Pico A) ácido clorogénico y B) (-)-epicatequina.

VI.4.1.2 Compuestos identificados en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N y 4 N

Un análisis similar al anterior determinó que el mejor perfil de este extracto se obtenía a 320 nm (Figuras 33 y 34, ANEXO). Cuatro estándares (A, B, C, D) pudieron ser identificados en esas dos muestras (Figuras 7 y 8).

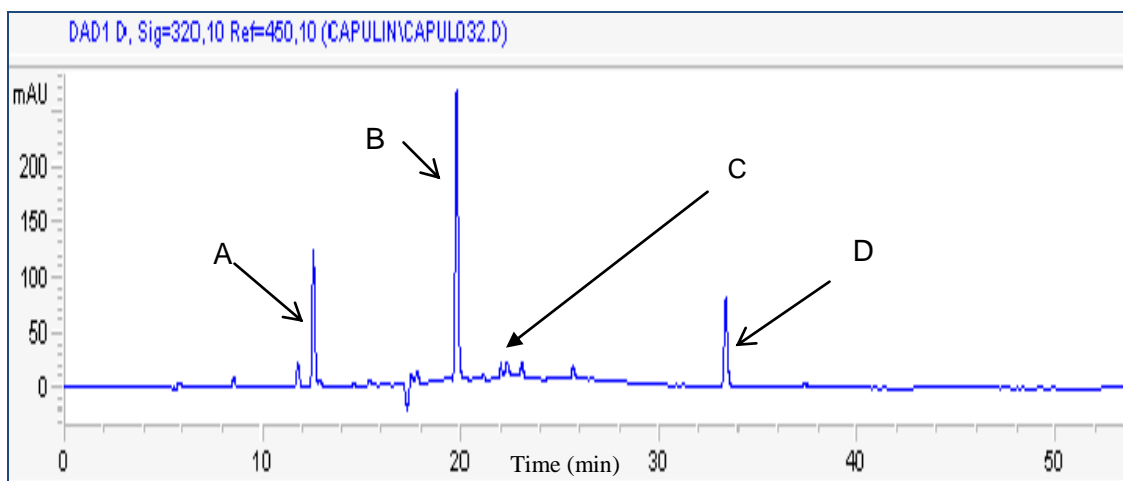


Figura 7. Picos identificados en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N a $\lambda=320$ nm:

A) ácido gálico, B) ácido clorogénico, C) epicatequina y D) quercetina.

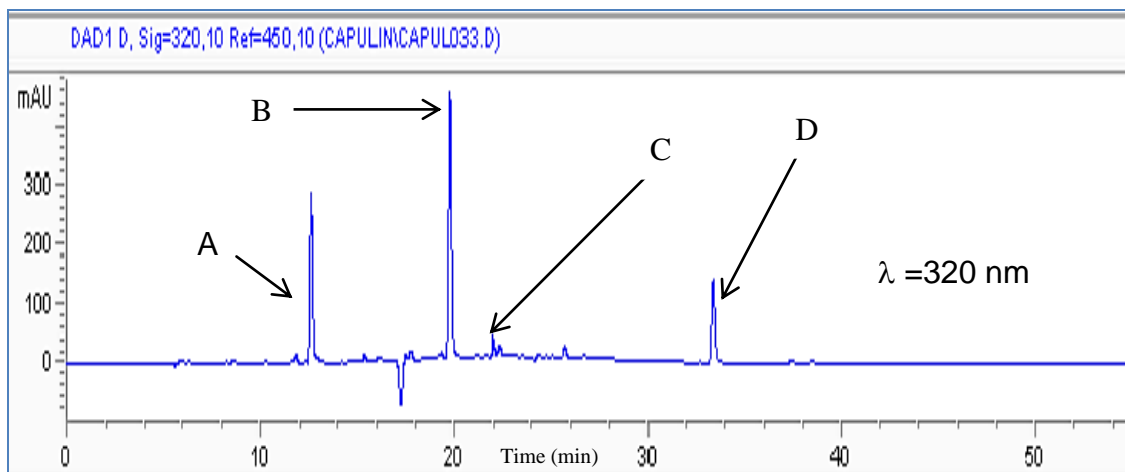


Figura 8. Cromatograma del extracto hidrolizado con HCl 4 N a 320 nm. Picos: A)

ácido gálico B) ácido clorogénico, C) epicatequina y D) quercetina.

Cuadro 6. Resumen de los compuestos fenólicos detectados mediante la CLAR-DAD.

Muestra	Pico	Tiempo de retención	λ_{\max} (nm)	Compuesto
Extracto crudo	A	20.0 min	330	Ácido clorogénico
	B	20.8 min	210 y 282	(-)-Epicatequina
Extracto hidrolizado con HCl 2.5 N y 4.0 N	A	11.8 min	208	Ácido gálico
	B	19.9 min	212 y 330	Ácido clorogénico
	C	22.1 min	210	(-)-Epicatequina
	D	33.5 min	210 y 260	Quercetina

VI.4.2. Identificación de fenoles en el extracto crudo mediante CLAR-EM

VI.4.2.1. Espectro de masas del extracto crudo

La confirmación de la identidad de los picos detectados mediante CLAR-DAD se logró mediante el sistema CLAR-EM/IEE⁻ (ver punto V.1.2). En primer lugar, se obtuvo el espectro de masas del extracto crudo (Figura 9), el cual registró únicamente el pico más intenso (pico-base) de los diferentes componentes. En cambio, para la identificación de otros dos compuestos mayoritarios (C y D), cuyos tiempos de retención no coincidieron con ninguno de los estándares, se estudiaron sus patrones de fragmentación (Figuras 15 y 16), comparándolos con datos descritos en la literatura (Vasco y col., 2009).

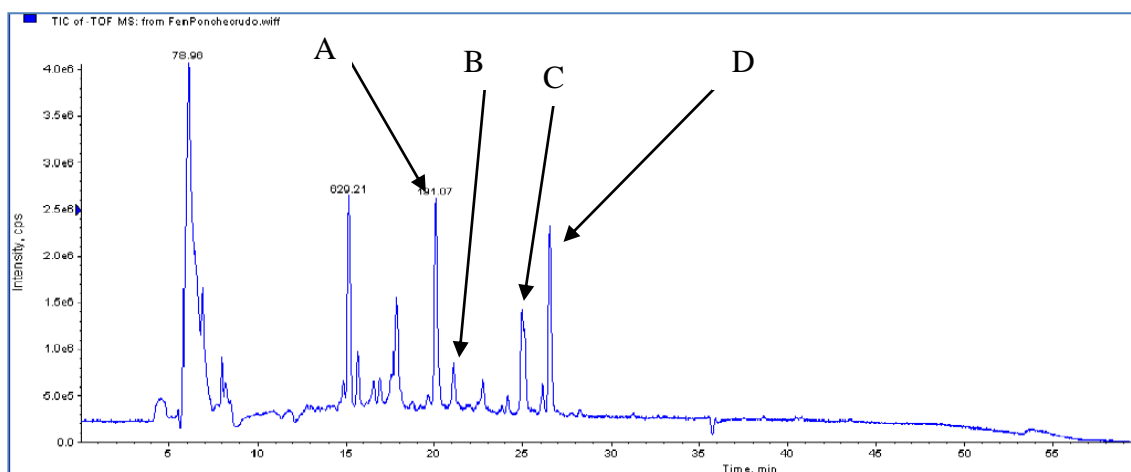


Figura 9. Espectro de masas del extracto crudo que indica los picos-base de los componentes eluidos con sus respectivos tiempos de retención. Picos: A) ácido clorogénico, B) (-)-epicatequina, C) hiperósido y D) pentósido de quercetina.

VI.4.2.2. Identificación del ácido clorogénico y la (-)-epicatequina

En base a los tiempos de retención observados en la Figura 9, se identificaron el ácido clorogénico (pico A) y la (-)-epicatequina (pico B). Posteriormente, se obtuvieron los espectros de masas completos de cada uno de esos dos picos (Figuras 10 y 11) a través del sistema CLAR-EM. Esos espectros y sus patrones de fragmentación permitieron finalmente confirmar las propuestas iniciales, mediante el estudio de los patrones de fragmentación.

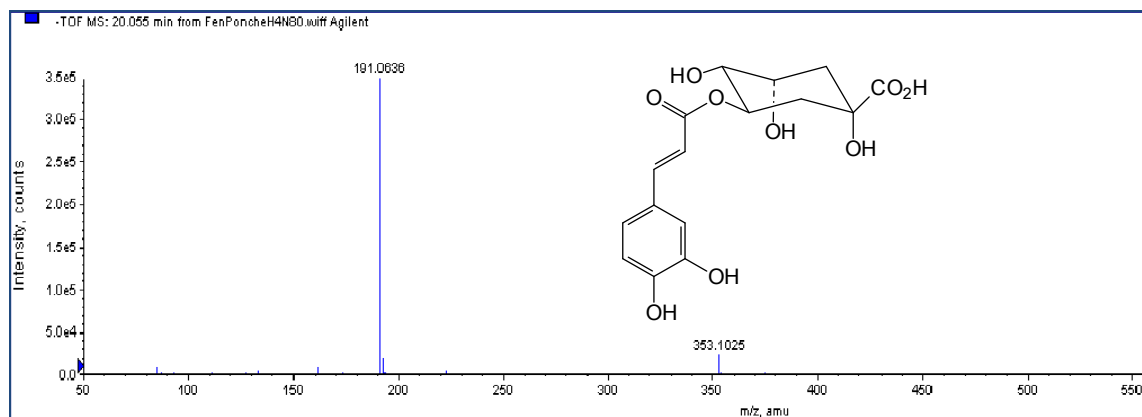


Figura 10. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 min en la Figura 9. Fragmentos en orden de abundancia: 191 (100%) y 353 (19.6%).

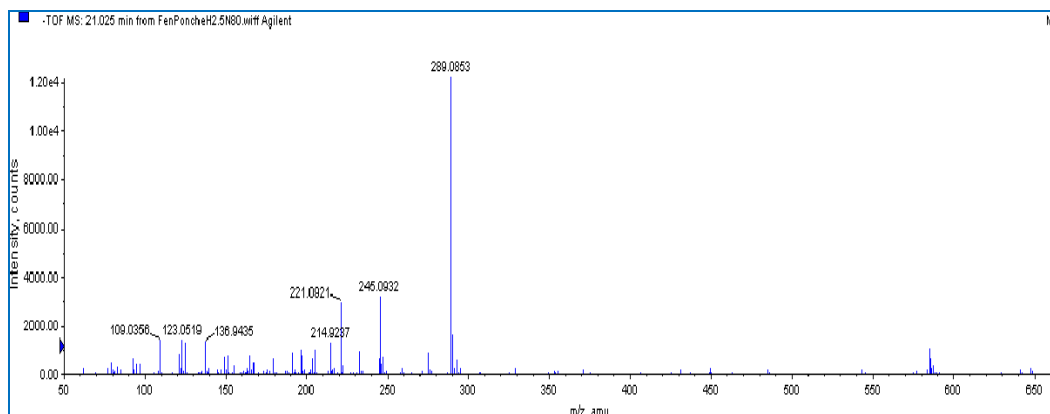


Figura 11. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 minutos en la Figura 9. Fragmentos en orden de abundancia: 289.08 (100%), 245.08 (24.2%), 205.05 (7.1%), 179.04 (3.3%).

VI.4.2.3 Identificación del hiperósido y de un pentósido de quercetina

El análisis de los patrones de fragmentación de los picos C y D en la Figura 9 mediante la comparación con datos descritos en la literatura (Vasco y col., 2009) permitió identificarlos como el hiperósido (Figura 12) y un pentósido de la quercetina (Figura 13), aunque en este último, los datos no fueron suficientes para determinar la naturaleza del azúcar ni su posición sobre la aglicona.

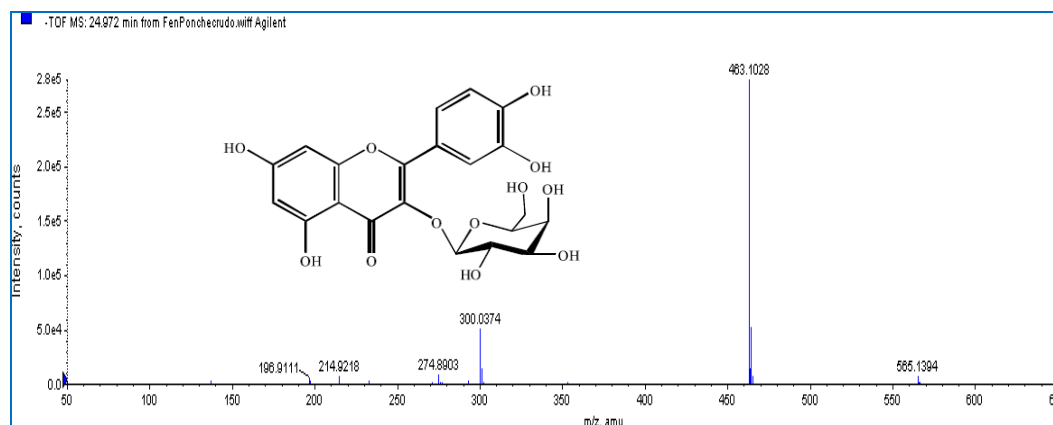


Figura 12. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 25 min en la Figura 9. Fragmentos en orden de abundancia: 463.09 (100%), 301.05 (6%).

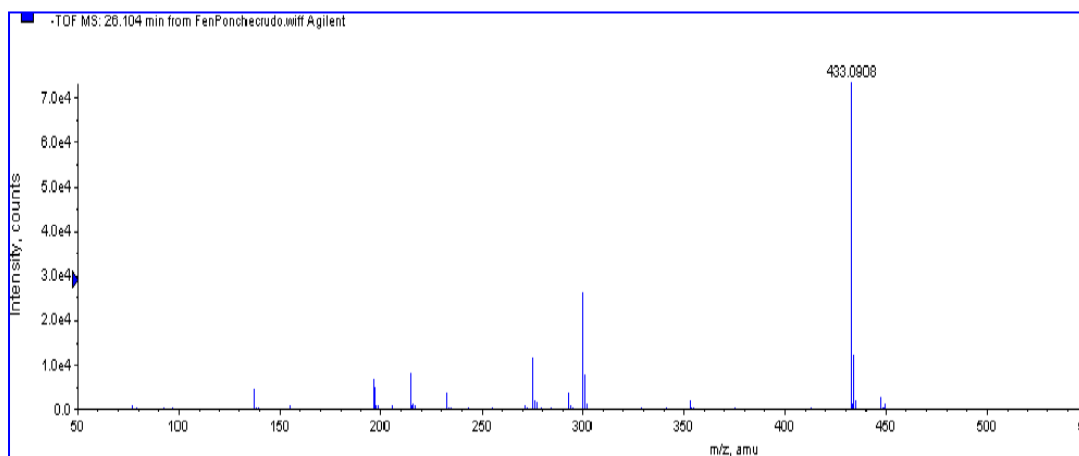


Figura 13. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 26.1 minutos en la Figura 9. Fragmentos en orden de abundancia: 433.09 (100%) y 301.03 (11.4%).

VI.4.3 Identificación de fenoles en el extracto hidrolizado con HCl 2.5 N

VI.4.3.1 Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N

Para la identificación de los compuestos fenólicos en este extracto, se siguió la misma metodología utilizada en el caso del extracto crudo. La figura 14 representa el espectro de masas del extracto hidrolizado con ácido clorhídrico 2.5 N que permitió identificar algunos estándares y obtener los patrones de fragmentación de los picos correspondientes.

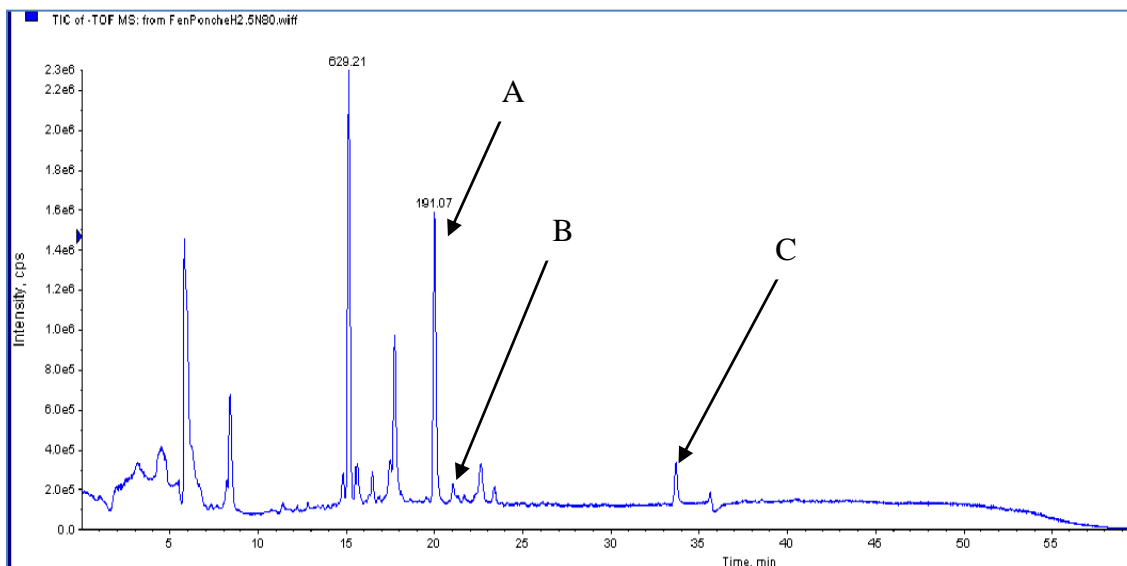


Figura 14. Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N que indica los picos-base de los componentes. Picos identificados: A) ácido clorogénico, B) (-)-epicatequina y C) quercetina.

VI.4.3.2 Confirmación de la identidad de los compuestos

Las Figuras 15, 16 y 17 representan los espectros de masas que permitieron identificar los picos A, B y C de la Figura 14, respectivamente como el ácido clorogénico, la (-)-epicatequina y la quercetina.

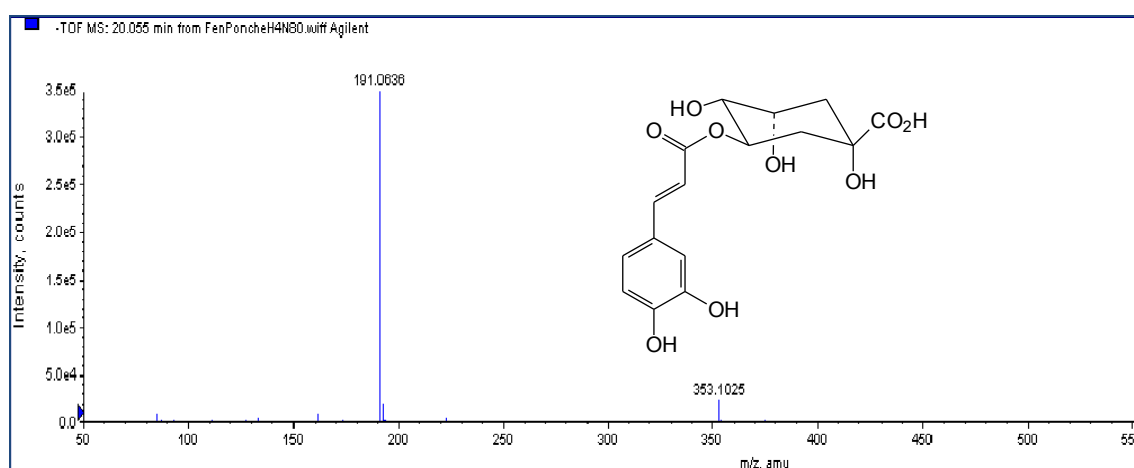


Figura 15. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 min (Figura 14) que fue identificado como el ácido clorogénico. Fragmentos en orden de abundancia: 191 (100%) y 353 (8.1%).

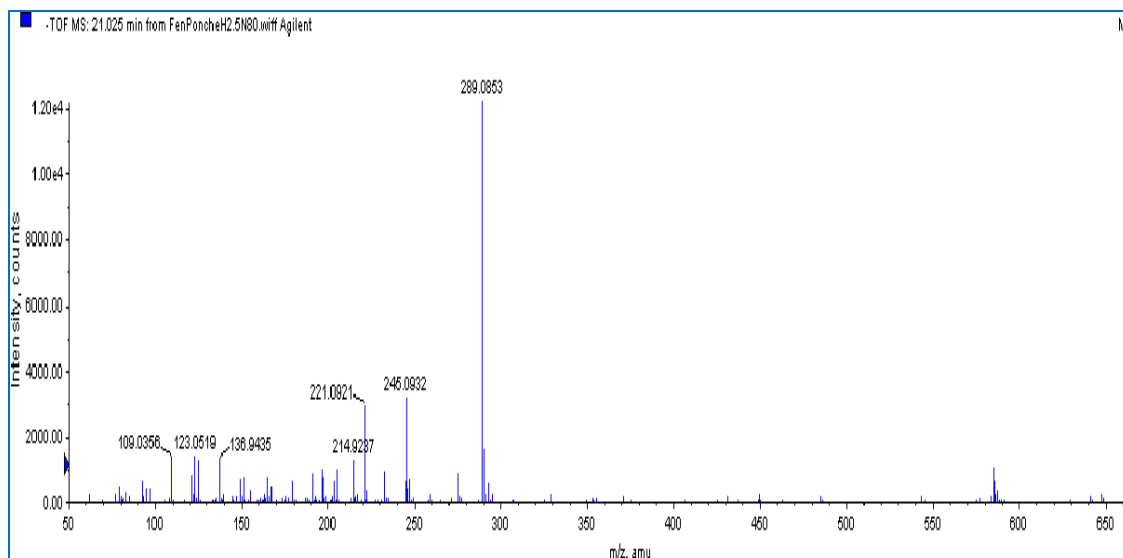


Figura 16. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 min en la Figura 14 y que fue identificado como (-)-epicatequina. Fragmentos en orden de abundancia: 289.08 (100%), 245.08 (26.7%), 205.05 (8.6%) y 179.04 (5.3%).

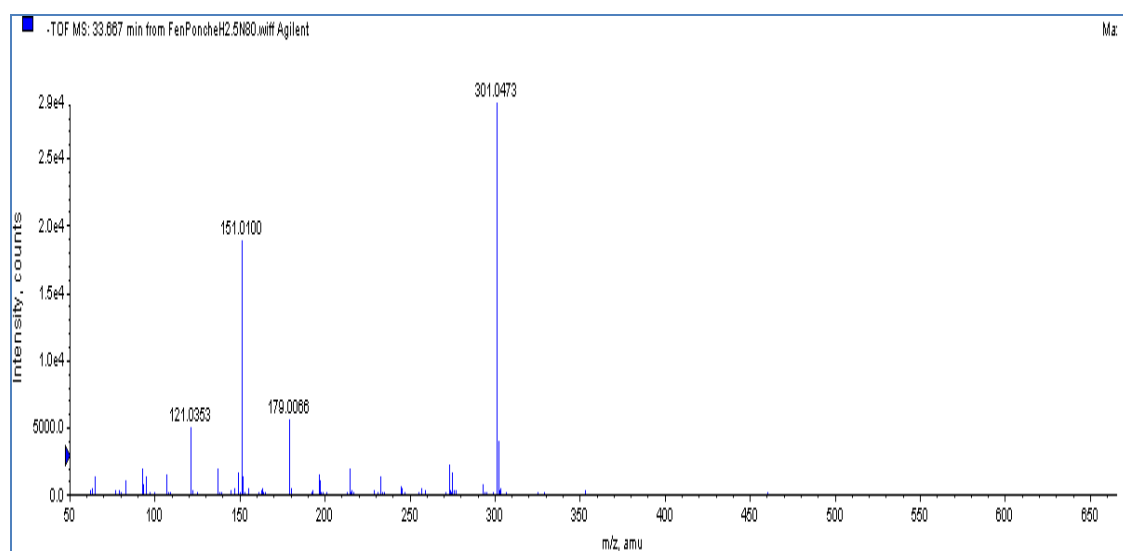


Figura 17. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 33.3 min en la Figura 14 y que fue identificado como quercetina. Fragmentos en orden de abundancia: 301.04 (100%), 151.01 (62.8%), 179.00 (18.7%) y 121.03 (16.6%).

VI.4. 4 Identificación de fenoles en el extracto hidrolizado con HCl 4 N

Como puede apreciarse, sólo se confirmó en este extracto la identidad del ácido clorogénico (Figura 19) y la (-)-epicatequina (Figura 20).

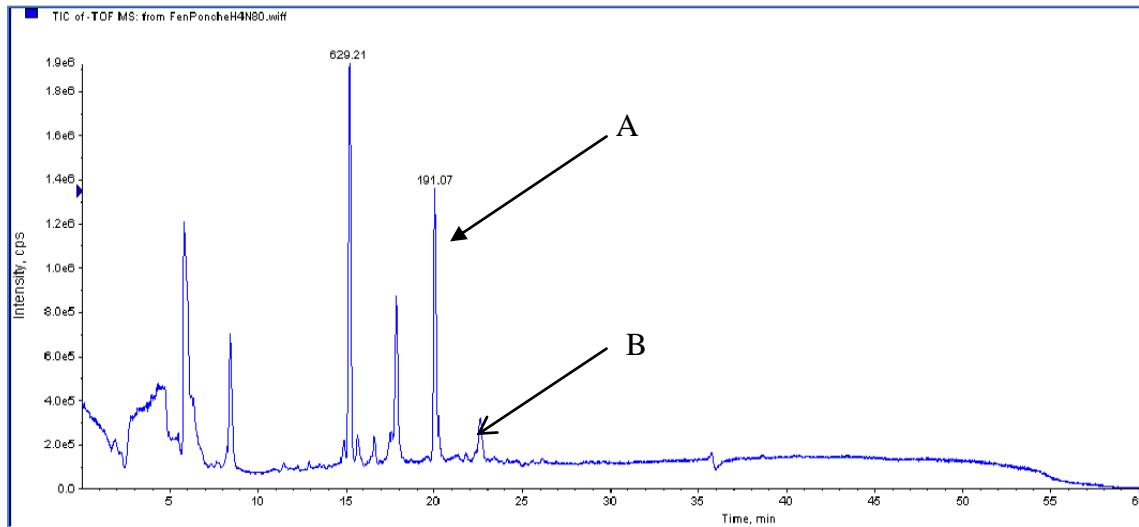


Figura 18. Espectro de masas del extracto hidrolizado con HCl 4 N que indica los picos-base de los componentes eluidos con sus respectivos tiempos de retención. A) ácido clorogénico, B) (-)-epicatequina.

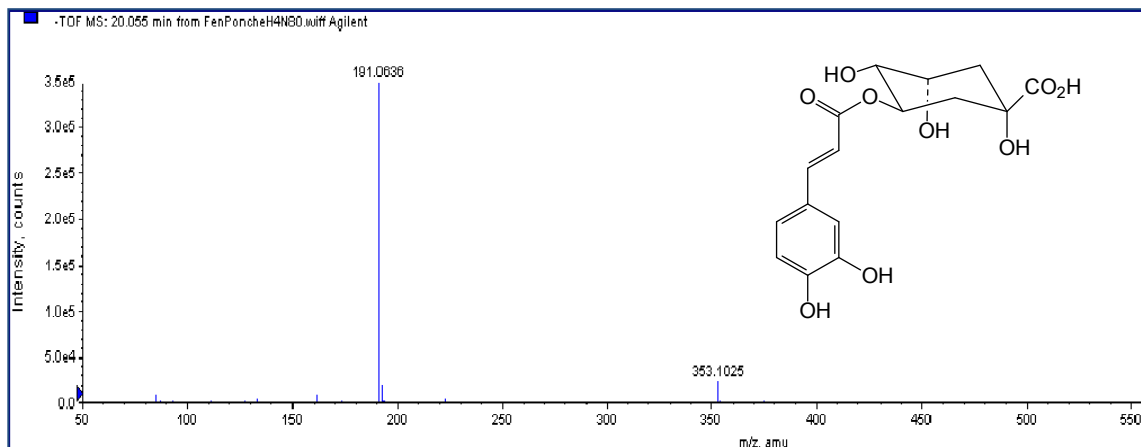


Figura 19. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 20.1 min en la Figura 18, el cual fue identificado como ácido clorogénico. Fragmentos en orden de abundancia: 191 (100%) y 353 (12.1%).

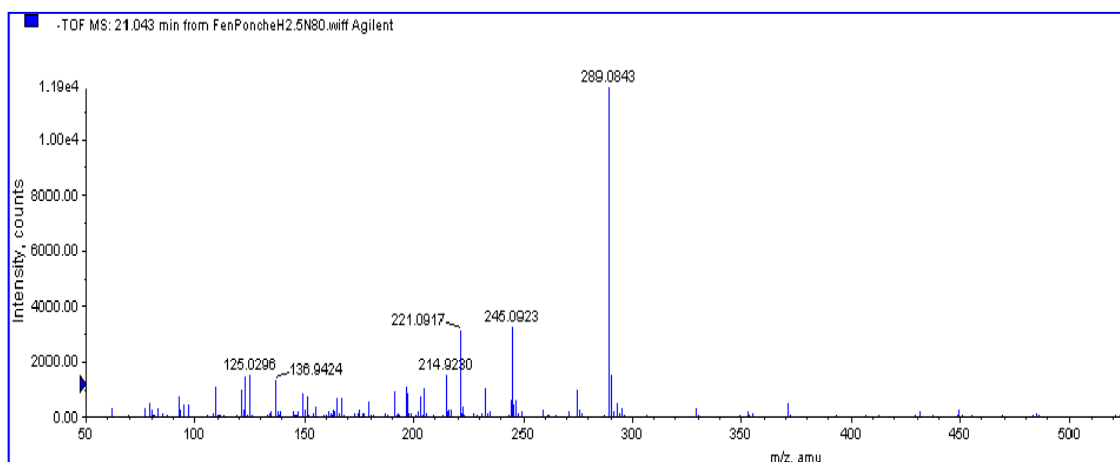


Figura 20. Patrón de fragmentación del pico con el tiempo de retención de 21.1 min en la Figura 18, el cual fue identificado como la (-)-Epicatequina. Fragmentos en orden de abundancia: 289.08 (100%), 245.08 (23.3%), 205.05 (12%) y 179.04 (2.1%).

En el Cuadro 7, se indican los compuestos confirmados mediante los espectros de masas de los diferentes extractos.

Cuadro 7. Compuestos fenólicos identificados mediante EM.

Muestra	Compuesto detectado	Tiempo de retención (min)	Masa exacta	Fragmentos
Extracto crudo	Ácido clorogénico	20.1 min	354.09	191.06, 353.10, 163.06.
	(-)-Epicatequina	21.1 min	290.07	289.08, 245.08, 205.05, 179.04.
	Hiperósido	25.0 min	464.09	463.09, 301.05.
	Pentósido de quercetina	26.5 min	434.09	433.09, 301.03.
Extracto 2.5 N	Ácido clorogénico	20.0 min	354.09	191.06, 353.10, 163.06.
	(-)-Epicatequina	21.1 min	290.07	289.08, 245.09.
	Quercetina	33.3 min	302.04	301.04, 151.01, 179.00, 121.03.
Extracto 4 N	Ácido clorogénico	20.1 min	354.09	191.06, 353.10, 163.06.
	Epicatequina	21.6 min	290.07	289.98, 245.09.

VI.5 Cuantificación de los compuestos encontrados en la CLAR

Las curvas de calibración se obtuvieron a las λ de 280 nm y 320 nm, dependiendo del mejor perfil cromatográfico obtenido para cada muestra. De esas curvas, se dedujeron las ecuaciones lineales que permitieron calcular las cantidades del compuesto fenólico correspondiente, las cuales fueron extrapoladas a mg/g de fruto fresco. A continuación, se describe un ejemplo de esa extrapolación.

De los 27.5 mL de extracto obtenidos a partir de la decocción de 30.11 g de fruto sin semilla en 30 mL, se tomaron aproximadamente 2 mL del extracto, se filtraron en un acrodisco de membrana de nylon y se colocaron en un vial de 1.5 mL de volumen. Finalmente, se inyectaron 20 μ L de esta última solución en el cromatógrafo de líquidos.

De acuerdo al área bajo la curva del pico tentativamente identificado como el estándar y su respectiva curva de calibración, es posible despejar de la curva la concentración correspondiente al área del pico, la cual se calcula despejando de la ecuación lineal establecida.

Entonces, en el caso del ácido clorogénico para el cual la curva de calibración tiende al modelo matemático $y = 25585x + 16.69$ y que tuvo un área bajo la curva de 2404.77, la cantidad determinada fue de 0.0933 mg/mL de extracto.

De esta forma, si 1 mL de extracto contiene 0.0933 mg de ácido clorogénico, entonces a partir de los 27.5 mL obtenidos de los 30.11 gramos de fruto, un gramo de fruto contendrá:

$$\frac{0.0933 \text{ mg}}{\text{mL}} \left(\frac{27.5 \text{ mL}}{30.11 \text{ g}} \right) = 0.0852 \text{ mg/g de fruto.}$$

Se siguió la misma secuencia de cálculo para determinar las cantidades de los demás compuestos, las cuales se resumen en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Resumen de los compuestos fenólicos cuantificados.

Compuesto fenólico	λ de detección	Área bajo la curva	mg/g de fruto fresco
Ácido clorogénico	280 nm	2404.77	0.0852
(-)-Epicatequina	280 nm	88.69	0.0052
Quercetina	320 nm	900.72	0.0300

VII. DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló para determinar la actividad antioxidante del fruto del capulín mexicano y la presencia de algunos de los compuestos fenólicos mayoritarios, los cuales serán considerados entre los marcadores de este fruto.

VII.1 Actividad antioxidante y fenoles totales

Los valores obtenidos de la evaluación de la actividad antioxidante de la decocción del fruto nos demuestran que el capulín posee mayor actividad antioxidante que la de algunos frutos mexicanos como el aguacate, la tuna y la papaya (Corral-Aguayo y col., 2009) (Figura 37, ANEXO). Los valores de fenoles totales y flavonoides totales encontrados en la decocción del fruto del capulín son a su vez superiores a los reportados para los frutos mencionados anteriormente, lo que nos indica que hay cierta correlación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides totales con la capacidad antioxidante encontrada en la decocción.

VII.2 Compuestos identificados en la CLAR-DAD

En el análisis mediante CLAR acoplada a un detector de arreglo de diodos, se realizaron determinaciones simultáneas a las longitudes de onda (λ) de 280, 320 y 520 nm, debido a que la mayoría de los fenoles simples y flavonoides pueden ser detectados a las dos primeras λ , mientras que las antocianinas, en la tercera, lo que nos permite identificar a la mayoría de los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en la decocción de este fruto. Sin embargo, en este análisis se obtuvieron los mejores perfiles (detección de mayor cantidad de compuestos) a 280 y 320 nm.

Mediante este método, en el extracto sin hidrolizar, se detectaron el ácido clorogénico y la (-)-epicatequina. Sin embargo, para evitar una subevaluación del potencial farmacológico de la decocción del fruto y, debido a que los compuestos fenólicos pueden encontrarse también en forma de glicósidos, el extracto se

sometió a hidrólisis con dos concentraciones distintas de ácido para aumentar la disponibilidad de los compuestos fenólicos presentes en la muestra y poder caracterizar las agliconas. De esta forma, además de los dos compuestos mencionados anteriormente, se identificaron también el ácido gálico y la quercetina en estos hidrolizados.

VII.3 Compuestos confirmados e identificados en la CLAR-DAD-EM

La confirmación de la identidad de los compuestos detectados en el análisis mediante CLAR-DAD se logró a través de la espectrometría de masas en la cual se realizó una comparación entre los patrones de fragmentación obtenidos con los patrones de fragmentación ya reportados en la literatura (Vasco y col., 2009).

Los análisis de los extractos mediante la CLAR-DAD-EM nos permitieron identificar en el extracto crudo a dos compuestos en forma de glicósidos: un pentósido de quercetina y un O-glucósido de quercetina (hiperósido), el cual se había reportado como un constituyente del extracto metanólico proveniente de las hojas del capulín con considerable efecto vasorrelajante (Ibarra y col., 2009). A su vez en este mismo extracto la espectrometría de masas nos permitió corroborar la presencia del ácido clorogénico y de la epicatequina. El mismo análisis descartó la presencia del ácido gálico.

Por otra parte, en el extracto hidrolizado con una concentración de ácido clorhídrico 2.5 N se logró corroborar la presencia de ácido clorogénico, epicatequina y quercetina. En cuanto al extracto hidrolizado a una concentración de HCl 4 N, solamente se pudo confirmar la presencia de ácido clorogénico y epicatequina. Por lo que la quercetina pudo haberse degradado al estar en contacto con una mayor concentración de ácido clorhídrico.

En el caso del pico detectado en el análisis mediante CLAR-DAD para antocianinas (λ 520 nm), los fragmentos de dicho pico y de sus cercanos en el cromatograma, no coincidieron con patrones de fragmentación ya reportados para moléculas de este tipo.

En cuanto a la cuantificación de los compuestos fenólicos, para el ácido clorogénico y la (-)-epicatequina, ésta se realizó a 280 nm mediante las curvas de calibración correspondientes a cada estándar encontrado. En el caso de la quercetina, la cuantificación se realizó a 320 nm, debido a que a esta λ se encontró una mayor intensidad de los picos tanto en la curva de calibración como en los cromatogramas de los distintos extractos analizados (crudo e hidrolizados).

En resumen, en la decocción del fruto sin semilla del capulín, se identificaron en el presente estudio al ácido clorogénico [0.0852 mg/g de fruto fresco (g.f.f)], la quercetina (0.0300 mg/g.f.f.), la (-)-epicatequina (0.0052 mg/g.f.f.), el hiperósido y un pentósido de quercetina.

Es ampliamente reconocida en la literatura científica la actividad antioxidante de esos compuestos fenólicos y sus propiedades farmacológicas.

VIII. CONCLUSIONES

Se identificaron y cuantificaron tres compuestos fenólicos: ácido clorogénico, quercetina y epicatequina, siendo los dos primeros los mayoritarios.

Mediante la espectrometría de masas, se identificaron dos glicósidos: el hiperósido (3-O-β-D-galactosil quercetina) y un pentósido de quercetina.

De los compuestos identificados, únicamente la quercetina se encontraba en forma de glicósido, ya que solamente se detectó después de la hidrólisis ácida del extracto; los demás compuestos fenólicos no existían en forma de glicósidos, ya que la hidrólisis ácida no proporcionó cantidades adicionales de los mismos en el extracto no hidrolizado.

Los compuestos fenólicos encontrados son estables aún a altas temperaturas, lo cual le confiere a la decocción del capulín una buena actividad antioxidante, comparable a la de otros frutos mexicanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abd El-Hady, D. 2007. Selective and sensitive hydroxypropyl-beta-cyclodextrin based sensor for simple monitoring of (+)- catechin in some commercial drinks and biological fluids. *Analytica Chimica Acta*: Vol. 593: 178-187.

Aronson, D. 2003. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffness of aging and diabetes. *Journal of Hypertension*: Vol. 21: 3-12.

Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berboucha, M., Debbache, N., Boudaoud, H. 2009. Flavonoids in human health: from structure to biological activity. *Current Nutrition & Food Science*: Vol. 5: 225-237

Benzie, I.F.F., and Strain, J.J., 1996. The ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. Vol. 239: 70-76.

Calderón de Rzedowski, G., Rzedowski, J. 2001. Rosaceae. Flora fanerogámica del valle de México. 2ª Edición. Instituto de Ecología, A.C y Comisión para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Michoacán, México: 233.

Caronni, F. E. 2008. <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/266628>. Fecha de consulta: 18 octubre de 2010.

Chen, S., Wang, Y., Lou, L. 2008 Advances in research on chlorogenic acid. *Shipin Keji*: Vol. 2: 195-199.

Chen, H. M., Wu, Y. C., Chia, Y. C. , Chang, F. R., Hsu, H. K., Hsieh, Y. C., Chen, C. C., Yuan, S. S. 2009. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Letters*: Vol. 286: 161-171.

Chi-Hao, W., Chi-Tai, Y., Ping-Hsiao, S., Gow-Chin, Y. 2010. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*: Vol. 54 (Suppl. 2): S127-S140.

Chin-Lin, H., Gow-Chin, Y. 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*: Vol. 52: 53-61.

Cirillo, G., Kraemer, K., Fuessel, S., Puoci, F., Curcio, M., Spizzirri, U. G., Altimari, I., Iemma, F. 2010. Biological Activity of a Gallic Acid-Gelatin Conjugate. *Biomacromolecules*: Vol. 11: 3309-3315.

Comisión Nacional Forestal/Sistema Nacional de Información Forestal. http://148.223.105.188:2222/snif_portal/secciones/usos/UsosPDF.php?especieURL=Prunusserotina/. Fecha de consulta: 18 de octubre de 2010.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad), Sistema Integrado de Información Taxonómica; <http://siit.conabio.gob.mx/> Fecha de consulta: 18 de Octubre 2010.

Corral-Aguayo, R., Yahia, E.M., Carrillo-Lopez, A., and Gonzales-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*: Vol. 56: 10498-10504.

Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., Crozier, A. 2010. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*: Vol. 2: 820-833.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., Lui, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 50: 3010-3014.

Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A. 1993a. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *General Pharmacology*: Vol. 24: 857-862.

Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Jimenez, J., Tamargo, J. 1993b Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*: Vol. 239: 1-7.

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "Ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltametry. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*: Vol. 1721: 174-184.

Fukumoto, A. M., Mazza, G. **2000**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 48: 594-598.

Garcia-Lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A., Rostagno, M. A.; Martinez, J. A. **2009**. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*: Vol. 58: 537-552.

Grace, Mary H.; Wilson, George R.; Kandil, Fayed E.; Dimitriadis, Eugene; Coates, Robert M. **2009**. Characteristic flavonoids from *Acacia burkittii* and *A. acuminata* heartwoods and their differential cytotoxicity to normal and leukemia cells. *Natural Product Communications*: Vol. 4: 69-76.

Grael, C. F. F., Kanashiro, A., Kabeya, L., Jordao, C., Takeara, R., Gobbo-Neto, L., Polizello, A. C. M., Lucisano-Valim, Y. M., Lopes, N. P., Lopes, J. L. C. **2010**. In vitro study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. *Quimica Nova*: Vol. 33: 867-870.

Guerrero, M.F., Puebla, P., Carron, R., Martin, M.L., San Roman, L. **2002**. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*: Vol. 54: 1373-1378.

Ho, H. H., Chang, C. S., Ho, W. C, Liao, S. Y., Wu, C. H., Wang, C. J.. **2010**. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF- κ B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. *Food and Chemical Toxicology*: Vol. 48:: 2508-2516.

Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L., **2005**. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 53: 1841-1856.

Ibarra-Alvarado, C., Rojas, A., Luna, F., Rojas, J.I., Rivero-Cruz, and Rivero-Cruz, J.F., **2009**. Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus serotina* "capulín". *Revista Latinoamericana de Química*. Vol. 37(2):164-173.

Jiang, H., Hou, Z., Di, Z., Wang, G., You, X. **2010**. Preliminary study on anti-inflammatory active components from *Leontopodium leontopodioides*. *Zhongchengyao*: Vol. 32: 1048-1050.

Kaur, M., Velmurugan, B., Rajamanickam, S., Agarwal, R., Agarwal, C. 2009. Gallic Acid, an Active Constituent of Grape Seed Extract, Exhibits Anti-proliferative, Pro-apoptotic and Anti-tumorigenic Effects Against Prostate Carcinoma Xenograft Growth in Nude Mice. *Pharmaceutical Research*: Vol. 26: 2133-2140.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*: Vol. 113(9B): 71S-88S.

Kroes, B. H., Van den Berg, A. J. J., Quarles van Ufford, H. C., Van Dijk, H., Labadie, R. P. 1992. Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Medica*: Vol. 58: 499-504.

Lin, H-H., Chen, J-H., Chou, F-P, Wang, C-J. 2010. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF- κ B pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *British Journal of Pharmacology*: Vol: 162: 237-254.

Martínez, M. 1991. Las plantas Medicinales de México. 6ª Ed. Ediciones Botas. México, D.F: 61-62.

Martínez-Flóres, S., Gonzales, J., Culebras, J.M, Tuñon, M.J, 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. Vol. 17: 271-278.

Min, S. W., Ryu, S. N., Kim, D. H. 2010. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *International Immunopharmacology*: Vol. 10: 959-966.

Mojzisova, G., Mojzis, J. 2008 Flavonoids and their potential health benefits: relation to heart diseases and cancer. *Recent Progress in Medicinal Plants*: Vol. 21: 105-129.

Oomah, B. D., Corbe, A., Balasubramanian, P. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 58: 8225-8230.

Pal, C., Bindu, S., Dey, S., Alam, A., Goyal, M., Iqbal, M. S., Maity, P., Adhikari, S. S., Bandyopadhyay, U. 2010. Gallic acid prevents nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy in rat by blocking oxidative stress and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*: Vol. 49: 258-267.

Peng-Gao, L., Jin-Wen, X., Katsumi, I., Akira, K., Yasuyo, K., Takahiko, M., Takao, I., Yukio, Y. 2005. Caffeic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*: Vol. 28: 369-77.

Perez-Vizcaino, F., Ibarra, M., Cogolludo, A.L., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Moreno, L., Lopez-Lopez, G., Tamargo, J. 2002 Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*: Vol. 302: 66-72.

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 53: 4290-4302.

Shukla, S., Gupta, S. 2005. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. *Nutrition and Cancer*: Vol. 53: 18-32.

Singh, R., Barden A., Mori T., Beilin L. 2001. Advanced glycation endproducts: a review. *Diabetologia*: 44: 129-146.

Soobrattee, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*: Vol. 579: 200-213.

Srivastava, A., Greenspan, P., Hartle, D. K., Hargrove, J. L., Amarowicz, R., Pegg, R. B. 2010. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Polyphenolics from Southeastern U.S. Range Blackberry Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 58: 6102-6109.

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

Weyant, M. J., Carothers, A. M., Dannenberg, A. J., Bertagnolli, M. M. **2001**. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase activation in the Min/+ mouse. *Cancer Research*: Vol. 61: 118-125.

ANEXO

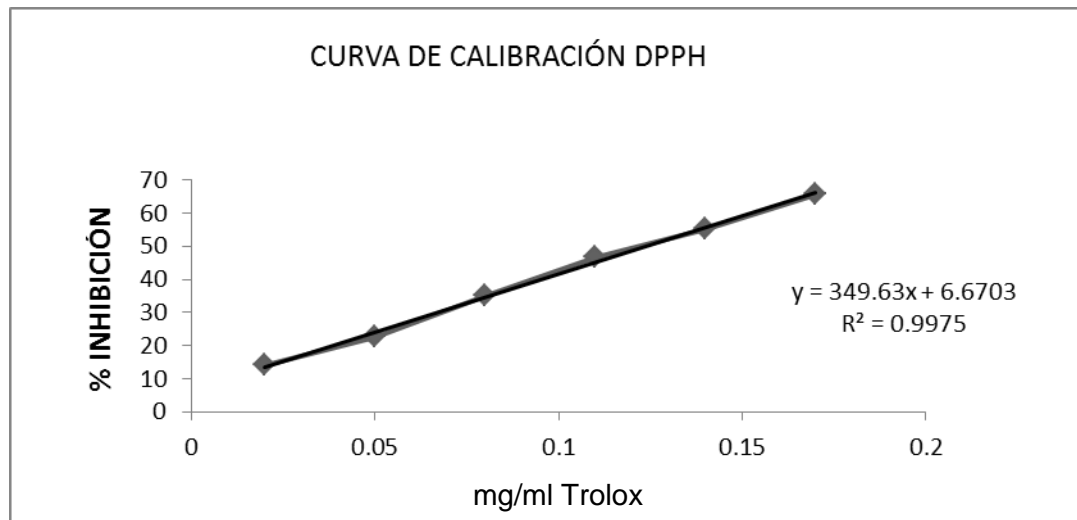


Figura 21. Curva de calibración para DPPH.

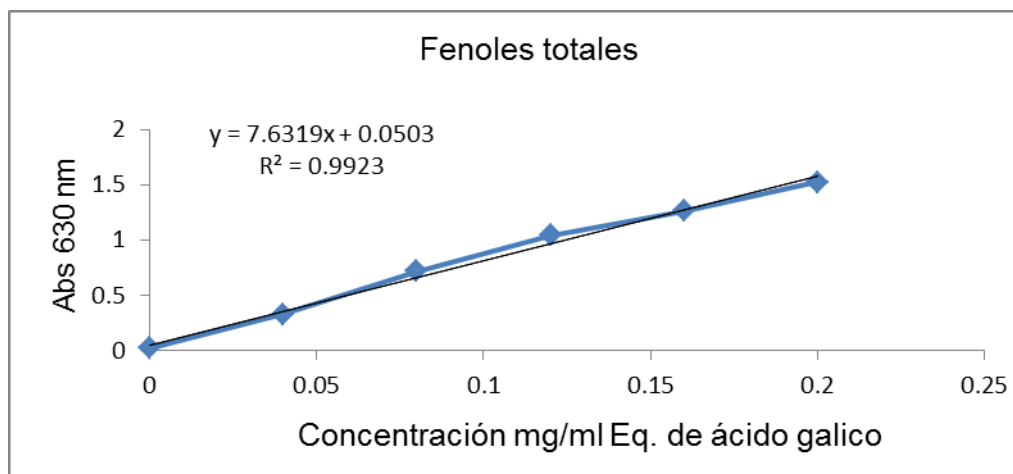


Figura 22. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales.

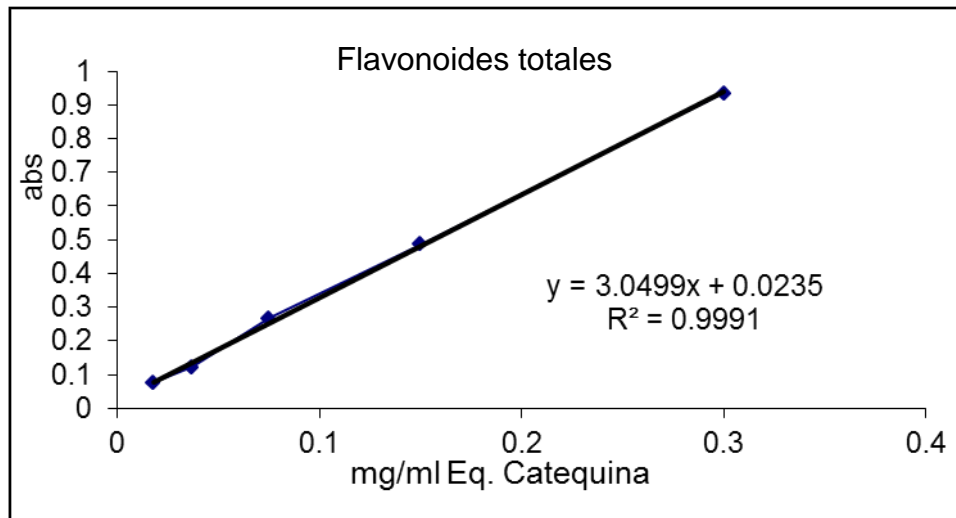


Figura 23. Curva de calibración para flavonoides totales.

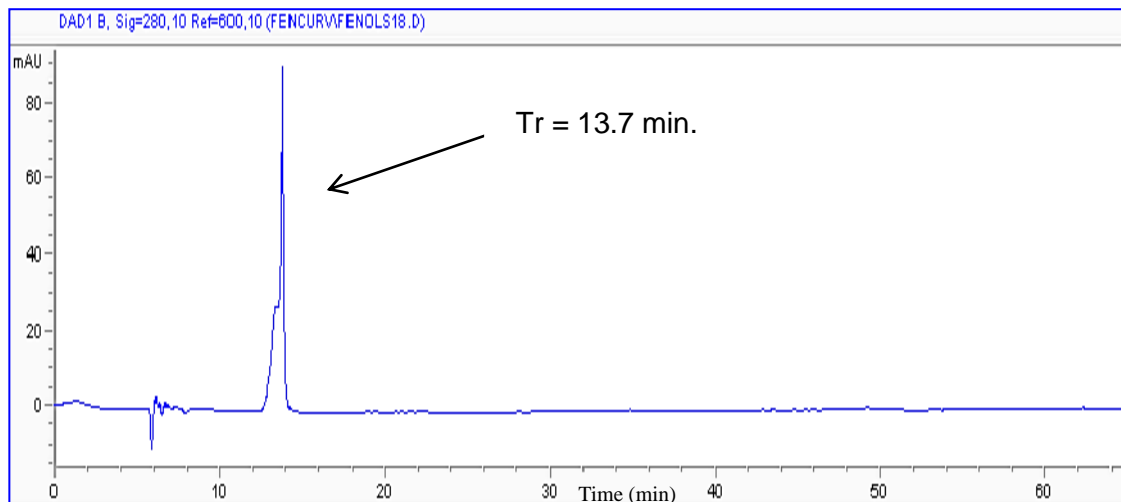


Figura 24. Cromatograma generado por el ácido gálico usado como estándar. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

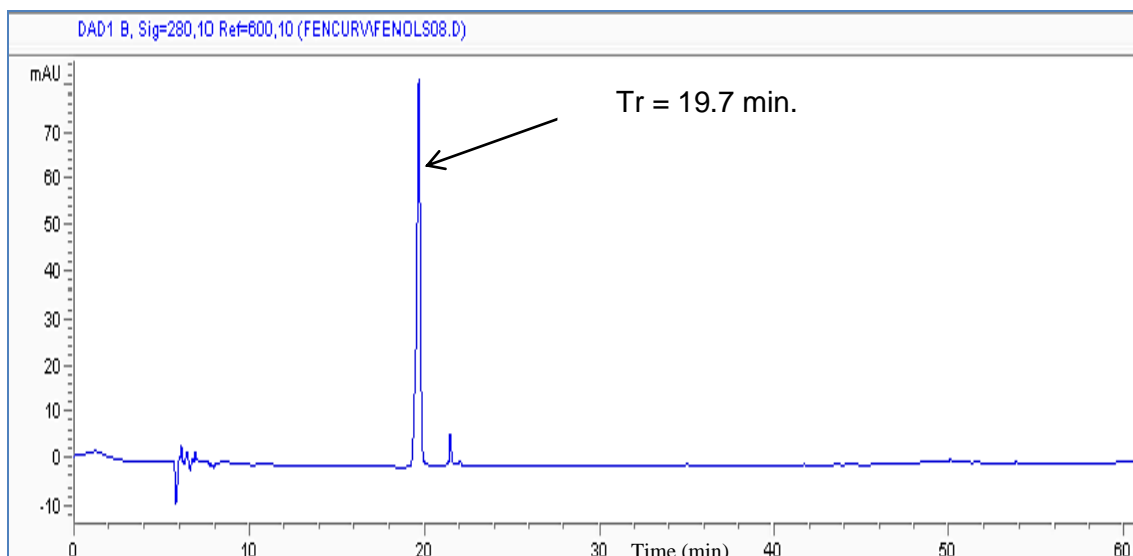


Figura 25. Cromatograma del estándar de ácido clorogénico. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

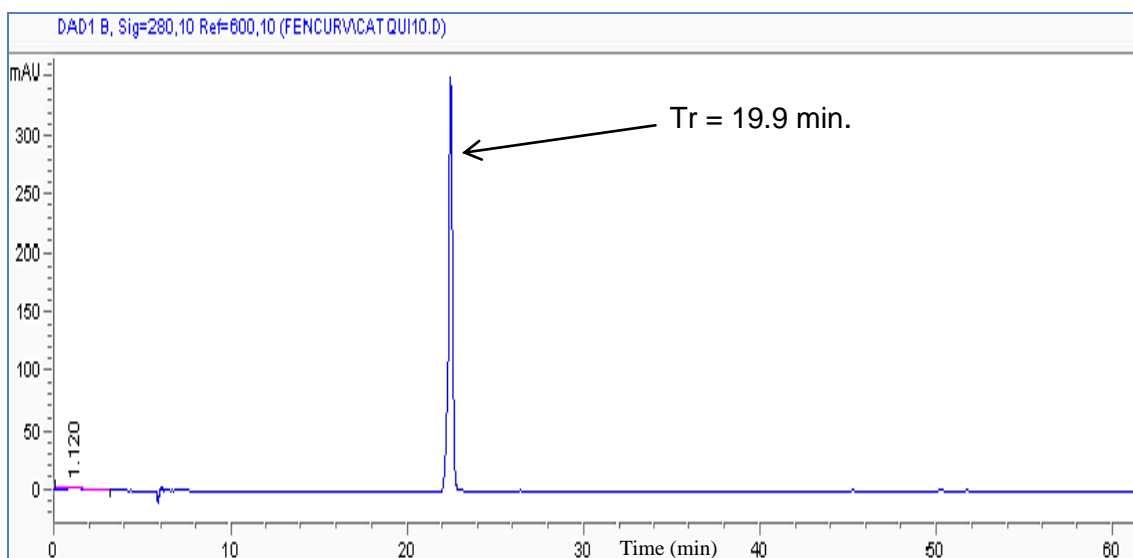


Figura 26. Cromatograma del estándar de (+)-catequina. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

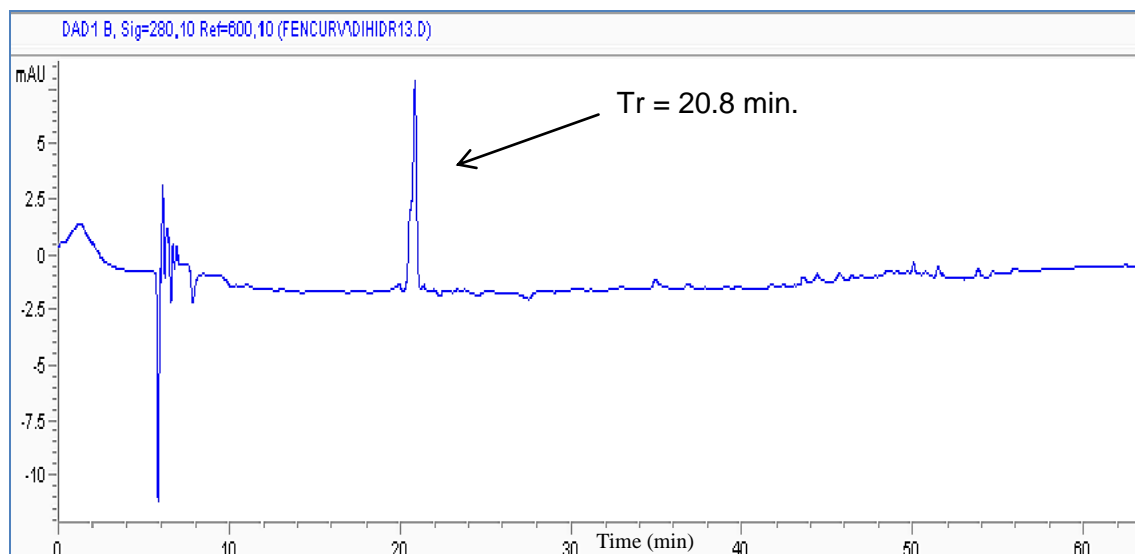


Figura 27. Cromatograma del estándar de (-)-epicatequina. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

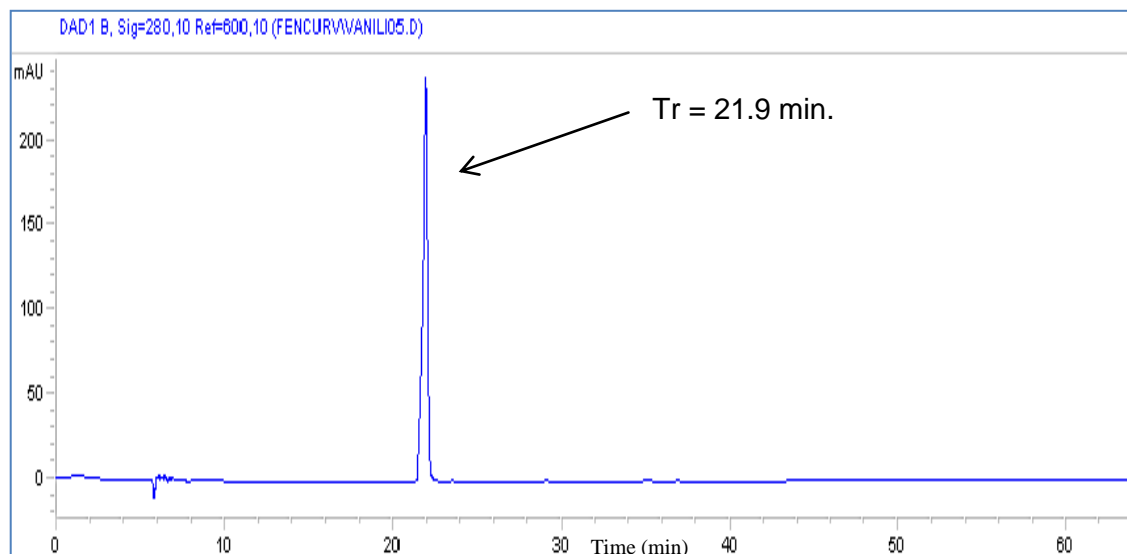


Figura 28. Cromatograma del estándar de ácido vanílico. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

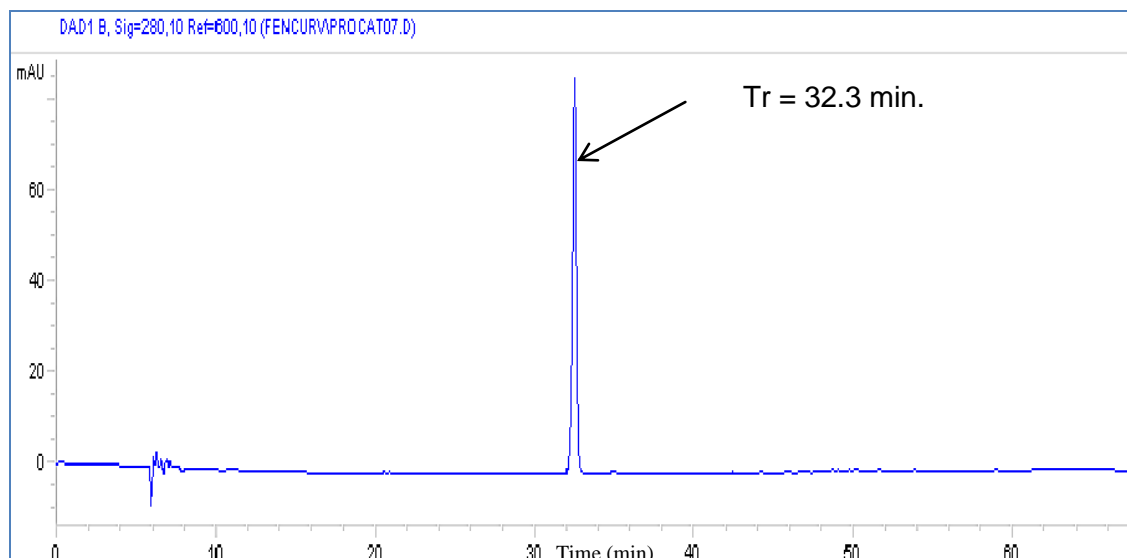


Figura 29. Cromatograma del estándar de ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico). Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

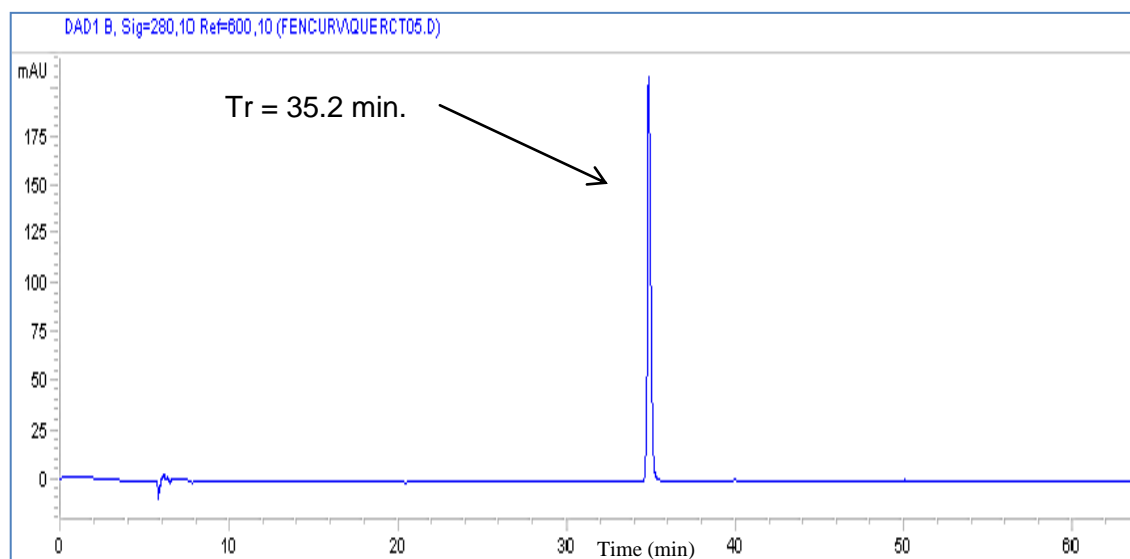


Figura 30. Cromatograma del estándar de quercetina. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

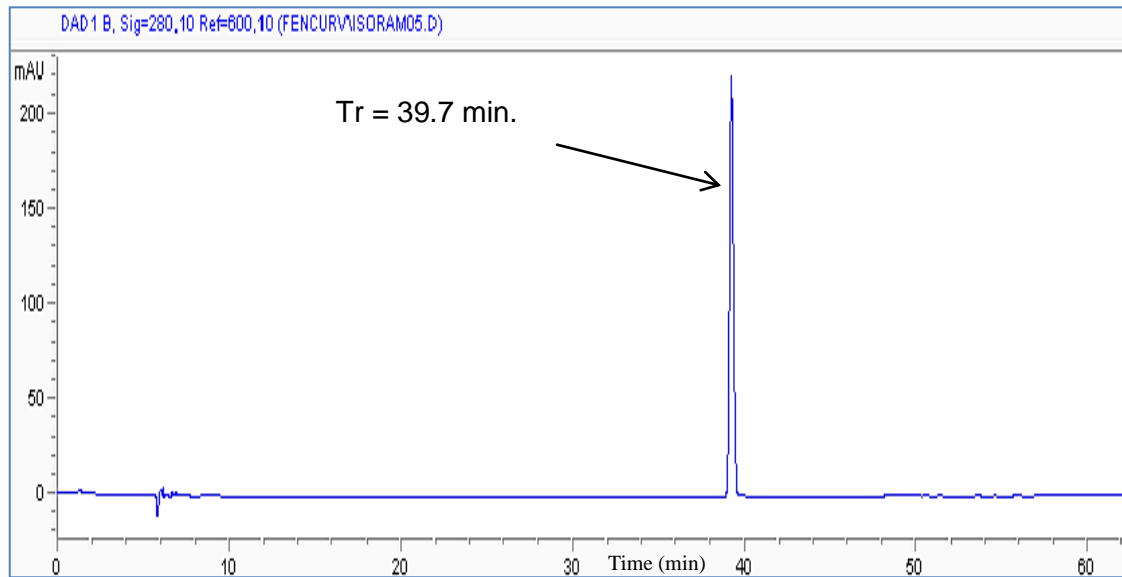


Figura 31. Cromatograma del estándar de isoramnetina. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

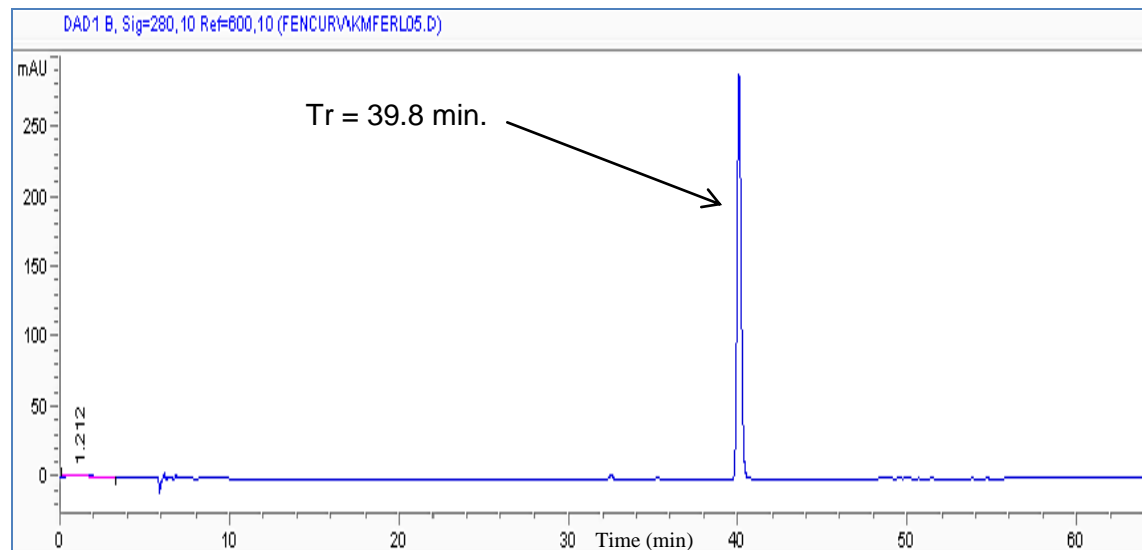


Figura 32. Cromatograma generado por kamferol puro. Condiciones de análisis: columna XTerra C-18; fase móvil: gradiente de acetonitrilo-acido fórmico (0.01 N), flujo: 0.5 ml/min, λ de detección: 280 nm.

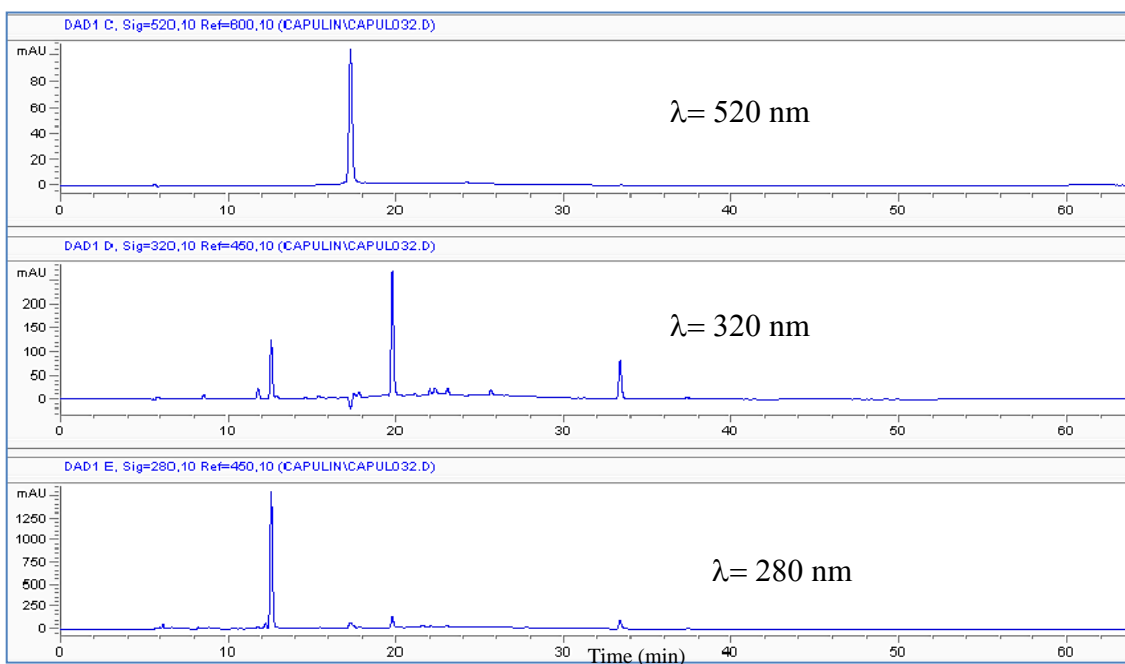


Figura 33. Cromatogramas obtenidos del extracto hidrolizado con HCl 2.5 N a 280 nm, 320nm y 520 nm.

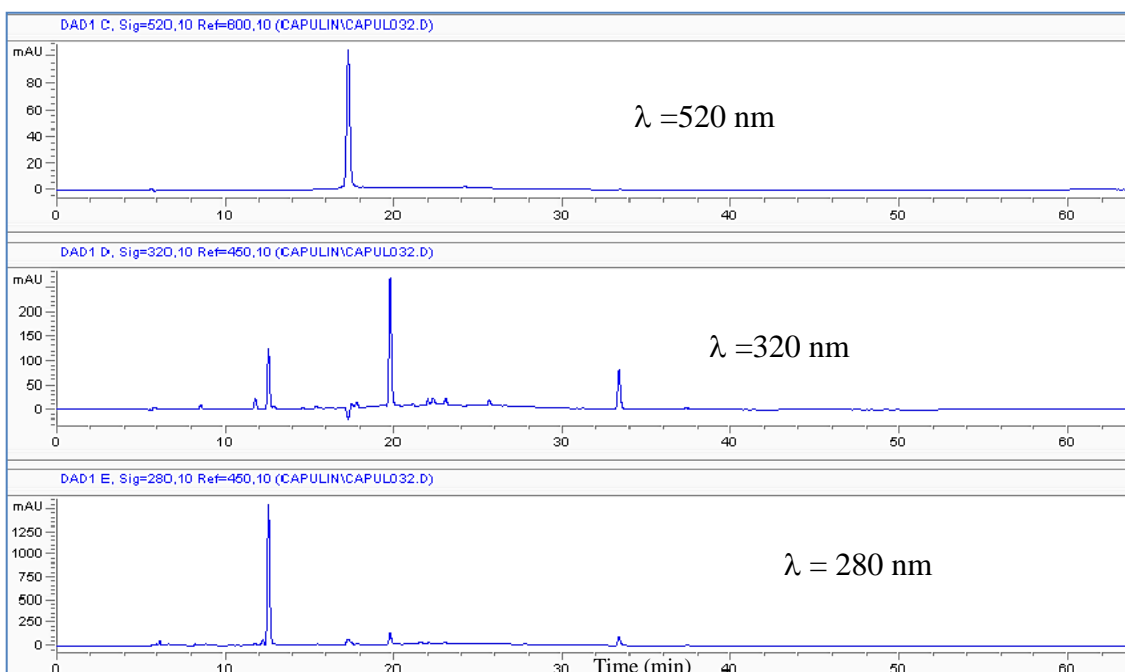


Figura 34. Cromatogramas del extracto hidrolizado con HCl 4 N registrados a 280 nm, 320nm y 520 nm.

Curvas de calibración

Ácido clorogénico

CONCENTRACIÓN mg/ml	AREA
0	0
0.01	233.90829
0.0125	361.19928
0.025	700.4989
0.05	1289.38245
0.1	2.57E+03

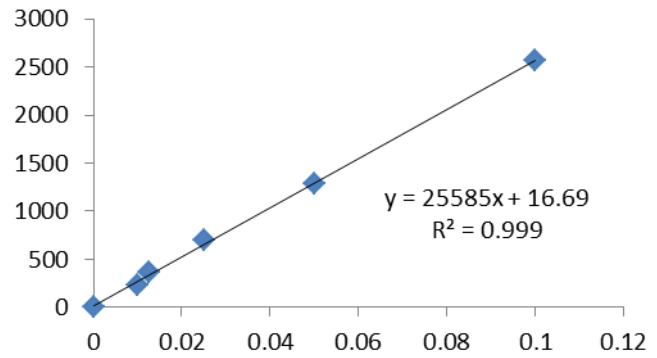


Figura 35. Curva de calibración para la cuantificación de ácido clorogénico a λ 280 nm.

Quercetina

CONCENTRACIÓN mg/ml	AREA
0	0
0.0001	19.12987
0.0005	23.27062
0.001	36.14477
0.01	254.90196
0.1	2.73E+03

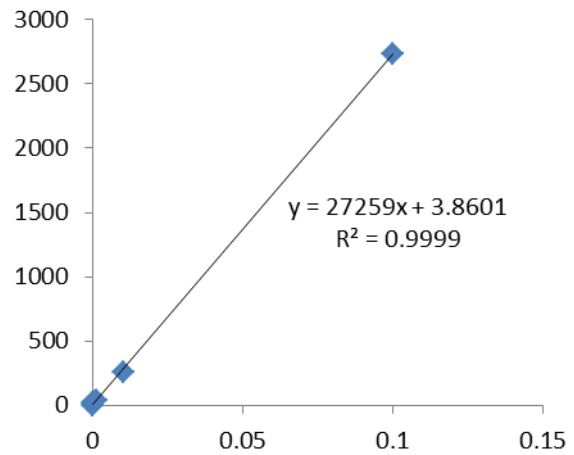


Figura 36. Curva de calibración para la cuantificación de quercetina a $\lambda = 320$ nm.

$\mu\text{M Eq. Trolox/g de fruto}$

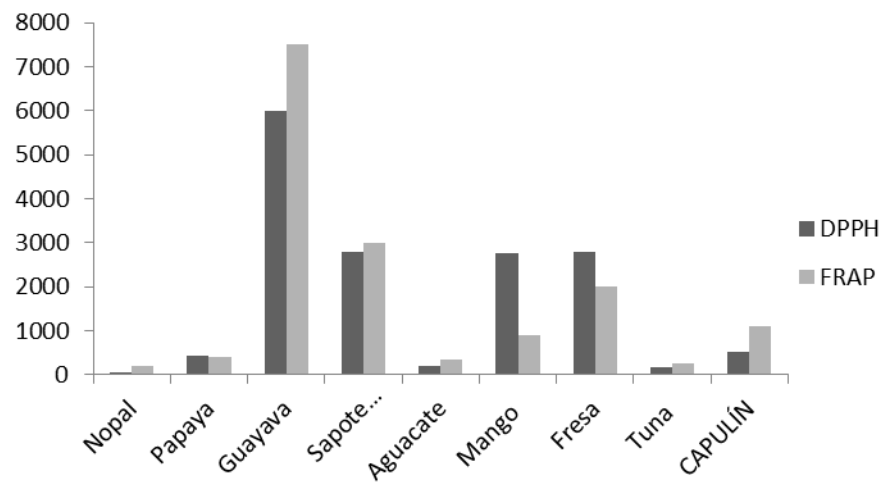


Figura 37. Comparación de los valores de los ensayos de DPPH y FRAP con los valores obtenidos en la decocción del fruto del capulín (Corral y col., 2009)