

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF) QUE PERMITA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br. Luis Antonio De Freitas Fernandez, para optar al título de Licenciado en Química.

Caracas, Mayo, 2012

Nosotros, Profesora María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y Profesor Jimmy Castillo, Investigador del Laboratorio de Espectroscopia Laser de la Escuela de Química de la Universidad central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF) QUE PERMITA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS”.

Que presenta el Br. Luis Antonio De Freitas Fernandez, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2011 y 2012, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Marzo de 2012.

Dra. María Rodríguez.

(Directora).

Dr. Jimmy Castillo.

(Director).

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA (CCF) QUE PERMITA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS DE PLANTAS". Presentado por el Br. Luis Antonio De Freitas Fernandez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dra. María Rodríguez.

(Directora).

Dr. Jimmy Castillo.

(Director).

Dra. Ivette Piña.

(Jurado).

Dr. Carlos Márquez.

(Jurado).

Agradecimientos.

Gracias a mi madre y hermanos, por ayudarme a la construcción de mi proyecto de vida, por guiarme, apoyarme y ayudarme a cumplir esta meta. Sin ustedes no lo habría logrado. Los amo.

A toda mi familia, especialmente a mi tía Conci, nuestro ángel guardián, gracias por estar presente tanto en los momentos buenos como en los malos.

A mis tutores de tesis María Rodríguez y Jimmy Castillos, por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto, por sus consejos, paciencia, por el tiempo que dedicaron para que este trabajo culminara exitosamente.

A Vicmary Vargas, mi compañera durante todas las etapas de mi carrera, es un honor para mí el poderme graduar contigo, gracias por haber hecho mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que jamás olvidaré.

Gracias a Edwin Ruíz, por confiar y creer en mí, por motivarme en los momentos de desesperación, por ayudarme y aconsejarme cuando más lo necesito.

A todo el equipo de productos naturales, especialmente a Reine Mendoza y Jairo Bermúdez.

A todos mis amigos, por escucharme y alentarme, por compartir mis inquietudes, y aconsejarme cuando fue necesario.

Resumen.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo desarrollar un método rápido y sencillo mediante cromatografía de capa fina que permita la cuantificación de metabolitos secundarios presentes en extractos de plantas. Para ello, se seleccionaron tres plantas que presentaran uno o varios metabolitos secundarios como marcadores quimiotaxonómicos y que, adicionalmente, se contase con un patrón puro para su comparación y cuantificación. Estas plantas fueron: raíces de *Hydrastis canadensis*, frutos de *Crataegus oxycantha* y raíces de *Echinacea purpurea*; los metabolitos secundarios estudiados fueron el alcaloide protoberberínico, berberina para la primera y el flavonoide glicosilado rutina para las dos últimas. La metodología para la cuantificación de estos compuestos se basó en colocar soluciones metanólicas de concentraciones conocidas de los extractos de plantas y patrones en placas de silica gel para CCF con indicador de fluorescencia. Luego, se desarrolló cada placa utilizando como fase móvil, la mezcla de solventes más idónea que permitiese la identificación del metabolito a ser cuantificado. La detección se realizó con luz UV a 254nm a través de fotografías con una cámara digital, la cual se mantuvo a una distancia de 8cm durante todo el experimento. Estas imágenes se descargaron en una computadora y se analizaron con un programa denominado en este trabajo como UCV-software (se denomina así por razones de simplicidad, debido a que aún no posee nombre) elaborado por el Laboratorio de Espectroscopía Laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, a través del programa MATLAB 7.5.0., el cual genera densitogramas que permiten relacionar la densidad óptica en cada mancha en la placa con la concentración relativa de un determinado compuesto en el extracto; esto se relaciona con curvas de calibración del patrón puro del compuesto que se desea cuantificar.

Los resultados indicaron que *Hydrastis canadensis* posee una concentración de $4,23 \pm 0,09$ - $4,98 \pm 0,20$ % de berberina, *Crataegus oxycantha* de $0,75 \pm 0,02$ - $0,79 \pm 0,03$ % de rutina y *Echinacea purpurea* $0,44 \pm 0,03$ - $0,52 \pm 0,02$ % de rutina. Además, el

método mostró ser preciso (%CV<5%), exacto (%Recuperación=96,63-105,58%) y lineal ($R^2>0,99$); con límites de detección de 27,65 -75,58 ng, 55,74 - 152,92ng y 59,26 - 102,75ng; y de cuantificación de 92,16 - 251,94 ng, 185,79- 509,74ng y 197,55 - 342,51ng, para berberina en *Hydrastis canadensis* y rutina en *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, respectivamente. Por otra parte, el método resultó ser simple, económico y rápido, en comparación con otras técnicas cromatográficas y permite la evaluación de flavonoides y alcaloides en muestras de plantas, con posibles aplicaciones en análisis de otros metabolitos o compuestos.

Índice general

1. Introducción.	17
1.1. Metabolitos secundarios.	21
2. Antecedentes.	24
3. Objetivos.	28
3.1. Objetivo general.	28
3.2. Objetivos específicos.	28
4. Materiales y metodología experimental.	29
4.1. Materiales y equipos.	29
4.1.1. Muestras.	29
4.1.2. Patrones.	29
4.1.3. Placas de CCF.	29
4.1.4. Sistema de solvente de la fase móvil.	30
4.1.5. Sistema de detección.	30
4.1.6. Equipo para capturar las imágenes de las placas cromatográfica desarrolladas.	30
4.2. Metodología experimental.	30
4.2.1. Escogencia de las plantas a utilizar.	30
4.2.2. Preparación de las soluciones de la muestra.	31
4.2.3. Preparación de los patrones.	33
4.2.4. Metodología para el desarrollo cromatográfico.	34
4.2.5. Metodología para la cuantificación de los metabolitos.	34

4.2.6. Metodología para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado.	36
4.2.7. Metodología empleada para el uso del UCV-Software.	37
4.2.8. Absorción de radiación UV.	43
4.2.9. Reproducibilidad.	46
4.2.10. Linealidad del método.	47
4.2.11. Límites de detección y cuantificación.	47
4.2.12. Exactitud.	48
5. Presentación y discusión de resultados.	49
5.1. Reproducibilidad	49
5.2. Linealidad del método.	51
5.3. Límites de detección y cuantificación.	53
5.4. Exactitud.	54
5.5. Cuantificación de Berberina en la raíz de <i>Hydrastis canadensis</i> .	56
5.6. Cuantificación de Rutina en frutos de <i>Crataegus oxycantha</i> .	58
5.7. Cuantificación de Rutina en <i>Echinacea purpurea</i> .	64
6. Conclusiones.	67
7. Recomendaciones.	69
8. Bibliografía.	70
9. Apéndices.	77
Apéndice 1: Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de los metabolitos secundarios.	77
Apéndice 2: Curvas de calibración empleadas para la determinación de la exactitud del método.	82

Apéndice 3: Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis cuantitativo.	85
Apéndice 4: Fotos de las placas empleadas en cuantificación de los metabolitos estudiados.	86
Apéndice 5: Densitogramas empleados en la cuantificación de los metabolitos en las plantas estudiadas.	88
Apéndice 6: Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis de reproducibilidad.	93

Índice de Tablas

Tabla 1. Peso en gramos y concentración en ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos de las especies <i>H. canadensis</i> , <i>C. oxycantha</i> y <i>E. purpurea</i> utilizados para la cuantificación por CCF.	31
Tabla 2. Peso en gramos y concentración en ppm ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los extractos de las especies <i>H. canadensis</i> , <i>C. oxycantha</i> y <i>E. purpurea</i> utilizados en los ensayos de reproducibilidad.	32
Tabla 3. Soluciones preparadas a partir de la disolución de alícuotas de la solución inicial de <i>Hydrastis canadensis</i> (tabla 2) empleadas en el ensayo de reproducibilidad.	33
Tabla 4. Coeficiente de variación obtenido en los ensayo de reproducibilidad del método.	50
Tabla 5. Coeficientes de variación de métodos densitométricos reportados por otros autores.	50

Tabla 6.	Coeficiente de correlación y ecuación de las rectas de las curvas de calibración trazadas para la cuantificación de los metabolitos de los extractos de plantas estudiadas.	52
Tabla 7.	Coeficiente de correlación de las curvas de calibración reportados por otros autores en investigaciones sobre CCFAE.	52
Tabla 8.	Limites de detección y de cuantificación del método.	53
Tabla 9.	Exactitud del método de cuantificación desarrollado.	55
Tabla 10.	Exactitud reportada por otros autores en sus investigaciones sobre CCFAE.	55
Tabla 11.	Resultados de cuantificación de berberina en <i>Hydrastis canadensis</i> .	57
Tabla 12.	Resultados de cuantificación de rutina en frutos de <i>Crataegus oxycantha</i> .	59
Tabla 13.	Contenido de rutina en diferentes especies de plantas del género <i>Crataegus</i> reportado por otros autores.	60
Tabla 14.	Resultados de cuantificación de rutina en <i>Echinacea purpurea</i> .	65
Tabla 15.	Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de berberina en <i>Hydrastis canadensis</i> .	77
Tabla 16.	Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de rutina en <i>Crataegus oxycantha</i> .	78

Tabla 17.	Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de rutina en <i>Echinacea purpurea</i> .	80
Tabla 18.	Área de los picos de berberina de los densitogramas de <i>Hydrastis canadensis</i> .	85
Tabla 19.	Áreas de los picos de rutina de los densitogramas de <i>Crataegus oxycantha</i> .	85
Tabla 20.	Áreas de los picos de rutina de los densitogramas de <i>Echinacea purpurea</i> .	85
Tabla 21.	Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis de reproducibilidad.	93

Índice de Figuras

Figura 1.	Modelo de las placas empleadas para la cuantificación de los metabolitos estudiados.	35
Figura 2.	Montaje experimental para la captura de las imágenes con la cámara fotográfica.	36
Figura 3.	Modelo de placa empleada para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado.	37

- Figura 4.** Captura de pantalla del UCV-Software al cargar la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*. 38
- Figura 5.** Captura de pantalla de la selección del fondo en la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*. 39
- Figura 6.** Captura de pantalla de la selección del perfil de la muestra y patrones de la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*. 40
- Figura 7.** Captura de pantalla del densitograma generado por el UCV-Software de la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*. 40
- Figura 8.** Densitogramas de las soluciones metanólicas de *Saraca asoca* (A) y de (+)-catequina (B) publicado por Rathe y col. 2010. 41
- Figura 9.** Densitograma de la formulación de α -cipermetrina publicado por Sherma (2005). Picos: 1: punto de aplicación, pico 2: α -cipermetrina, pico 3: frente de solvente. 41
- Figura 10.** Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la imagen en blanco y negro sin invertir de la placa 1 de cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*. 42

- Figura 11.** Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*. 43
- Figura 12.** Estructura de la rutina. 45
- Figura 13.** Estructura de la berberina. 45
- Figura 14.** Espectro de absorción de la berberina. 46
- Figura 15.** Fotografía de las placas 1 de los análisis de reproducibilidad de a) *Crataegus oxycantha*, b) *Echinacea purpurea*, c) Muestra de 14150 ppm de *Hydrastis canadensis*, d) Muestra de 7075 ppm de *Hydrastis canadensis* y e) Muestra de 3537,5 ppm de *Hydrastis canadensis*. 51
- Figura 16.** Fotos de la placa 3 de la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*. 58
- Figura 17.** Foto de la placa 2 de la cuantificación de rutina en frutos de *Crataegus oxycantha*. 61
- Figura 18.** Cromatograma de la muestra de *Crataegus oxycantha* obtenido por HPLC-RF (equipo Diodex Ultimate 3000) con detección UV 254nm. La fase estacionaria fue C18 y la fase móvil consistió en un gradiente de elución de metanol y ácido acético. 62
- Figura 19.** Densitograma del perfil de la muestra 1 del extracto metanólico de *Crataegus oxycantha* de la placa 2 empleada en la cuantificación de rutina. 63

- Figura 20.** Densitograma del perfil de la muestra 2 del extracto metanólico de *Crataegus oxycantha* de la placa 2 empleada en la cuantificación de rutina. 63
- Figura 21.** Foto de la placa 1 de la cuantificación de Rutina en *Echinacea purpurea*. 66
- Figura 22.** Curvas de calibración para el análisis de berberina en *Hydrastis canadensis* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 78
- Figura 23.** Curvas de calibración para el análisis de rutina en *Crataegus oxycantha* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 79
- Figura 24.** Curvas de calibración para el análisis de rutina en *Echinacea purpurea* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 81
- Figura 25.** Curvas de calibración para el análisis de exactitud de berberina en *Hydrastis canadensis*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 82
- Figura 26.** Curvas de calibración para el análisis de exactitud de rutina en *Crataegus oxycantha*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 83
- Figura 27.** Curvas de calibración para el análisis de exactitud de rutina en *Echinacea purpurea*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3. 84
- Figura 28.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*. 86

- Figura 29.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de rutina en *Crataegus oxycantha*. 86
- Figura 30.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*. 87
- Figura 31.** Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*. 89
- Figura 32.** Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de rutina en *Crataegus oxycantha*. 90
- Figura 33.** Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*. 92
- Figura 34.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3 y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 14150 ppm. 94
- Figura 35.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 7075 ppm. 94
- Figura 36.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 3538 ppm. 95
- Figura 37.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Crataegus oxycantha*. 95

- Figura 38.** Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Echinacea purpurea*. 96
- Figura 39.** Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Crataegus oxycantha*. 98
- Figura 40.** Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Echinacea purpurea*. 100
- Figura 41.** Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (14150 ppm). 101
- Figura 42.** Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (7075 ppm). 102
- Figura 43.** Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (3538 ppm). 103

1. Introducción.

La cromatografía, definida como una técnica que permite la separación de mezclas de compuestos por su distribución entre dos fases, fue desarrollada en 1901 por el botánico ruso Mijaíl Semiónovich Tswet, durante su investigación sobre los pigmentos de las plantas. Es la técnica de separación más amplia y versátil debido al desarrollo de métodos de detección muy sensibles disponibles para todos los tipos de cromatografía y a las pequeñas cantidades de material necesarias para separar, identificar y analizar. Adicionalmente, las separaciones cromatográficas son relativamente rápidas y un análisis se puede completar en un corto intervalo de tiempo. Otra de las ventajas de la cromatografía es su relativa simplicidad y facilidad de operación en comparación con otras técnicas. Por último, si el procedimiento establecido está bien controlado se puede lograr una buena exactitud y precisión. ^[1]

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de las fases estacionarias y móviles. Si la fase estacionaria es un sólido el proceso se denomina cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido, es llamado cromatografía de partición. La diferencia entre estos tipos de cromatografía se puede atribuir a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre dos fases. Existen otros tres modos de cromatografía, en los cuales la fase estacionaria es un sólido, que se clasifican de manera diferente debido a la naturaleza exclusiva de sus procesos de separación. Estas son la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía por exclusión por tamaño y la cromatografía de afinidad. ^[2]

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasa por la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación dependen de la capacidad de los átomos que se encuentran en la superficie para remover los solutos de la fase móvil y adsorberlos de manera temporal por medio

de fuerzas electrostáticas ^[2]. Este tipo de cromatografía se realiza, principalmente, a través de dos modalidades; en columna o en capa fina. La diferencia se encuentra en la forma de soportar el adsorbente; en la cromatografía en columna la fase estacionaria se introduce en un tubo o columna (generalmente de vidrio), mientras que en la cromatografía de capa fina el adsorbente se deposita en forma de capa delgada sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico. ^[3]

Básicamente la cromatografía en capa fina se realiza de la siguiente manera: una pequeña alícuota de la muestra se coloca cerca de un extremo de la placa en fase estacionaria, compuesta por una fina capa de adsorbente, para formar la zona inicial. La muestra se seca. El extremo de la fase estacionaria con la zona inicial se coloca en la fase móvil evitando que esta toque la muestra, por lo general una mezcla de dos a cuatro disolventes puros, dentro de un recipiente cerrado. Si la fase estacionaria y la fase móvil fueron elegidas correctamente, los componentes de la mezcla van a migrar a diferentes velocidades durante el movimiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria. Esto se llama desarrollo cromatográfico. Cuando la fase móvil se ha desplazado una distancia apropiada, la placa con la fase estacionaria es removida de la fase móvil la cual se seca rápidamente, y las zonas se detectan en luz visible o con luz ultravioleta (UV 254 y 365 nm) con o sin la aplicación de un reactivo de revelado. ^[4]

Generalmente, se utilizan placas de CCF que contienen un indicador fluorescente que permiten la detección con luz ultravioleta de longitud de onda de 254nm ^[5]. Al incidir la radiación UV en este tipo de placas, se observa una fluorescencia verde, mientras que las zonas que contienen la muestra presentan tonalidades oscuras, debido a que las moléculas de la muestra absorben la luz impidiendo su llegada al indicador. A medida que la concentración de la muestra aumenta, más oscura es la zona en la que se encuentra. ^[6]

Este tipo de técnica posee la capacidad de analizar varias muestras en paralelo y permite una mayor flexibilidad y simplicidad en la evaluación de la muestra debido a la posibilidad de detección secuencial mediante técnicas complementarias, derivatización postcromatográfica para la identificación y cuantificación, archivo de una separación para su evaluación en un momento posterior, y a la accesibilidad de la muestra debido al formato en plano. Además, la CCF es una técnica ampliamente utilizada como un método rentable para el análisis rápido de mezclas simples. ^[1]

La CCF (TLC en sus siglas en inglés) se utiliza a menudo como método cualitativo. Con esta se puede determinar el número de componentes en una mezcla, verificar la identidad de sustancias, monitorear el progreso de una reacción o determinar la eficacia de una purificación. La identificación de compuestos en CCF se basa inicialmente en una comparación con los valores de R_f (factor de retención) de patrones de referencia ^[4]. Este factor es el cociente de la distancia de la zona de la muestra (Z_s) entre la distancia recorrida por la fase móvil (Z_f), medidas desde la zona de aplicación y se determina por la ecuación 1 ^[5].

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_f} \quad (\text{ec. 1}) \quad [5]$$

Los análisis cuantitativos por CCF son típicos de la CCFAE (CCF de alta eficiencia). Las placas de CCFAE poseen partículas más finas que las placas habituales de CCF y, en consecuencia, son más adecuadas para análisis cuantitativos, sin embargo son más costosas. Las muestras en CCFAE son sembradas en las placas utilizando aplicadores mecánicos (dosímetros) y analizadas con equipos automáticos, tales como un escáner de CCF. ^[6]

Una de las técnicas empleadas para la evaluación cuantitativa por CCF es la densitometría, usualmente realizada con escáneres para CCF. Esta técnica permite

medir la cantidad de radiación absorbida (o densidad óptica), ya sea visible, ultravioleta o fluorescente, directamente sobre la placa. La diferencia entre la densidad óptica de las zonas con muestra y de las zonas sin muestra en la placa, se relaciona con la concentración de los estándares por medio de una curva de calibración. Como regla general, la muestra y los estándares deben estar en condiciones similares, es decir, en la misma placa cromatográfica. El método ofrece una alternativa para un análisis más simple y económico que otras técnicas cromatográficas. Además permite realizar el análisis de los componentes directamente en las placas, sin tener que recurrir a la elución o al raspado. ^[1]

Aún así, los equipos para análisis cuantitativos por CCF son costosos. Por ejemplo, un CAMAG's TLC Scanner 3 cuesta alrededor de 30.000 dólares con el software necesario para el trabajo analítico. El sistema de documentación, Digistore 2, de CAMAG cuesta 17.500 dólares pero necesita el software Videoscan (6.300 dólares) para realizar el análisis. Este equipo cubre una necesidad específica en el mercado de los sistemas orientados a la producción (principalmente grandes compañías que necesitan equipos automáticos para procesos tales como análisis de alimentos); sin embargo, no es práctico para pequeñas compañías y laboratorios. ^[6]

Algunos de los ámbitos en donde se emplea la CCF se muestran a continuación:

- **Cosmetología:** Materias primas para tintes, conservantes, surfactantes, ácidos grasos, constituyentes de perfumes. ^[7]
- **Análisis de Alimentos** Determinación de pesticidas y fungicidas en agua potable, residuos en verduras, ensaladas y carnes, vitaminas en los refrescos y margarina, evaluación del cumplimiento de los valores límite (por ejemplo,

compuestos policíclicos en agua potable, aflatoxinas en leche y productos lácteos).^[7]

- **Análisis Ambiental:** Análisis de las aguas subterráneas, determinación de contaminantes en el suelo y aguas superficiales, análisis de los productos de la descomposición de los colorantes azoicos utilizados en la industria textil.^[7]
- **Análisis de sustancias inorgánicas:** Determinación de iones inorgánicos (metales).^[7]
- **Química Clínica, Química Forense y Bioquímica:** Determinación de sustancias activas y sus metabolitos en matrices biológicas, diagnóstico de trastornos metabólicos como la fenilcetonuria (PKU), la cistinuria y la enfermedad de jarabe de arce en los bebés.^[7]
- **Productos farmacéuticos y medicamentos:** Identificación, pruebas de pureza y determinación de la concentración de ingredientes activos, sustancias auxiliares, conservantes en medicamentos, preparación de drogas y procesos de control de fabricación sintética.^[7]

1.1. Metabolitos secundarios.

En la historia de la humanidad, las plantas han constituido la base de la medicina tradicional. Incluso con la tecnología moderna, las plantas se siguen utilizando como fuente de medicamentos y como base para muchos productos farmacéuticos o cosméticos^[8]. Aproximadamente el 60% de la población mundial depende casi exclusivamente de las plantas como fuente importante de medicamentos^[9]. Entre el 60 y 80% de los fármacos y agentes terapéuticos utilizados como antitumorales, antimalariales y antibacteriales están relacionados con las plantas.^{[8][9]}

Una sola especie puede contener hasta 1.000 estructuras químicas únicas que no pueden ser sintetizadas en un laboratorio o a escala industrial de una manera viable. Las plantas nos proporcionan una gran colección de estructuras complejas y muy variadas.^[8]

Las plantas, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de diversa naturaleza química. Estos compuestos se denominan metabolitos secundarios (MS) o productos naturales.^[10] La producción de metabolitos secundarios es una de las estrategias de defensa que las plantas poseen contra agentes bióticos y abióticos. Los MS participan también en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es, el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos.^[11]

Ciertos grupos de MS presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando su producción restringida a un determinado género de plantas, familia, o incluso a algunas especies^[10], por lo que se pueden utilizar como caracteres taxonómicos en la clasificación de las plantas.^[12]

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos.^[13]

Los MS pueden ser agrupados en cuatro clases principales; terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales), compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos), glicósidos (saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides. ^[10]

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas de una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, esterificación y glicosilación, entre otras. ^[11]

Los productos naturales tienen un valor medicinal y económico significativo derivado de su uso en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. ^[10]

En este trabajo se presenta el desarrollo de una metodología que permite la cuantificación por cromatografía en capa fina (CCF) de metabolitos secundarios en matrices complejas como extractos polares de plantas.

2. Antecedentes.

Irish (2007), desarrolló un método que permite realizar análisis cuantitativos por CCF al combinar esta técnica con una cámara fotográfica digital. Su estudio se basó en colocar concentraciones conocidas de soluciones de nicotinamida y vainillina en placas fluorescentes de CCF, realizar el desarrollo cromatográfico correspondiente (con las fases móviles respectivas), para luego capturar imágenes de la placa iluminada con luz UV a 254nm, con una cámara digital, la cual se mantuvo a la misma distancia focal durante todo el experimento. Estas imágenes se descargaron en una computadora y se analizaron con un programa que tiene por nombre CCF Analyzer, el cual permite, entre otras aplicaciones, calcular la densidad óptica de la mancha de la muestra en la placa, y relacionar esta con las curvas de calibración del patrón puro. El método presentó una alta relación lineal ($R^2 \approx 0.97-0.98$) y una buena reproducibilidad (RSD, 5%), con límites de detección cercanos a los de CCFAE, concluyendo así que este método se puede utilizar para realizar análisis cuantitativos más económicos que otros métodos cromatográficos. ^[6]

Kapadi y colaboradores (2010), desarrollaron un método simple, rápido, reproducible, exacto y preciso para la estandarización y cuantificación por CCFAE del 14-deoxi-11, 12-dihidroandrografolido, compuesto con propiedades inmunoestimulantes, extraído de las hojas y raíces de *Andrographis paniculata*. Kapadi y col. trabajaron con placas de sílica gel 60 F254 de 20x10cm y 0,25mm de espesor, y como sistema de solvente, tolueno: acetato de etilo (50:50). Aplicaron 10 μ L de cada muestra y patrón en las placas en formas de bandas de 6mm de ancho a 10mm de la parte inferior de la placa. El tiempo de saturación que utilizaron fue de 20 min y el recorrido de la fase móvil fue de 8 cm. Para realizar la cuantificación las placas de CCF se escanearon a 263 nm obteniendo un límite de detección de 40 ng. ^[14]

Nehete y colaboradores (2001), establecieron y validaron un método simple por CCFAE para la determinación de ácido oleanólico en extractos metanólicos de raíces y hojas de *Achyranthes aspera* utilizando el sistema de solvente tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico (4.5:0.5:0.1 v/v) como fase móvil. La detección y cuantificación fue realizada por densitometría a una longitud de onda de 529 nm. El contenido de ácido oleanólico que se encontró en los extractos metanólicos de las raíces y hojas fue de 0,37% y 0,13% p/p, respectivamente. El método validado mostró una respuesta lineal en el rango de concentraciones entre 100 y 900 ng. El límite de detección y límite de cuantificación fue de 12,1 ng y 36,68 ng, respectivamente. Estos investigadores concluyeron que el método desarrollado resulto ser simple, preciso y puede ser utilizado para la estimación del contenido de ácido oleanólico en los extractos de plantas en las formulaciones a base de hierbas. ^[15]

Patel y colaboradores (2010), desarrollaron un método para la cuantificación simultánea de vasicina y piperina en Vasavaleha (formulación Ayurvédica a base de hierbas), utilizando CCFAE. En el método emplearon placas de CCF de aluminio recubiertas con gel de sílice 60 F254 como fase estacionaria. El sistema de solvente dioxano: tolueno: acetato de etilo: metanol: amoníaco (1.5:2:1:1:0.3% v/v) permitió observar manchas compactas para vasicina y piperina a 285 nm. La regresión lineal para la curva de calibración que obtuvieron fue de $r^2 = 0.992$ y 0.993 para las áreas de los picos de vasicina y piperina, respectivamente, en el rango de concentración de 2-10 μg por punto de sembrado. Estos investigadores indican que el método es uno de los primeros en desarrollarse para la estimación simultánea de vasicina y piperina en Vasavaleha. Además, afirman que el método fue exacto, preciso, reproducible y que puede ser utilizado para el control de calidad de las materias primas, así como las formulaciones. ^[16]

El objetivo del trabajo realizado por Rathee y colaboradores (2010) fue el de cuantificar la catequina aislada de la corteza del tallo de *Saraca asoka* utilizando

métodos densitométricos por CCFAE. Catequina, es un flavonoide utilizado a menudo por los naturópatas para el tratamiento sintomático de diversas enfermedades gastrointestinales, respiratorias y vasculares. La extracción del flavonoide la realizaron con metanol bajo reflujo en baño de agua. Se utilizaron placas de CCF de 20x10 cm, recubiertas con sílica gel 60 F254 (0.2 mm de espesor). Aplicaron en cada placa 10 μ l de solución de la muestra junto con la (+)-catequina empleada como estándar y desarrollaron la placa utilizando un sistema de solvente tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico: metanol (3: 6: 1.6: 0.4) hasta una distancia de 8 cm. Una vez desarrollada la placa esta fue observada bajo luz UV a 254 y 366 nm. De esta forma construyeron curvas de calibración para la determinación del flavonoide en la planta, obteniendo un porcentaje de 0,048 %. Por otra parte, la precisión instrumental del método fue de 3,36 (%RSD). Estos investigadores llegaron a la conclusión que el método resultó ser sencillo, preciso, específico, sensible y exacto, útil para la cuantificación de (+) - catequina en materias primas a base de hierbas. Según estos investigadores, este fue el primer informe de cuantificación del flavonoide antes mencionado en *Saraca asoka* mediante CCFAE. ^[17]

Rojsanga y colaboradores (2006), desarrollaron un método sencillo, exacto y preciso para la determinación cuantitativa de berberina en *Coscinium fenestratum* utilizando cromatografía en capa fina de alta eficiencia (CCFAE). Para esto emplearon placas de sílica gel F254 como fase estacionaria y una mezcla de butanol: ácido acético: agua (14:3:4), como fase móvil. La detección y cuantificación de berberina se realizó por densitometría en la longitud de onda de 415 nm, en el intervalo de linealidad de 240-840 ng ($R^2 = 0,9982$). La cantidad de berberina encontrada en la planta fue de 2,67 - 3.37%. La precisión del método fue de 4,13 (%RSD). Los límites de detección y cuantificación fueron de 25 y 50 ng, respectivamente. ^[18]

Trivedi y Pundarikakshudu (2008), reportaron un método por CCFAE para la determinación indirecta de los ácidos gimnémicos como gymnemagenin en la especie

Gymnema sylvestre. La gymnemagenin aglicona de los ácidos gimnémicos, carece de conjugación, por lo que presenta poca absorción en el UV por que utilizaron un método de derivación post-columna con el fin de realizar su cuantificación. Estos investigadores obtuvieron un porcentaje de recuperación de $98,4 \pm 1,0\%$ e indican que el rango lineal del método se encuentra en 180 - 1440 ng/mancha. Asimismo, lograron aplicar el método para la cuantificación de gymnemagenin a partir de hojas pulverizadas de las plantas, extractos y formulaciones herbales comercializadas. ^[19]

En el trabajo realizado por Wójciak-Kosior y col. (2006), se describió un método de cromatografía de capa fina de alta eficiencia combinado con densitometría, para la determinación de fenobarbital. Estos investigadores, realizaron la cromatografía en placas de gel de sílice 60 F254 utilizando diclorometano: acetato de etilo: ácido fórmico 9,5:0,5:0,1 v/v, como fase móvil. Para el procedimiento propuesto, la linealidad ($r > 0,999$), la sensibilidad (límite de detección 0.4 μg), la recuperación (97,8 a 102,1%), y la reproducibilidad se consideraron satisfactorios. Por otra parte, los investigadores concluyen que la CCFAE combinada con la densitometría puede utilizarse como un método de bajo costo, rápido y sensible y por tanto adecuado para el control rutinario de fenobarbital en productos farmacéuticos. ^[20]

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Desarrollar un método rápido y sencillo mediante cromatografía de capa fina que permita la cuantificación de metabolitos secundarios presentes en extractos de plantas.

3.2. Objetivos específicos.

1. Determinar las condiciones óptimas de separación por CCF de los metabolitos secundarios presentes en *Hydrastis canadensis*, *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, utilizando para ello diferentes sistemas de solventes y agentes de revelación.
2. Desarrollar un método para la cuantificación de los metabolitos secundarios utilizados como marcadores quimiotaxonómicos, presentes en *Hydrastis canadensis*, *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea* por CCF.

4. Materiales y metodología experimental.

4.1. Materiales y equipos.

4.1.1. Muestras.

Se utilizó el polvo vegetal de las siguientes plantas certificadas, donadas por la compañía “No hagas mas dieta Olalde” (NULAB: Nutraceutical Laboratory): *Hydrastis canadensis*, *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*.

4.1.2. Patrones.

Los patrones empleados se escogieron según su identificación como marcador quimiotaxonómico para cada una de las plantas objeto de análisis; estos son: sulfato de berberina (CAS: 316-41-6) para *Hydrastis canadensis* y rutina (CAS: 153-18-4) para *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, de la corporación Sigma-Aldrich.

4.1.3. Placas de CCF.

Placas de sílica gel 60F254, 20 x 20 cm, de 0,25 mm de espesor soportadas sobre aluminio de la casa Merck.

4.1.4. Sistema de solvente de la fase móvil.

Los sistemas de solventes que permitieron la separación de los metabolitos en cada especie estudiada fueron los siguientes:

- ***Hydrastis canadensis***: isopropanol: ácido acético: agua, 90:1:9.
- ***Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea***: Acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua, 100:10:10:10.

4.1.5. Sistema de detección.

Lámpara UV a dos longitudes de onda: 254 y 366nm. Marca MINERALIGHT®, modelo UVGL-25.

4.1.6. Equipo para capturar las imágenes de las placas cromatográfica desarrolladas.

Cámara fotográfica digital Panasonic Lumix DMC-F2 de 10 MP.

4.2. Metodología experimental.

4.2.1. Escogencia de las plantas a utilizar.

La selección de las plantas dependió principalmente de la presencia de por lo menos un metabolito secundario como marcador quimiotaxonómico y la disponibilidad

de un patrón para su comparación y cuantificación. Se realizó un análisis preliminar por CCF que verificó la presencia e identidad del metabolito de interés, comparando los R_f de los patrones con los de los componentes de la muestra.

4.2.2. Preparación de las soluciones de la muestra.

Se pesó una cantidad dada de polvo vegetal, que se dejó en maceración por 24 horas empleando un solvente que permitió la extracción de los metabolitos a estudiar. Luego, se tomó una alícuota de la solución sobrenadante y se dejó secar. El extracto seco se pesó y se utilizó para preparar soluciones en metanol de concentraciones conocidas. Las cantidades empleadas en la preparación de las muestras para la cuantificación y los ensayos de reproducibilidad se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1: Peso en gramos y concentración en ppm ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos de las especies *H. canadensis*, *C. oxycantha* y *E. purpurea* utilizados para la cuantificación por CCF.

	Muestra		
	<i>Hydrastis canadensis</i>	<i>Crataegus oxycantha</i>	<i>Echinacea purpurea</i>
Masa polvo vegetal (g)	0,4064	1,0045	1,0023
Masa extracto seco (g)	0,0175	0,0598	0,0198
Concentración de las soluciones de las plantas (ppm)	5833,3	59800,0	19800,0

Alícuota solución sobrenadante (ml)	1	3	3
Volumen solución de muestra (ml)	3	1	1

La incertidumbre de las masas es de $\pm 0,0002\text{g}$. La incertidumbre de los volúmenes es de $\pm 0,015\text{ml}$.
 Los solventes de extracción fueron: 2,5 ml Metanol + 2,5 ml Solución NaCO_3 25% para *Hydrastis canadensis*, 5 ml Metanol para *Crataegus oxycantha* y 2,5 ml Metanol + 2,5ml Butanol para *Echinacea purpurea*.

Tabla 2: Peso en gramos y concentración en ppm ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos de las especies *H. canadensis*, *C. oxycantha* y *E. purpurea* utilizados en los ensayos de reproducibilidad.

	Muestra		
	<i>Hydrastis canadensis</i>	<i>Crataegus oxycantha</i>	<i>Echinacea purpurea</i>
Masa polvo vegetal (g)	0,4017	1,0180	1,0006
Masa extracto seco (g)	0,0283	0,0659	0,0203
Alícuota solución sobrenadante (ml)	3	3	3
Concentración de las soluciones de las plantas (ppm)	14150	65900	20300
Volumen solución de muestra (ml)	2	1	1

Incertidumbre de las masas es de $\pm 0,0002\text{g}$. Incertidumbre de los volúmenes es de $\pm 0,015\text{ml}$.
 Los solventes de extracción fueron: 2,5 ml Metanol + 2,5 ml Solución NaCO_3 25% para *Hydrastis canadensis*, 5 ml Metanol para *Crataegus oxycantha* y 2,5 ml Metanol + 2,5ml Butanol para *Echinacea purpurea*.

Adicionalmente, en el caso de *Hydrastis canadensis* se prepararon dos soluciones extras para los ensayos de reproducibilidad, con el propósito de evaluar la precisión del método con diferentes concentraciones de una misma muestra. Los datos de la preparación de estas soluciones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Soluciones preparadas a partir de la disolución de alícuotas de la solución inicial de *Hydrastis canadensis* (tabla 2) empleadas en el ensayo de reproducibilidad.

Alícuota de la solución inicial (ml)	Volumen solución de muestra (ml)	Concentración (ppm)
0,5	1	7075,0
0,5	2	3537,5

. Incertidumbre de los volúmenes es de $\pm 0,015$ ml.

4.2.3. Preparación de los patrones.

En primer lugar, se preparó una solución madre de aprox. 2000ppm en metanol. Posteriormente, con alícuotas de la madre, se prepararon soluciones patrones de diferentes concentraciones, mostradas a continuación:

- Patrón de rutina para el análisis de *Crataegus oxycantha*: 300; 400; 500; 600 y 700 ppm.
- Patrón de rutina para el análisis de *Echinacea purpurea*: 200; 300; 400; 500 y 600 ppm.

- Patrón de sulfato de berberina para el análisis de *Hydrastis canadensis*: 100; 200; 300; 400 y 500 ppm

Patrones para los ensayos de reproducibilidad:

- Patrón de rutina para el análisis de *Crataegus oxycantha*: 600ppm.
- Patrón de rutina para el análisis de *Echinacea purpurea*: 600 ppm.
- Patrón de sulfato de berberina para el análisis de *Hydrastis canadensis*: 600 , 300 y 150 ppm

4.2.4. Metodología para el desarrollo cromatográfico.

Las soluciones de la muestra y patrones se aplicaron en la parte inferior de la placa en forma de puntos, manteniendo una distancia de 5 mm entre ellos. La siembra se realizó mediante una microjeringa de 10 μ L. La placa se introdujo verticalmente en una cámara de CCF saturada previamente con los vapores de la fase móvil seleccionada. Cuando el frente del eluyente recorrió una distancia de aproximadamente 7cm desde el punto de aplicación, se retiró la placa y se dejó secar al aire libre. Posteriormente, se tomaron fotografías de la placa bajo luz UV de 254nm.

4.2.5. Metodología para la cuantificación de los metabolitos.

Se aplicó 1 μ L de muestra y de los patrones en la placa de CCF. Posteriormente, se efectuó el desarrollo cromatográfico correspondiente. Hecho esto, se procedió a tomar una imagen de la placa bajo luz UV de 254nm, manteniendo constante una distancia focal de 8cm durante la captura de las imágenes (véase el montaje empleado

en la figura 2), las cuales se almacenaron en un ordenador para, posteriormente, realizar el análisis a través de un software desarrollado por el Laboratorio de Espectroscopia Laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela a través del programa MATLAB 7.5.0 (en este trabajo se denominará UCV-Software, por razones de simplicidad). Este software registra la densidad óptica de la imagen en función de la posición de cada señal, obteniendo un densitograma de la placa (véase figura 7). Con el área de los picos de los patrones se crearon las curvas de calibración que permitieron la cuantificación de los metabolitos secundarios (Véase el modelo de la placa empleada en la figura 1).

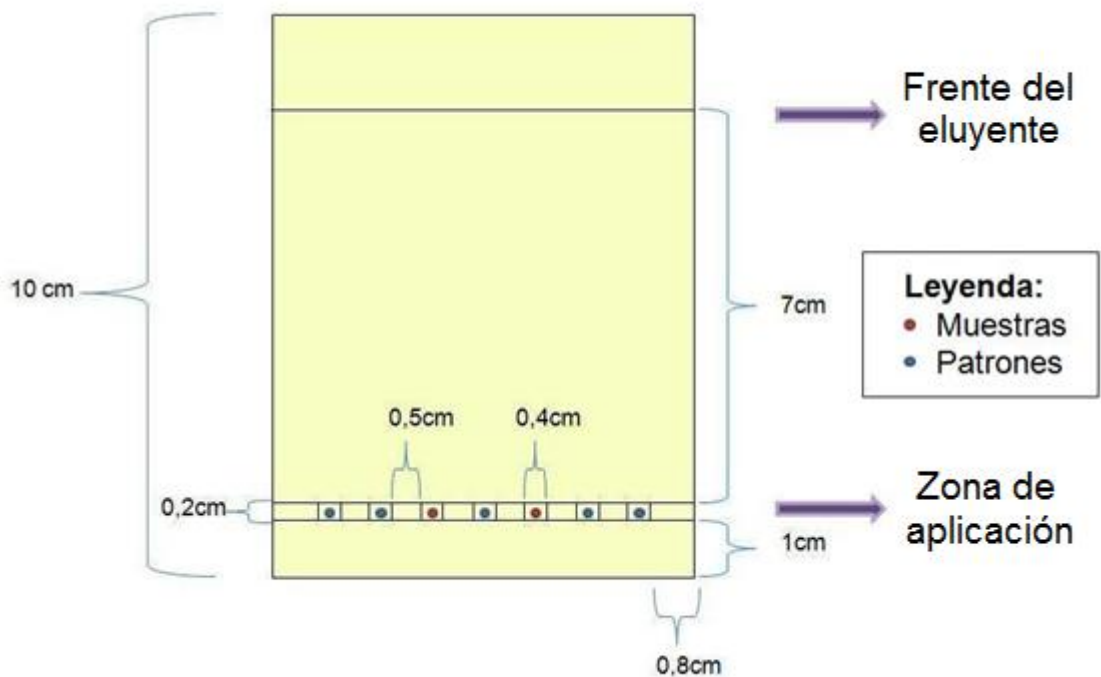


Figura 1: Modelo de las placas empleadas para la cuantificación de los metabolitos estudiados.

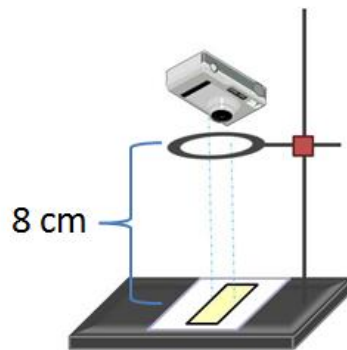


Figura 2: Montaje experimental para la captura de las imágenes con la cámara fotográfica.

4.2.6. Metodología para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado.

La metodología para la determinación de la reproducibilidad es semejante a la empleada para la cuantificación de los metabolitos con algunas modificaciones. En este caso, se aplicó en la placa $1\mu\text{L}$ de la solución de la muestra y patrones para el estudio de *Hydrastis canadensis*, y $3\mu\text{L}$ de las soluciones de muestras y patrones para el análisis de *Crataegus oxycantha* y de *Echinacea purpurea*. Otra diferencia es que una vez obtenida el área de los picos de los metabolitos de interés en cada placa, se procedió a determinar el coeficiente de variación. La reproducibilidad se midió empleando 4 placas. En el caso de berberina en *Hydrastis canadensis*, se ensayó a tres concentraciones diferentes. El modelo de la placa utilizado se muestra en la figura 3.

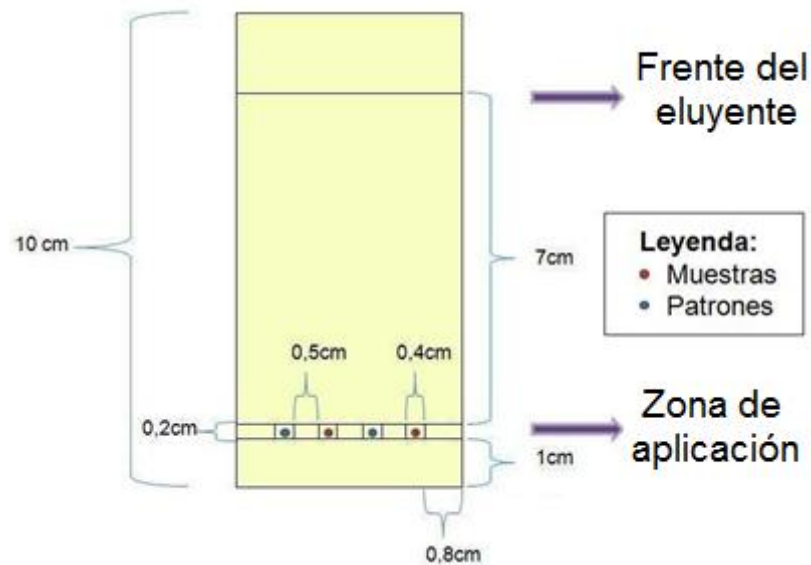


Figura 3: Modelo de placa empleada para la determinación de la reproducibilidad del método de cuantificación desarrollado.

4.2.7. Metodología empleada para el uso del UCV-Software.

El funcionamiento del software se basa en las características que poseen las imágenes digitales. Cada una de estas imágenes está compuesta de filas y columnas de “puntos” llamados píxeles. Cada píxel almacena información que representan las cantidades de rojo, verde y azul ^[6] a través de un modelo conocido como RGB (Red (rojo), Green (Verde) y Blue (azul)). Todos los demás colores se definen como una mezcla de estos tres. Para indicar un color se prescriben tres números entre 0 y 255, cada uno de ellos indicando la intensidad de un color ^[21]. Cuando todos los números están en su valor máximo, el píxel es de color blanco. Cuando todos los números están en su valor mínimo, el píxel es negro ^[6]. Por ejemplo, blanco=RGB [255,255,255], negro=RGB [0,0,0], amarillo= RGB [255,255,0], azul=RGB [0,0,255] ^[21].

Las imágenes en blanco y negro están hechas de un promedio de los componentes rojos, verde y azul ^[6]. Si un píxel en una imagen a color está representado

por RGB [20,30,40], al cambiarlo a una imagen en blanco y negro pasaría a tener el siguiente código RGB [30,30,30], es decir, estaría en la escala de grises con una intensidad de color igual a 30 ^[21]. Dentro de esta escala, la intensidad de cada pixel se le denomina densidad óptica, donde el blanco corresponde con el valor de máxima densidad y el negro con el valor de menor densidad ^[22].

El UCV-Software utiliza estas características de las imágenes digitales para crear los densitogramas necesarios para el análisis de las placas de CCF.

Para realizar el análisis de las fotografías, en primer lugar, se cargó la imagen de cada placa en el UCV-Software, al realizar esto, el programa detecta los valores RGB de los pixeles de la fotografía y los promedia, transformando la imagen de color a una en blanco y negro (véase figura 4). Luego se invirtieron los colores de la imagen a una escala de grises, en la opción “Imagen Invertida”.

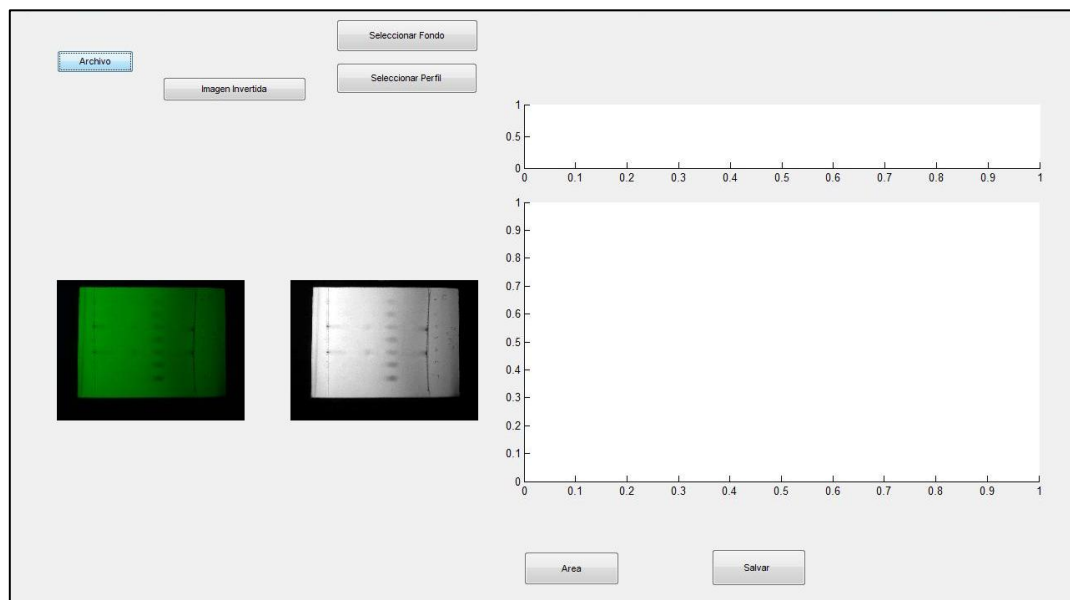


Figura 4: Captura de pantalla del UCV-Software al cargar la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*.

Posteriormente, con “Seleccionar Fondo” se eligió una zona de la placa adyacente al lugar en donde se encuentra la muestra y patrones, tal como se muestra en la figura 5. Posteriormente, se escogió la zona en la que se encontraba la muestra y patrones con la opción “Seleccionar perfil”, como se observa en la figura 6. Hecho esto, el programa automáticamente resta los valores de densidad de los pixeles de la sección cercana a la muestra con los valores de densidad óptica de los pixeles del perfil de la muestra y patrones. Esto se hace para eliminar las posibles señales causadas por las zonas sin muestras en la placa.

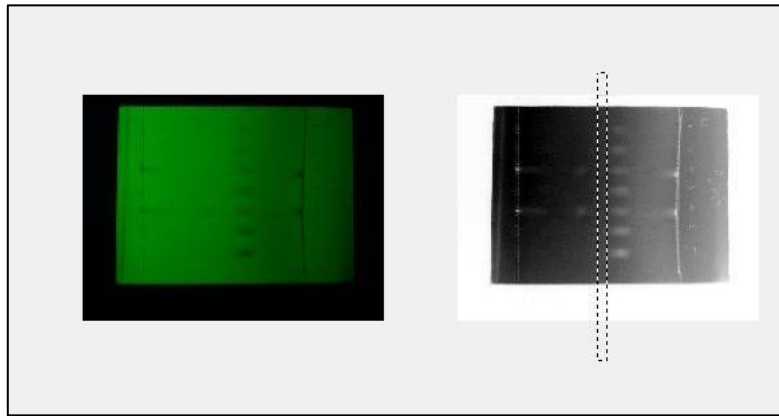


Figura 5: Captura de pantalla de la selección del fondo en la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*.

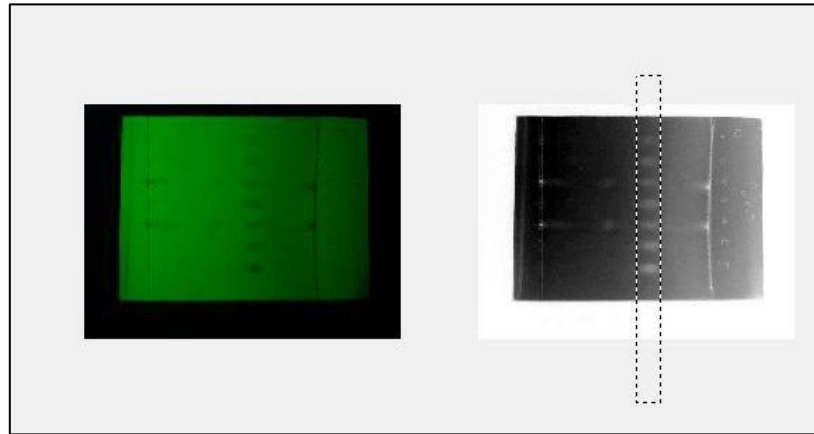


Figura 6: Captura de pantalla de la selección del perfil de la muestra y patrones de la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*.

El programa grafica el resultado de esta resta en función de la posición de la señal, dando como resultado un densitograma (véase figura 7), semejante a los obtenidos mediante otras técnicas densitométricas, como las mostradas en las figuras 8 y 9.

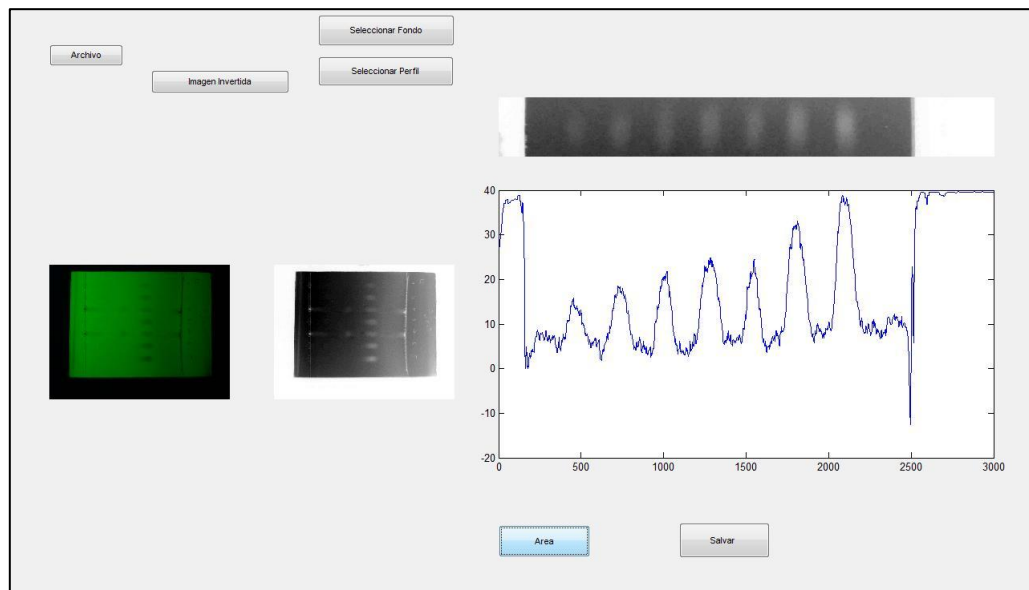


Figura 7: Captura de pantalla del densitograma generado por el UCV-Software de la imagen de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*.

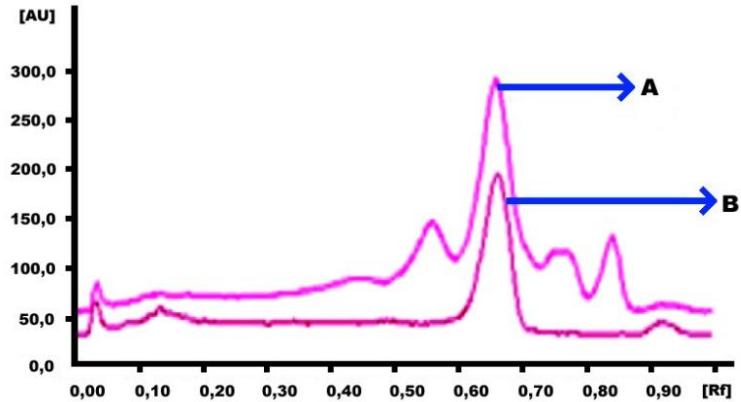


Figura 8: Densitogramas de las soluciones metanólicas de *Saraca asoca* (A) y de (+)-catequina (B) publicado por Rathe y col. 2010 ^[17].

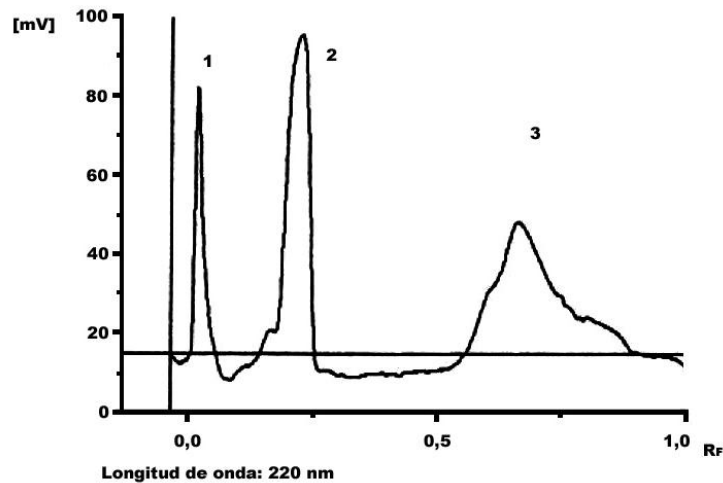


Figura 9: Densitograma de la formulación de α -cipermetrina publicado por Sherma (2005) ^[23]. Picos: 1: punto de aplicación, pico 2: α -cipermetrina, pico 3: frente de solvente.

En el caso de no invertir los colores de las imágenes blanco y negro de las placas desarrolladas en los experimentos de esta investigación, el programa reporta los resultados de manera tal que los picos obtenidos mostraban valores negativos (véase

figura 10). Para obtener una imagen adecuada, se tuvo que invertir dichos valores para obtener, en contraste, picos con pendientes positivas (véase figura 8).

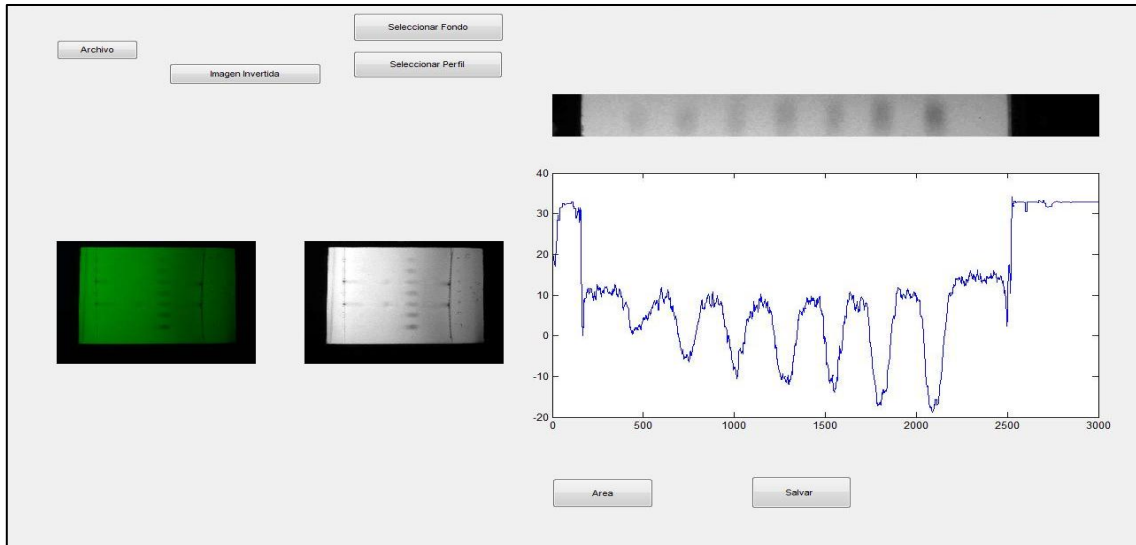


Figura 10: Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la imagen en blanco y negro sin invertir de la placa 1 de cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*.

Por último, al pulsar en “Área”, el UCV-Software calcula, a través de métodos de integración, el área de cada pico del densitograma y los muestra en otra ventana (véase figura 11). Estas áreas son las que se emplean para trazar las curvas de calibración utilizadas en el análisis cuantitativo de los metabolitos estudiados.

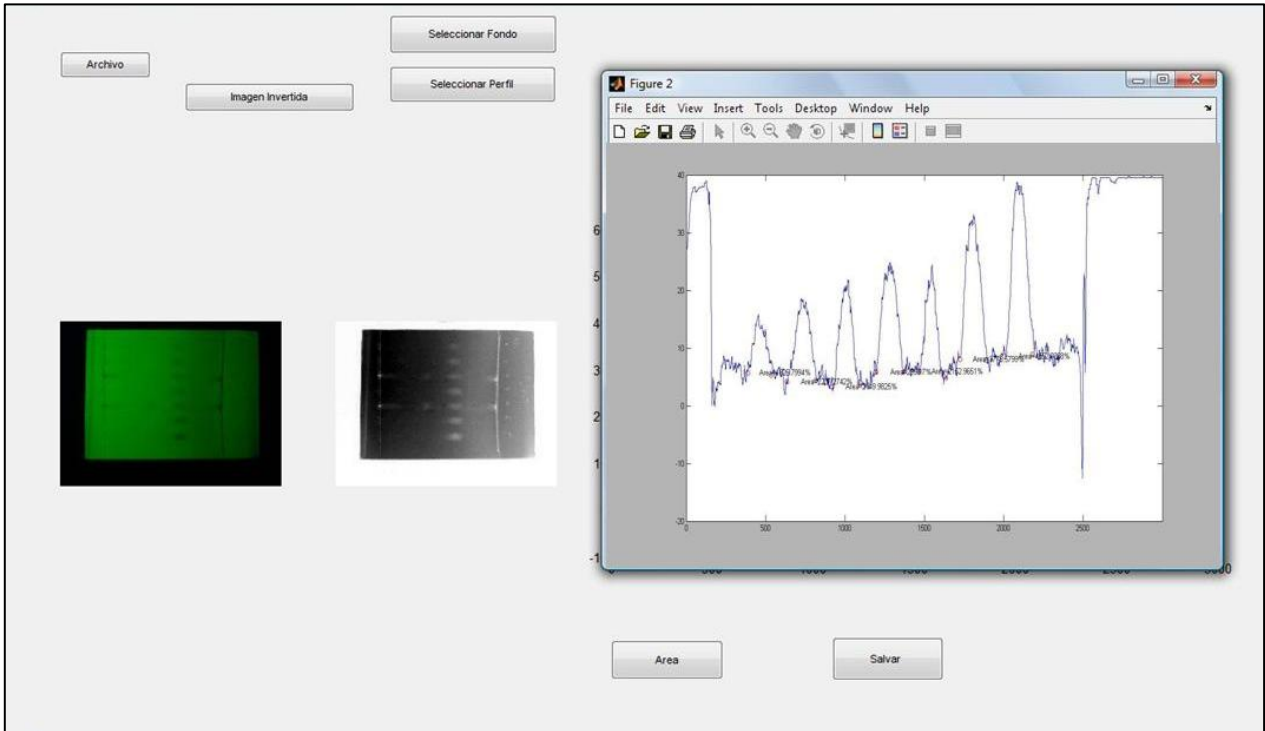


Figura 11: Captura de pantalla de la ventana que muestra el área de los picos del densitograma de la placa 1 correspondiente al análisis por CCF de *Echinacea purpurea*.

4.2.8. Absorción de radiación UV.

La ley fundamental que permite relacionar la densidad óptica con la concentración de una sustancia es la ley de Beer- Lambert (ec. 2). [24] [5]

$$D(\nu) = \log \frac{I_0(\nu)}{I(\nu)} = \varepsilon(\nu) \cdot b \cdot c \quad (\text{ec. 2}) [24] [5]$$

donde $I_0(\nu)$ e $I(\nu)$ son las intensidades de la radiación de frecuencia ν , incidente y transmitida, respectivamente, en la capa de fase estacionaria de espesor b , en la que

está contenida la sustancia a la concentración c ; $\epsilon(\nu)$ es el llamado coeficiente de absorptividad molar, característico de cada sustancia, y $D(\nu)$ la absorbancia o densidad óptica. ^{[24] [5]}

La ley de Beer-Lambert muestra que la densidad óptica de la mancha tiene una relación lineal con la cantidad de muestra en la placa cromatográfica ^[6], debido a que cuando la luz atraviesa una solución de analito, la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del analito. Cuanto mayor sea la concentración del analito, habrá más especies que absorban la radiación. ^[25]

Cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia frecuencia característica de la radiación electromagnética ^[25]. La absorción en moléculas orgánicas se basa principalmente en transiciones electrónicas n y π al estado excitado π^* , porque la energía requerida para estos procesos lleva las bandas de absorción hacia las regiones ultravioleta-visible (200 a 700nm) ^[26]. Para ello, la molécula ha de tener grupos cromóforos, es decir, grupos funcionales que contienen dobles o triples enlaces, conjugación ^[27], enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos. ^[25]

Dada la presencia de grupos cromóforos en su estructura, los flavonoides y flavonoides glicosilados como la rutina, presentan absorciones características en la región UV-VIS del espectro electromagnético. Todos los flavonoides exhiben una absorción de intensidad fuerte a media en la región de 200-270 nm (Banda II) y en la zona de 300-400 nm ^[28]. Por ello la rutina (véase su estructura en la figura 12), puede ser detectada empleando radiación de 254nm.

La berberina también puede ser detectada en esta longitud de onda, ya que presenta grupos cromóforos, principalmente del tipo aromático (véase figura 13), que permite a la molécula absorber radiación en el intervalo de longitudes de onda de 200

- 300 nm, 300-400nm y 400-500 nm ^[18] aproximadamente, tal como se muestra en el espectro de absorción UV-vis de la figura 14.

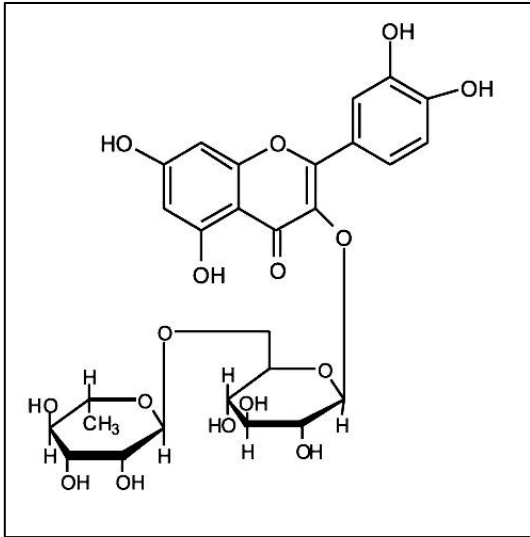


Figura 12: Estructura de la rutina. ^[29]

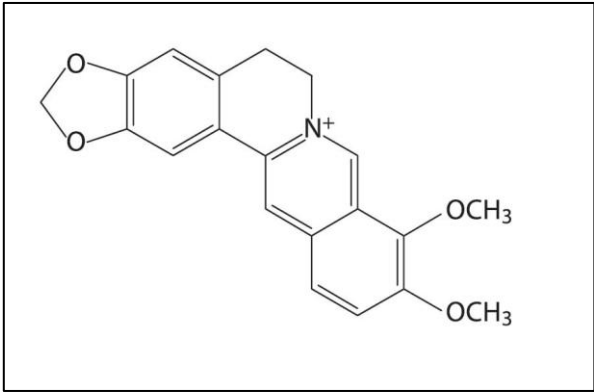


Figura 13: Estructura de la berberina. ^[18]

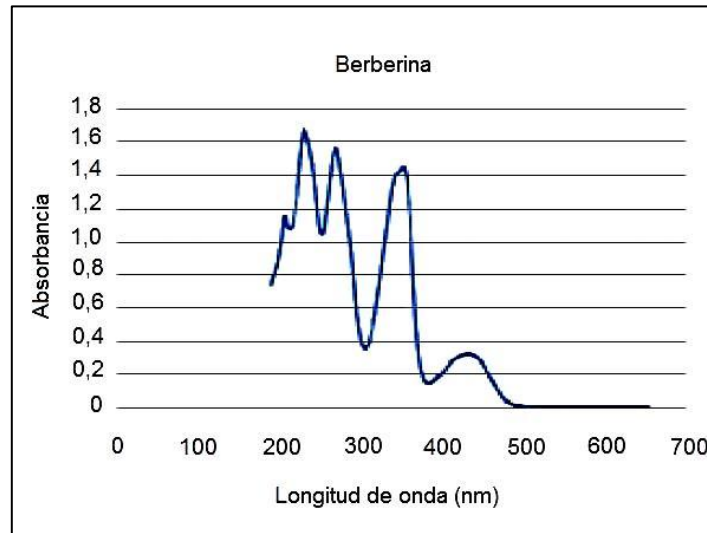


Figura 14: Espectro de absorción de la berberina. ^[30]

Por ello, se empleó la lámpara UV-254nm como medio de detección de estos metabolitos en las placas cromatográficas.

4.2.9. Reproducibilidad.

La reproducibilidad es la expresión de la precisión de una medida, es decir la concordancia entre varias medidas sobre alguna propiedad, hechas a una población o muestra ^[31]. La precisión indica la medida del error aleatorio, o indeterminado, de un análisis. Los parámetros de calidad de la precisión son la desviación estándar absoluta, la desviación estándar relativa, el coeficiente de variación (CV) y la varianza ^[32]. En esta investigación, se consideró el coeficiente de variación como medida de la reproducibilidad. Este parámetro se calculó por medio de la ecuación 3:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (\text{ec. 3})^{[32]}$$

donde S es la desviación estándar absoluta y \bar{X} la media de las medidas ^[32].

4.2.10. Linealidad del método.

La linealidad de un método analítico es su habilidad para proporcionar resultados que sean proporcionales a la concentración de analito presente en la muestra, directamente o mediante transformación matemática. [33]

La linealidad se midió utilizando el coeficiente de correlación (R^2) de cada curva de calibración trazada, pues este indica el grado en que dos magnitudes están relacionadas linealmente, donde 1 representa una total linealidad. [34]

4.2.11. Límites de detección y cuantificación.

El límite de detección (LOD) se puede definir como la concentración más baja de analito que puede ser detectable en una muestra, no necesariamente cuantificable, en las condiciones experimentales de trabajo. [33]

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja de analito presente en una muestra que puede ser determinada con una precisión y exactitud aceptable en las condiciones experimentales de trabajo. [33]

Ambos se expresan normalmente en términos de concentración o masa de analito en la muestra y, en un método instrumental se pueden determinar de varias formas. En este trabajo, para estimar los límites LOD y LOQ se aplicaron las ecuaciones 4 y 5, respectivamente, empleando los datos correspondientes de cada curva de calibración trazada [33] [35] [36]:

$$LOD = 3 \frac{S_a}{b} \quad (\text{ec. 4})^{[33]}$$

$$LOQ = 10 \frac{S_a}{b} \quad (\text{ec. 5})^{[33]}$$

Donde S_a corresponde a la desviación estándar del intercepto de la curva en la ordenada y b es la pendiente de la recta de calibrado ^[33].

4.2.12. Exactitud.

La exactitud es la cercanía de una variable a su valor verdadero. Generalmente, la exactitud de un método se calcula mediante estudios de recuperación, que consisten en aplicar el método a una cantidad conocida del analito y se expresa como el porcentaje de analito recuperado tras el ensayo ^[33], relacionando el valor medido (\bar{X}) respecto al valor teórico (X_r) a través de la ecuación 6 ^[37].

$$Rec. (\%) = \frac{\bar{X}}{X_r} * 100 \quad (\text{Ec. 6})^{[37]}$$

En este trabajo, se determinó la recuperación midiendo la concentración del patrón 3 de las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de los metabolitos (patrón de 500 ppm del análisis de rutina en *Crataegus oxycantha*; patrón de 400ppm del análisis de rutina en *Echinacea purpurea* y patrón de 300 ppm del análisis de berberina en *Hydrastis canadensis*). Estos patrones se seleccionaron ya que corresponden a los puntos intermedios de las curvas de calibración. Con los datos de los otros patrones de cuantificación, se realizaron nuevas curvas de calibración, excluyendo los patrones 3 (las curvas de calibración se muestran en el apéndice 2). Con estas curvas, se interpoló el valor del área del pico del patrón seleccionado para obtener la concentración que indica el método, la cual se relacionó con la concentración real del patrón mediante la ecuación 6 dando como resultado el porcentaje de recuperación.

5. Presentación y discusión de resultados.

A continuación se discuten los resultados obtenidos durante el trabajo especial de grado, los cuales se centran en los siguientes aspectos: la reproducibilidad, linealidad, exactitud y límites de detección y cuantificación del método. Además, se discuten los resultados obtenidos en la cuantificación de los metabolitos estudiados en *Hydrastis canadensis*, *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*.

5.1. Reproducibilidad

Los valores de los CV obtenidos fueron de 2,05-4,65% para la berberina en las diferentes concentraciones de las soluciones del extracto seco de *Hydrastis Canadensis*, 3,87% para rutina en *Crataegus oxycantha* y 3,92% para rutina en *Echinacea purpurea* (tabla 4). Comparando los resultados con los valores reportados por otros autores (véase tabla 5), se deduce que la reproducibilidad del método es aceptable y comparable a otras técnicas densitométricas por CCFAE. Adicionalmente, por medio del método se pueden obtener resultados reproducibles con concentraciones diferentes de la muestra a estudiar, tal como se observa con los CV de los ensayos en *Hydrastis Canadensis*.

En la figura 15, se muestra la fotografía de una de las placas empleadas para cada análisis (el resto de las fotografías se encuentran en el apéndice 7). En el apéndice 6 y 8 se encuentran los datos y los densitogramas empleados para la obtención de los CV, respectivamente.

Tabla 4: Coeficiente de variación obtenido en los ensayo de reproducibilidad del método.

Muestra	CV (%)
<i>Hydrastis canadensis</i> (14150 ppm)	4,65
<i>Hydrastis canadensis</i> (7075 ppm)	2,05
<i>Hydrastis canadensis</i> (3537,5 ppm)	3,18
<i>Crataegus oxycantha</i>	3,87
<i>Echinacea purpurea</i>	3,92

El CV se calculó a partir de 8 réplicas de cada extracto de planta estudiado.

Tabla 5: Coeficientes de variación de métodos densitométricos reportados por otros autores.

Autor	CV (%)	Metabolito cuantificado
Irish (2007) ^[6]	0,95-4,72	Nicotamida
Kapadi y col. (2010) ^[14]	1,56-6,52	14-deoxi-11, 12-dihidroandrografolido
Rathe y col. (2010) ^[17]	3,36	Catequina
Trivedi y col. (2008) ^[19]	1,96	Gymnemagenin
Wojciak y col. (2006) ^[20]	1,04-2,11	Fenobarbital
Patel y col. (2010) ^[16]	1,54	Vasicina
	2,17	Piperina
Rojsanga y col. (2006) ^[18]	4,13	Berberina

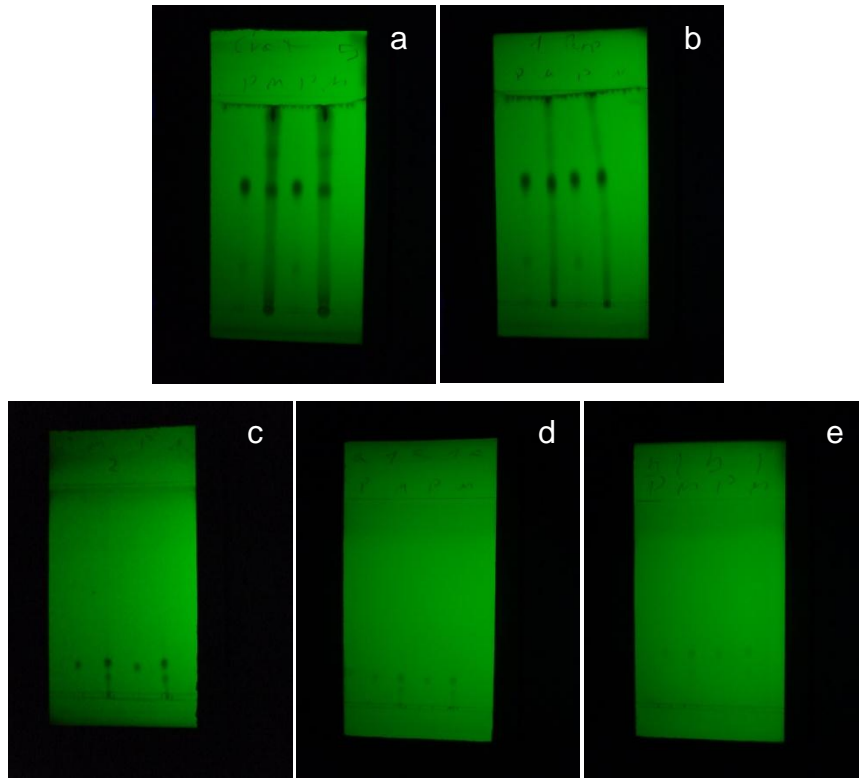


Figura 15: Fotografía de las placas 1 de los análisis de reproducibilidad de **a)** *Crataegus oxycantha*, **b)** *Echinacea purpurea*, **c)** Muestra de 14150 ppm de *Hydrastis canadensis*, **d)** Muestra de 7075 ppm de *Hydrastis canadensis* y **e)** Muestra de 3537,5 ppm de *Hydrastis canadensis*.

5.2. Linealidad del método.

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos en esta investigación se muestran en la tabla 6. Estos son comparables a los reportados por otros autores en sus investigaciones sobre CCFAE (tabla 7). Esto significa que las curvas fueron lineales en el rango de concentraciones estudiado. Por lo tanto, se deduce que la ley de Beer-Lambert es una buena aproximación para relacionar la concentración de muestras que

absorben en el UV con la densidad óptica de las mismas, en placas fluorescentes de CCF.

Tabla 6: Coeficiente de correlación y ecuación de la recta de las curvas de calibración trazadas para la cuantificación de los metabolitos de los extractos de plantas estudiadas.

Planta	Placa	R ²	Ecuación de la recta
<i>Hydrastis canadensis</i>	1	0,9995	$y = 9,8061x + 47,405$
	2	0,9957	$y = 8,5703x + 693,62$
	3	0,9971	$y = 10,86x + 3662,4$
<i>Crataegus oxycantha</i>	1	0,9991	$y = 8,7032x + 417,84$
	2	0,9981	$y = 7,9682x + 1989$
	3	0,9932	$y = 9,525x + 719,17$
<i>Echinacea purpurea</i>	1	0,9954	$y = 7,3996x + 3,8259$
	2	0,9985	$y = 10,09x + 102,5$
	3	0,9977	$y = 5,526x + 526,69$

Tabla 7: Coeficiente de correlación de las curvas de calibración reportados por otros autores en investigaciones sobre CCFAE.

Autor	R ²	Metabolitos cuantificados
Irish (2007) ^[6]	0,9870	Nicotamida
	0,9710	Vainillina

Kapadi y col. (2010) ^[14]	0.9986 - 0.9992	14-deoxi-11, 12-dihidroandrografolido
Nehete y col. (2009) ^[15]	0,9884	Ácido oleanólico
Rathe y col. (2010) ^[17]	0,9970	Catequina
Trivedi y col. (2008) ^[19]	0,9998	Gymnemagenin
Wojciak y col. (2006) ^[20]	>0,9990	Fenobarbital
Patel y col. (2010) ^[16]	0,9920	Vasicina
	0,9930	Piperina
Rojsanga y col. (2006) ^[18]	0,9982	Berberina

5.3. Límites de detección y cuantificación.

Los valores de LOQ y LOD obtenidos para el método propuesto se muestran en la tabla 8. La variación de los límites de detección y de cuantificación entre las placas de la misma muestra indica que la reproducibilidad del método decrece con concentraciones relativamente bajas del analito. Esto se debe a que el contraste de coloración entre el fondo de la placa y la muestra disminuye, lo cual ocasiona que el método tenga dificultades en la detección de la misma. Una forma de mejorar esto, podría ser a través de la aplicación de agentes de revelado químico, los cuales aumentan la coloración de la muestra permitiendo disminuir estos límites.

Tabla 8: Límites de detección y de cuantificación del método.

Planta	Placa	LOD (ng)	LOQ (ng)
<i>Hydrastis canadensis</i>	1	27,65	92,16
	2	75,58	251,94

	3	64,08	213,59
<i>Crataegus oxycantha</i>	1	55,74	185,79
	2	80,88	269,59
	3	152,92	509,74
<i>Echinacea purpurea</i>	1	102,75	342,51
	2	59,26	197,55
	3	72,30	240,99

5.4. Exactitud.

Los porcentajes de recuperación obtenidos por el método para berberina en *Hydrastis canadensis* y rutina en *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, fueron de 96,63-101,94%; 98,18-105,58% y 97,80-99,61% (véase tabla 9), respectivamente. Estos valores son comparables a los reportados en otras investigaciones con CCFAE (tabla 10), demostrando que el método permite la cuantificación de estos metabolitos con una exactitud relativamente alta.

Los porcentajes de recuperación mayores a 100% indican interferencias debido a la matriz o errores determinados; recuperaciones menores indican pérdidas de analito durante las fases de preparación y análisis de la muestra ^[38].

Tabla 9: Exactitud del método de cuantificación desarrollado.

Planta	Placa	Concentración real (ppm)	Concentración Método (ppm)	Error relativo (%)	Recuperación (%)
<i>Hydrastis canadensis</i>	1	309 ± 2	303 ± 2	-1,94	98,06
	2		299 ± 15	-3,37	96,63
	3		315 ± 13	1,94	101,94
<i>Crataegus oxycantha</i>	1	515 ± 4	506 ± 4	-1,82	98,18
	2		509 ± 10	-1,17	98,83
	3		544 ± 19	5,58	105,58
<i>Echinacea purpurea</i>	1	412 ± 3	403 ± 16	-2,20	97,80
	2		422 ± 7	2,43	102,43
	3		410 ± 12	-0,39	99,61

Tabla 10: Exactitud reportada por otros autores en sus investigaciones sobre CCFAE.

Autor	Recuperación (%)	Metabolito cuantificado
Kapadi y col. (2010) ^[14]	94,02 - 96,34	14-deoxi-11, 12-dihidroandrografolido
Rathe y col. (2010) ^[17]	101,45	Catequina
Trivedi y col. (2008) ^[19]	98,4	Gymnemagenin
Wojciak y col. (2006) ^[20]	97,8-102,1	Fenobarbital
Patel y col. (2010) ^[16]	91,11-93,59	Vasicina
	89,63-92,89	Piperina
Rojsanga y col. (2006) ^[18]	97,58-98,71	Berberina

5.5. Cuantificación de Berberina en la raíz de *Hydrastis canadensis*.

Las fotografías de las placas utilizadas para este análisis se muestran en la figura 16 y apéndice 4. En estas fotos se observa que una mancha presente en la muestra posee el mismo R_f (0,14) de los patrones. Adicionalmente, mostró características similares en otras longitudes de onda y empleando el reactivo de Dragendorff. Por estas razones, la mancha se asoció con la presencia de berberina en la raíz de la planta. Al evaluar estas fotografías en el UCV-Software se obtuvieron los densitogramas mostrados en el apéndice 5. Estas áreas, al relacionarlas con la concentración de los patrones, permitieron trazar las curvas de calibración mostradas en el apéndice 1.

Efectuando una regresión lineal en las curvas de calibración con las áreas de los picos de la berberina de la muestra, se logró determinar que la cantidad de este metabolito en *Hydrastis canadensis* fue de $4,23 \pm 0,09$ - $4,98 \pm 0,20$ % (véase tabla 11). Estos resultados coinciden con lo reportado reportado por Wagner y Bladt de 2 - 4,5%.
[39]

Los coeficientes de varianza mostrados en la tabla 11, concuerdan con los obtenidos en los análisis de reproducibilidad (véase tabla 4).

Con estos resultados se demuestra que el método desarrollado permite la cuantificación de berberina en la raíz de *Hydrastis canadensis* por lo que podría ser útil para cuantificar este metabolito en otras matrices complejas con las mismas características.

Por otra parte, la berberina es un indicador quimiotaxonómico y por lo general se utiliza para calcular el contenido alcaloidal total en *Hydrastis canadensis* debido a las concentraciones relativamente altas de este metabolito en esta planta ^{[39] [40]}.

Tabla 11: Resultados de cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Concentración Muestra a (%m/m)	4,20 ± 0,09	4,98 ± 0,23	4,82 ± 0,20
Concentración Muestra b (%m/m)	4,26 ± 0,09	-	4,75 ± 0,20
Promedio (\bar{X})	4,23	4,98	4,78
Desv. Estándar del método(S)	0,09	0,24	0,20
Desv. estándar del valor promedio ($S_{\bar{X}}$)	0,05	-	0,05
Coefficiente de varianza (CV%)	2,07	4,73	4,21
Ecuación de la recta	$y = 9,8061x + 47,405$	$y = 8,5703x + 693,62$	$y = 10,86x + 3662,4$
R²	0,9995	0,9957	0,9971



Figura 16: Fotos de la placa 3 de la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*.

5.6. Cuantificación de Rutina en frutos de *Crataegus oxycantha*.

El contenido de rutina en los frutos de *Crataegus oxycantha* determinado por el método propuesto fue de $0,75 \pm 0,02$ - $0,79 \pm 0,03$ % (véase tabla 12).

En la tabla 13 se muestra el porcentaje de rutina en diferentes especies del género *Crataegus*. La cantidad de este metabolito puede variar según el solvente utilizado para su extracción ^[41]. Por ejemplo, Kostic y col. (2012) explican que el porcentaje de rutina en los frutos de *Crataegus oxycantha* es de 16,50% si extrae con una mezcla de acetona 80%-ácido 0,5% (no especifican el tipo de ácido), mientras que empleando etanol se obtiene un porcentaje de 0,014-0,018% ^[41]. En la tabla 13 también se observa que el contenido de este flavonoide puede variar grandemente entre las especies y partes de una misma planta.

Además, puede existir variación en la cantidad de flavonoides y otros metabolitos en individuos de la misma especie, esto se debe a que cambios en las condiciones ambientales, luz, temperatura y abastecimiento de agua, predominantes en el crecimiento de cada planta, pueden afectar intensamente el metabolismo celular induciendo cambios en la concentración y cualidad de los metabolitos secundarios sintetizados. ^[42]

Por lo anterior, el valor de rutina en los extractos metanólicos de los frutos de *Crataegus oxycantha* obtenido en esta investigación es aceptable, asumiendo que las diferencias con los datos obtenidos por otros investigadores se deben, posiblemente, a las variables expuestas anteriormente. Además, los resultados en la evaluación de la exactitud y reproducibilidad del método, aumentan la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 12: Resultados de cuantificación de rutina en frutos de *Crataegus oxycantha*.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Concentración Muestra a (%m/m)	0,74 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,73 ± 0,03
Concentración Muestra b (%m/m)	0,76± 0,02	0,83 ± 0,02	0,77 ± 0,03
Promedio (\bar{X})	0,75	0,79	0,75
Desv. Estándar (S)	0,02	0,02	0,03
Desv. estándar del valor promedio ($S_{\bar{X}}$)	0,01	0,05	0,03

Coefficiente de varianza (CV%)	2,07	5,96	3,84
Ecuación de la recta	$y = 8,7032x + 417,84$	$y = 7,9682x + 1989$	$y = 9,525x + 719,17$
R²	0,9991	0,9981	0,9932

Tabla 13: Contenido de rutina en diferentes especies de plantas del género *Crataegus* reportado por otros autores.

Autor	Planta	Rutina	Parte de la planta	Solvente extracción
Rizea y col. (2010) ^[43]	<i>C. oxycantha</i>	1,70%	Flores	Metanol
Wang y col. (2010) ^[44]	<i>C. pinnatifida</i>	0,35%	Hojas	Etanol 70%
Cheng y col. (2007) ^[45]	<i>C. pinnatifida</i>	0,43%	Hojas	Etanol 95%
Kostic y col. (2012) ^[41]	<i>C. oxycantha</i>	16,50%	Frutos	Acetona 80%-ácido 0,5%
		0,014-0,018%	Frutos	Etanol
Bernatoniene y col. (2009) ^[46]	<i>C. monogyna</i>	0,36%	Frutos	Etanol 70%
Zhang y col. (2001) ^[47]	Especies de <i>Crataegus</i>	0,26%	Frutos	Etanol 80%
Fleming (2000) ^[48]	<i>C. laevigata</i>	0,17%	-	-



Figura 17: Foto de la placa 2 de la cuantificación de rutina en frutos de *Crataegus oxycantha*.

En la figura 17, se muestra la fotografía de la placa 2 empleada en la cuantificación de rutina en *Crataegus oxycantha*, en esta se observa que el Rf (0,53) de los patrones coincide con el de uno de los componentes de la planta, indicando así, la presencia de rutina en la misma. Adicionalmente, mostró también características similares en otras longitudes de onda y empleando anisaldehído - ácido sulfúrico como agente de revelado.

La figura 18 muestra un cromatograma obtenido por HPLC-RF (cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, según sus siglas en inglés) del extracto metanólico del polvo vegetal de los frutos de *Crataegus oxycantha* empleado en esta investigación. En este se observa que la rutina es un metabolito minoritario en este fruto, con respecto a otros flavonoides glicosilados presentes en esta especie. Esto también se evidencia en los densitogramas de los perfiles de las muestra 1 y 2 de la placa 2 empleada para la cuantificación en los frutos de esta planta (véase figura 19 y 20, respectivamente). Lo anterior, demuestra que el método cromatográfico

desarrollado en esta investigación permite la cuantificación de metabolitos secundarios minoritarios presentes en plantas.

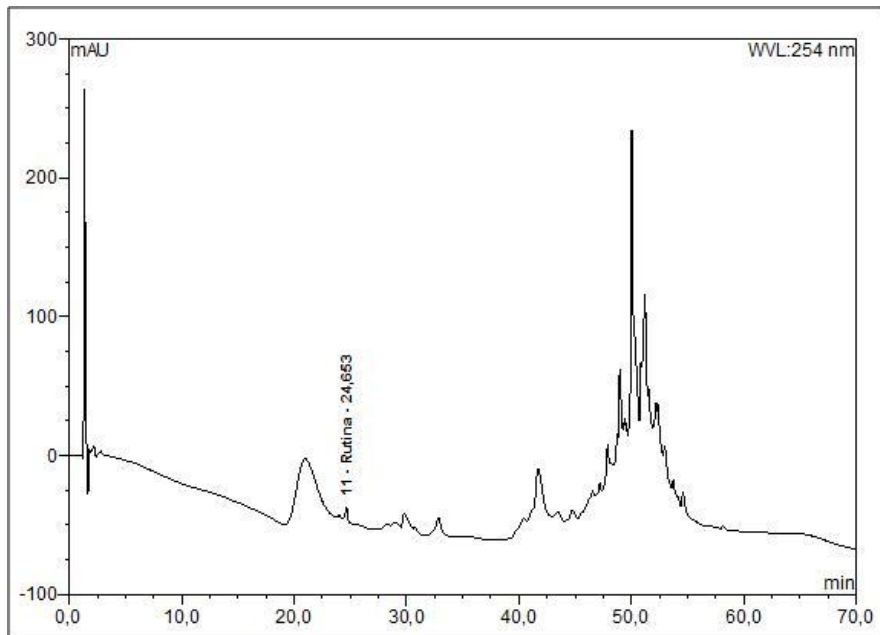


Figura 18: Cromatograma de la muestra de *Crataegus oxycantha* obtenido por HPLC-RF (equipo Diodex Ultimate 3000) con detección UV 254nm. La fase estacionaria fue C18 y la fase móvil consistió en un gradiente de elución de metanol y ácido acético.

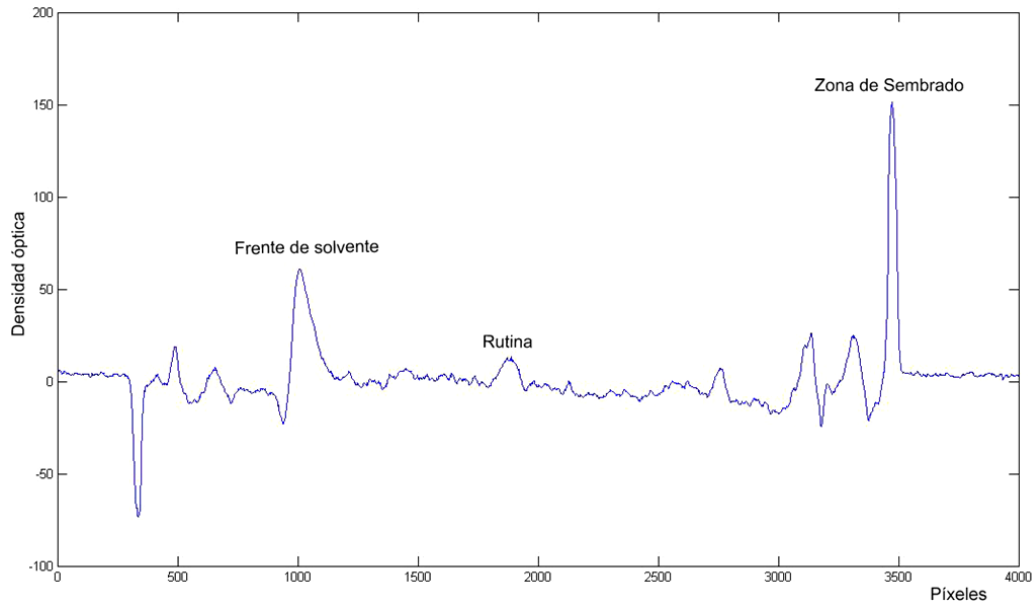


Figura 19: Densitograma del perfil de la muestra 1 del extracto metanólico de *Crataegus oxycantha* de la placa 2 empleada en la cuantificación de rutina.

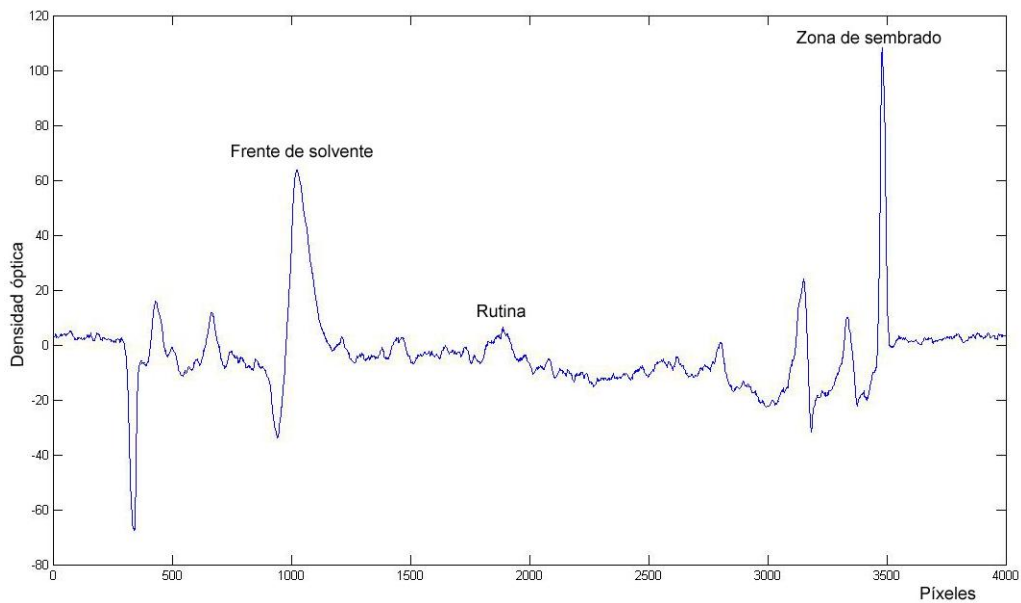


Figura 20: Densitograma del perfil de la muestra 2 del extracto metanólico de *Crataegus oxycantha* de la placa 2 empleada en la cuantificación de rutina.

Las curvas de calibración, las áreas de los picos, las fotografías y los densitogramas empleados para la cuantificación de este metabolito, se muestran en los apéndices 1, 3, 4 y 5, respectivamente.

5.7. Cuantificación de Rutina en *Echinacea purpurea*.

La cuantificación de rutina en *E. purpurea*, también se realizó en tres placas al igual que en los casos anteriores, con dos muestras de plantas sembradas en cada una. En la figura 21, se muestra una de las fotos utilizadas para el análisis con el UCV-Software. En esta, se puede observar que coincide a un mismo Rf (0,63) con uno de los componentes de la muestra, sugiriendo la presencia de rutina. Adicionalmente, mostró también características similares en otras longitudes de onda y empleando anisaldehído - ácido sulfúrico como agente de revelado. Además se muestra que el sistema de solvente (AcOEt, AcOH, HCOOH, H₂O, 100:10:10:10), permitió separar este flavonoide glicosilado de los otros metabolitos presentes en *E. purpurea*.

Con el método densitométrico empleado en esta investigación, se obtuvo que la cantidad de rutina en esta planta fue de $0,44 \pm 0,03$ - $0,52 \pm 0,02\%$ (véase tabla 14), comparable con la cantidad de rutina de 0,198-0,530% reportada por Palaghiciuc (2009) para la misma especie ^[49]. Además, se observa que los coeficientes de varianza son relativamente bajos comparándolos con los mostrados en la tabla 3, en el análisis de reproducibilidad. Lo anterior sugiere que el método desarrollado es útil para cuantificar rutina y otros metabolitos presentes en plantas y posiblemente en otras matrices.

Por otra parte, la rutina es un indicador quimiotaxonómico y por lo general se utiliza para calcular el contenido flavonoidal total en *Echinacea purpurea* debido a las concentraciones relativamente altas en esta planta. ^[49]

Las curvas de calibración, las áreas de los picos, las fotografías y los densitogramas empleados para la cuantificación de este producto natural, se muestran en los apéndices 1, 3, 4 y 5, respectivamente.

Tabla 14: Resultados de cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*.

	Placa 1	Placa 2	Placa 3
Concentración Muestra a (%m/m)	0,49	0,45	0,51
Concentración Muestra b (%m/m)	0,49	0,44	0,54
Promedio (\bar{X})	0,49	0,44	0,52
Desv. Estándar (S)	0,03	0,02	0,02
Desv. estándar del valor promedio ($S_{\bar{X}}$)	0,0005	0,01	0,02
Coefficiente de varianza (CV%)	0,12	0,05	0,11
Ecuación de la recta	$y = 7,3996x + 3,8259$	$y = 10,09x + 102,5$	$y = 5,526x + 526,69$
R²	0,9954	0,9985	0,9977

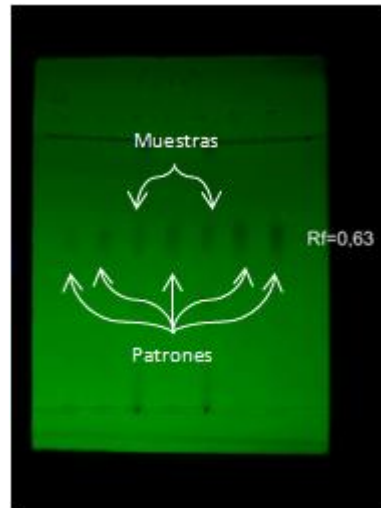


Figura 21: Foto de la placa 1 de la cuantificación de Rutina en *Echinacea purpurea*.

6. Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos y de las discusiones realizadas en este trabajo, se plantean las siguientes conclusiones:

Las placas de sílica gel 60F₂₅₄, la distancia de recorrido de 7cm y las mezclas de solventes empleadas como fases móviles: isopropanol: ácido acético:agua, en proporción 90:1:9 y acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua, en proporción 100:10:10:10, produjeron la separación óptima de berberina en *Hydrastis canadensis* y rutina en *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, respectivamente.

Los resultados del análisis de reproducibilidad indican que el método es preciso (%CV<5%). También muestra que los coeficientes de variación de las medidas realizadas son semejantes a la de otros métodos de CCFAE.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para berberina en *Hydrastis canadensis* (96,63-101,94%) y rutina para *Crataegus oxycantha* (98,18-105,58%) y *Echinacea purpurea* (97,80-99,61%) son comparables a los reportados en otras investigaciones sobre CCFAE e indican que el método permite cuantificar estos metabolitos con una exactitud relativamente alta.

La linealidad del método es alta ($R^2 > 0,99$), comparable a otros métodos de CCFAE. Además muestra que la ley de Beer-Lambert es una buena aproximación para comparar la densidad óptica con la concentración de las muestras que absorben radiación a 254nm sobre placas fluorescentes de CCF.

Los límites de detección del método fueron iguales a 27,65 -75,58 ng, 55,74 - 152,92ng y 59,26 - 102,75ng; y los de cuantificación fueron iguales a 92,16 - 251,94 ng, 185,79- 509,74ng y 197,55 - 342,51ng, para berberina en *Hydrastis canadensis* y rutina en *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*, respectivamente.

El método permitió determinar la cantidad de berberina en raíces de *Hydrastis canadensis* ($4,23 \pm 0,09$ - $4,98 \pm 0,20$ %) y de rutina en frutos de *Crataegus oxycantha* ($0,75 \pm 0,02$ - $0,79 \pm 0,03$ %) y en raíces de *Echinacea purpurea* ($0,44 \pm 0,03$ - $0,52 \pm 0,02$ %), de forma rápida, económica y sencilla, en comparación a otras técnicas cromatográficas como HPLC.

7. Recomendaciones.

Se propone utilizar el método desarrollado en la cuantificación de otros metabolitos secundarios en *Hydrastis canadensis*, *Crataegus oxycantha* y *Echinacea purpurea*.

Utilizar el método para cuantificar metabolitos secundarios empleando reveladores químicos y radiación de longitudes de onda diferente a 254nm.

Estudiar la utilidad del método en la cuantificación de metabolitos secundarios presente en otras especies vegetales y en otros organismos vivos, por ejemplo, en esponjas y corales.

Determinar la aplicabilidad del método para cuantificar los componentes en otras mezclas complejas, como crudos, pesticidas en plantas, tintes, medicamentos, entre otros.

8. Bibliografía.

[1] Srivastava M. (2011). High-Performance Thin- Layer Chromatography (HPTLC). New York, Springer: 4, 5, 8, 205, 206, 207, 263 y 267.

[2] Bailey L. (2003). Remington: Farmacia, Tomo 1. 20ª Edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana: 686

[3] Durst H. y Gokel G. (2007). Química Orgánica Experimental. Primera edición, España, Editorial Reverté, S.A.: 79

[4] Sherma J. and Fried B. (2003). Handbook of Thin-Layer Chromatography. Third Edition, Revised and Expanded, New York, Marcel Dekker, INC: 1-2.

[5] Spangenberg B., Poole C. and Weins C. (2011). Quantitative Thin-Layer Chromatography, A practical Survey, Berlin, Springer: 22, 23, 232, 285, 286.

[6] Irish A. (2007). Digitally Enhanced Thin-Layer Chromatography: An Inexpensive, New Technique for Qualitative and Quantitative Analysis. Journal of Chemical Education, vol. 84 (5): 842-847.

[7] Hahn-Deinstrop E. (2007). Applied Thin-Layer Chromatography, Best Practice and Avoidance of Mistakes. Second Edition, Weinheim, Wiley-VCH: 3.

[8] Pan S., Pan S., Yu Z, Ma D., Chen S., Fong W., Han Y. and Ko K. (2010). New Perspectives on Innovative Drug Discovery: An Overview. Journal Pharm Pharmaceut Sci, vol. 13 (3): 450 – 471.

- [9] Harvey A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, vol. 5 (7): 294-300.
- [10] Ávalos A y Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, vol. 2 (3): 119-145.
- [11] Sepúlveda G., Porta H. y Rocha M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21 (3): 355-363.
- [12] Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J. and Kowalska T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Chromatographic Science Series, New York, Taylor & Francis Group: 60.
- [13] Marcano D. y Hasegawa M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*, Segunda edición, Caracas, Torino: 32.
- [14] Kapadi C., Patel B., Katkar K., Suthar A. and Chauhan V. S., (2010). A quantitative estimation of 14-deoxy-11, 12- didehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* by HPTLC. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 2 (4): 49-52.
- [15] Nehete J., Deshmukh V.N., Shewale V., Narkhede M. and Aurangabadkar V.M. (2009). Quantitation of oleanolic acid in *Achyranthes aspera* roots and leaves extracts by high-performance thin-layer chromatography. *International Journal of Pharma Research and Development – online*, Vol. 7. Disponible: http://www.ijprd.com/Article_No_18_Sep_09_3_.Html [consulta: 2011, abril 17].

- [16] Patel R., Kanani R., Patel V. and Patel M. (2010). Development and Validation of HPTLC Method for Simultaneous Quantification of Vasicine and Piperine in Vasavaleha. *International Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 2 (3): 14-17.
- [17] Rathee P., Rathee S., Rathee D. and Rathee D. (2010). Quantitative estimation of (+)-Catechin in stem bark of *Saraca asoka* Linn using HPTLC. *Der Pharma Chemica*, vol. 2(1): 306-314.
- [18] Rojsanga P., Gritsanapan W. and Suntornsuk L. (2006). Determination of Berberine Content in the Stem Extracts of *Coscinium fenestratum* by TLC Densitometry. *Medical Principles and Practice*, vol. 15: 373-378.
- [19] Trivedi P. and Pundarikakshudu K. (2008). A Validated High Performance Thin - layer Chromatographic method for the estimation of gymnemic acids through gymnemagenin in *Gymnema sylvestre*, materials, extracts and formulations. *International Journal of Applied Science and Engineering*, vol. 6 (1): 19-28.
- [20] Wójciak-kosior M., Skalska A., Matysik G., and Kryska M. (2006). Quantitative analysis of phenobarbital in dosage form by thin-layer chromatography combined with densitometry. *Journal of aoac international*, vol. 89 (4): 995-998.
- [21] Aguirre J. (2008). *Dibujo Técnico y Matemáticas: una Consideración Interdisciplinaria*. Primera Edición, España, TARAVILLA S.L.: 59.
- [22] Ochoa O. (2006). *Técnico Especialista en Radiodiagnóstico de Atención Primaria Del Instituto de Cataluña*. Primera edición, España, Editorial Mad, S.L.: 532
- [23] Sherma J. (2005). Thin layer chromatography of pesticides, a review of applications for 2002–2004. *Acta chromatographica* No. 15: 5-30.

[24] Matrovic S. (2004). Desarrollo y Validación del Análisis Cuantitativo de Ibuprofeno en Comprimidos por Espectroscopía Infrarroja. *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 23 (4): 527-532.

[25] Matías E. (2008). Caracterización Fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría UV de flavonoides totales en extractos de rizomas y frondas de *Polypodium triseriale*. Informe de tesis para optar por el Título de Química farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala: 19- 20.

[26] Skoog D., Holler F. y Crouch S. (2008). Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición, Mexico, Cengage learning: 367-369.

[27] Silva M., García M, Del Castillo L., Ania J. y Gómez D. (2006). Temario de Técnico especialista en laboratorio. Segunda edición, España, Editorial Mad. S. L.: 235.

[28] Ortega G., Bermello A., Guerra M., Michelena L., Castillo G., Armenteros S., Mieres G., Carreras E., Crespo D., Matos S., Legrá S. (2007). Estudios de separación y caracterización de pigmento en caldos de fermentación de *Botryodiplodia theobromae*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLI (3): 27-34.

[29] Dos Santos S., Mazo L. and Cavalheiro É. (2008). The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 19 (8): 1600-1606.

[30] Miranda J. (2007). Química y evaluación farmacológica de la raíz de *Berberis buxifolia* en ratones diabéticos inducidos con aloxano. Tesis de Grado para optar al Título de Químico Farmacéutico, Universidad Austral de Chile, Valdivia: 67.

[31] Riaño N. (2007). Fundamentos de química analítica básica, Análisis cuantitativo. Segunda edición, Colombia, Editorial Universidad de Caldas: 101.

[32] Skoog D., Holler F. y Nieman T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición, España, McGraw-Hill: 12.

[33] Morante S., Sierra I. y Del Hierro I. (2007). Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica. Primera edición, España, Universidad Rey Juan Carlos, Servicio de Publicaciones: 24, 26, 27.

[34] Costa J. (2005). Diccionario de Química Física. Primera edición, España, Díaz de Santos: 75.

[35] Meyyanathan S., Ramasarma G. y Suresh B. (2004). Análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento. *Ars Pharmaceutica*, vol. 45 (2): 121-129.

[36] Gómez S., Martínez J. y Martínez F. (2010). Validación de un método analítico empleando cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación de ibuprofeno en medios biorrelevantes. *Química Nova*, vol. 33 (8): 1794-1799.

[37] Sierra I, Pérez D., Gómez S. y Morante S. (2010). Análisis instrumental. Primera edición, España, Netbiblio, S. L.: 9.

[38] Pérez J. y Pujol M. (2001). Validación de métodos analíticos. Primera edición, España, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: 15.

- [39] Wagner H. and Bladt. S. (2009). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second edition, Germany, Springer: 10.
- [40] Etefagh K., Burns J., Junio H., Kaatz G. and Cech N. (2011). Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) Extracts Synergistically Enhance the Antibacterial Activity of Berberine via Efflux Pump Inhibition. *Planta Med*, vol. 77(8): 835-840.
- [41] Kostic D., Velickovic J., Mitic S, Mitic M. and Randelovic S. (2012). Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) Fruit Extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 11 (1): 117-124.
- [42] Varas D. (2004). Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. Tesis de grado para optar al Título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral De Chile, Chile: 42.
- [43] Rizea G., Mihele D., Ionescu S., Setnic S. and Mazilu E. (2010). The content in free radical scavenging compounds in plants used in cardiovascular phytotherapy. *Proceeding of the International Conference BIOATLAS*: 94-100.
- [44] Wag S., Chai J., Zhang W., Liu X., Du Y., Cheng Z., Ying X. and Kang T. (2010). HPLC Determination of Five Polyphenols in Rat Plasma after Intravenous Administrating Hawthorn Leavs Extract and Its Application to Pharmacokinetic Study. *Yakugaku Zassi*, vol. 130 (11): 1603-1613.
- [45] Cheng S., Qiu F., Huang J. and He J. (2007). Simultaneous determination of vitexin-299-Oglucoside, vitexin-299-O-rhamnoside, rutin, and hyperoside in the extract of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.) leaves by RP-HPLC with ultraviolet photodiode array detection. *Journal of Separation Science*, vol. 30: 717-721.

[46] Bernatoniene J., Kucinskaite A., Masteikova R., Kalveniene Z., Kasparaviciene G. and Savickas A. (2009). The comparison of anti-oxidative kinetics in vitro of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn. *Acta Poloniae Pharmaceuticae-Drug Research*, vol. 66 (4): 415-421.

[47] Zhang Z., Chang Q., Zhu M., Huang Y., Ho W. and Chen Z. (2000). Characterization of antioxidants present in hawthorn fruits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 12 (3): 144-152.

[48] Fleming, T. (2000). *Physician Desk Reference for Herbal Medicine*. Second edition. New Jersey. Medical Economics Co.: 271.

[49] Palaghiciuc G., Baciuc I., Mihai F., Lazar P. (2009). Influence of Irradiation Treatment on Antioxidant Compounds from Echinacea species. *Revista de Chimie*, vol. 60 (10): 1000-1005.

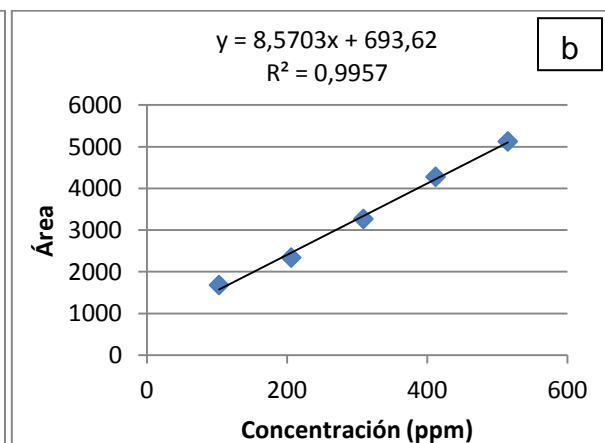
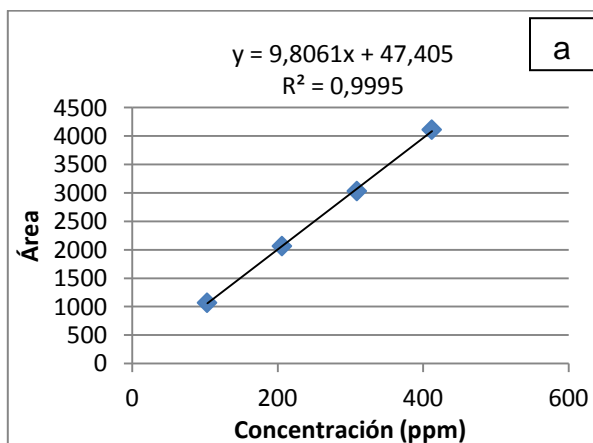
9. Apéndices.

Apéndice 1: Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de los metabolitos secundarios.

- *Hydrastis canadensis*

Tabla 15: Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de berberina en *Hydrastis canadensis*.

Patrón	Concentración (ppm)	Áreas de los picos del densitograma		
		Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	103 ± 2	1071,2951	1684,3296	4771,6574
2	206 ± 2	2067,6022	2343,8816	5929,3074
3	309 ± 3	3035,6086	3270,4487	7070,1861
4	412 ± 3	4115,3814	4281,2193	7976,9468
5	515 ± 4	-	5129,3871	9341,8638



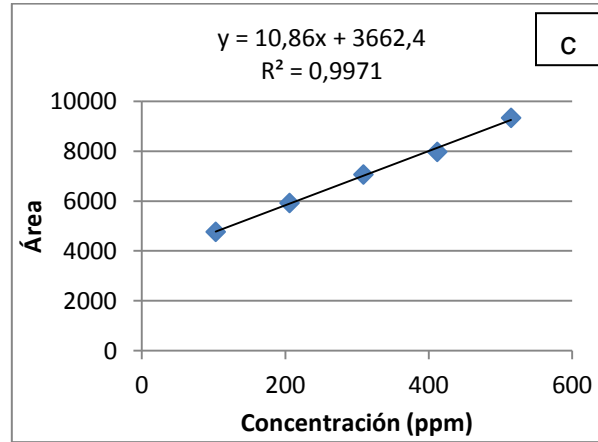


Figura 22: Curvas de calibración para el análisis de berberina en *Hydrastis canadensis* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

- ***Crataegus oxycantha***

Tabla 16: Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de rutina en *Crataegus oxycantha*.

Patrón	Concentración real (ppm)	Áreas de los picos del densitograma		
		Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	309 ± 3	3105,5509	4519,9296	3563,9021
2	412 ± 3	4034,4903	5198,2418	4648,2367
3	515 ± 4	4834,6018	6052,4288	5843,3544
4	618 ± 5	5840,6863	6939,8362	6547,4448
5	721 ± 6	6684,5937	7752,7387	7519,6502

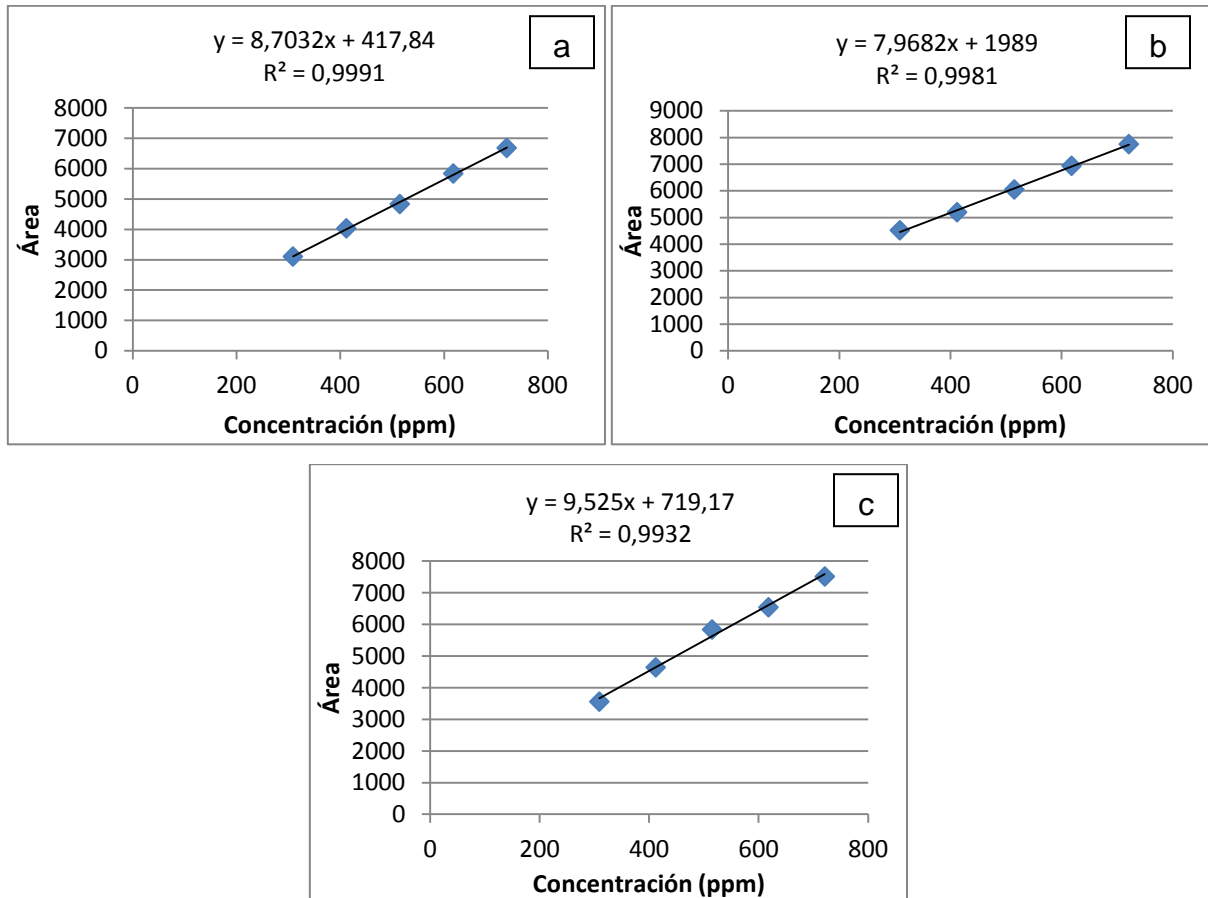
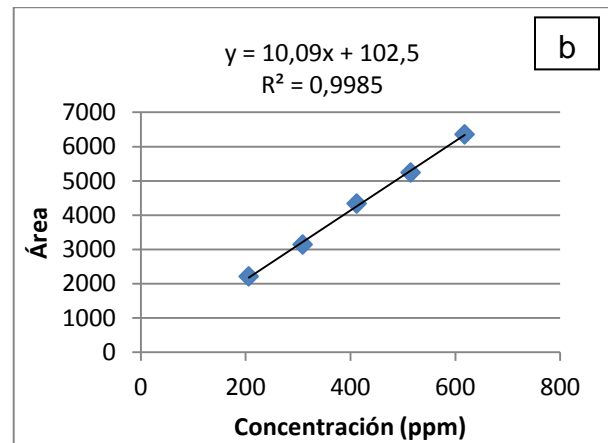
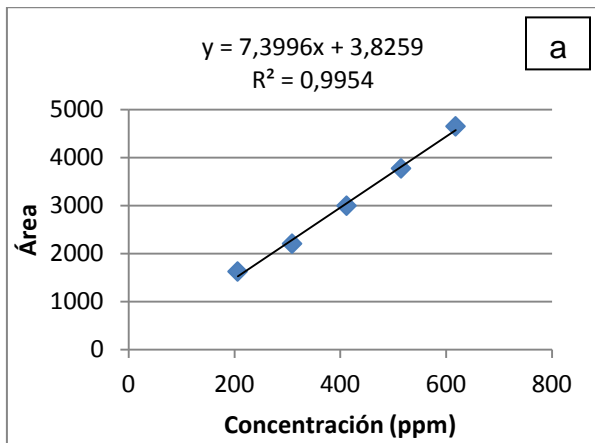


Figura 23: Curvas de calibración para el análisis de rutina en *Crataegus oxycantha* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

- *Echinacea purpurea*

Tabla 17: Datos empleados para construir las curvas de calibración en el análisis de rutina en *Echinacea purpurea*.

Patrón	Concentración real	Áreas de los picos del densitograma		
		Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	206 ± 2	3105,5509	4519,9296	3563,9021
2	309 ± 3	4034,4903	5198,2418	4648,2367
3	412 ± 3	4834,6018	6052,4288	5843,3544
4	515 ± 4	5840,6863	6939,8362	6547,4448
5	618 ± 5	6684,5937	7752,7387	7519,6502



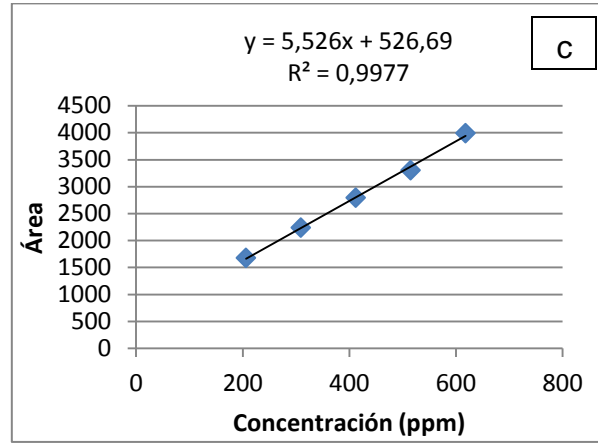


Figura 24: Curvas de calibración para el análisis de rutina en *Echinacea purpurea* de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

Apéndice 2: Curvas de calibración empleadas para la determinación de la exactitud del método.

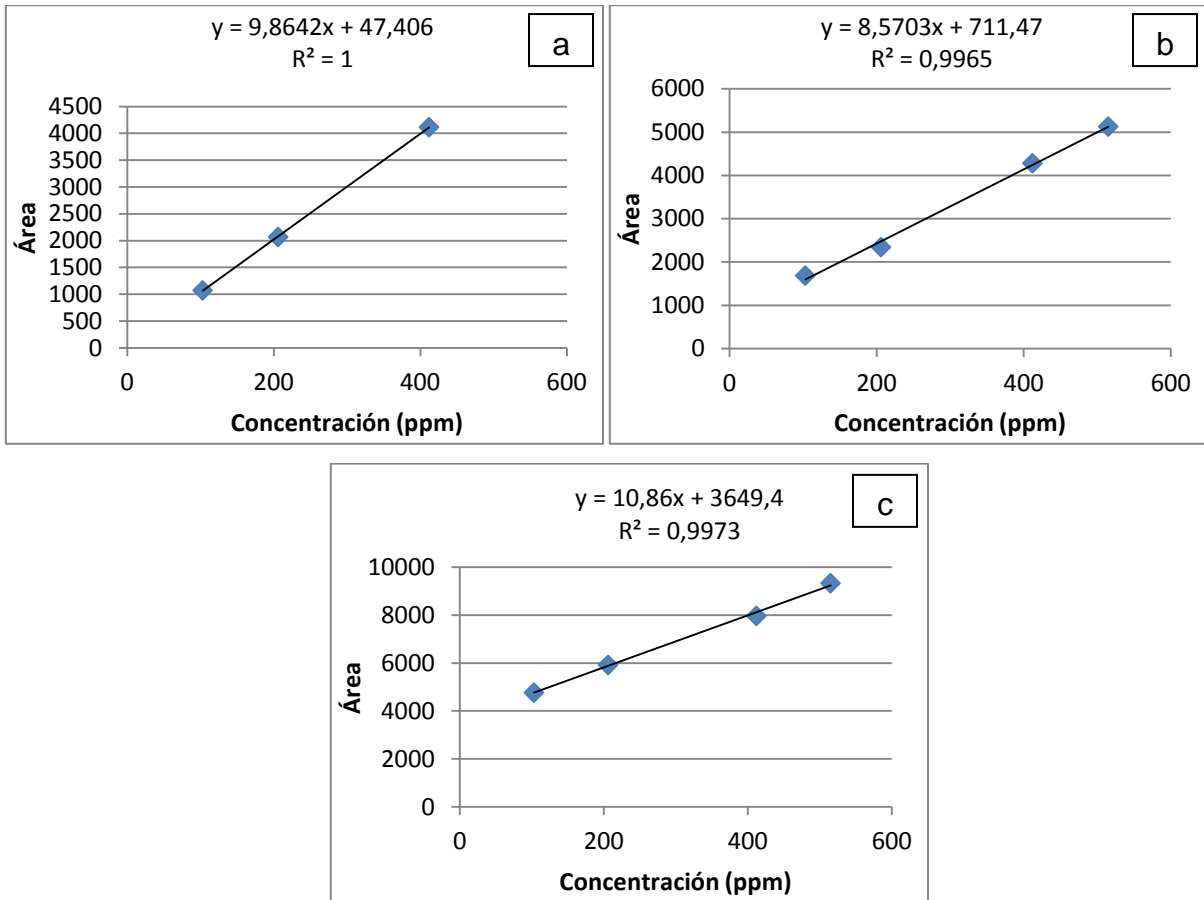


Figura 25: Curvas de calibración para el análisis de exactitud de berberina en *Hydrastis canadensis*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

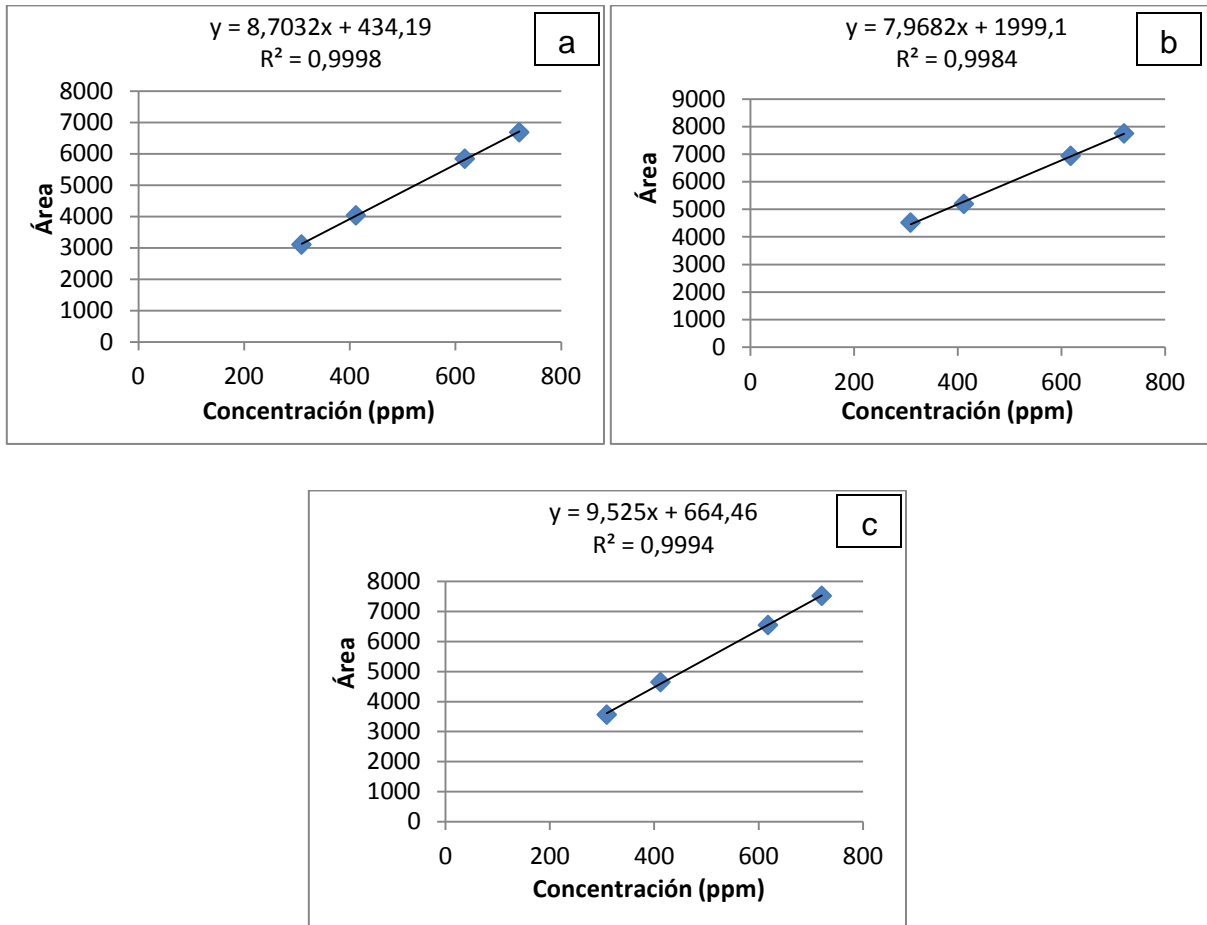


Figura 26: Curvas de calibración para el análisis de exactitud de rutina en *Crataegus oxyantha*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

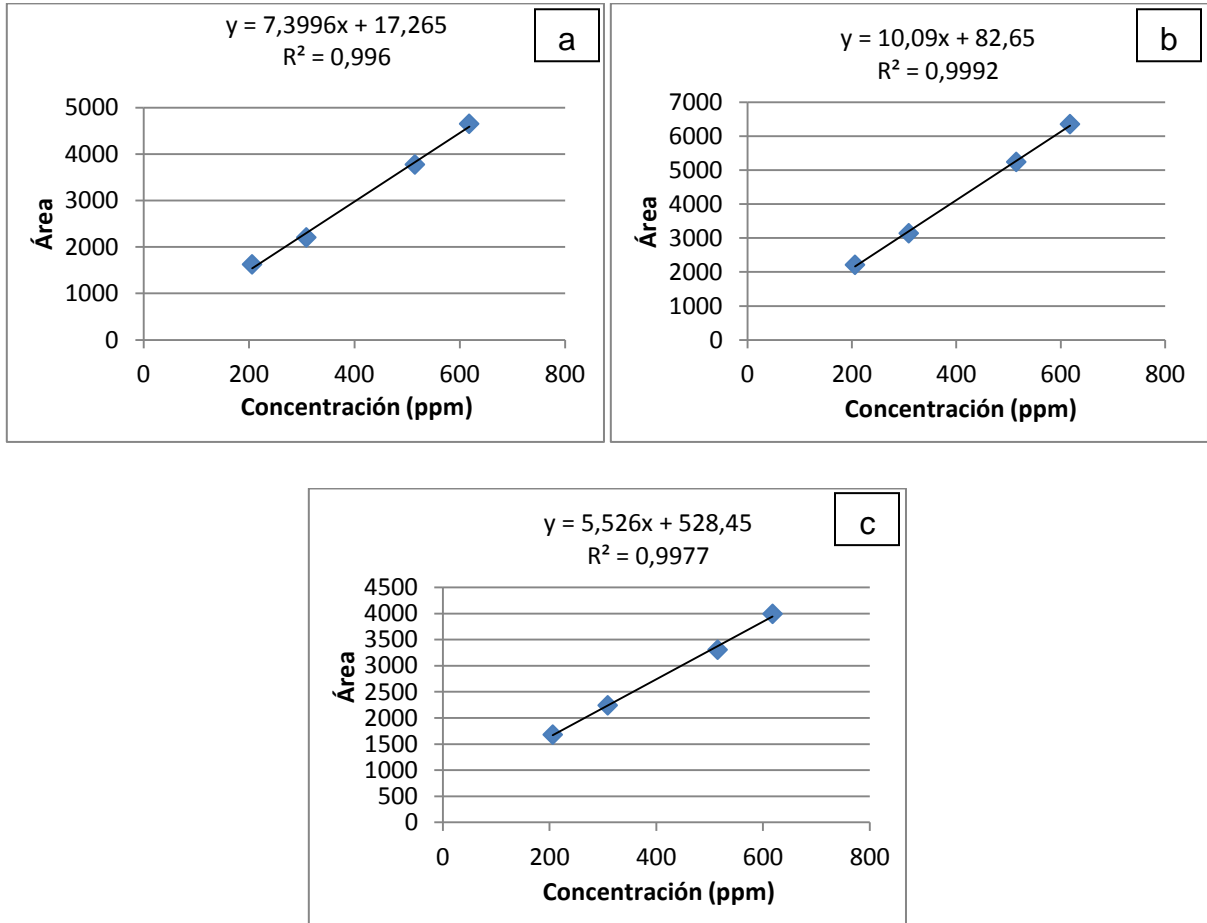


Figura 27: Curvas de calibración para el análisis de exactitud de rutina en *Echinacea purpurea*, de las placas a) 1; b) 2 y c) 3.

Apéndice 3: Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis cuantitativo.

Tabla 18: Áreas de los picos de berberina de los densitogramas de *Hydrastis canadensis*.

Muestra	Áreas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	2447,0809	3185,0333	6713,0766
2	2486,8487	-	6669,3234

Tabla 19: Áreas de los picos de rutina de los densitogramas de *Crataegus oxycantha*.

Muestra	Áreas		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	4272,5814	5604,5576	4867,7528
2	4368,0501	5922,7836	5099,1922

Tabla 20: Áreas de los picos de rutina de los densitogramas de *Echinacea purpurea*.

Muestra	Área picos de rutina en las muestras		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3
1	2149,9825	2818,3464	2191,8912
2	2152,9650	2714,9341	2306,5124

Apéndice 4: Fotos de las placas empleadas en cuantificación de los metabolitos estudiados.

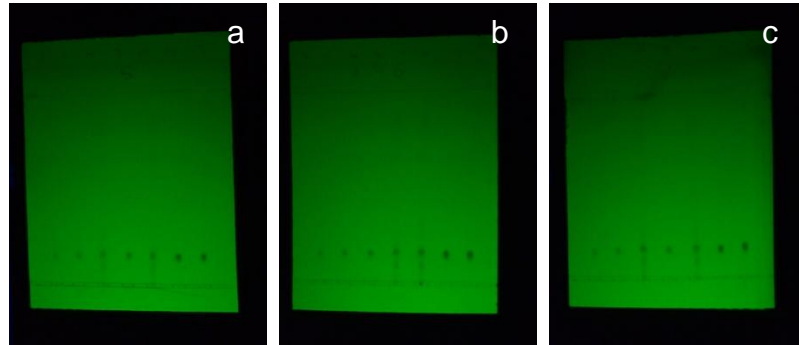


Figura 28: Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*.

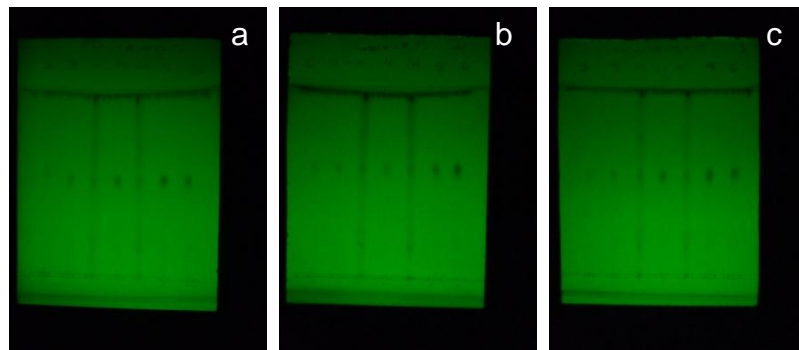


Figura 29: Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de rutina en *Crataegus oxycantha*.

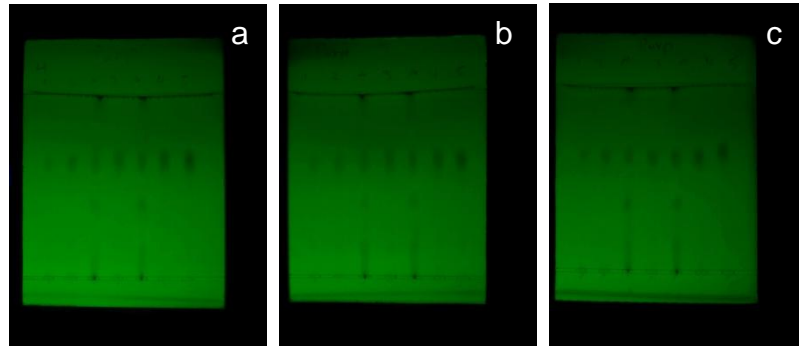
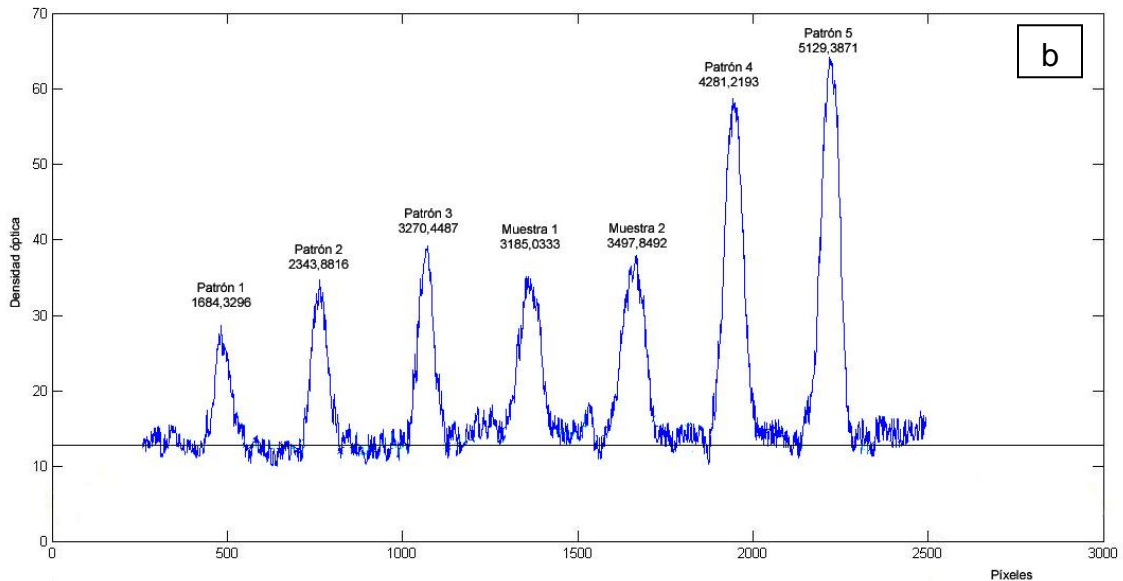
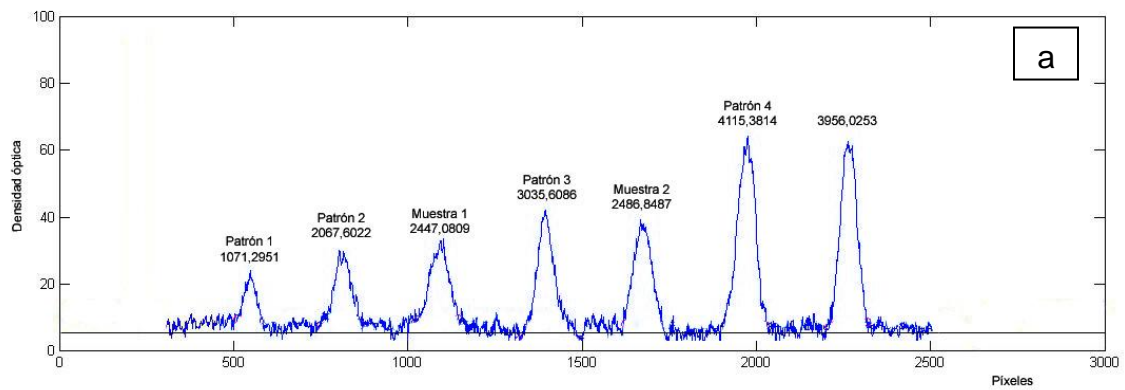


Figura 30: Fotografías de las placas a) 1, b) 2 y c) 3; empleadas para la cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*.

Apéndice 5: Densitogramas empleados en la cuantificación de los metabolitos en las plantas estudiadas.

Los densitogramas se editaron eliminando la señal producida por el soporte donde se encontraba la placa, se añadió una línea base, se reescribió los valores de las áreas y se indicó los picos correspondientes a cada patrón y muestra.



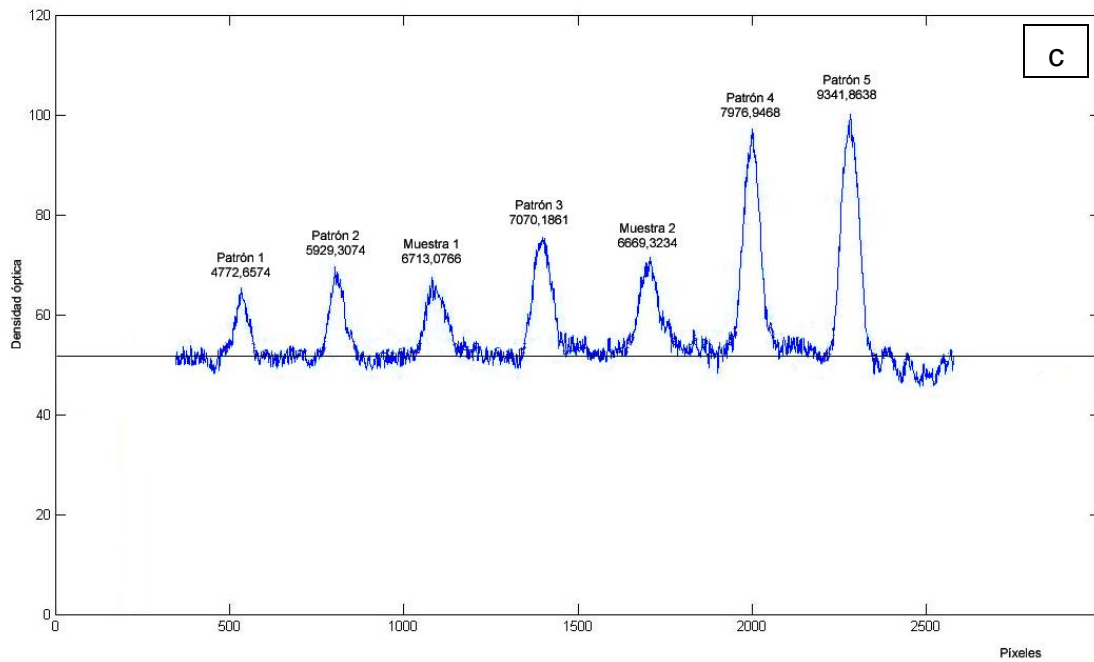


Figura 31: Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de berberina en *Hydrastis canadensis*.

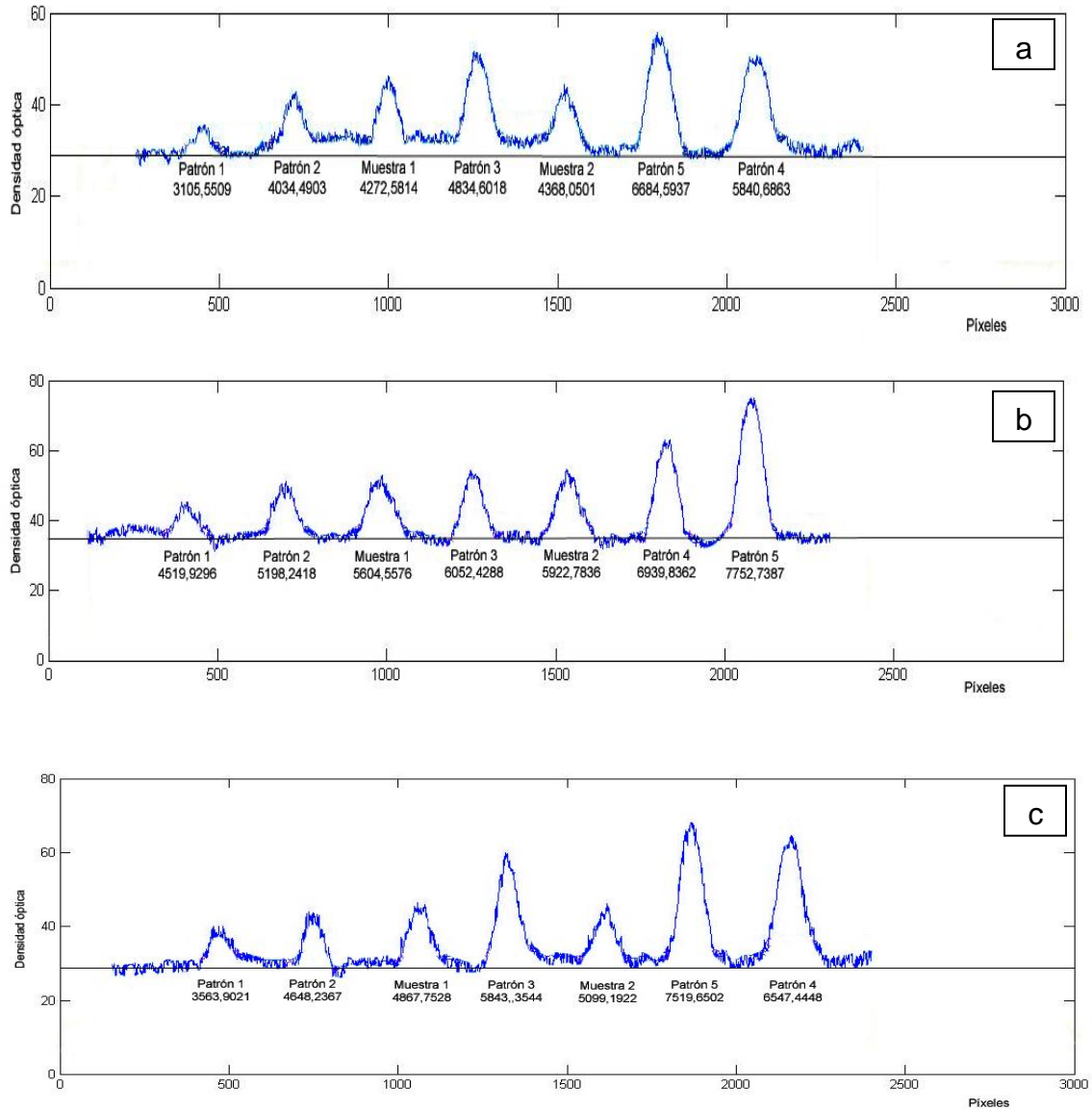
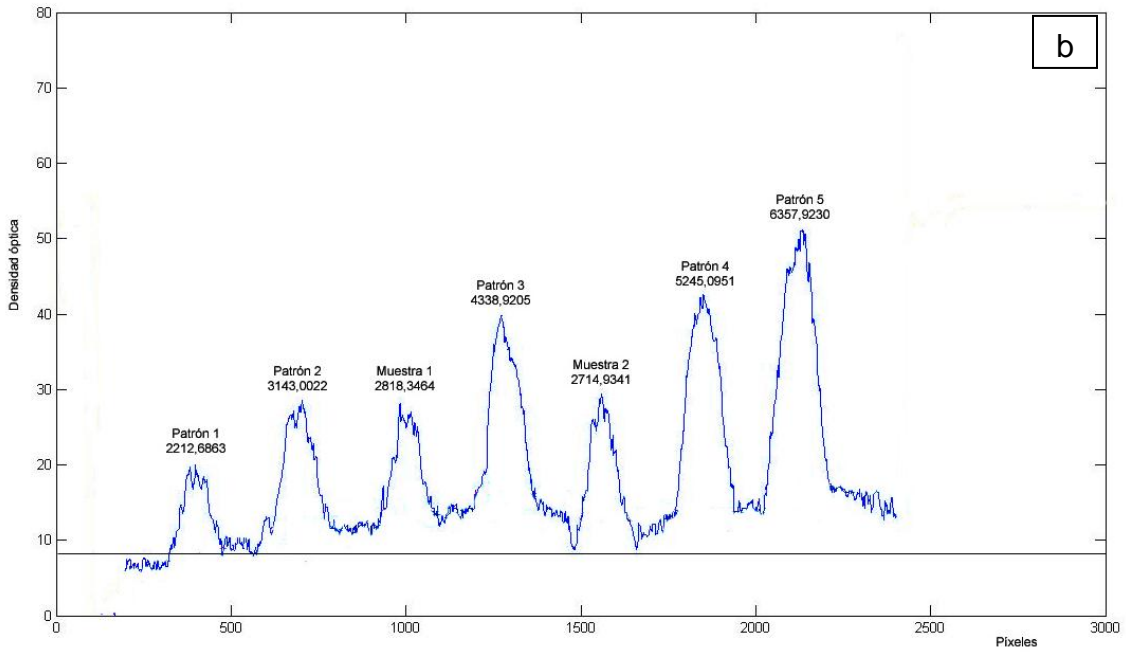
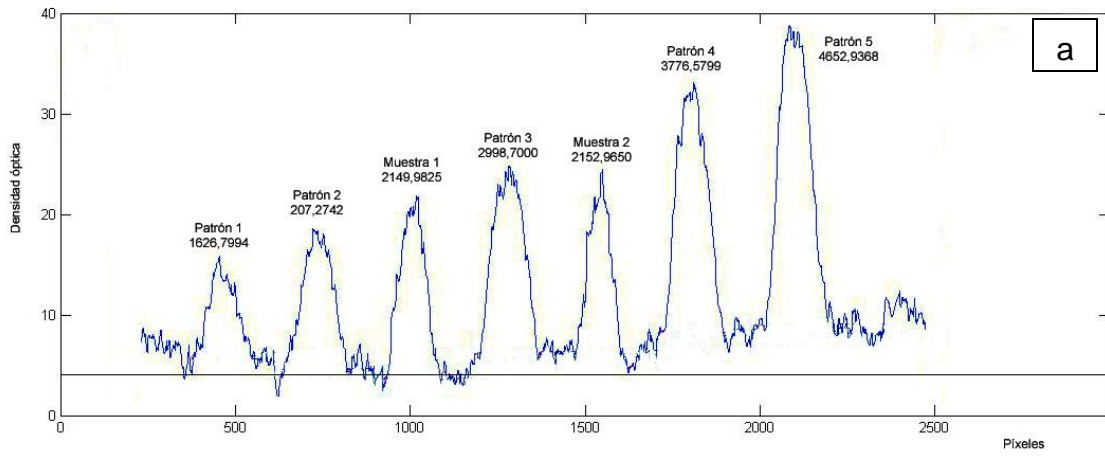


Figura 32: Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de rutina en *Crataegus oxycantha*.



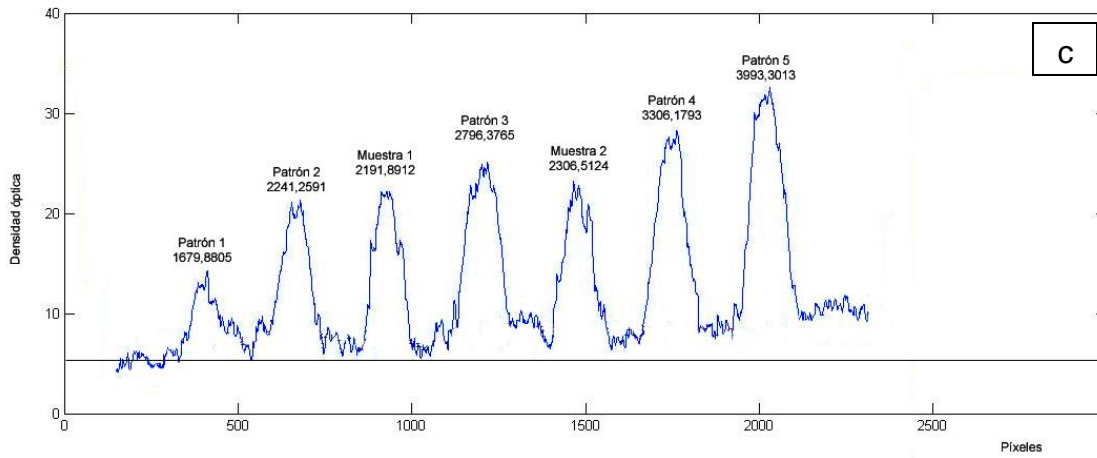


Figura 33: Densitogramas de las placas a)1, b)2 y c)3, empleadas para la cuantificación de rutina en *Echinacea purpurea*.

Apéndice 6: Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis de reproducibilidad.

Tabla 21: Áreas de los picos de los metabolitos en los densitogramas empleados para el análisis de reproducibilidad.

Placa	Área				
	<i>Hydrastis canadensis</i> (14150 ppm)	<i>Hydrastis canadensis</i> (7075 ppm)	<i>Hydrastis canadensis</i> (3538 ppm)	<i>Crataegus Oxycantha</i>	<i>Echinacea purpurea</i>
2	4578,1522	1883,3006	936,2165	3433,8937	3809,8748
	4646,7867	1941,4222	938,8521	3102,3610	3872,6424
3	4458,1622	1927,9825	1021,3669	3066,2271	3896,2773
	4776,6209	1926,1014	974,5508	3160,6257	3956,0985
5	4365,6050	1916,8075	927,6990	3298,9630	3574,3315
	4925,9209	1978,0679	966,8008	3244,6072	3844,4850
6	4577,1850	1980,4342	985,1488	3107,8234	3761,4531
	4982,0960	1870,0882	962,0847	3269,9834	4094,8424
Promedio	4663,8161	1928,0256	964,0900	3210,5606	3851,2506
Des. Estándar	216,8220	39,4914	30,6666	124,1949	150,8644
CV (%)	4,65	2,05	3,18	3,87	3,92

Apéndice 7: Fotos de las placas utilizadas en el análisis de reproducibilidad.

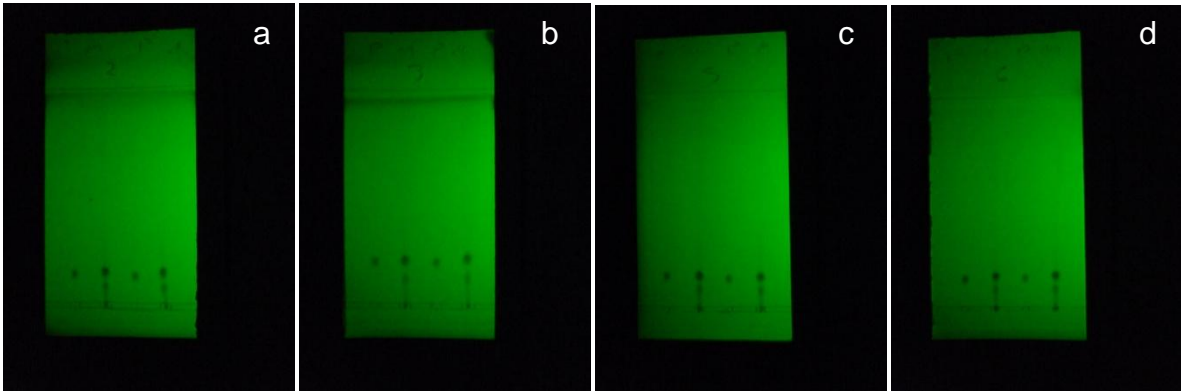


Figura 34: Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3 y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 14150 ppm.

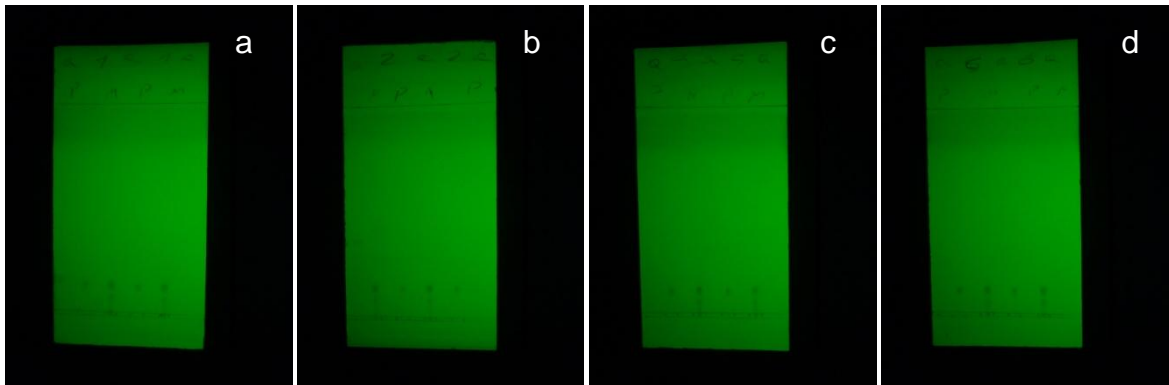


Figura 35: Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 7075 ppm.

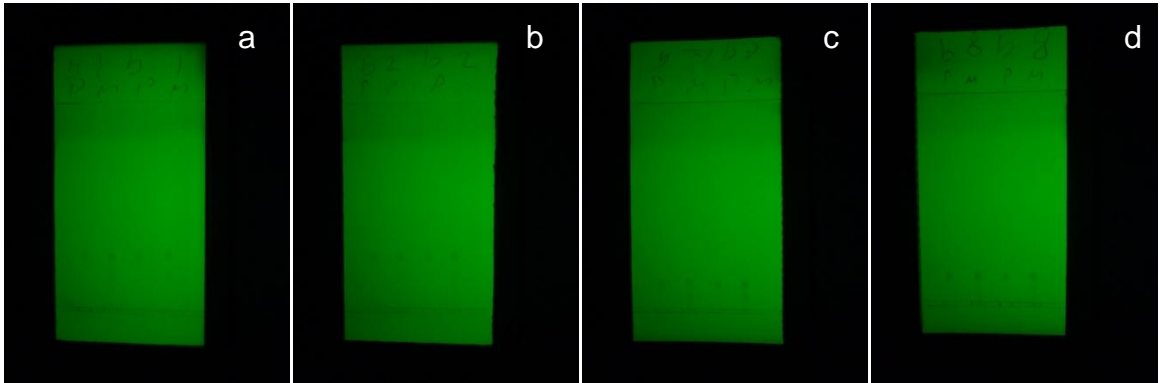


Figura 36: Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* de 3538 ppm.

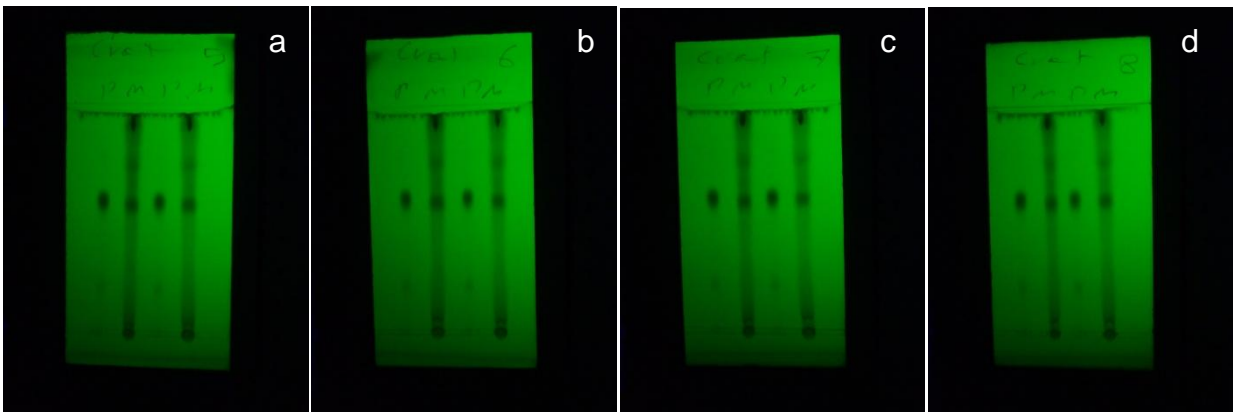


Figura 37: Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Crataegus oxycantha*.

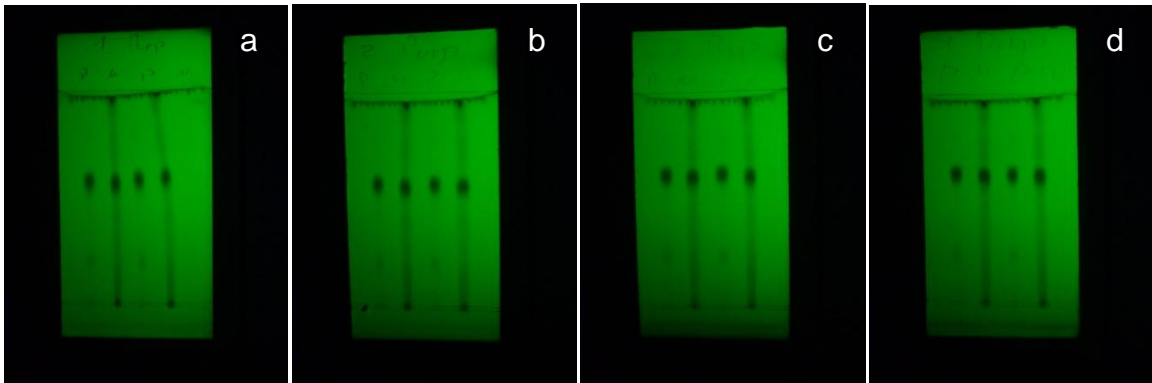
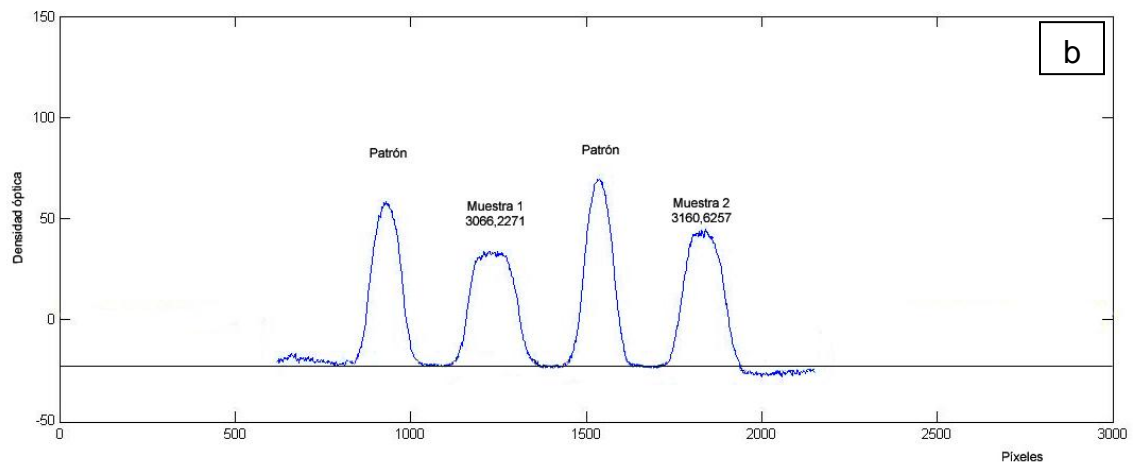
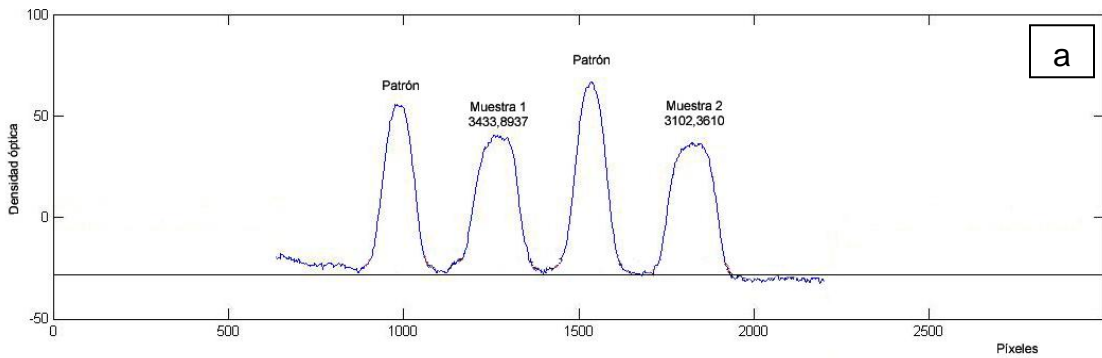


Figura 38: Fotografías de las placas a) 1, b) 2, c) 3, y d) 4; empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Echinacea purpurea*.

Apéndice 8: Densitogramas utilizados en el análisis de reproducibilidad.

Los densitogramas se editaron eliminando la señal producida por el soporte donde se encontraba la placa, se añadió una línea base, se reescribió los valores de las áreas y se indicó los picos correspondientes a cada patrón y muestra.



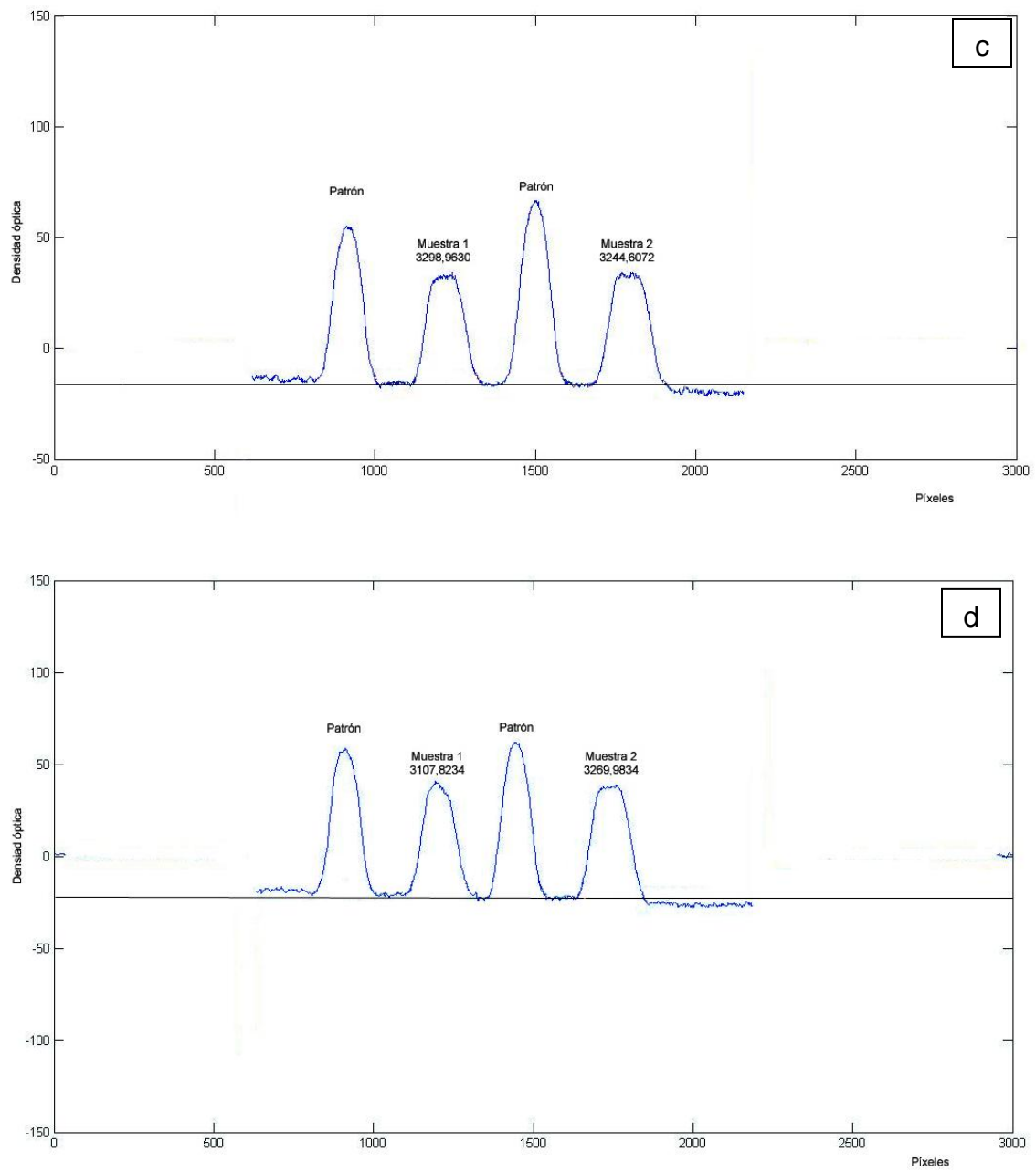
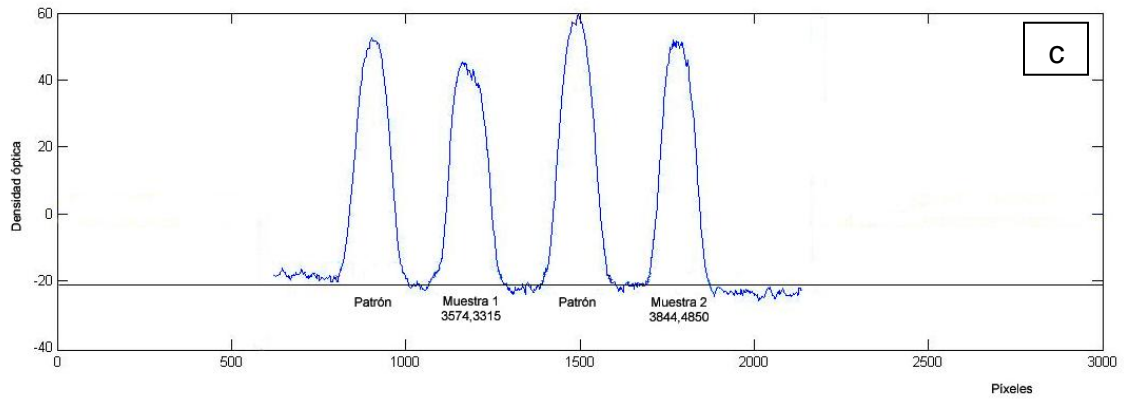
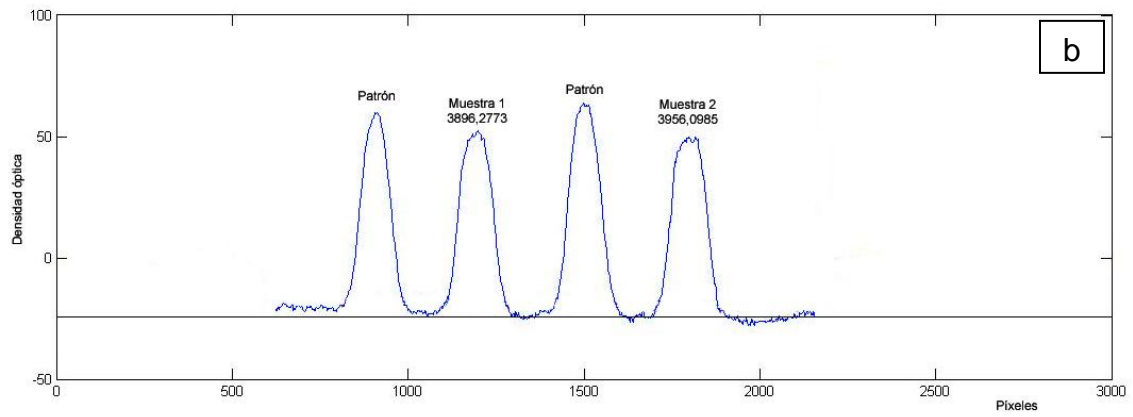
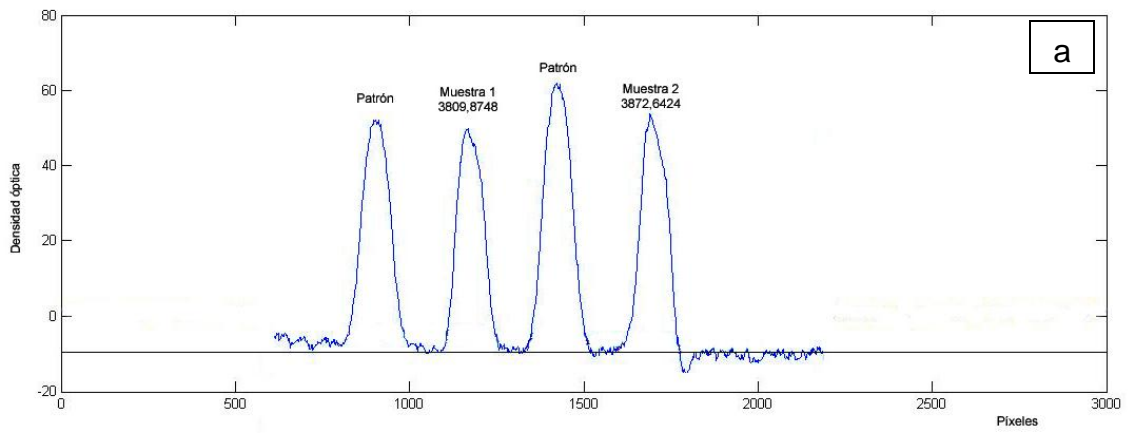


Figura 39: Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Crataegus oxycantha*.



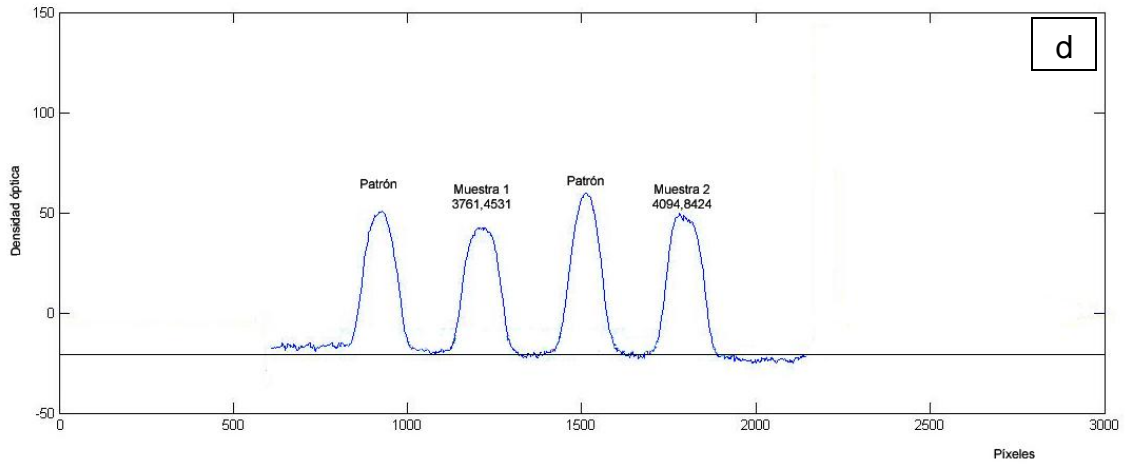
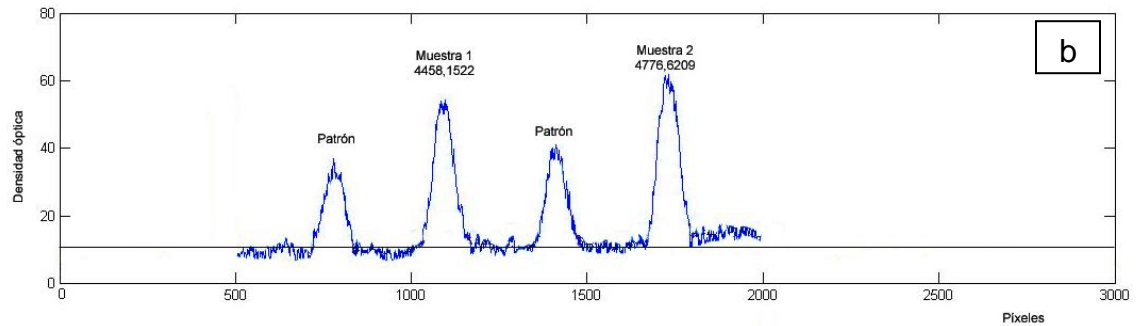
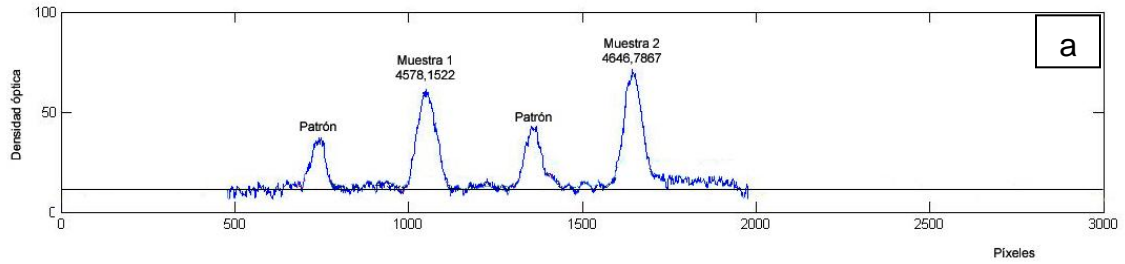


Figura 40: Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de rutina en *Echinacea purpurea*.



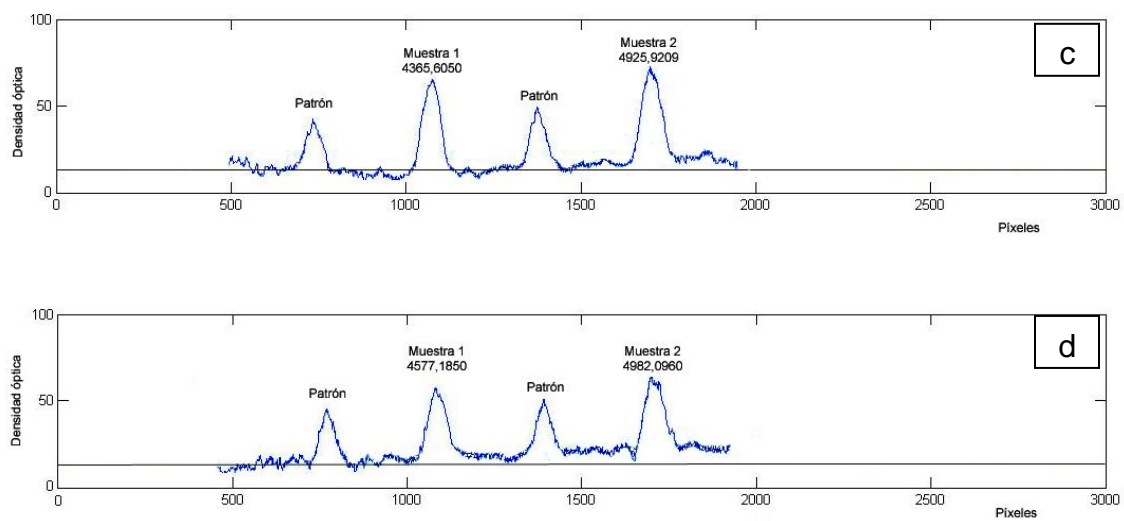
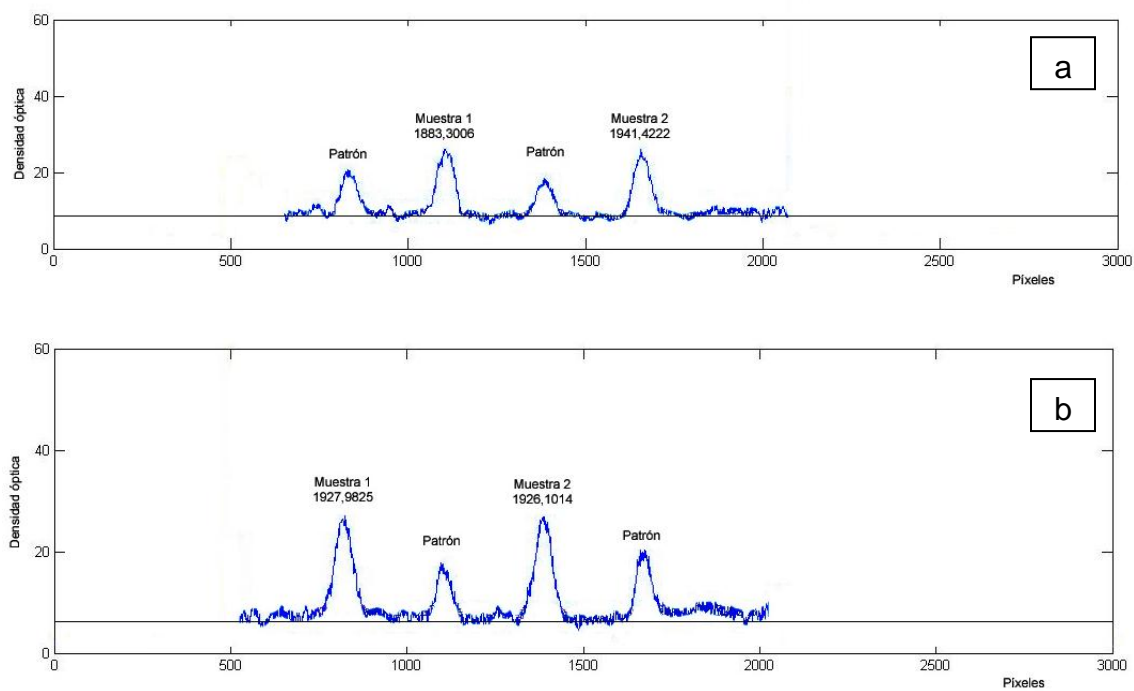


Figura 41: Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (14150 ppm).



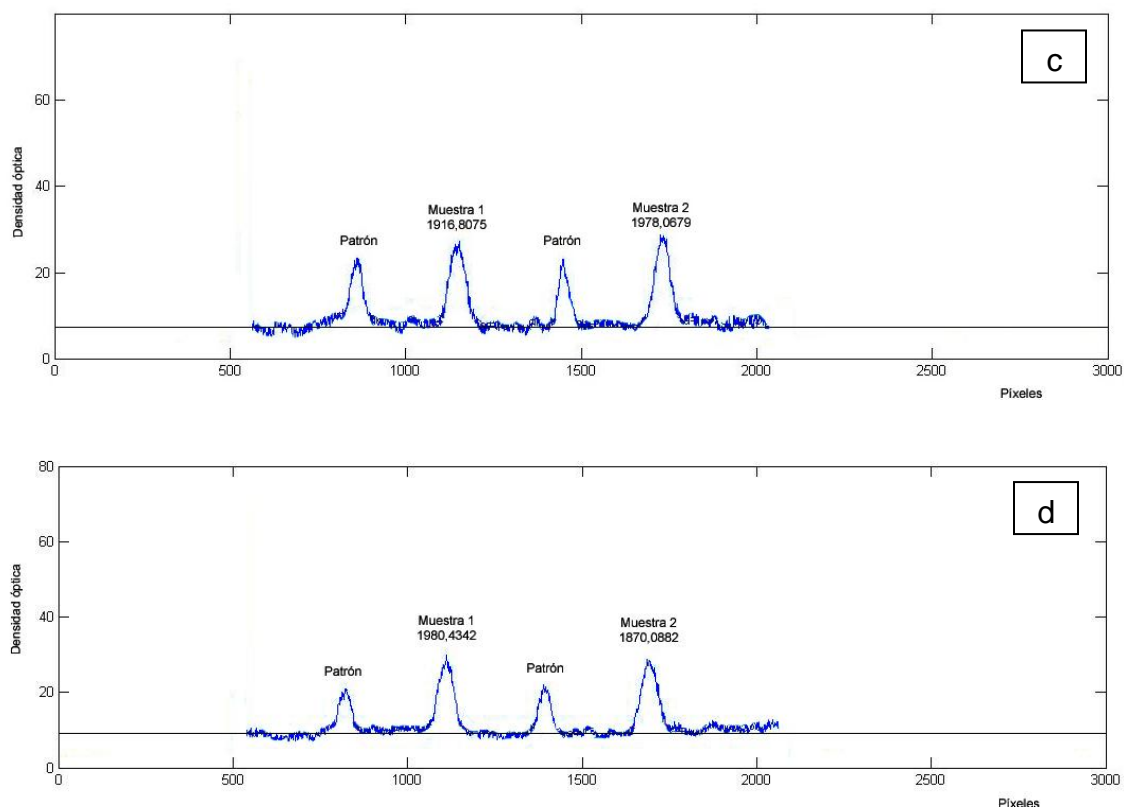


Figura 42: Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (7075 ppm).

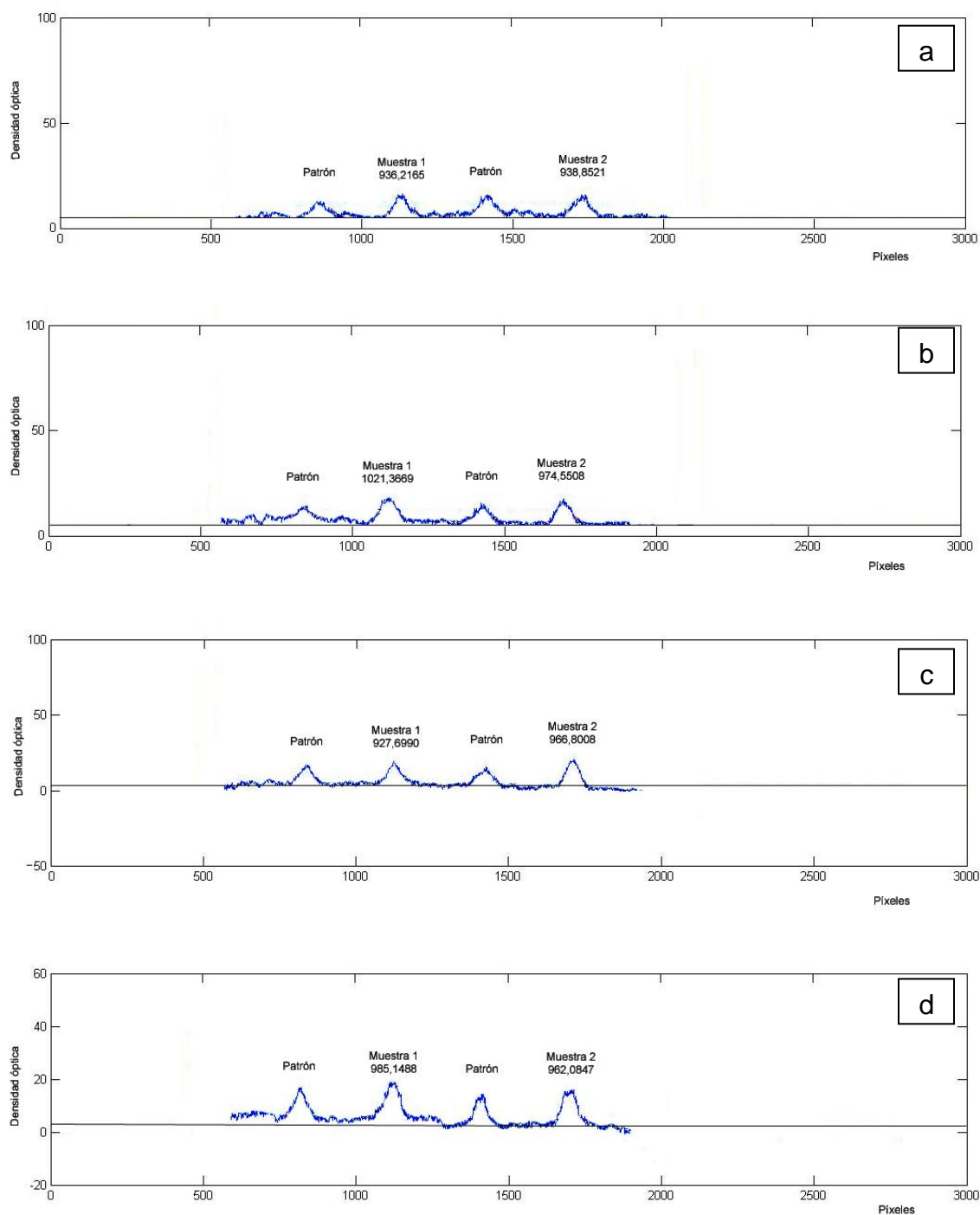


Figura 43: Densitogramas de las placas a)1, b)2, c)3 y d)4, empleadas para el análisis de reproducibilidad de berberina en *Hydrastis canadensis* (3538 ppm).