

FACULTAD DE CIENCIAS
TRABAJO FIN DE GRADO

Estudio para la determinación de polygodial y
estigmasterol en especies vegetales:
Philodendron Bipinnatifidum y *Polygonum
Punctatum*



Universidad de Valladolid

AUTORA:

Verónica Martín Hernández

TUTORES:

Dr. Luis Debán Miguel

Universidad de Valladolid, Departamento de Analítica

Dra. Gloria Arminda Resquín Romero

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay, Departamento de
Fitopatología

Agradecimientos

Las muestras analizadas para este TFG fueron obtenidas en Paraguay, dentro del programa PACID de la Universidad de Valladolid.

Primeramente, agradecer a mi tutor por haberme proporcionado los medios necesarios para la realización del trabajo, así como sus consejos durante la duración de este.

De igual manera, agradecer a Francisco de la Rosa y a Rosario Gómez por proporcionarme la ayuda necesaria.

Por último, gracias a Rubén y Javier por sus apreciaciones a lo largo del trabajo.

Índice general

1. Resumen/Abstract	5
2. Introducción	7
2.1. Descripción de los ejemplares vegetales estudiados	8
2.1.1. <i>Philodendron Bipinnatifidum</i>	8
2.1.2. <i>Polygonum Punctatum</i>	9
2.2. Descripción de los analitos estudiados	11
2.2.1. Stigmasterol	11
2.2.2. Polygodial	12
2.3. Antecedentes bibliográficos	12
3. Objetivos y Plan de Trabajo	15
4. Procedimiento Experimental	17
4.1. Material	17
4.2. Equipos	17
4.3. Reactivos	18
4.4. Obtención de la muestra	18
4.5. Toma y preparación de muestras	19
4.5.1. Extracción en Soxhlet	19
4.5.2. Extracción por maceración	20
4.5.3. Preparación de las disoluciones patrón de Polygodial y Stigmasterol	20
4.6. Técnicas de análisis	21

4.6.1. Espectroscopia molecular UV-Visible	21
4.6.2. Cromatografía líquida HPLC	21
4.6.3. Cromatografía de gases	21
4.7. Experimentación	22
4.7.1. Espectroscopia UV-Visible	22
4.7.2. HPLC con detector UV-Vis	22
4.7.3. Cromatografía de gases, detector FID	25
5. Resultados y discusión	31
5.1. Cromatografía líquida de alta resolución	31
5.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama	33
6. Conclusiones	41
Bibliografía	43
Anexos	44

Índice de figuras

2.1. Área geográfica de <i>Philodendron Bipinnatifidum</i>	8
2.2. <i>Philodendron Bipinnatifidum</i>	9
2.3. Área geográfica de <i>Polygonum Punctatum</i>	10
2.4. <i>Polygonum Punctatum</i>	10
2.5. Estigmasterol	11
2.6. Polygodial	12
4.1. Coordenadas de la toma de la muestra	19
4.2. Extracción mediante Soxhlet de la muestra	20
4.3. Espectro de absorción del estigmasterol. Patrón de 10 mg/l	22
4.4. Patrón de Estigmasterol de 10 ppm	23
4.5. Cromatograma de extracto de <i>P. Bipinnatifidum</i> ampliado	23
4.6. Patrón estigmasterol 100 ppm, fase móvil 95 % acetonitrilo, 5 % metanol	24
4.7. Extracto de <i>P. Bipinnatifidum</i>	25
4.8. Cromatograma patrón polygodial	26
4.9. Cromatograma extracto en hexano de <i>P. punctatum</i>	27
4.10. Cromatograma extracto en metanol mediante Soxhlet de <i>P. punctatum</i>	28
4.11. Cromatograma extracto en metanol mediante maceración de <i>P. punctatum</i>	28
4.12. Cromatograma extracto en metanol observando la degradación de <i>P. punctatum</i>	29
4.13. Cromatograma extracto en diclorometano de <i>P. punctatum</i>	29
5.1. Recta de calibrado mediante el método de patrón externo para el Estigmasterol	32

5.2. Gráfica de los residuales de la regresión del método de patrón externo para el estigmasterol	32
5.3. Recta de calibrado mediante el método de adiciones patrón para el Estigmasterol .	33
5.4. Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón para el Estigmasterol	33
5.5. Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en hexano	34
5.6. Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en hexano	34
5.7. Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en metanol	35
5.8. Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en hexano	35
5.9. Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en metanol	36
5.10. Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en metanol mediante macerado	37
5.11. Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en diclorometano	38
5.12. Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en metanol mediante macerado	38

Índice de tablas

2.1. Resumen bibliográfico de distintos métodos de separación y cuantificación del estigmasterol	13
4.1. Resumen de distintas fases móviles en columna C18	22
4.2. Resumen de distintas fases móviles en columna altamente polar	24
4.3. Fases móviles empleadas para la separación del extracto en una columna apolar	25
4.4. Resumen de las distintas rampas del CG-FID para el patrón de polygodial	26
5.1. Tabla patrón externo estigmasterol	31
5.2. Tabla adiciones patrón estigmasterol	32
5.3. Tabla adiciones patrón en hexano	34
5.4. Tabla adiciones patrón en metanol	35
5.5. Tabla adiciones patrón en metanol	36
5.6. Tabla adiciones patrón en diclorometano	37
5.7. Comparativa extracción en Soxhlet	38
5.8. Comparativa extracciones mediante maceración	39

Lista de abreviaturas

- CECTEC: Centro de Educación, Capacitación y Tecnología Campesina
- CG: Cromatografía de gases
- CG-MS: Cromatografía de gases con detector de masas
- EC₅₀: half maximal effective concentration.
- FID: Detector de ionización de llama
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
- HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución con detector fotodiodo array y ultravioleta
- HSV: Herpes Simplex Virus
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
- IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
- LOD: Límite de detección
- LOQ: Límite de cuantificación
- MIC: minimal inhibitory concentration
- RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Capítulo 1

Resumen/Abstract

En el presente trabajo, se ha realizado un estudio para la determinación de polygodial y stigmasterol, compuestos de origen biológico, mediante cromatografía de gases con detector de ionización a la llama y de líquidos con detector ultravioleta-visible. Estos compuestos se encuentran presentes en diversas especies vegetales, y pueden ser empleados de forma medicinal o como controladores biológicos, sobre todo en algunas zonas de Latinoamérica. Primeramente, se ha procedido a tratar de optimizar un proceso de extracción con distintos disolventes (metanol, etanol, diclorometano y hexano) para, a continuación, realizar un estudio sobre patrones y extractos a fin de establecer las condiciones óptimas de medida, tanto para GC como para HPLC. Por último, se han realizado determinaciones en muestras de plantas: *Philodendron Bipinnatifidum* y *Polygonum Punctatum*, recogidas en Paraguay. Los resultados obtenidos corroboran la existencia de estos compuestos en las plantas, representando un porcentaje entre el 0,1 % y el 0,01 % del peso total de cada una de ellas.

Abstract

In this work, there has been made a study about the determination of polygodial and stigmasterol which are biological compounds through gas chromatography with flame ionization detector and high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible absorbance detector. These compounds are found in diverse vegetal species and could be used in a medicinal way or as biological controllers, especially in some places in Latin-America. First, it has proceeded to try to optimize an extraction procedure with different solvents (methanol, ethanol, dichloromethane and hexane) to, then, perform a study in standard patron and herbal extracts to establish the optimal conditions of measure for both CG and HPLC. Finally, it was determined in plants: *Philodendron Bipinnatifidum* and *Polygonum Punctatum*, picked in Paraguay. The results obtained confirm the existence of this compounds in each one of them.

Capítulo 2

Introducción

Es innegable que muchos vegetales presentan actividad farmacológica y ha sido durante muchos siglos la principal fuente para elaborar productos con capacidad curativa, ya que se mantiene en el acervo popular, como puede ser el ejemplo del ácido salicílico, presente en las hojas y corteza de sauce. En el caso del que versa este trabajo, se abordará el uso de los vegetales como controladores biológicos de plagas en determinadas zonas de América del Sur y la identificación de alguno de sus principios activos.

Los agrosistemas -es decir, los ecosistemas agrícolas- son ecosistemas frágiles por definición, puesto que el equilibrio existente entre las especies se rompe. En este tipo de ecosistemas la variedad de especies (tanto vegetales como animales) es muy limitada por lo que es fácil que aparezcan plagas al eliminarse la competencia natural entre especies. Para combatir las plagas tradicionalmente se han empleado plaguicidas e insecticidas. Sin embargo, están surgiendo nuevas tendencias para combatir las plagas más respetuosas para con el medio ambiente, como son los controladores biológicos.

Se definen los controladores biológicos como el conjunto de métodos que hacen intervenir a los seres vivos o productos derivados de ellos para reducir o suprimir las pérdidas causadas por las especies perjudiciales para el hombre, sus cultivos o sus animales domésticos [1]. Lo que se pretende con estos métodos no es la completa erradicación de la plaga, sino mantener las poblaciones causantes del daño en un umbral de actividad con el fin de reducir las pérdidas.

El uso de los controladores biológicos de plagas presenta altas expectativas en lo tocante al desarrollo de los cultivos, sobre todo desde el punto de vista de la agricultura ecológica, donde se promueven prácticas agrícolas basadas en el uso de fertilizantes y pesticidas de origen natural, en sistemas de policultivos excluyendo los monocultivos de gran extensión que por ser agroecosistemas más frágiles. Actualmente la agricultura ecológica representa una alternativa real en la producción agrícola mundial con cerca de 60 millones de hectáreas, destinadas a este tipo de producción y alrededor de tres millones de productores, con un comercio valorado en 100.000 millones de dólares [2].

Un ejemplo de este tipo de controladores son biológicos los que han sido objeto de este trabajo. Estas especies, son usadas por los agricultores paraguayos como método insecticida y repelente de insectos, empleándose o bien en solitario, o bien una mezcla de varios vegetales. También ofrecen la ventaja de que, al ser especies vegetales comunes que crecen de forma silvestre en la zona de estudio, son accesibles y económicas para el campesinado más pobre.

2.1. Descripción de los ejemplares vegetales estudiados

Los controladores biológicos que se han estudiado son las especies *Philodendron bipinnatifidum* y *Polygonum Punctatum*, ya que con estos ejemplares se ha trabajado en cultivos agroecológicos. Ambos vegetales difieren mucho entre sí, tanto en sus características físicas observables como en su forma de reproducción, ya que, de hecho, ni tan siquiera pertenecen a la misma clase de la división angiosperma, puesto que el ejemplar *Philodendron Bipinnatifidum* pertenece a las monocotiledóneas y el ejemplar *Polygonum Punctatum* pertenece a la clase II o dicotiledóneas.

2.1.1. *Philodendron Bipinnatifidum*

Esta especie vegetal se localiza en el continente sudamericano entre los meridianos 41^o y 58^o de longitud Oeste y los paralelos 20^o y 27^o de latitud Sur. Dicha zona abarca la provincia de misiones (Argentina), el sur de Brasil y todo Paraguay (exceptuando los departamentos de Alto Paraguay y Boquerón), [3] como puede verse en la figura 2.1. Esta planta se conoce comúnmente con los nombres de *güembé*, *imbé* o *banana-de-macao*, siendo los dos últimos siendo exclusivos de la zona brasileña.



Figura 2.1: Área geográfica de *Philodendron Bipinnatifidum*

La especie *Philodendron Bipinnatifidum* pertenece a la familia de las Araceae. Es una planta perenne que contiene látex en su interior y puede medir hasta 1,5 metros de altura. El tallo arborecente puede medir hasta unos 18 cm de diámetro. Las hojas presenta una forma ovalada, semejante a la forma de un corazón y están subdivididas en pequeños gajos o pinnatifidos. Son hojas flexibles pero con cierta resistencia, y miden de largo entre 10 a 100 cm y de ancho de 300-70 cm. Los pinnatifidos a su vez presentan un borde dentado [3]. Ejemplificando esta descripción, se puede observar la especie estudiada en la figura 2.2.

Recientemente, ya han sido identificados diversos compuestos presentes en la planta tales como stigmasterol o β -sitosterol [4].



Figura 2.2: *Philodendron Bipinnatifidum*

Usos medicinales

Los usos medicinales de la planta son conocidos desde hace casi un siglo. Ya se documentó en 1931 como los indios canigüá empleaban las hojas como antiséptico [3] y en Brasil, la planta en su totalidad se emplea para combatir úlceras, reumatismo y orquitis, así como aplicado en la curación de heridas [5].

Usos en la agricultura

Las hojas de *Philodendron Bipinnatifidum* se emplean como insecticida tanto en la provincia de Misiones (Argentina) así como en Paraguay. La forma de empleo más antigua documentada consiste en triturar la hoja y esparcir los fragmentos en el suelo y sirve para combatir piques (*Tunga penetrans*), pulgas (*Siphonaptera*), nigüas (*Sarcpsilla penetrans*) y algunos otros insectos [3].

También se ha observado *in situ* su uso en el terreno, bien empleando extractos solamente de la planta o bien en combinación con extractos de otras plantas.

2.1.2. *Polygonum Punctatum*

Esta planta se localiza en hábitats húmedos, tales como humedales o en la proximidad de los ríos. Su distribución geográfica es amplia pues puede encontrarse en prácticamente la totalidad del continente americano y en diversos países asiáticos, como se muestra en la figura 2.3.

Este vegetal alcanza una altura de 1,5 metros de alto, El tallo es simple de color verde rojizo, agudizándose los tonos rojos de este al secarse. Las hojas pueden medir hasta 16 cm de largo y con forma de punta de lanza. Las flores se agrupan en racimos de hasta 8 cm de largo y son pequeñas y de color blanquecino [27]. Es una planta de baja altura (aproximadamente 50 cm de alta), con hojas alargadas de unos 2 cm de largo y con forma de lanza. El tallo presenta un color verde-rojizo, agudizándose el color rojo al secarse. Las flores son de color blanco brillante. Estos

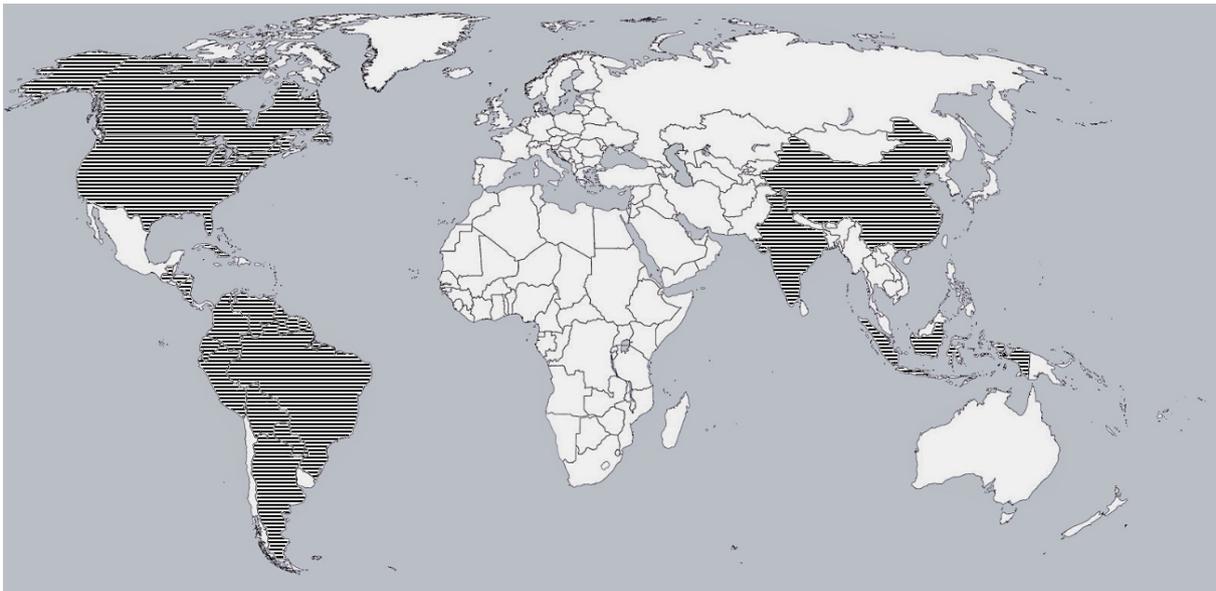


Figura 2.3: Área geográfica de *Polygonum Punctatum*

detalles pueden observarse en la figura 2.4.

Esta planta presenta un sabor picante, lo cual hace que en guaraní esta hierba sea conocida como *Kaá'tai* o en Argentina con el nombre de Vinagrillo.



Figura 2.4: *Polygonum Punctatum*

En la actualidad, el total de compuestos identificados en esta planta asciende a dos: polygodial [6] y β -sitosterol [7].

Usos medicinales

Esta planta se emplea en el tratamiento de diversas enfermedades e infecciones. Su uso para el tratamiento de enfermedades de forma tradicional se encuentra ampliamente documentado, puesto que tanto las tribus preexistentes en Latinoamérica como los criollos que llegaron con

la colonización empleaban infusiones de las partes aéreas de las plantas para el tratamiento de hemorroides, como desinfectante aplicándose sobre heridas abiertas o como antiinflamatorio [8], [9], [10].

Extractos mediante maceración en diclorometano de la planta presentan actividad frente a diversos microorganismos, inhibiendo el crecimiento de estos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* mientras que los extractos en metanol presenta actividad solo contra *Bacillus subtilis*. Dicha planta no solo presenta actividad antimicrobiana, sino que extractos metanólicos del vegetal muestran actividad anti-HSV [11].

Extractos en diclorometano de esta planta también presentan actividad antifúngica frente a *C.sphaerospermum* [6].

Usos en la agricultura

Al igual que el ejemplar anterior, esta planta se emplea también como un biodefensor en diversos cultivos en Paraguay, enmarcados en el ámbito de la agroecología, aunque su uso todavía es limitado.

2.2. Descripción de los analitos estudiados

2.2.1. Estigmasterol

Este compuesto pertenece a la familia de los fitoesteroles y su nombre mediante la nomenclatura de la IUPAC es (3S, 10R, 13R)-17-((2R,5S,E)-5-etil-6metilhepten-3-il) -10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17 -tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ol, pero nos referiremos a lo largo de este trabajo por su nombre más común, estigmasterol (figura 2.5). Su peso molecular es de 412,37 g/mol y en estado sólido es un sólido blanco.

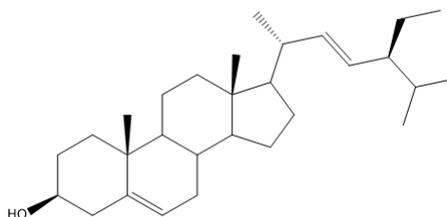


Figura 2.5: Estigmasterol

Este compuesto orgánico, se encuentra presente en numerosas especies vegetales, ya que la familia de los fitoesteroles es común a todos los vegetales, lo único que varía entre cada planta es la cantidad de fitoesteroles de cada tipo. Recientemente se está investigando el efecto de este compuesto frente a diversos tipos de cáncer, como el cáncer gástrico [12]. También se ha estudiado la actividad inhibidora de hormonas tiroideas (T_4) cuando se aplica sobre organismos vivos [13].

2.2.2. Polygodial

La nomenclatura IUPAC de esta molécula es (1R, 8aS)-5,5,8a-trimetil-1,4,5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno-1,2-dicarbaldehído y su fórmula química es $C_{15}H_{22}O_2$ aunque se denomina polygodial (figura 2.6). Su peso molecular es de 234,34 g/mol. En estado sólido, presenta un color amarillo claro-beis.

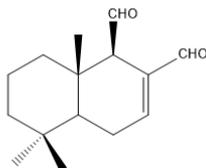


Figura 2.6: Polygodial

Este sesquiterpeno dialdehído se encuentra en una gran variedad de plantas, como es el caso de la familia *Polygonaceae* a la que pertenece la especie *Polygonum Punctatum*.

Esta molécula orgánica presenta actividad repelente frente a áfidos (insectos de la familia *Aphidoidea*) [14], [15], no solo actuando como repelente, sino que también mata a las larvas de estos empleando disoluciones con concentraciones mayores o iguales a 40 ppm, convirtiendo a este compuesto en un insecticida más potente que el conocido DEET [16].

En diversos ensayos biológicos, el polygodial se ha sido visto como un prometedor antifúngico frente a hongos filamentosos como pueden ser *Sacharomices Cerevisiae* y *Candida albicans* y se ha comprobado que es más potente frente a estos que otros antibióticos, tales como actinomycin D, rifampicin y amphotericin B, siendo el MIC del polygodial de 1,56 $\mu\text{g/ml}$ frente al hongo *S. cerevisiae* [19].

Adicionalmente, presenta actividad antihelmíntica frente a *C. elegans* con un $EC_{50} = 13,1 \pm 5,3 \mu\text{M}$. Diversos estudios han demostrado que es un inhibidor de la movilidad de las larvas de la especie *Trichostrongylus soluriformis* (un nemátodo parásito de las ovejas) presentando un $IC_{50} = 0,07 \text{ mg/ml}$ [18].

2.3. Antecedentes bibliográficos

En lo referente al estigmasterol, la bibliografía, relativa a su identificación y cuantificación es extensa. Las columnas empleadas para ello son apolares (C18) o de una polaridad intermedia (C8), y las fases móviles empleadas son muy variopintas como se ve resumido en la tabla 2.1.

Columna	Fase móvil	Referencia bibliográfica
C8	Metanol 86 %, agua 14 %	[20]
	88 % metanol, 12 % agua	[21]
	metanol 95 % agua 5 %	[22]
C 18	70 % acetonitrilo 30 % metanol	[23]
	amonio acetato en agua	[24]
	90 % metanol, 10 % acetonitrilo	[25]
	50 % acetonitrilo, 50 % agua	[26]

Tabla 2.1: Resumen bibliográfico de distintos métodos de separación y cuantificación del estigmasterol

Los antecedentes bibliográficos del polygodial presentan un número menor, y, se centran en la observación mediante técnicas más novedosas, como el CG-MS. De forma general, se suele emplear una rampa desde 70°C hasta 200 °C de 10°C/min, empleando como gas portador He [19], [17] y la identificación del compuesto se realiza por comparación con bibliografía existente.

Capítulo 3

Objetivos y Plan de Trabajo

El objetivo del presente trabajo consiste en la determinación de los compuestos de polygodial y estigmasterol en plantas, concretamente en los ejemplares *P. Punctatum* y *P. Bipinnatifidum* cuyos compuestos presentan actividad farmacológica y pesticida, comentada en el capítulo anterior. Ambos compuestos orgánicos fueron extraídos a través de dos técnicas: el método Soxhlet y mediante maceración del vegetal en disolventes orgánicos. La identificación de dichas moléculas y, posterior cuantificación de las mismas se realizó poniendo a punto dos métodos distintos para cada uno de ellos; el estigmasterol se identificará y cuantificará por medio de HPLC-UV/Vis y el polygodial mediante CG-FID.

Para la consecución de los objetivos se analizarán los patrones en diversas condiciones en cada uno de los equipos disponibles, así como los extractos en varias condiciones para obtener la mejor separación de las moléculas orgánicas a analizar.

Capítulo 4

Procedimiento Experimental

4.1. Material

- Botes de plástico (45 y 100 ml)
- Equipo de extracción Soxhlet
- Filtro de papel gravimétrico
- Filtro de jeringa 25mm 0,45 μ m
- Filtro de jeringa 25mm 0,22 μ m
- Matraces Erlenmeyer (100 ml)
- Matraces volumétricos (5 ml, 10 ml, 25 ml, 100 ml)
- Pipetas (1ml, 2 ml, 5 ml, 10ml y 25ml)
- Vasos de precipitados (50 ml, 100 ml y 250 ml)
- Viales de 10 ml
- Viales para cromatografía de gases

4.2. Equipos

Los equipos empleados en la elaboración de este trabajo de investigación se localizan en el departamento de analítica de la Universidad de Valladolid y son los siguientes:

- Balanza Analítica de precisión 0,00001g
- Columna del gases BP-20
- Columna del HPLC C18 5.0 de longitud 150 x 4,6 mm.
- Columna del HPLC de CN 5.0 longitud 250 x 4,6 mm

- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID) Agilent Technologies 6890N
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC con detector ultravioleta visible Agilent Technologies 1200 series
- Espectrofotómetro de UV-Visible Marca HP Hewlett Packard
- Rotavapor

4.3. Reactivos

Reactivos:

- Polygodial $\geq 97\%$ Sigma - Aldrich®
- Stigasterol $\geq 95\%$ Sigma - Aldrich®

Disolventes:

- Acetonitrilo calidad HPLC (pureza $\geq 99,6\%$)
- Agua calidad HPLC (hablar del destilador de agua)
- Diclorometano (pureza $\geq 95\%$)
- Etanol (pureza $\geq 99,5\%$)
- Hexano (pureza $\geq 99,6\%$)
- Metanol (pureza $\geq 95\%$)
- Metanol calidad HPLC (pureza $\geq 99,9\%$)
- Tampón ácido fosfórico

4.4. Obtención de la muestra

Las muestras fueron obtenidas en terrenos pertenecientes a CECTEC ubicado en el departamento de Itapúa, distrito de Edelira de Paraguay durante el mes de noviembre (fecha 15/11/2018), época estival. La identificación de los ejemplares fue realizada sobre en el terreno por la cotutora de este trabajo y fue ratificada en la Universidad Nacional de Asunción, campus de San Lorenzo de dicha universidad. Asimismo, se guardó un ejemplar de herbario por cada una de las plantas en el departamento mencionado con anterioridad.

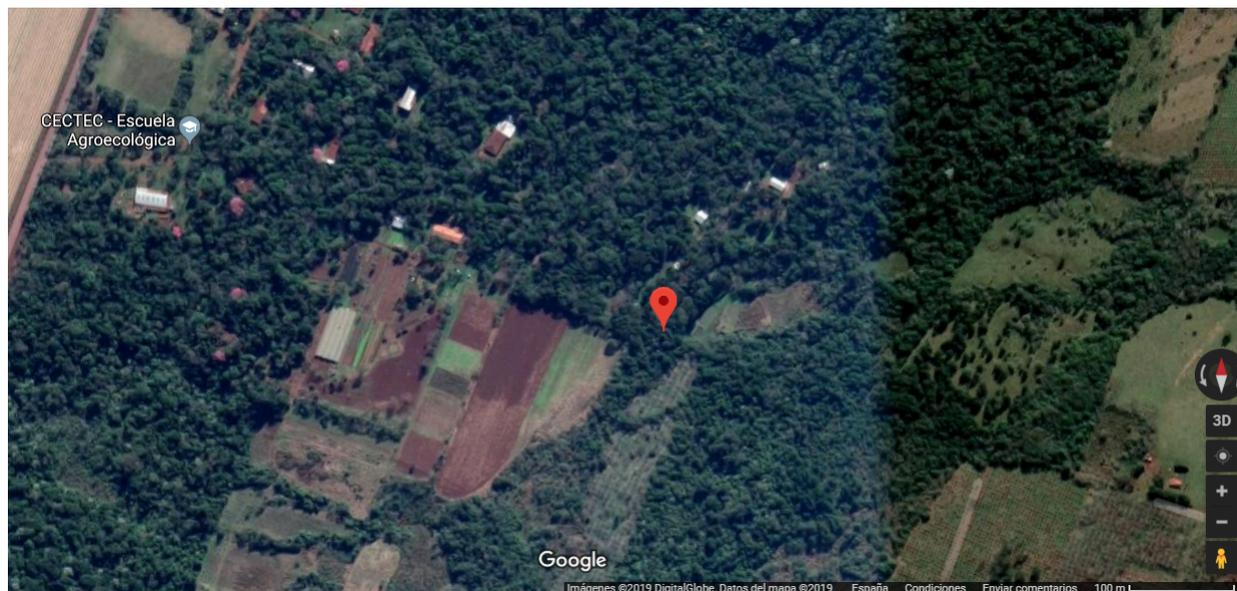


Figura 4.1: Coordenadas de la toma de la muestra

4.5. Toma y preparación de muestras

Las muestras se recogieron en la zona anteriormente indicada en Paraguay. Las dos especies vegetales, fueron cortadas (sólo la parte aérea) a medio día (12 a.m.) para evitar la humedad la acumulación de humedad, y se dejaron secar a temperatura ambiente de unos 30 °C durante 3 semanas. Posteriormente, fueron trituradas en un molino y envasadas en plástico para su posterior transporte a España. En Valladolid, se toma una cantidad representativa de la muestra, se trocea, se trocea, se deja secar a temperatura ambiente de laboratorio 48 horas. A continuación, se pesa una cantidad de alrededor de 5 gramos y del modo conveniente se procede a su tratamiento para la extracción de los compuestos a estudiar.

4.5.1. Extracción en Soxhlet

El método de extracción Soxhlet (figura 4.2) es uno de los tipos de extracción sólido-líquido basado en la diferente solubilidad de los compuestos que componen la matriz sólida, permitiendo así acotar el número de compuestos a extraer por su solubilidad. Este método consiste en realizar una extracción en continuo, favoreciendo así que el disolvente entre mayor número de ocasiones en contacto con el analito, aumentando así la cantidad de analito extraída. En el caso que abarca este trabajo, se prepararon cartuchos de celulosa con cantidades comprendidas entre 4,7 y 5,1 gramos de muestra que fueron situados en el cuerpo del sohxlet, añadiendo disolvente en el matraz inferior que se encuentra en contacto con una fuente de calor. Para evitar la evaporación del disolvente, el cuerpo del Soxhlet se encuentra unido por la parte superior a un refrigerante que condensa el disolvente. Mediante esta técnica se realizaron extracciones con hexano y metanol en el caso de *P. Punctatum* y solo con etanol en el caso de *p. Bipinnatifidum*. El tiempo de extracción fue de 8 horas. El volumen obtenido en los tres casos se llevó a un matraz de 100 ml y se enrasó con el correspondiente disolvente.



Figura 4.2: Extracción mediante Soxhlet de la muestra

4.5.2. Extracción por maceración

Se han realizado extracciones por maceración en diferentes disolventes en ambos ejemplares de plantas. Para ello, se toma una proporción de aproximadamente 5 gramos de material vegetal del ejemplar *P. Puntatum* seco se introdujo en sendos Erlenmeyer a los que se añadieron 100 ml de metanol y diclorometano y, en el caso del vegetal *P. Bipinnatifidum* se tomó una cantidad también en torno a 5 gramos que se introdujo en un vaso de precipitados con un volumen de etanol igual que en el caso anterior y se mantuvo a temperatura ambiente durante 72 horas. Posteriormente se eliminó el disolvente mediante rotavapor para evitar calentar la muestra.

4.5.3. Preparación de las disoluciones patrón de Polygodial y Stigmasterol

Se toman alrededor de 0,010 g de estigmasterol, se disuelve en etanol y la disolución se lleva a un matraz de 100 ml, enrasando con etanol, con lo cual se obtiene una disolución del orden de 100 ppm, a partir de esta y por dilución con etanol se preparan los demás patrones entre 2 ppm y 50 ppm.

Asimismo, se tomaron cantidades del orden de 0,001 g de polygodial que se diluyeron en etanol, en un matraz de 10 ml, obteniéndose una disolución de 100 ppm. El resto de disoluciones patrón de menor concentración se obtuvieron a partir de la dilución de esta primera, estando estas comprendidas en un rango entre 20 ppm y 80 ppm.

4.6. Técnicas de análisis

4.6.1. Espectroscopia molecular UV-Visible

Esta técnica se basa en la medida de la absorbancia de una molécula que se encuentra en el interior de una celda transparente a la longitud de onda de la fuente de luz incidente.

4.6.2. Cromatografía líquida HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución es una modalidad de separación en la cual la fase móvil es líquida pasa a través de la fase estacionaria, sólida o líquida, que está retenida en un recinto cilíndrico (columna). En esta técnica la fase móvil es empujada mediante un sistema de bombeo a través de la columna y, a la salida de esta, la muestra es detectada por el detector correspondiente, en el aparato empleado, es un detector ultravioleta-visible como el empleado en la espectroscopia molecular visible señalada en el apartado inmediatamente superior.

4.6.3. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que la muestra se separa debido a las interacciones que establece la muestra con la fase estacionaria. La principal diferencia con la cromatografía anterior es que la muestra y la fase móvil se encuentra en fase gas e interacciona con una fase estacionaria ligada y entrecruzada con la sílice presente en la fase estacionaria. La muestra se introduce en el portal de inyección donde se volatiliza y es arrastrada por la fase móvil a lo largo de toda la columna, para posteriormente, a la salida de la columna ser detectada.

Detector de ionización a la llama (FID)

El funcionamiento de este detector está basado en la relación que existe entre la conductividad eléctrica de un gas y la concentración de partículas cargadas. La muestra es pirolizada a la salida de la columna mediante una llama formada por una mezcla de aire e hidrógeno. Al combustiónarse la muestra, se generan las partículas cargadas anteriormente que se detectan mediante un picoamperímetro. La magnitud de la corriente es proporcional al número de átomos o partículas cargadas, por lo que este detector produce una señal directamente proporcional a la cantidad de materia introducida. De forma general, presenta elevada sensibilidad, un gran intervalo de respuesta lineal y bajo ruido de fondo, aunque es un detector destructivo con la muestra

4.7. Experimentación

4.7.1. Espectroscopia UV-Visible

Diferentes disoluciones patrón de estigmasterol fueron analizadas por esta técnica con el fin de obtener la longitud de onda de máxima absorbancia. Para ello, se introdujeron en cubetas espectrofotométricas de cuarzo y se realizó un barrido para determinar la longitud de onda de máxima absorción a efectos de los posibles estudio y determinación por cromatografía de líquidos HPLC detector ultravioleta visible. El espectro de absorción se observa en la imagen inferior.

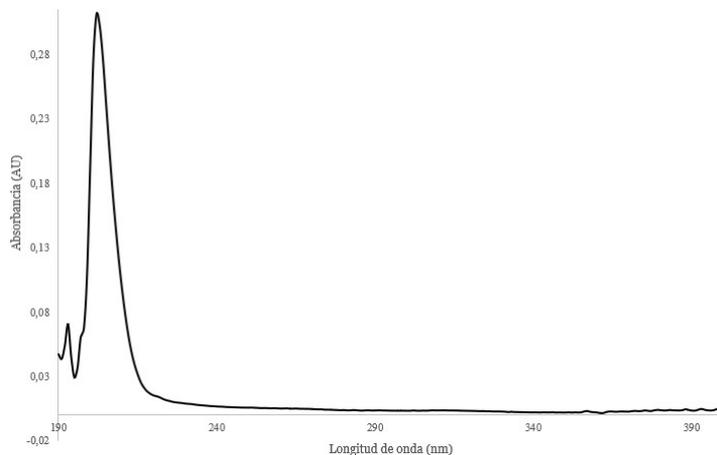


Figura 4.3: Espectro de absorción del estigmasterol. Patrón de 10 mg/l

Como puede observarse en la figura 4.3, la longitud de onda de máxima absorción para el estigmasterol este compuesto corresponde a 205 nm.

4.7.2. HPLC con detector UV-Vis

Se realizó un estudio para disoluciones patrón de estigmasterol en dos columnas, una columna con fase estacionaria apolar y otra altamente polar, para observar cual producía mejores resultados.

Columna con fase estacionaria apolar

Se empleó una columna apolar C18 y se emplearon las fases móviles, reflejadas en la tabla 4.1.

Fase móvil			Tiempo de retención (min)
Acetonitrilo	Metanol	Tampón ácido fosfórico	
70 %	30 %	0 %	30,157
30 %	20 %	1 %	30,112

Tabla 4.1: Resumen de distintas fases móviles en columna C18

Se determinó que la presencia de ácido fosfórico en la fase móvil no afectaba a la resolución del pico ni a la retención del compuesto, puesto que se obtenía en el mismo tiempo de retención. Finalmente, las condiciones óptimas de análisis consta de una fase móvil formada por una mezcla 70% acetonitrilo y 30% metanol en régimen isocrático, flujo de la fase móvil de 1,2 ml/min, temperatura de la columna 25°C, presión media durante la medida de 47 bares.

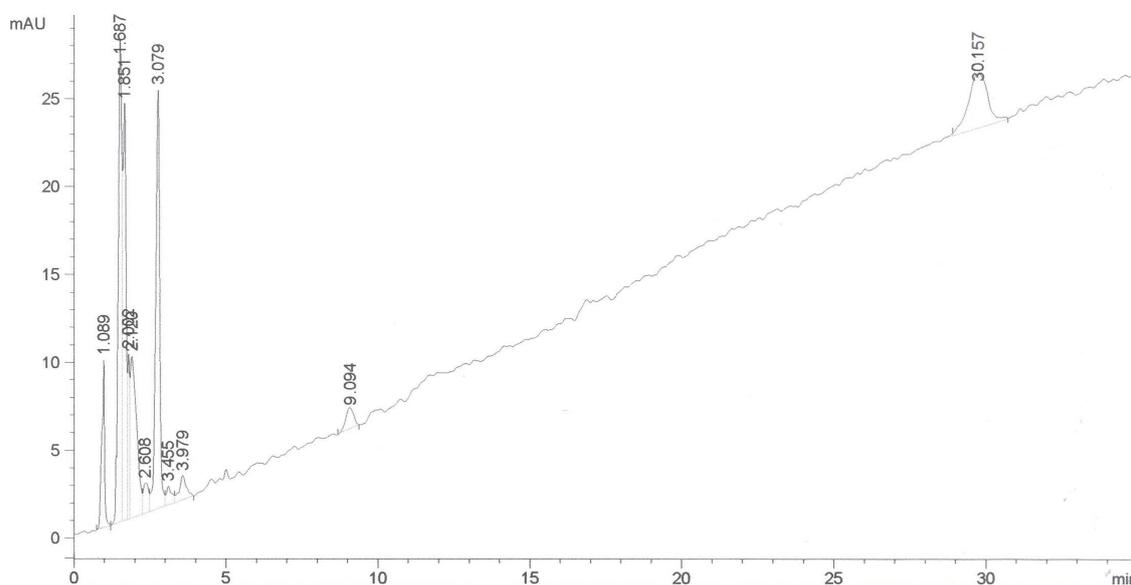


Figura 4.4: Patrón de Estigmasterol de 10 ppm

El tiempo de retención del compuesto de interés con esta fase móvil es de 30 minutos como puede verse en la figura 4.4. Posteriormente se optimizó la separación de los compuestos en el extracto procedente de la planta. Al realizar el análisis del extracto obtenido a partir de la extracción mediante el método Soxhlet, no se observó el compuesto, por lo tanto, los extractos obtenidos mediante este método no pueden cuantificarse. En el extracto obtenido mediante maceración, se observa el pico correspondiente al analito en un tiempo de retención análogo al del patrón, como se refleja en la figura 4.5.

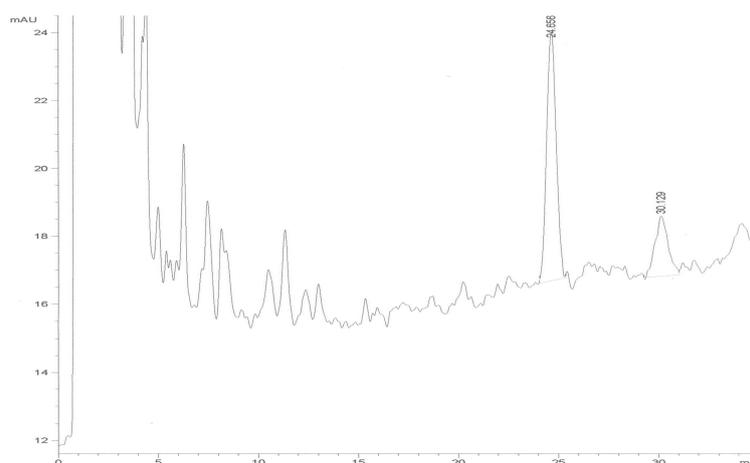


Figura 4.5: Cromatograma de extracto de *P. Bipinnatifidum* ampliado

Por último, y de cara a observar la sensibilidad del método de análisis del compuesto se calculan los límites de detección y cuantificación. El método ya optimizado con la fase móvil oportuna presenta un límite de detección de 0,32 mg/l y un límite de cuantificación entorno a 1 mg/l

Columna con fase estacionaria polar

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio en empleando una columna altamente polar, cuya fase estacionaria está compuesta por grupos ciano monofuncionales anclados a la fase estacionaria. Puesto que la información de la que se disponía es, escasa, se fueron eligieron diversas fases móviles de polaridades diferentes, partiendo de la fase móvil que se había empleado con la columna anterior para comparar la retención entre ambas columnas y, optimizar la fase móvil. Las distintas fases móviles se encuentran resumidas en la tabla 4.2 La fase móvil óptima para el análisis del analito

Fase móvil			Tiempo de retención (min)
Acetonitrilo	Metanol	Agua	
30 %	70 %	0 %	3,65
70 %	30 %	0 %	3,17
30 %	30 %	40 %	3,07
50 %	50 %	0 %	3,39
50 %	0 %	50	5,37
80 %	20 %	0 %	3,17
90 %	0 %	10 %	3,13
95 %	5 %	0 %	3,22

Tabla 4.2: Resumen de distintas fases móviles en columna altamente polar

consiste en una composición 95 % de acetonitrilo y 5 % de metanol, reflejado en la figura 4.6 ya que se obtiene un pico en un tiempo de retención de 4,316 min.

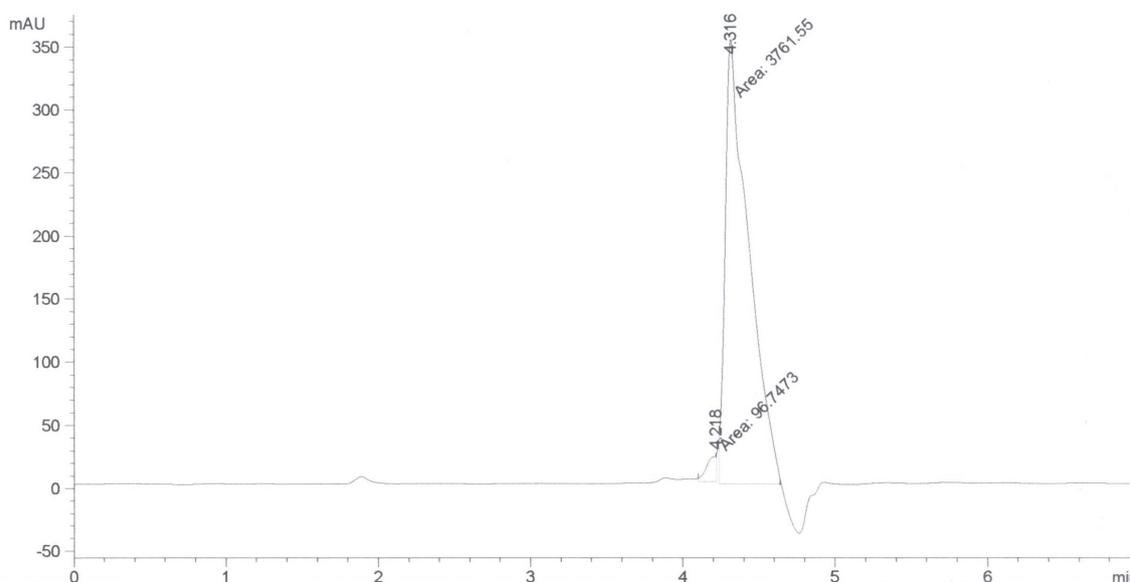


Figura 4.6: Patrón estigmasterol 100 ppm, fase móvil 95 % acetonitrilo, 5 % metanol

Posteriormente se analiza el extracto para lo cual se procede a la optimización de la fase móvil empleada en la fase móvil, resumidas las distintas fases móviles en la tabla 4.3. La fase móvil que presenta mejor resolución es la fase móvil formada por un 95 % de acetonitrilo, 5 % metanol, representada en la figura 4.7.

Fase móvil		Tiempo de retención (min)
Acetonitrilo	Metanol	
70 %	30 %	3,23
80 %	20 %	3,37
90 %	10 %	3,45
95 %	5 %	3,51

Tabla 4.3: Fases móviles empleadas para la separación del extracto en una columna apolar

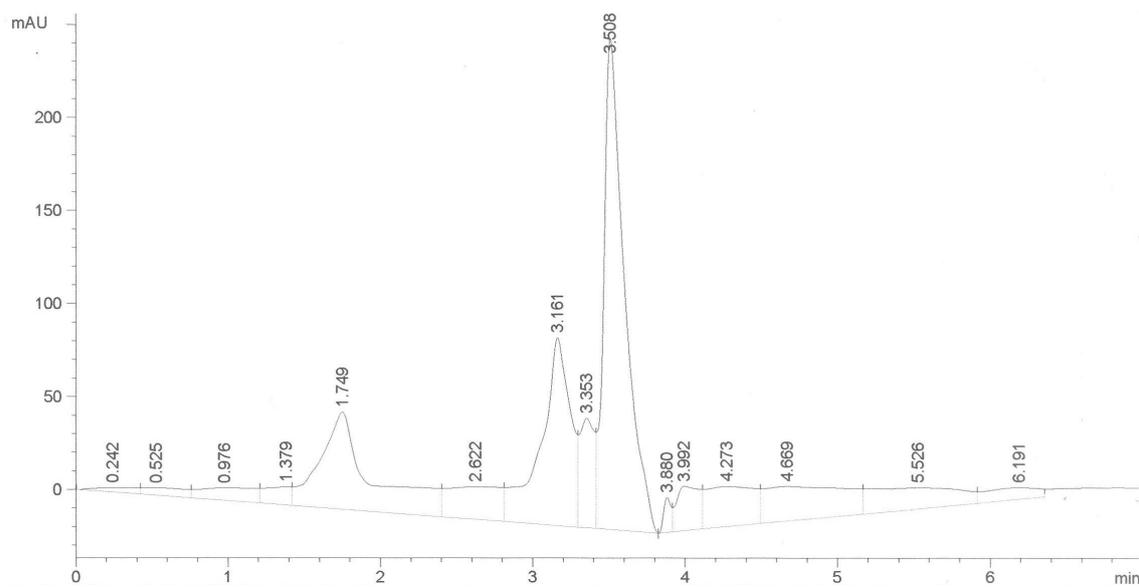


Figura 4.7: Extracto de *P. Bipinnatifidum*

Los solapamientos que se producen nos indican que posiblemente esta columna no es la más adecuada para su determinación.

Por tanto, tomadas en cuenta todas las consideraciones, el método ideal para la separación del estigmasterol es mediante el empleo de una columna C18 fase apolar.

4.7.3. Cromatografía de gases, detector FID

Para la el análisis del polygodial mediante esta técnica se ha empleado como referencia diversos trabajos en los que la identificación se realiza mediante CG-MS.

La identificación y cuantificación del compuesto se ha realizado mediante cromatografía de gases y un detector de ionización a la llama. La columna empleada para la separación es un BP-20 con fase estacionaria de polietilenglicol. Primeramente se llevaron a cabo mediciones del patrón puro para observar el pico y la intensidad de este, empleando diferentes rampas que se encuentran resumidas en la tabla 4.4. Posteriormente se optimizó la separación de los diversos componentes del extracto siguiendo las rampas que se habían empleado para el estudio del patrón. Las condiciones óptimas de separación de los diversos compuestos del extracto consiste en: portal de inyección 250°C y temperatura programada en el horno con dos rampas; una primera rampa de 80°C a 190°C de 20°C/min seguidas de otra rampa más leve (5°C/min) hasta alcanzar la temperatura

Temperatura de inyección (°C)	Rampas
250	80 °C a 250 °C 10°C/min
250	80 °C a 250 °C 20°C/min
250	80 °C a 280 °C 20°C/min
250	80 °C a 280 °C 30°C/min
250	80°C a 250°C 50°/min
250	80 °C a 280 °C 50°C/min
250	80°C a 190°C 20°C/min y 190°C a 250°C 5°C/min

Tabla 4.4: Resumen de las distintas rampas del CG-FID para el patrón de polygodial

de 250°C. La temperatura de la llama de hidrógeno se encuentra a 300 °C. Estas condiciones se mantendrán durante todos los análisis para comparar los extractos en los diferentes tiempos de retención. Los límites de detección y cuantificación para este método toman unos valores de alrededor de 0,58 mg/l y 1,7 mg/l respectivamente.

La identificación del compuesto se ha realizado por comparación en las mismas condiciones del tiempo de retención del patrón puro y de los compuestos del extracto, apareciendo en un tiempo de retención comprendido entre 16,6 a 16,7 minutos, como se puede observar en la figura 4.8. Habiéndose optimizado las condiciones del equipo para la cuantificación del compuesto de

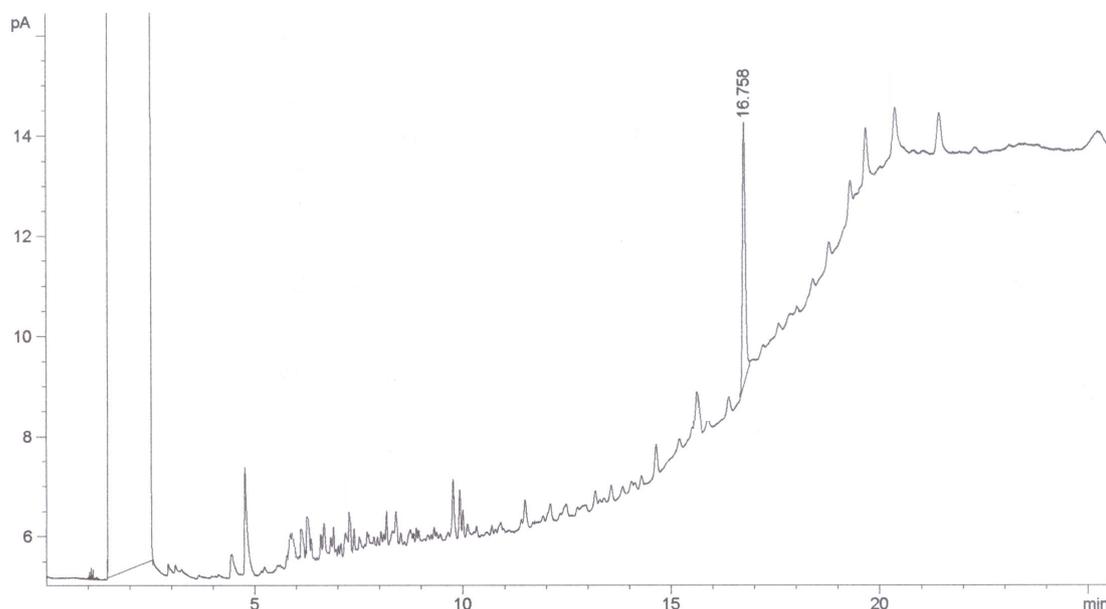


Figura 4.8: Cromatograma patrón polygodial

interés, en este caso polygodial, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de dicho analito de interés en los diversos extractos que se han realizado empleando los métodos de extracción mediante Soxhlet y mediante maceración. Para determinar la cantidad de compuesto presente en la muestra se realizó el método de adiciones patrón, puesto que, la matriz es compleja y puede ocluir al analito impidiendo la volatilización total de este en la muestra.

Extractos en hexano

Se analizó un extracto de 100 ml extraído mediante Soxhlet. Se identificó el compuesto en el extracto obtenido, teniendo el compuesto un tiempo de retención similar al patrón empleado, como puede observarse en la figura 4.9, observándose la existencia de un pico cromatográfico en el minuto 16,716, al igual que en el patrón.

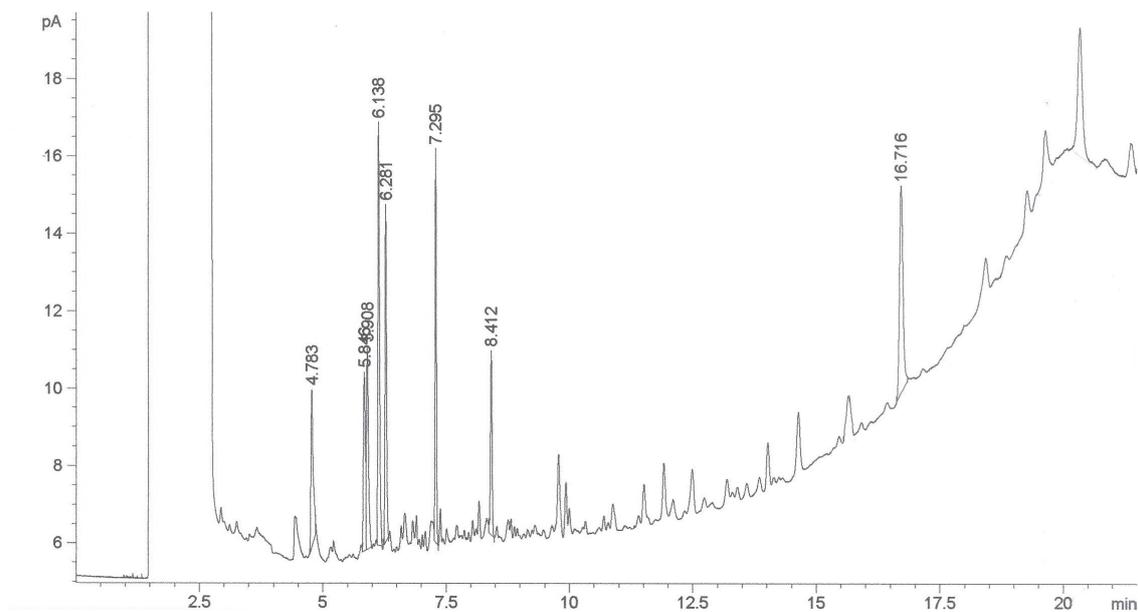


Figura 4.9: Cromatograma extracto en hexano de *P. punctatum*

El analito aparece en un tiempo de retención semejante al del patrón de 16,7 minutos.

Extractos en metanol

En lo relativo a este disolvente se han empleado dos técnicas de extracción: mediante Soxhlet y mediante macerado.

Observando el cromatograma del extracto mediante Soxhlet, figura 4.10 se observa un pico en un tiempo de retención de 16,705 minutos, semejante al tiempo de retención del patrón.

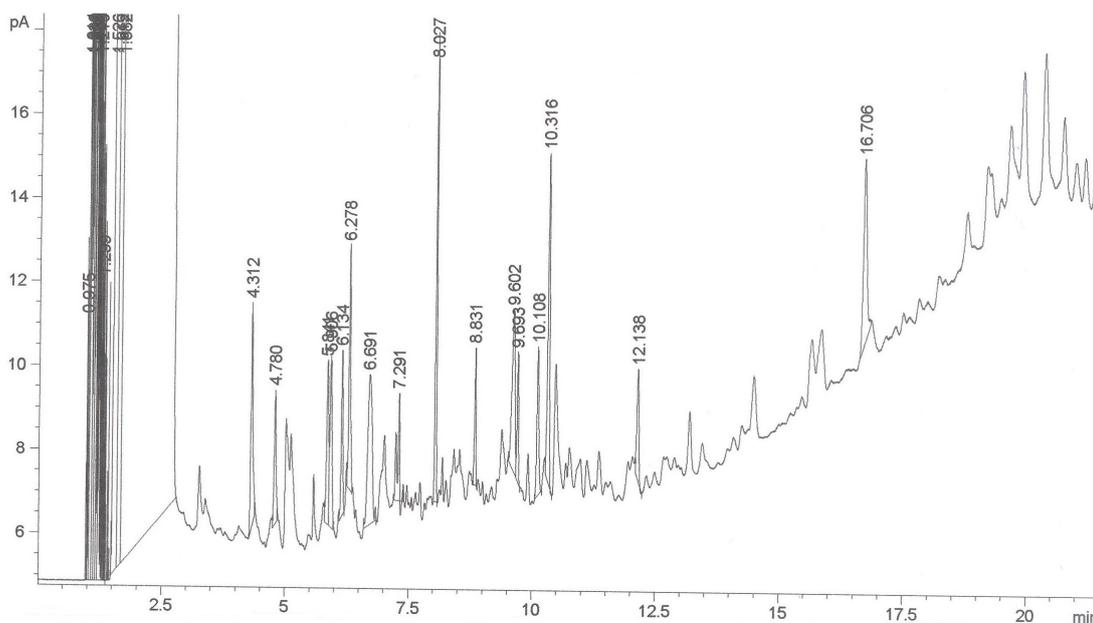


Figura 4.10: Cromatograma extracto en metanol mediante Soxhlet de *P. punctatum*

En el cromatograma del extracto mediante maceración (figura 4.11) se observa el pico correspondiente al polygodial en el tiempo de retención del patrón (16,725 minutos).

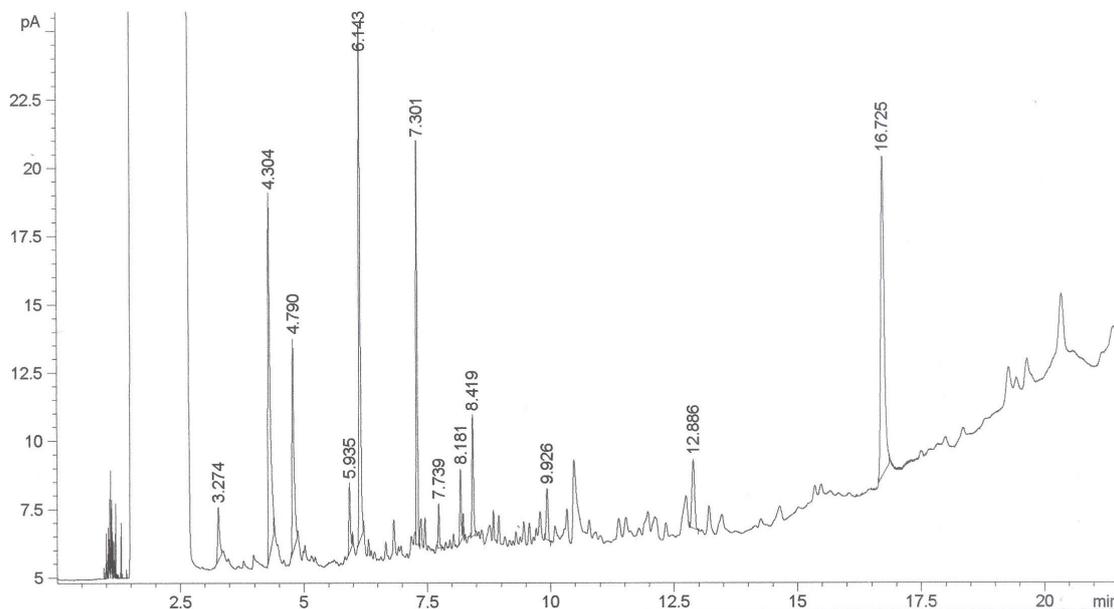


Figura 4.11: Cromatograma extracto en metanol mediante maceración de *P. punctatum*

Con el fin de observar la evolución del compuesto con el tiempo, una fracción del extracto se almacenó durante dos meses a temperatura de laboratorio y en presencia de luz, dando lugar al cromatograma de la figura 4.12. En él, se observa una gran cantidad de compuestos a menores tiempos de retención que en los cromatogramas anteriores, mientras que no se encuentra el pico correspondiente al analito, lo que indica que el compuesto se degrada con el tiempo.

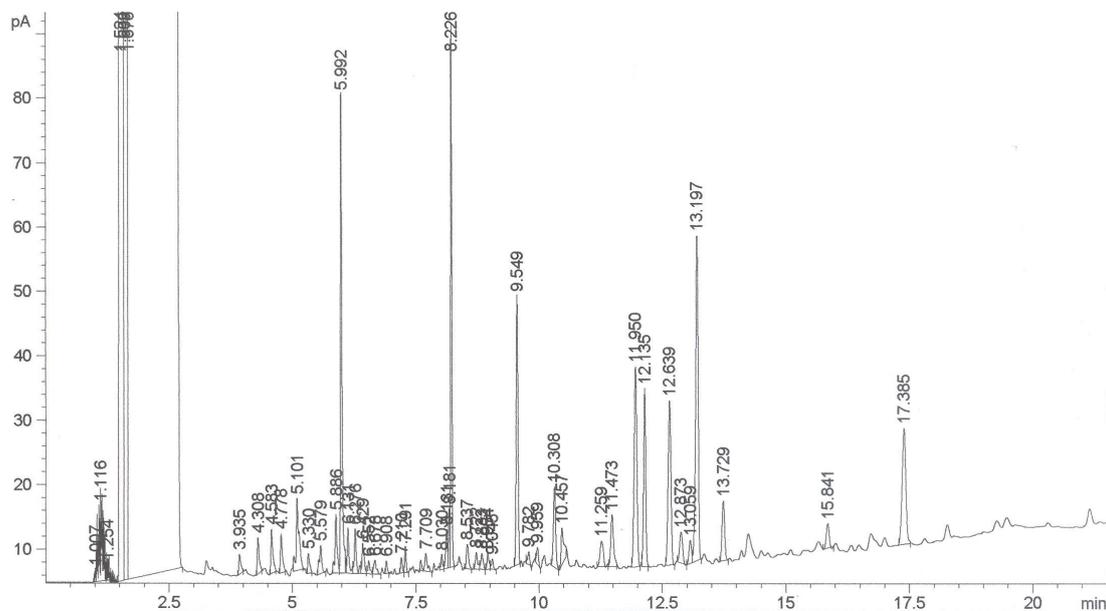


Figura 4.12: Cromatograma extracto en metanol observando la degradación de *P. punctatum*

Extractos en diclorometano

Las extracción en el caso de este disolvente se ha realizado solamente mediante maceración, identificándose el compuesto en un tiempo de retención (16,705 minutos) análogo al patrón.

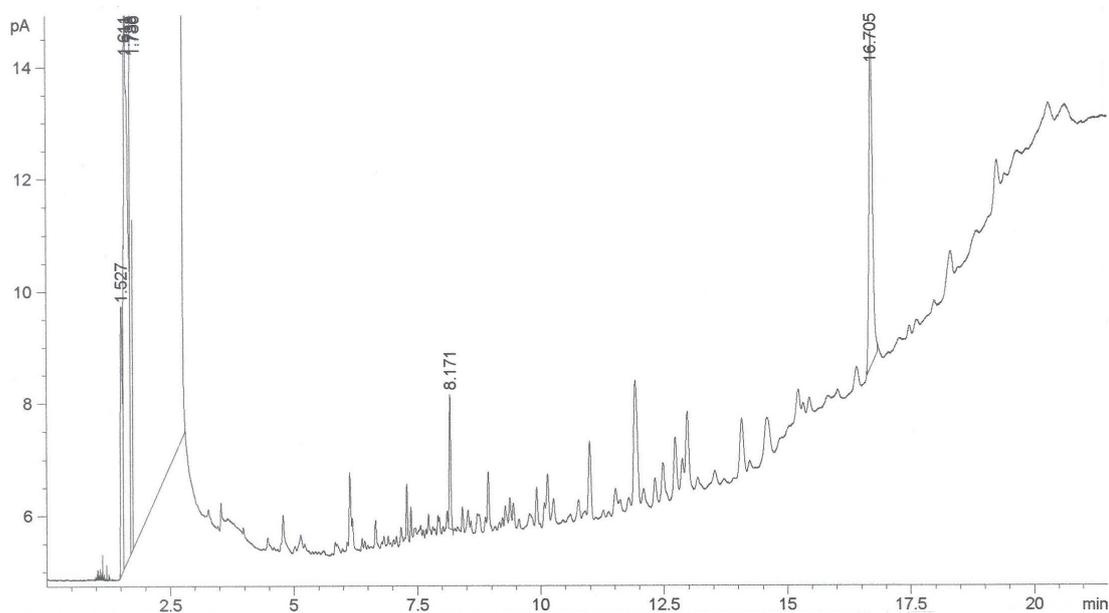


Figura 4.13: Cromatograma extracto en diclorometano de *P. punctatum*

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Cromatografía líquida de alta resolución

Puesto a punto el método para el análisis del analito mediante el empleo de la columna apolar, se llevo a cabo la cuantificación del compuesto, empleando dos métodos distintos para ello: el método el patrón externo y el método de adiciones patrón. El extracto a analizar es el obtenido mediante maceración, puesto que, como se observó anteriormente, el extracto extraído mediante Soxhlet no presentaba ningún pico en el área de análisis del patrón.

Método de patrón externo para el Estigmasterol

Para la ejecución de este método, en el extracto macerado se procedió a realizar la medidas de patrón de concentraciones comprendidas entre 4 mg/l y 40 mg/l (tabla 5.1). Los resultados presentan una tendencia lineal ajustándose a la recta de ecuación $\text{Área} = 10,178C - 0,7901$ y cuyo coeficiente de regresión $R^2 = 0,9996$, presentada en la gráfica 5.1. La ecuación de la recta

Concentración (mg/l)	Área (mAU/s ⁻¹)
4,0	42,2707
8,0	80,5014
16,0	155,2484
20,0	206,9016
40,0	406,7560

Tabla 5.1: Tabla patrón externo estigmasterol

obtenida presenta la expresión

El gráfico de residuales de la recta de regresión (figura 5.2) no presenta tendencia, por lo que se puede concluir que los datos se ajustan a una recta.

Sustituyendo por el valor del área obtenido al analizar el extracto (figura 4.5), se obtiene el valor de 7,89 mg/l, siendo el valor total en la muestra de extracto de 0,15 mg por cada gramo extraído.

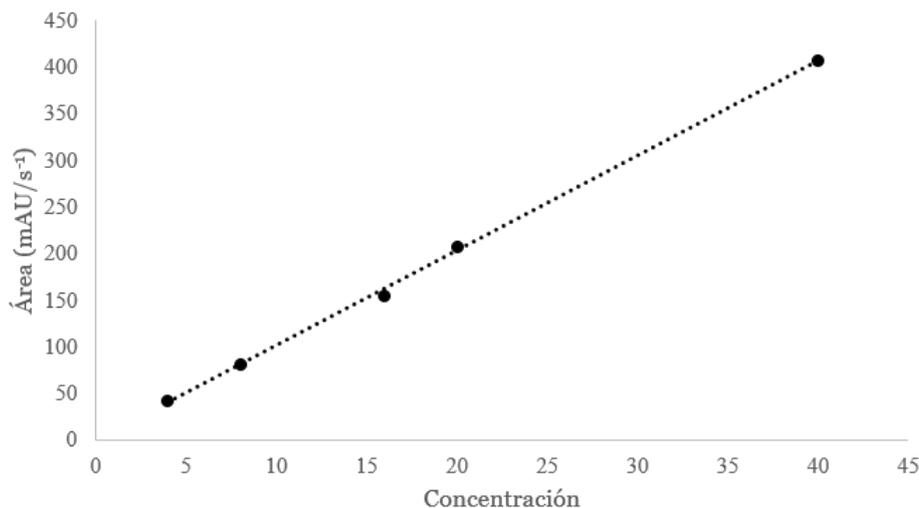


Figura 5.1: Recta de calibrado mediante el método de patrón externo para el Estigmasterol

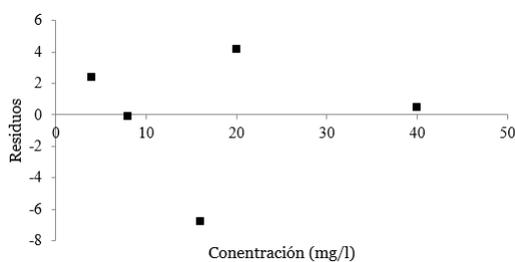


Figura 5.2: Gráfica de los residuales de la regresión del método de patrón externo para el estigmasterol

Método de adiciones patrón para el Estigmasterol

Posteriormente se realiza el método de adiciones patrón a fin de evitar el posible efecto matriz. Este sería el método indicado en matrices complejas, como ocurre en el caso del extracto de una planta, puesto que la cantidad de compuestos orgánico es elevada, además de que pueden presentar polaridades semejantes, dificultando así la identificación de un pico cromatográfico que pueda asignarse con certeza al compuesto que buscamos.

En lo tocante al análisis mediante el método de adiciones patrón, fueron preparadas distintas disoluciones patrón comprendidas entre 5 y 50 ppm, como puede observarse en la tabla 5.2, donde se ven las áreas correspondientes. Las medidas se realizaron por triplicado.

Concentración (mg/l)	Área (mAU/s ⁻¹)
0	39,3572
5	83,5385
10	162,9310
15	231,8086
20	274,1570
25	325,1280
50	652,6528

Tabla 5.2: Tabla adiciones patrón estigmasterol

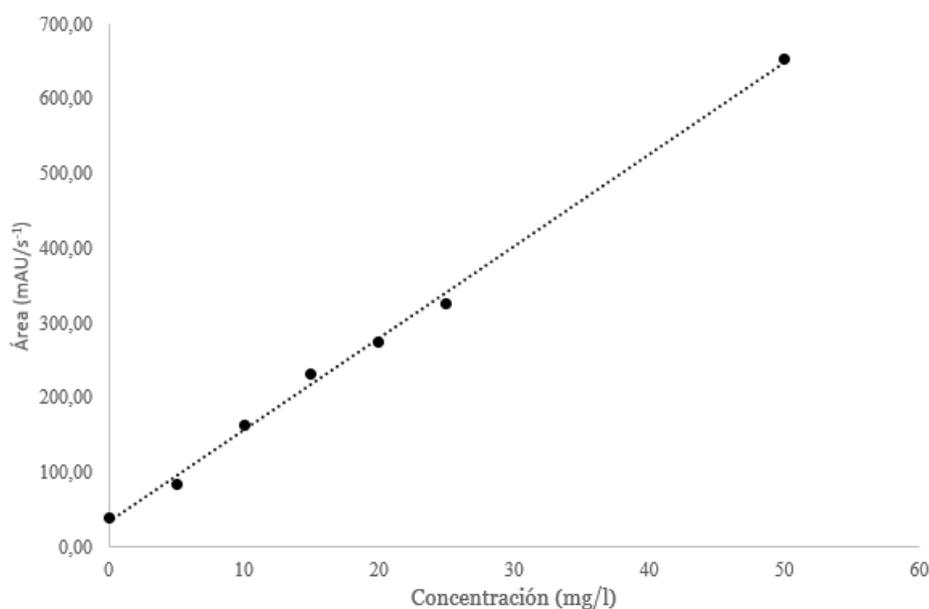


Figura 5.3: Recta de calibrado mediante el método de adiciones patrón para el Estigmasterol

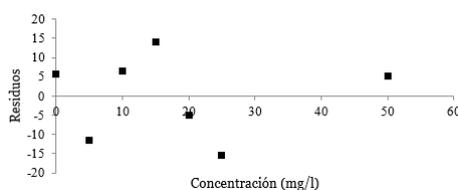


Figura 5.4: Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón para el Estigmasterol

Los resultados se ajustan a una recta de ecuación $\text{Área} = 33,572C + 12,276$ con coeficiente de regresión $R^2 = 0,9959$, reflejada en la gráfica 5.3, el gráfico de los residuales (figura 5.4) no exhibe una tendencia clara, por lo que los resultados se ajustan a una recta. Interpolando en dicha recta se obtiene que el valor de la concentración en el extracto es igual a 5,47 mg/l, obteniéndose 0,10 mg por cada gramo de material vegetal seco.

Comparando ambos métodos de cuantificación, se observa que los valores entre ambos difieren, por lo que se constata que existe efecto matriz. Por lo tanto, el método más conveniente de análisis de compuesto de interés en la muestra sería el método de adiciones patrón.

5.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

Puesta a punto la técnica de medida con las condiciones comentadas con anterioridad, se procedió a la cuantificación del polygodial extraído mediante diferentes técnicas. En los ensayos previos que se hicieron se observó proporcionalidad directa entre las áreas, pero la cuantificación se realizó exclusivamente mediante el método de adiciones patrón.

Método de adiciones patrón en hexano

Se tomaron fracciones de 5 ml de un volumen total de extracto de 100 ml al cual se le realizaron sucesivas adiciones de patrones de polygodial de concentraciones comprendidas entre 10 mg/l y 40 mg/l, enrasando la disolución resultante a un volumen de 10 ml, como queda reflejado en la tabla 5.3. Las medidas se realizaron por triplicado y se realizó un promedio entre las áreas resultantes.

Concentración patrón (mg/l)	Concentración (mg/l)	Área (pAs^{-1})
0	0	26,18639
20	10	32,74583
40	20	43,38622
60	30	60,52920
80	40	73,56777

Tabla 5.3: Tabla adiciones patrón en hexano

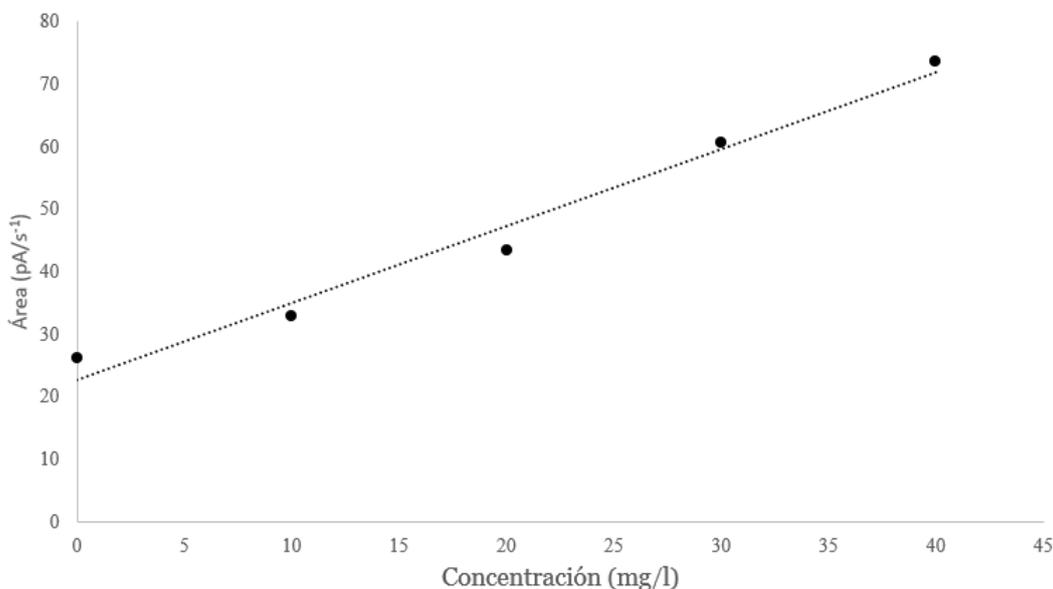


Figura 5.5: Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en hexano

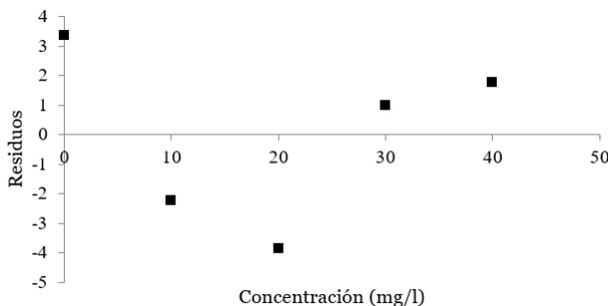


Figura 5.6: Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en hexano

Los resultados se encuentran representados en la gráfica 5.5, cuya recta asociada presenta la ecuación $\text{Área} = 1,228C + 22,701$ y $R^2 = 0,969$. El gráfico de los residuales procedentes del

análisis de los datos obtenidos 5.6 no refleja una tendencia, así que se afirma que los datos siguen una tendencia lineal

Interpolando en la recta, se obtiene una concentración en 100 ml de extracto de 36,98 mg/l. La cantidad total extraída son 0,66 mg por gramo de muestra.

Método de adiciones patrón en extracto en metanol obtenido por Soxhlet

Diversas disoluciones de concentraciones crecientes de patrón fueron preparadas a partir de porciones de 5 ml procedentes de una disolución de extracto de 100 ml y se llevaron a un volumen de 10 ml mediante la adición del patrón, realizándose la medida por triplicado, que se refleja en la tabla 5.4.

Concentración patrón (mg/l)	Concentración (mg/l)	Área (pA/s^{-1})
0	0	22,73297
20	10	30,37251
40	20	37,10826
60	30	52,95093
80	40	61,21628

Tabla 5.4: Tabla adiciones patrón en metanol

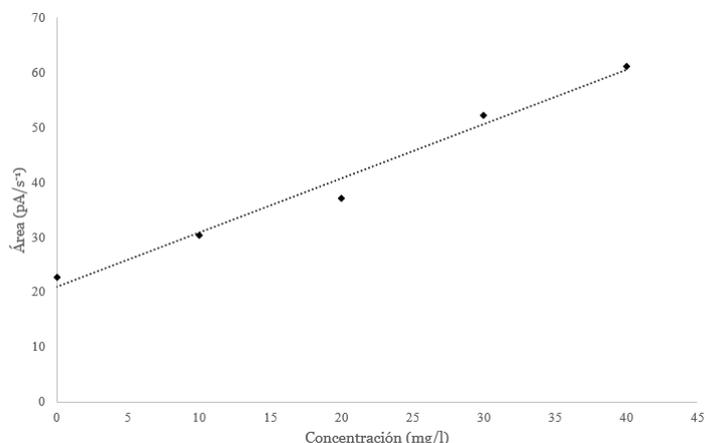


Figura 5.7: Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en metanol

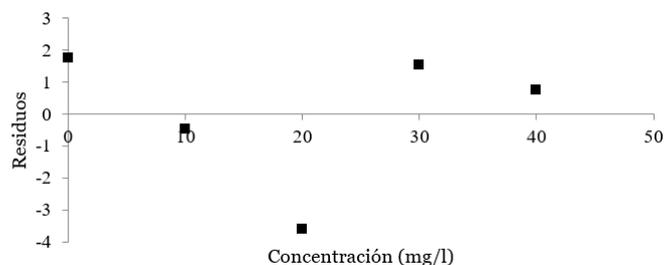


Figura 5.8: Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en hexano

Los datos obtenidos se representaron en la siguiente recta (figura 5.7 de ecuación $\text{Área} = 20,967 + 0,9871C$ valor del coeficiente de regresión de $R^2 = 0,9806$. El gráfico de los residuales 5.8 no presenta una tendencia clara, por lo que se confirma que los datos se ajustan a una recta de regresión.

Interpolando en la ecuación de la recta, se se obtiene que la concentración presente en 100 ml de extracto es de 42,48 mg/l, siendo la cantidad total extraída a partir de la masa de la planta es de 0,89 mg por cada gramo de material vegetal.

Método de adiciones patrón en extracto obtenido por maceración en metanol

La masa extraída mediante maceración de la muestra y pesada fue llevada a un matraz de 25 ml y se disolvió en metanol. De dicha disolución se tomaron 5 ml a lo que se les añadieron concentraciones crecientes de patrón de polygodial en un rango entre 10 mg/l y 40 mg/l para su posterior análisis por triplicado.

Concentración patrón (mg/l)	Concentración (mg/l)	Área (pA/s^{-1})
0	0	60,92860
20	10	65,06456
40	20	73,99276
60	30	94,678615
80	40	98,125945

Tabla 5.5: Tabla adiciones patrón en metanol

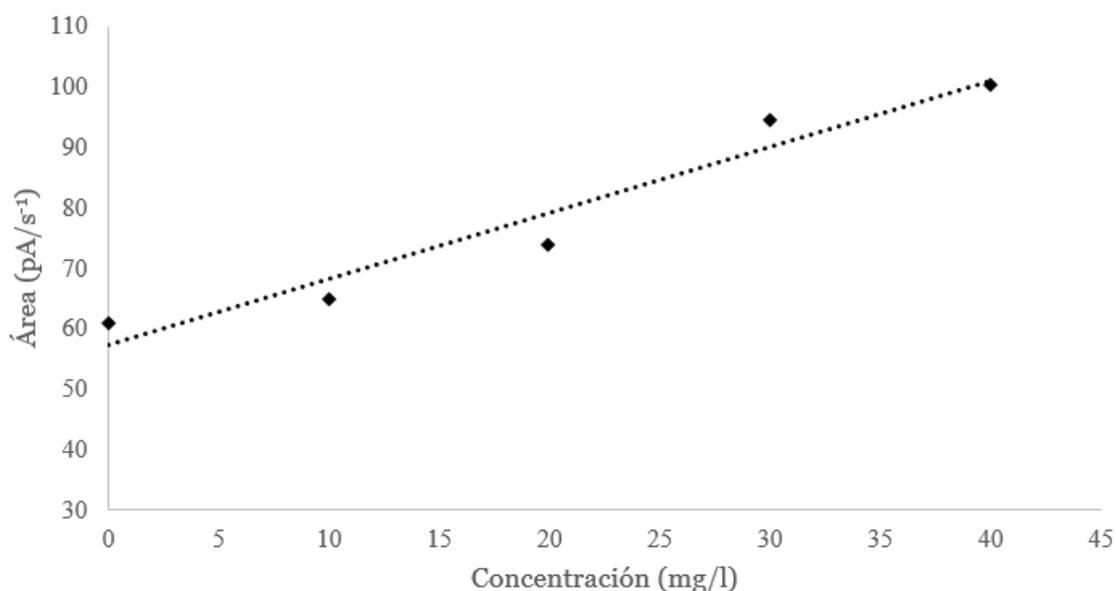


Figura 5.9: Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en metanol

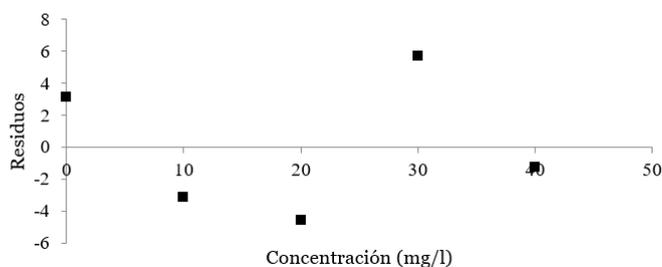


Figura 5.10: Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en metanol mediante macerado

Los resultados proporcionados en la tabla 5.5 originan una recta de ecuación $\text{Área} = 57,253 + 1,090C$ y $R^2 = 0,914$ como se ve en la figura 5.9. El gráfico de los residuales de la recta 5.10 no muestra una tendencia clara, por lo que los resultados obtenidos presentan un ajuste lineal.

Mediante estos datos, se obtiene como resultado que la concentración en los 25 ml de extracto es de 2,78 mg siendo el porcentaje de compuesto extraído a partir de la planta de 0,57 mg por cada gramo.

Método de adiciones patrón en diclorometano

La masa extraída mediante maceración en diclorometano (0,0868 g) es diluida en un volumen de 25 ml de diclorometano. 5 ml de esta disolución se llevan a un matraz de 10 ml que se enrasa con concentraciones de patrón comprendidas entre 10 mg/l y 40 mg/l resumidas en la tabla 5.6 en la que aparecen las concentraciones de patrón frente al promedio de las áreas, ya que las medidas se realizaron por triplicado.

Concentración patrón (mg/l)	Concentración (mg/l)	Área (pA/s ⁻¹)
0	0	26,18639
20	10	32,74583
40	20	43,38622
60	30	60,52920
80	40	73,56777

Tabla 5.6: Tabla adiciones patrón en diclorometano

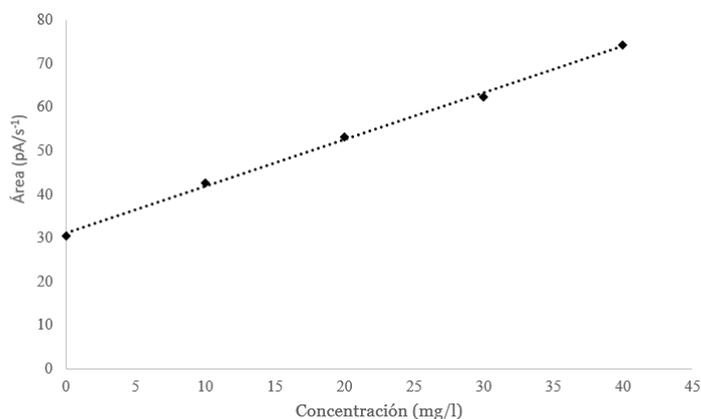


Figura 5.11: Recta de calibrado para el método de adiciones patrón sobre el extracto en diclorometano

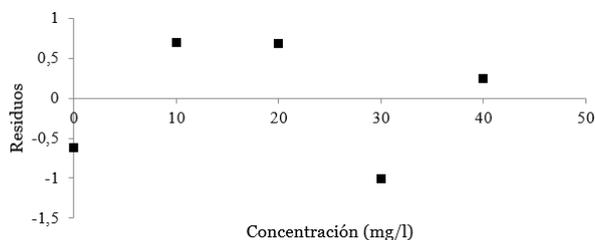


Figura 5.12: Gráfica de los residuales de la regresión del método de adiciones patrón en extracto en metanol mediante macerado

Los resultados son reflejados en la gráfica 5.11 dando lugar a una recta de ecuación $\text{Área} = 31,006 + 1,074C$, con valor de $R^2 = 0,997$. La gráfica de los residuales correspondiente a la anterior recta de regresión (figura 5.12 no presenta una tendencia clara, por lo que se puede decir que el ajusta a una línea es correcto.

El valor obtenido de la concentración en la disolución sin añadir patrón tiene el valor de 57,73 mg/l, siendo la cantidad total de compuesto extraído por diclorometano en total de 0,34 mg por cada gramo de muestra.

A partir de los datos obtenidos, se puede establecer una comparativa entre distintos disolventes y entre el mismo disolvente pero distinto método de extracción del compuesto. si observamos la extracción en Soxhlet (reflejada en la tabla 5.7, al mismo tiempo de extracción entre ambos compuestos, la extracción empleando metanol es más efectiva debido a que es un disolvente más polar, favoreciendo la interacción con el analito.

Extracción mediante Soxhlet		
Disolventes	Hexano	Metanol
Masa (mg/g)	0,67	0,89

Tabla 5.7: Comparativa extracción en Soxhlet

Del mismo modo, si se comparan las extracciones mediante macerado (tabla 5.8), ocurre lo mismo, a mayor polaridad del disolvente, mayor cantidad de compuesto extraído.

Extracción mediante macerado		
Disolventes	Metanol	Diclorometano
Masa (mg/g)	0,57	0,34

Tabla 5.8: Comparativa extracciones mediante maceración

Por último, observando las últimas tablas, entre el extracto mediante Soxhlet en metanol y el extracto mediante macerado se observa lo ya comentado con anterioridad; que la extracción en Soxhlet es más efectiva que una extracción mediante maceración, resultando ser más ventajoso.

Capítulo 6

Conclusiones

En el desarrollo de este trabajo se ha puesto a punto dos métodos para determinar en material vegetal, previa extracción en disolventes orgánicos, compuestos que presentan interés farmacológico e interés pesticida y repelente.

Estigmasterol

El estigmasterol se analizó y determinó mediante HPLC con detector UV/Vis empleando una fase móvil de 70 % acetonitrilo y 30 % metanol, dando un pico cromatográfico definido y posteriormente se cuantificó en extracto obtenido por maceración del material vegetal, encontrándose una cantidad por encima del límite de detección del método. Las cantidades determinadas de esta planta, constituyen el 0,01 % del peso total de la planta.

Polygodial

El polygodial se analizó mediante cromatografía de gases, resultando en un pico bien definido, en un tiempo de retención del orden de 16,7 minutos para posteriormente identificar el compuesto en el extracto y por último cuantificar. Analizando los diversos extractos de plantas se han determinado cantidades del orden de miligramos por gramo de muestra, encontrándose la cantidad extraída en un intervalo de porcentajes entre el 0,03 % y el 0,09 % del peso total de la planta seca. La mayor cantidad se obtiene mediante extracción en Soxhlet.

Ambos métodos han proporcionado resultados exitosos en lo referente a la cuantificación de los compuestos, aun siendo las cantidades extraídas un pequeño porcentaje en comparación con la cantidad de muestra empleada en la extracción, por lo que se recomienda emplear métodos de mayor sensibilidad para mejorar la precisión como CG-MS, aunque ambos métodos ofrecen resultados aceptables frente al alto coste económico que implica la utilización del equipo CG-MS.

Bibliografía

- [1] Roger Dajoz, *Tratado de ecología*, segunda edición. Ed. Mundi-Prensa
- [2] DANTZIG, G.B. y P. WOLFE, «*The world of organic agriculture*», FIL y FOAM- ORGANICS INTERNATIONAL. (2014)
- [3] Jorge V. Crisci y Omar A. Gancedo «*Sistemática y Etnobotánica del Güembé*», (1971) Sección Botánica, XI, pags. 285-302.
- [4] SCAPINELLO, JAQUELINE AND AGUIAR, GEAN PABLO S. AND DAL MAGRO, CAMILA AND CAPELEZZO, ANA P. AND NIERO, RIVALDO AND DAL MAGRO, JACIR AND DE OLIVEIRA, DÉBORA AND OLIVEIRA, J. VLADIMIR «*Extraction of bioactive compounds from *Philodendron bipinnatifidum* Schott ex Endl and encapsulation in PHBV by SEDS technique*», *Industrial Crops and Products* **125** (2018), 65-71.
- [5] BOLSON, MÔNICA AND HEFLER, SONIA REGINA AND DALL'OGGIO CHAVES, ELISIANE INÊS AND GASPAROTTO JUNIOR, ARQUIMEDES AND CARDOZO JUNIOR, EUCLIDES LARA «*Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil*», *Journal of Ethnopharmacology*, **161** (2015), 1-10.
- [6] ALVES, TÂNIA MARIA DE ALMEIDA AND RIBEIRO, FABIANE LACERDA AND KLOOS, HELMUT AND ZANI, CARLOS LEOMAR «*Polygodial, the Fungitoxic Component from the Brazilian Medicinal Plant *Polygonum punctatum**», *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96** (2001), no. 6, 831-833.
- [7] Martínez, Miguel and Benítez, Bonifacia and Alvarez, Sandra and Prieto, Rebeca and Valdo, Gil and Da, José and Bravo, José A and Vila, José L «*Determination of an Active Principle of *Polygonum Punctatum* Elliot*», *Bolivian Journal of Chemistry*, **34** (2017), no. 1, 14-17.
- [8] Leitão, Fernanda and Guimarães, Suzana and Stern, Viviane and Machline, Ines and Martins, Karine «*Original article Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro , Brazil : an overview on their botanical diversity and toxicological potential*» *Revista Brasileira de Farmacognosia* **24** (2014), no. 2, 225-247.
- [9] Scarpa, Gustavo F «*Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco*», **91** (2004), no. September 2003, 115-135.
- [10] Pignal, Marc and Romaniuc, Sergio and Grael, Cristiane F F and Fagg, Christopher W and Brand, Maria G L «*Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779 – 1853)*», **143** (2012), 488-500.
- [11] Tareq, Mahmud and Khan, Hassan and Ather, Arjumand and Thompson, Kenneth D and Gambari, Roberto «*EXTRACTS AND MOLECULES FROM MEDICINAL PLANTS AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUSES*» **67** (2005), 107-119.
- [12] Li, Kang and Yuan, Dawei and Yan, Rong and Meng, Lei and Zhang, Yong and Zhu, Kun «*Stigmasterol exhibits potent antitumor effects in human gastric cancer cells mediated via inhibition of cell migration, cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of JAK/STAT signalling pathway*» *Journal of B.U.O.N.* **23** (2018), no. 5, 1420-1425.
- [13] Panda, S. and Jafri, M. and Kar, A. and Meheta, B. K. «*Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma**» *Fitoterapia* **80** (2009), no. 2, 123-126.
- [14] Asakawa, Yoshinori and Dawson, G.W. and Griffiths, D.C. and Lallemand, J.-Y. and Ley, S.V., Mori «*Activity of drimane antifeedants against aphids, and comparative biological effects and chemical reactivity of (-)- and (+)- polygodial*» (1988), no. 10, 1845-1855.

- [15] Pickett, J A and Wadhams, L J and Woodcock, C M «*Developing sustainable pest control from chemical ecology*», Agriculture, Ecosystems and Environment **64** (1997), no. 2, 149-156.
- [16] Asakawa, Yoshinori and Ludwiczuk, Agnieszka and Nagashima, Fumihiko «*Phytochemistry Phytochemical and biological studies of bryophytes*», Phytochemistry **91** (2013), 52-80.
- [17] Derita, M. G. and Leiva, M. L. and Zacchino, S. A. «*Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties of Polygonum acuminatum Kunth*», Journal of Ethnopharmacology. 124 (2009), no. 3, 337-383.
- [18] Lorimer, Stephen D and Perry, Nigel B and Foster, Lysa M and Burgess, Elaine J and Douch, Philip G C and Hamilton, Mary C and Donaghy, Morgan J and McGregor, Rachael A «*A Nematode Larval Motility Inhibition Assay for Screening Plant Extracts and Natural Products*», 1 (1996), 2842-2845.
- [19] Derita, Marcos G. and Gattuso, Susana J. and Zacchino, Susana A. «*Occurrence of polygodial in species of Polygonum genus belonging to Persicaria section*», Biochemical Systematics and Ecology 36 (2008), no. 1, 55-58.
- [20] Lagarda, M. J. and García-Llatas, G. and Farré, R. «*Analysis of phytosterols in foods*», Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **41** (2006), no. 5, 1486-1496.
- [21] Grace, Mary H. and Esposito, Debora and Timmers, Michael A. and Xiong, Jia and Yousef, Gad and Komarnytsky, Slavko and Lila, Mary Ann «*Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts*», Food Chemistry **210** (2016), 85-95.
- [22] Nair, V. D.P. and Kanfer, I. and Hoogmartens, J. «*Determination of stigmaterol, β -sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection*», Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **41** (2006), no. 3, 731-737.
- [23] Sánchez-Machado, D. I. and López-Hernández, J. and Paseiro-Losada, P. and López-Cervantes, J. «*An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds*», Biomedical Chromatography **18** (2004), no. 3, 183-190.
- [24] Dias, Irundika H.K. and Wilson, Steven R. and Roberg-Larsen, Hanne «*Chromatography of oxysterols*», Biochimie **153** (2018), 3-12.
- [25] Sriraman, Sandhiya and Ramanujam, Ganesh Munuswamy and Ramasamy, Mohan Kumar and Dubey, Govind Prasad «*Identification of beta-sitosterol and stigmaterol in Bambusa bambos (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro*», Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **115** (2015), 55-61.
- [26] Talreja, Tamanna and Kumar, Mangesh and Goswami, Asha and Gahlot, Ghanshyam and Jinger, Surendra Kumar and Sharma, Tribhuwan «*Qualitative and quantitative estimation of phytosterols in Achyranthes aspera and Cissus quadrangularis by HPLC*», The Pharma Innovation Journal **6** (2017), no. 1, 76-79.
- [27] <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/polygonaceae/polygonum-punctatum/fichas/ficha.htm>

ANEXOS

Anexo I: HPLC detector UV-Vis

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 4:55:28 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 4:46:51 PM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 5:01:29 PM by VERO
(modified after loading)
Sample Info : 30%ACN, 70%MeOH
L = 205nm

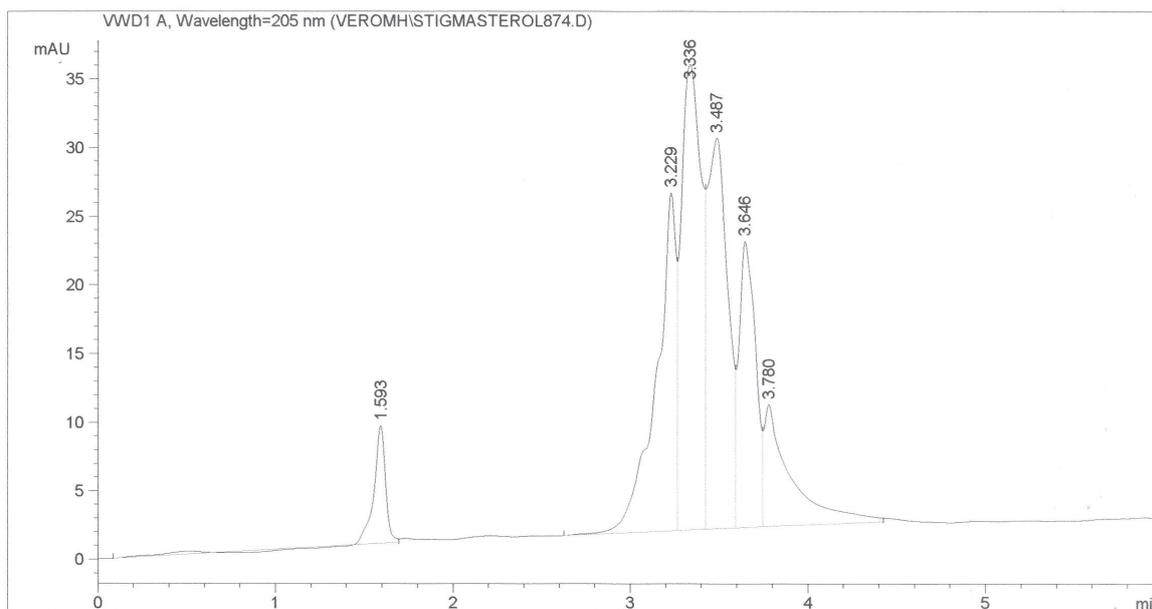


Figura 1: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil, 70% acetonitrilo, 30% metanol.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 5:21:12 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 5:17:05 PM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 5:27:13 PM by VERO
(modified after loading)
Sample Info : 30%ACN, 30%MeOH, 40%H2O
L = 205nm

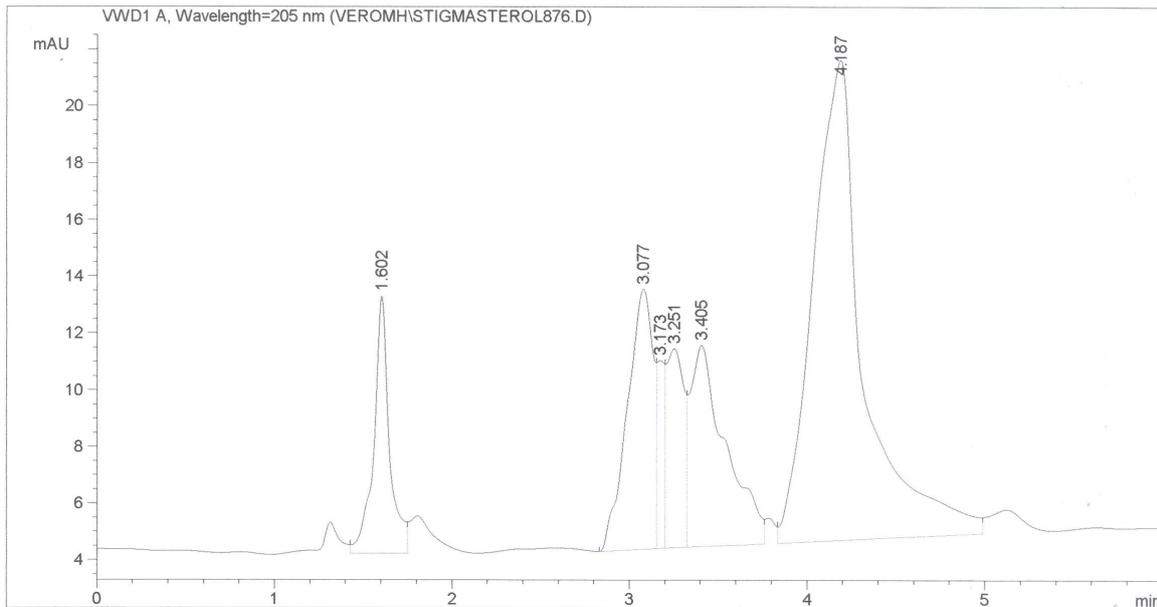


Figura 2: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 30 % acetonitrilo, 30 % metanol, 40 % agua.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 12:05:00 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 12:02:46 PM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 12:12:03 PM by VERO
(modified after loading)
Sample Info : 50%ACN, 50%MeOH
L = 205nm

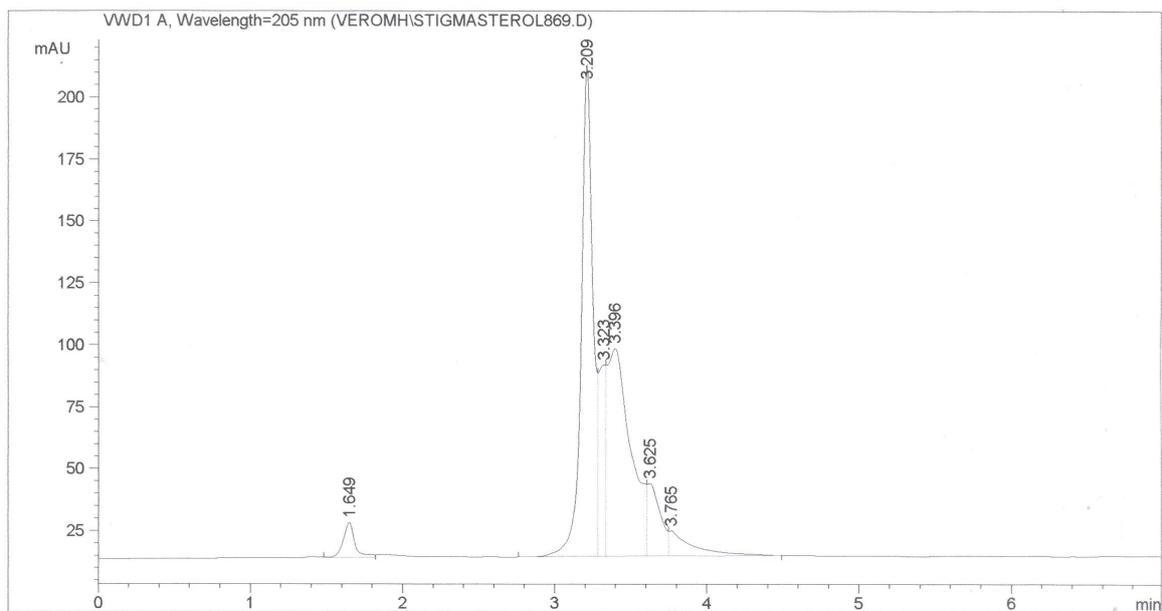


Figura 3: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 50 % acetonitrilo, 50 % metanol.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 12:45:26 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 12:55:11 PM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 6/10/2019 6:18:10 PM by Paula
Sample Info : 50%ACN, 50%H2O
L = 205nm

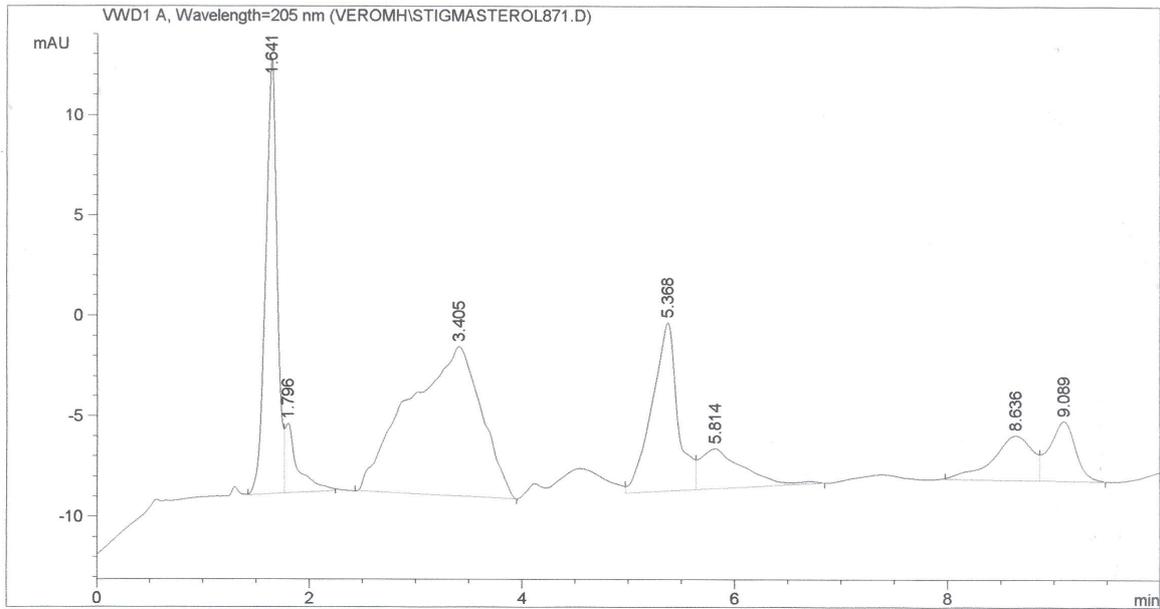


Figura 4: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 50 % acetonitrilo, 50 % agua.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 11:03:31 AM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 11:08:48 AM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 11:09:34 AM by VERO
(modified after loading)
Sample Info : 80%ACN, 20%MeOH,
L = 205nm

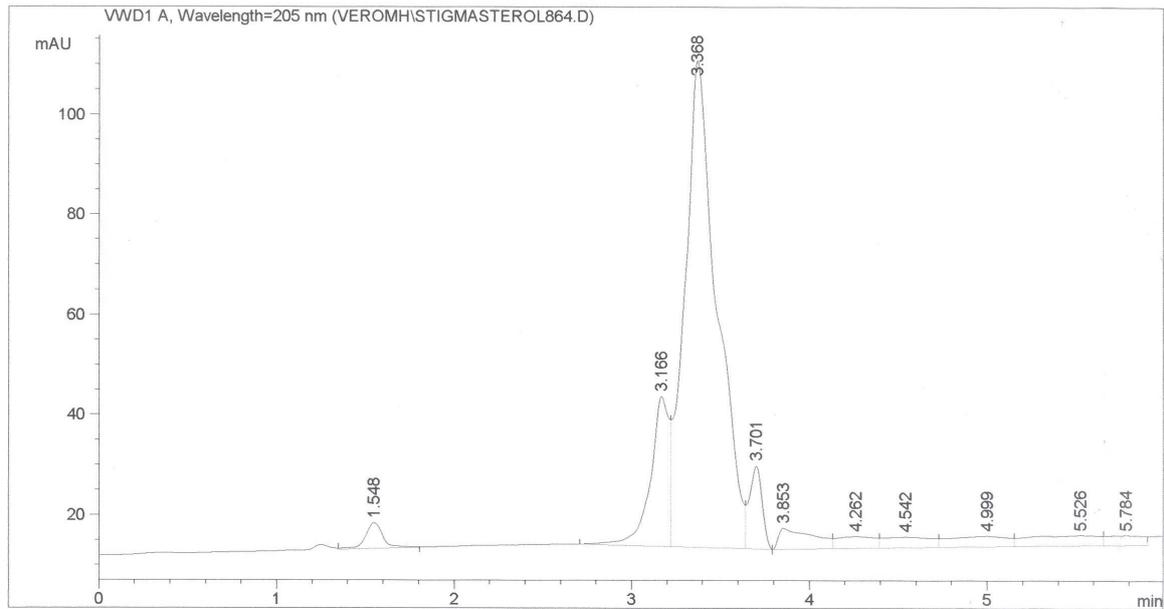


Figura 5: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 80 % acetonitrilo, 20 % metanol.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 11:38:25 AM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 11:45:09 AM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 6/10/2019 6:18:10 PM by Paula
Sample Info : 90%ACN,10%H2O,
L = 205nm

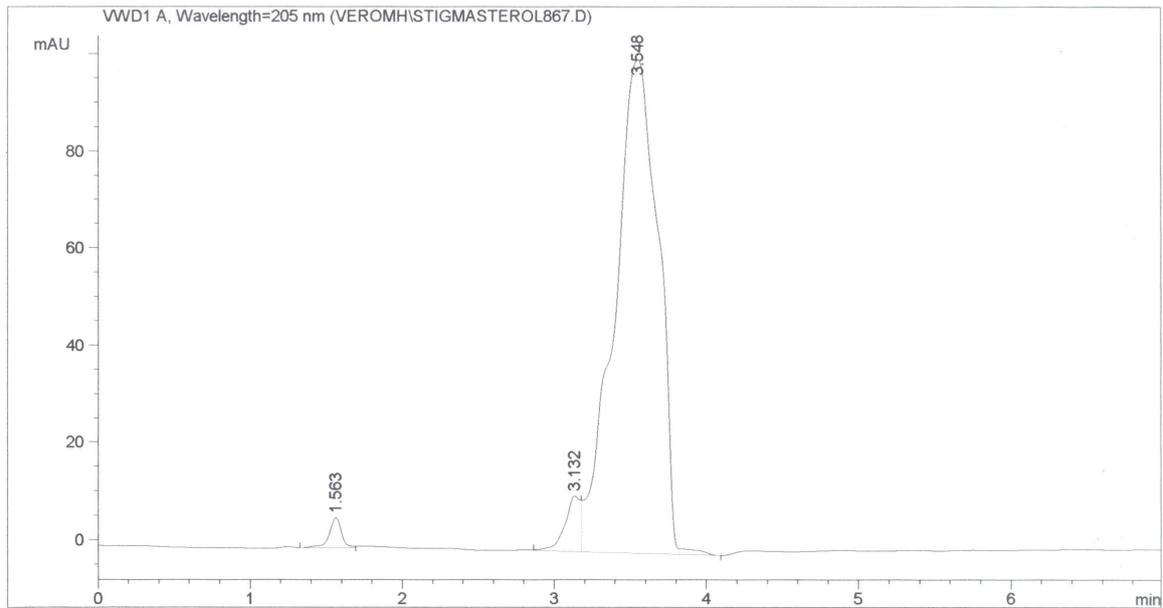


Figura 6: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 90% acetonitrilo, 10% agua.

Acq. Operator : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/1/2019 6:55:12 PM
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 4/1/2019 6:54:39 PM by VERO
(modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed : 6/10/2019 6:18:10 PM by Paula
Sample Info : 95%acetonitrilo5%metanol
L = 205nm

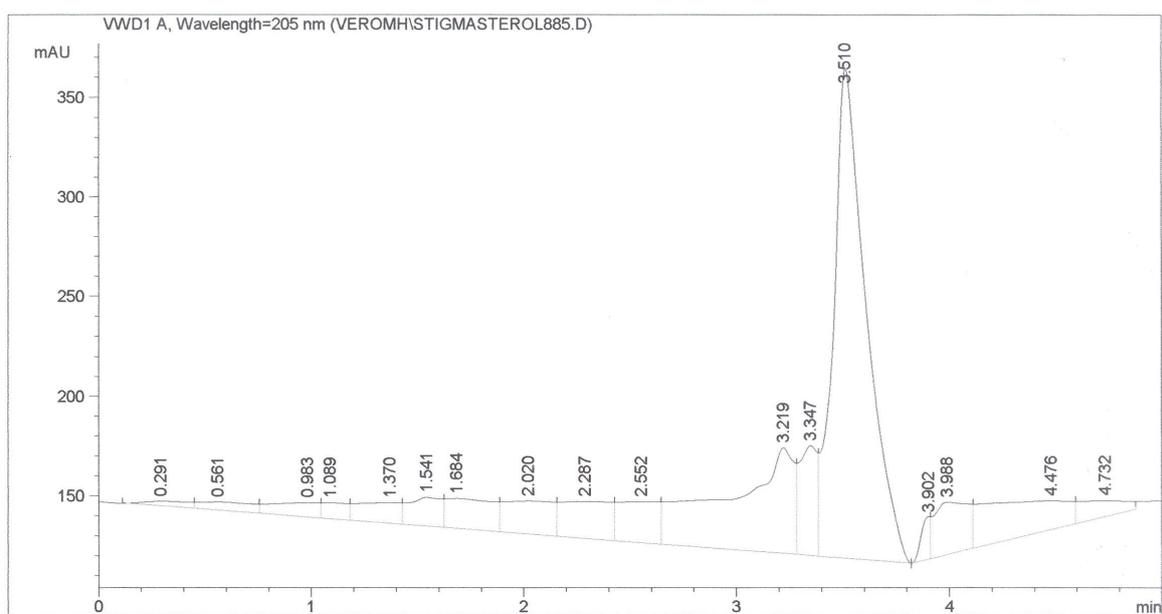


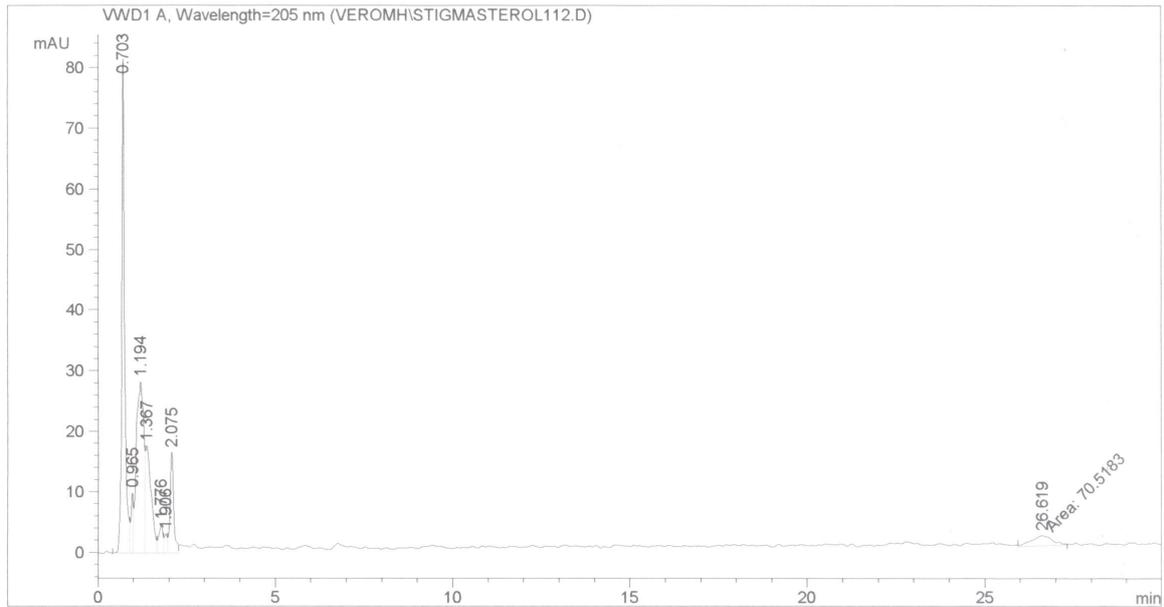
Figura 7: Cromatograma patrón 10 ppm. Columna CN. Fase móvil 95 % acetonitrilo, 5 % metanol.

Sample Name: A.PATRON_2

```

=====
Acq. Operator   : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1                Location : Vial 1
Injection Date  : 4/24/2019 6:01:09 PM
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed   : 4/24/2019 5:58:08 PM by VERO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed   : 4/24/2019 7:52:51 PM by VERO
Sample Info    : 70% ACN, 30% MeOH
                Patr3n Stigmasterol 4ppm disuelto en EtOH
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

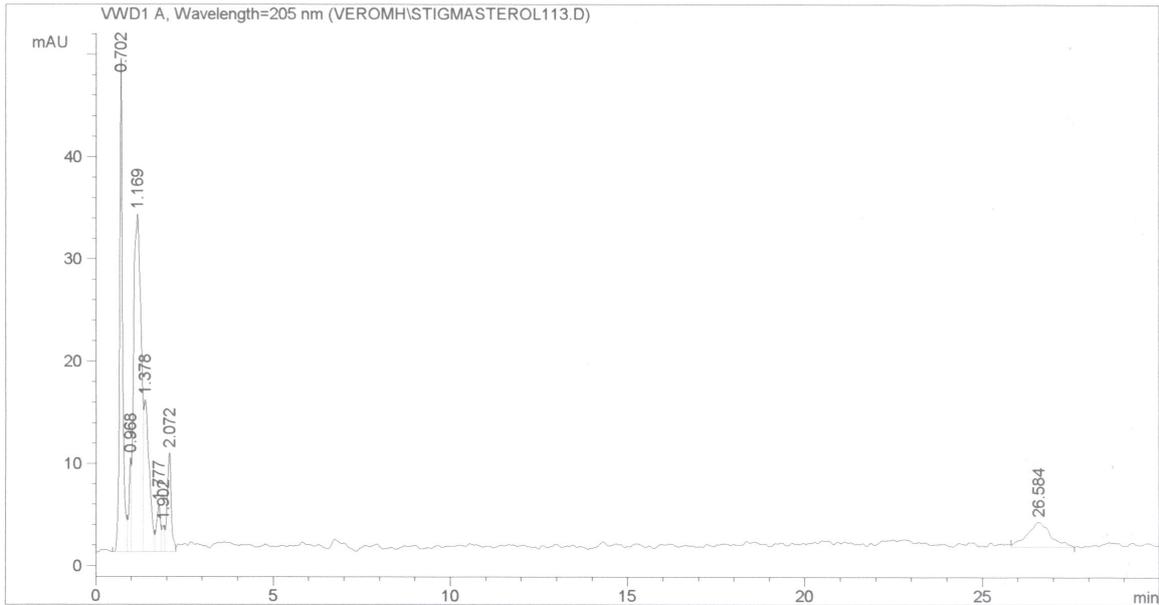
```

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	0.703	VV	0.0820	471.70529	81.64549	34.1717
2	0.965	VV	0.0667	47.30041	10.02352	3.4266
3	1.194	VV	0.1805	410.93820	28.39319	29.7695
4	1.367	VV	0.1594	199.28400	17.84081	14.4367
5	1.776	VV	0.1171	40.36779	4.79928	2.9244
6	1.906	VV	0.0818	17.98024	3.18638	1.3025
7	2.075	VV	0.1104	122.30362	16.66129	8.8600
8	26.619	MM	0.7016	42.51832	1.67516	5.1086

Figura 8: Cromatograma patr3n 4 ppm columna C18

```

=====
Acq. Operator   : VERO
Acq. Instrument : Instrument 1                Location : Vial 1
Injection Date  : 4/24/2019 6:36:25 PM
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed   : 4/24/2019 6:31:26 PM by VERO
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
Last changed   : 4/24/2019 7:52:51 PM by VERO
Sample Info    : 70% ACN, 30% MeOH
=====
    
```

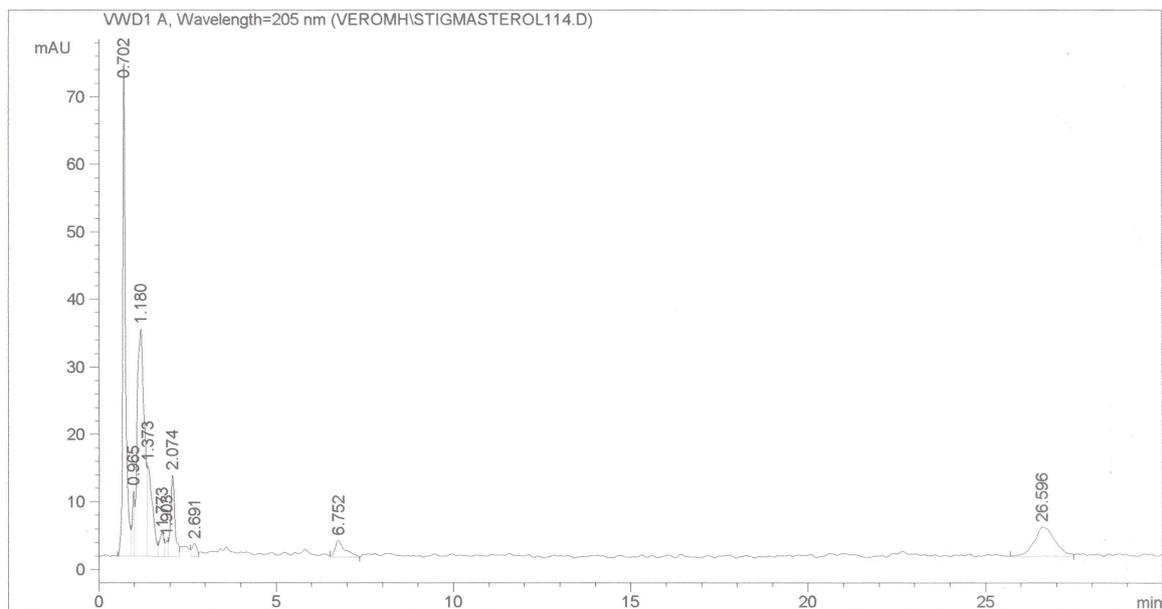


Area Percent Report

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	0.702	VV	0.0845	284.36710	48.43555	23.3693
2	0.968	VV	0.0607	39.92075	9.22915	3.2807
3	1.169	VV	0.1905	490.67831	33.09029	40.3240
4	1.378	VV	0.1510	160.00943	14.95731	13.1496
5	1.777	VV	0.1291	37.37683	4.56083	3.0716
6	1.902	VV	0.0754	13.76935	2.63861	1.1316
7	2.072	VV	0.1216	78.14034	9.70456	6.4216
8	26.584	VV	0.6105	152.57860	2.41018	9.2517

Figura 9: Cromatograma patrón 8 ppm columna C18

Acq. Operator : VERO
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 4/24/2019 7:07:54 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/24/2019 7:06:42 PM by VERO
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/24/2019 7:52:51 PM by VERO
 Sample Info : 70% ACN, 30% MeOH
 Patrón Stigmasterol 16ppm disuelto en EtOH

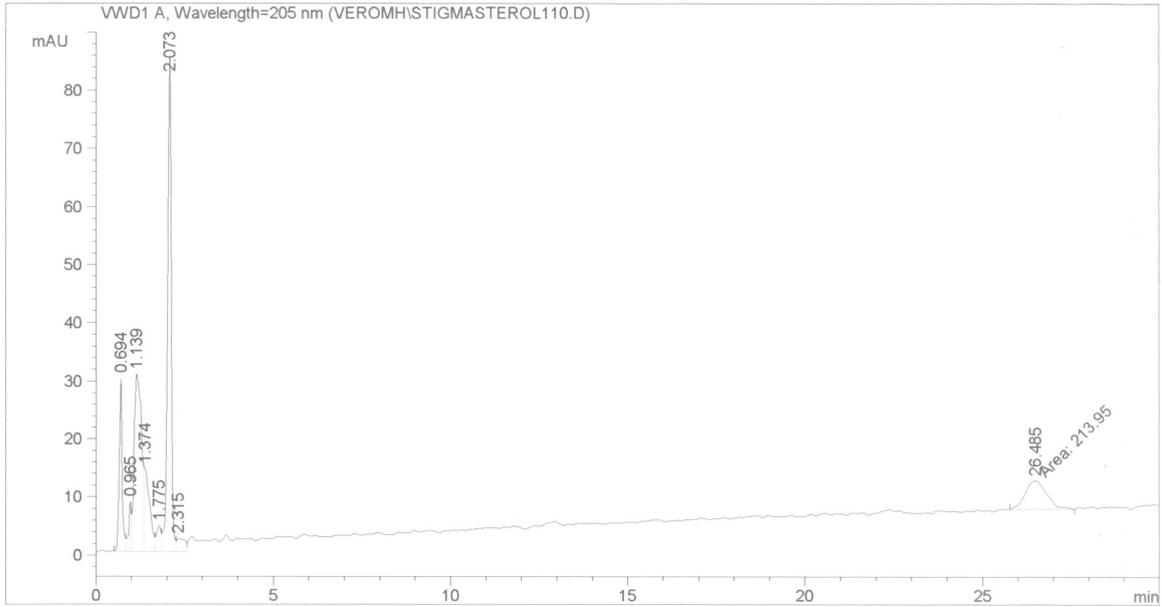


=====
 Area Percent Report
 =====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	0.702	VV	0.0818	412.60794		73.15427	28.1110
2	0.965	VV	0.0663	45.66519		9.75053	3.1112
3	1.180	VV	0.1856	468.88315		33.71045	31.9450
4	1.373	VV	0.1457	139.50943		13.45833	9.5048
5	1.773	VV	0.1355	31.49072		3.59991	2.1455
6	1.903	VV	0.0747	12.20821		2.36799	0.8317
7	2.074	VV	0.1297	103.86893		12.05097	7.0766
8	2.691	VV	0.1501	19.11450		1.91191	1.3023
9	6.752	VV	0.2764	50.02613		2.50802	3.4083
10	26.596	BV	0.5439	156.86387		4.35149	12.5637

Figura 10: Cromatograma patrón 16 ppm columna C18

Acq. Operator : VERO
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 4/24/2019 4:53:56 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/24/2019 4:51:27 PM by VERO
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/24/2019 7:52:51 PM by VERO
 Sample Info : 70% ACN, 30% MeOH
 Patrón Stigmasterol 20ppm disuelto en EtOH

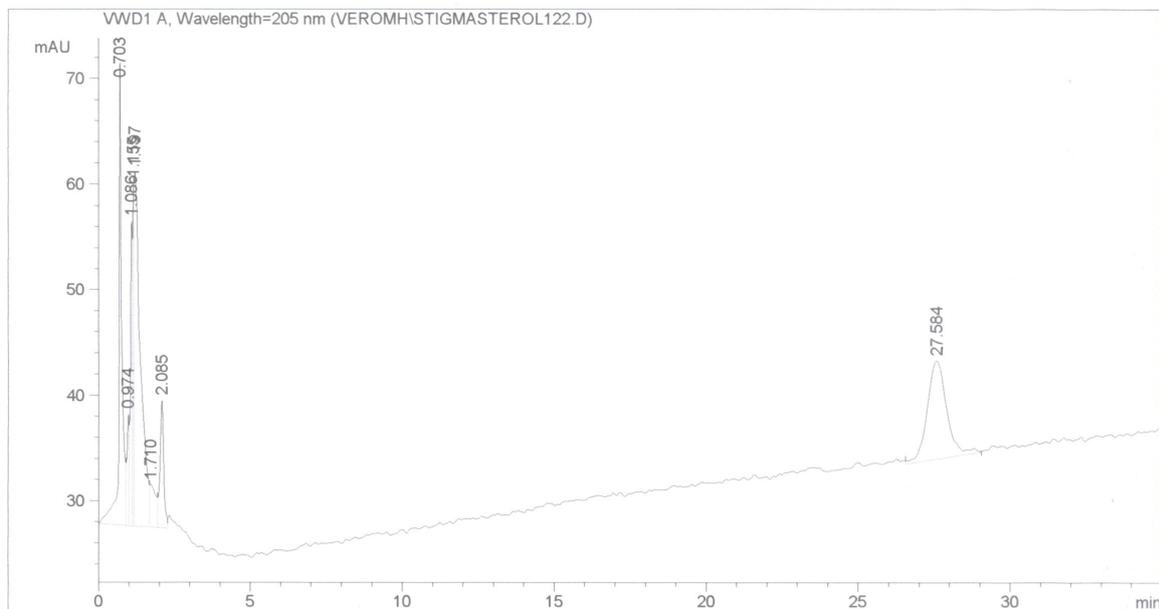


=====
 Area Percent Report
 =====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	0.694	BV	0.0833	172.48090		29.89799	9.8504
2	0.965	VV	0.0756	46.27282		8.63341	2.6426
3	1.139	VV	0.1860	457.72241		30.62720	26.1406
4	1.374	VV	0.1427	148.85977		14.36987	8.5014
5	1.775	VV	0.1389	41.11567		4.55166	2.3481
6	2.073	VV	0.1143	632.74829		85.23006	36.1364
7	2.315	VV	0.2117	37.85218		2.27414	2.1617
8	26.485	MM	0.7196	213.94992		4.95531	12.2187

Figura 11: Cromatograma patrón 20 ppm columna C18

Acq. Operator : VERO
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 4/25/2019 4:48:59 PM
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/25/2019 4:47:00 PM by VERO
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\STIGMASTEROL.M
 Last changed : 4/24/2019 7:52:51 PM by VERO
 Sample Info : 70% ACN, 30% MeOH
 Patrón Stigmasterol 50ppm disuelto en EtOH



=====
 Area Percent Report
 =====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	0.703	BV	0.0934	307.98398	43.93158	18.5620
2	0.974	VV	0.0722	55.39243	10.67563	3.3385
3	1.086	VV	0.0609	122.30341	28.96974	7.3711
4	1.155	VV	0.0471	102.66344	32.68784	6.1874
5	1.197	VV	0.1785	485.54294	33.66208	29.2633
6	1.710	VV	0.1906	54.30466	4.10978	3.2729
7	2.085	VV	0.1313	108.27542	12.19040	6.5257
8	27.584	MM	0.7539	402.75565	9.34629	25.4792

Figura 12: Cromatograma patrón 40 ppm columna C18

Sample Info : Extracto planta ultrasonido C = 10ppm
30% MeOH, 70% ACN
L = 205 nm
flujo = 1,2

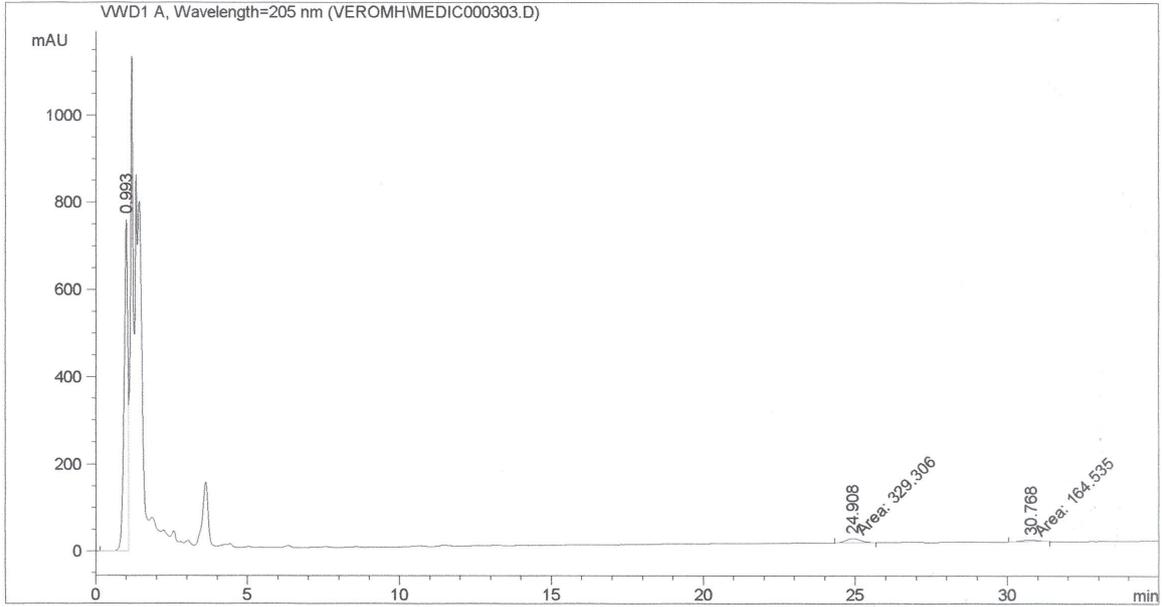


Figura 13: Cromatograma adiciones patrón 10 ppm columna C18

Sample Info : Extracto planta ultrasonido C = 20ppm
30% MeOH, 70% ACN
L = 205 nm
flujo = 1,2

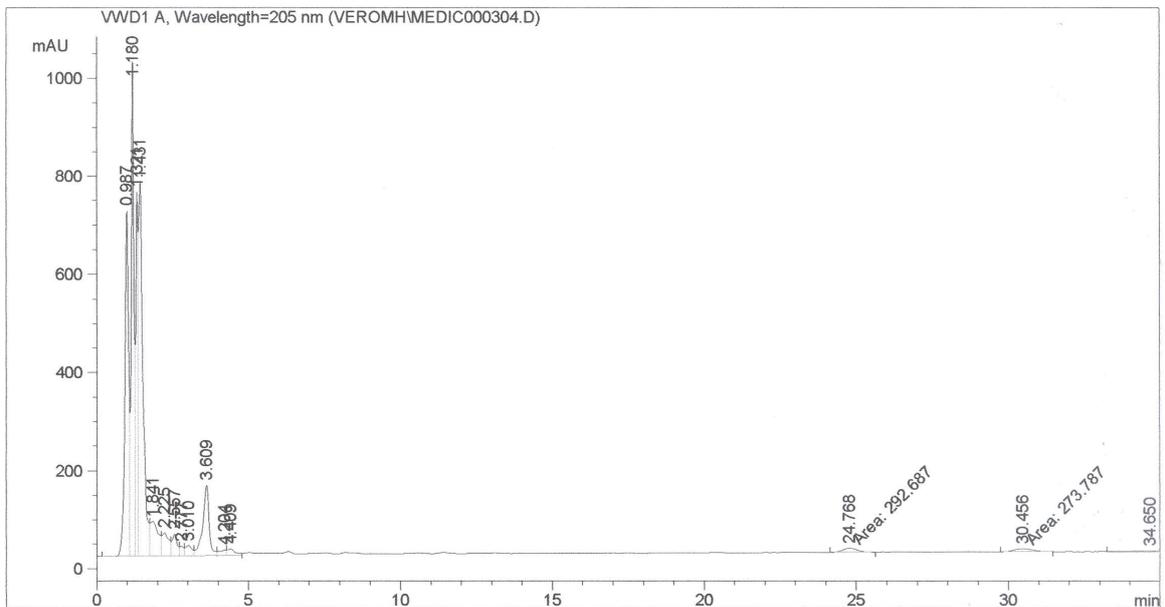


Figura 14: Cromatograma adiciones patrón 20 ppm columna C18

Sample Info : Extracto planta ultrasonido C = 25ppm
 30% MeOH, 70% ACN
 L = 205 nm
 flujo = 1,2

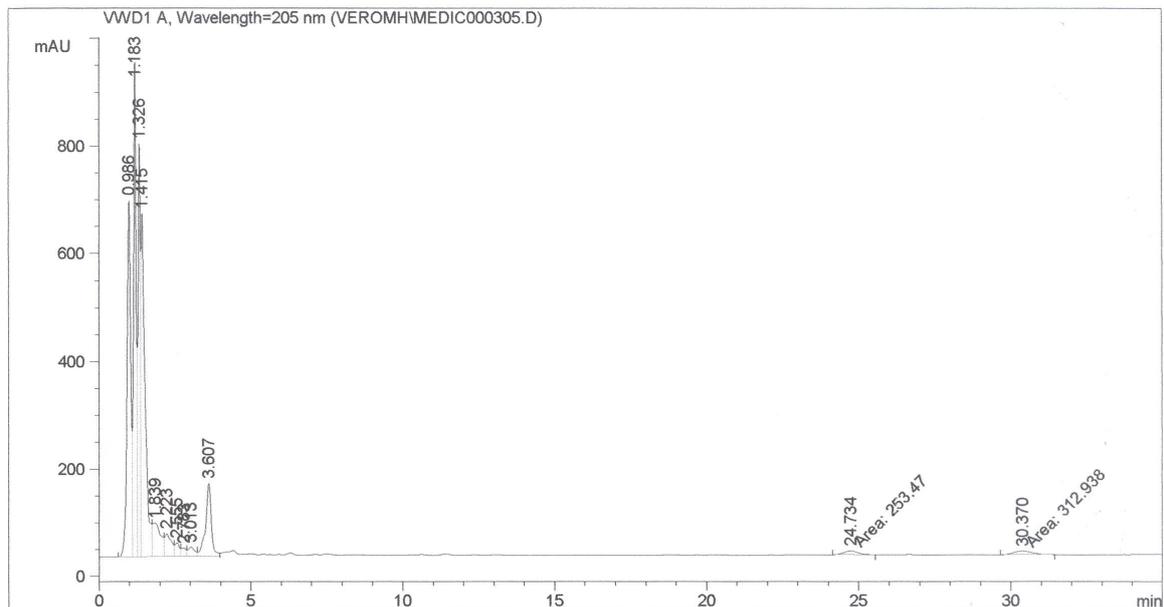
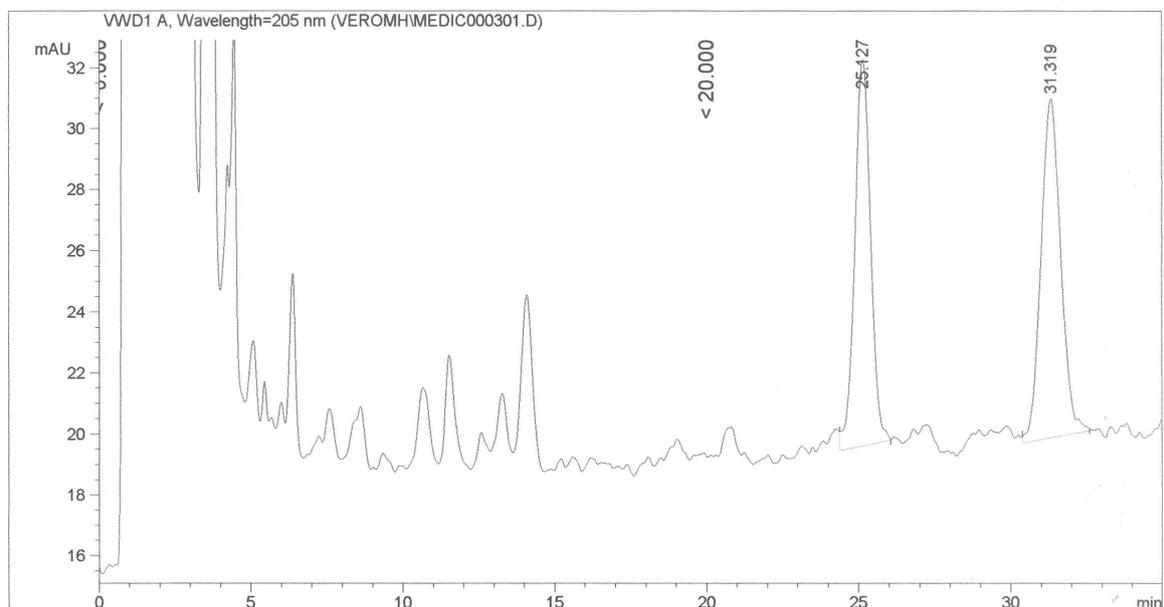


Figura 15: Cromatograma adiciones patrón 25 ppm columna C18

Sample Info : Extracto planta + patron 100ppm
 30% MeOH, 70% ACN
 L = 205 nm
 flujo = 1,2



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	25.127	VB	0.5528	459.81082		12.67409	47.6713
2	31.319	BB	0.7184	504.73260		11.12815	52.3287

Figura 16: Cromatograma adiciones patrón 100 ppm columna C18

Anexo II: CG-FID

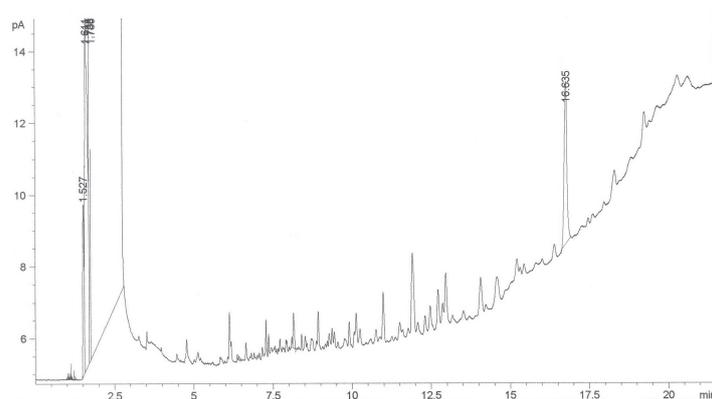


Figura 17: Cromatograma patrón polygodial. En el análisis se emplean dos rampas: la primera de 20°C/min desde 80°C hasta 190°C y la segunda de 5°C/min desde 190°C hasta 250°C.

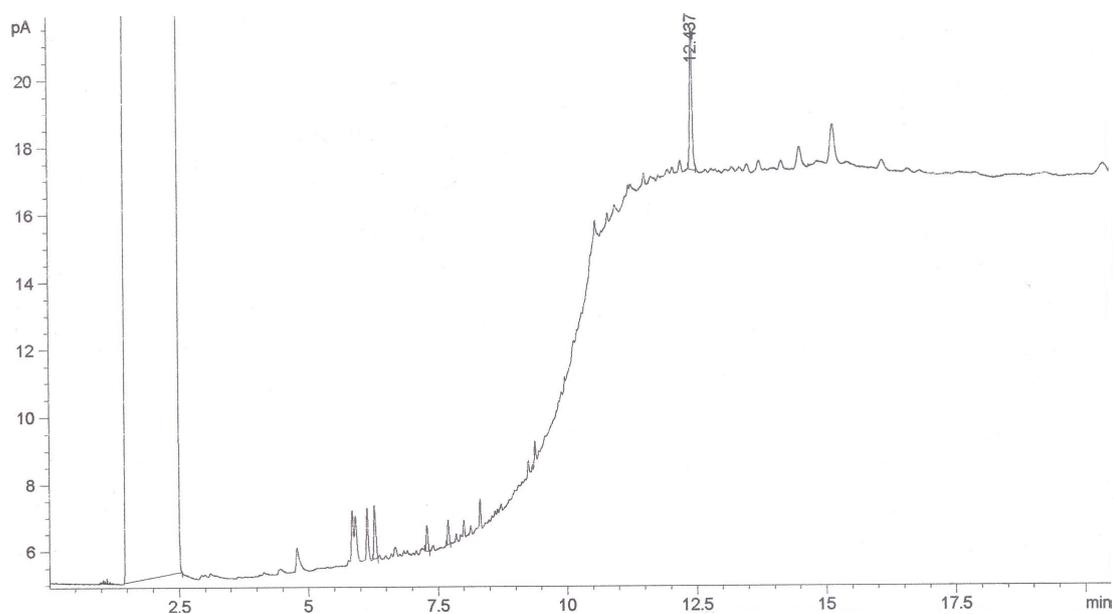


Figura 18: Cromatograma patrón polygodial en hexano. La rampa utilizada consistió en una rampa de 20°C/min partiendo de 80°C y llegando hasta 250°C.

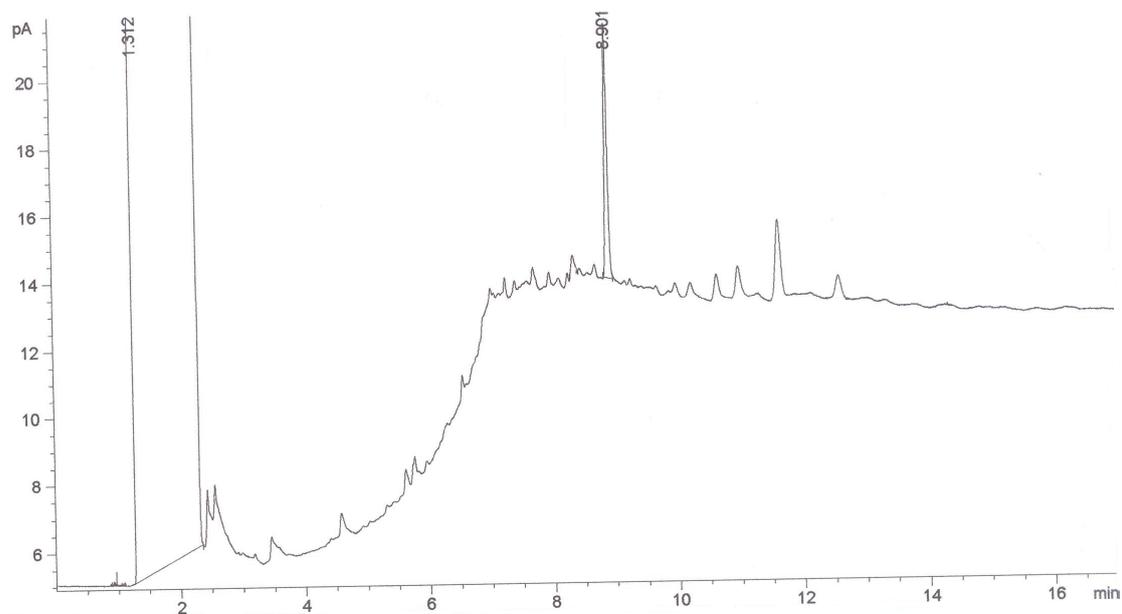


Figura 19: Cromatograma patrón polygodial en hexano. La rampa utilizada consiste en una única rampa de $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ partiendo de 150° hasta llegar a 280°C .

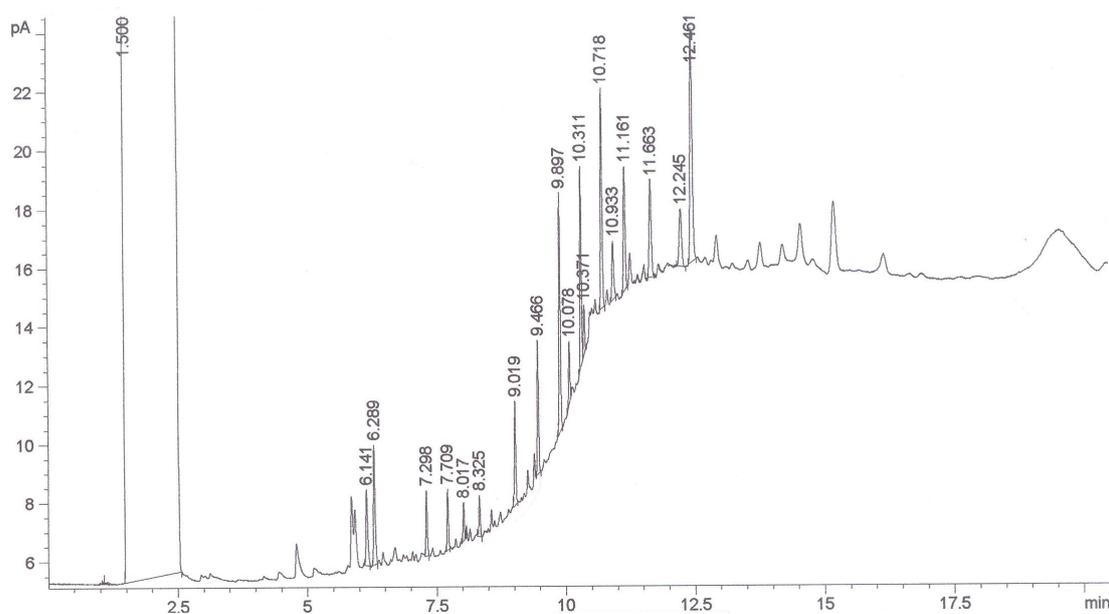


Figura 20: Extracto en hexano mediante Soxhlet de *Polygonum Punctatum*. La rampa utilizada consiste en una única rampa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ partiendo de 80°C y llegando hasta 250°C .

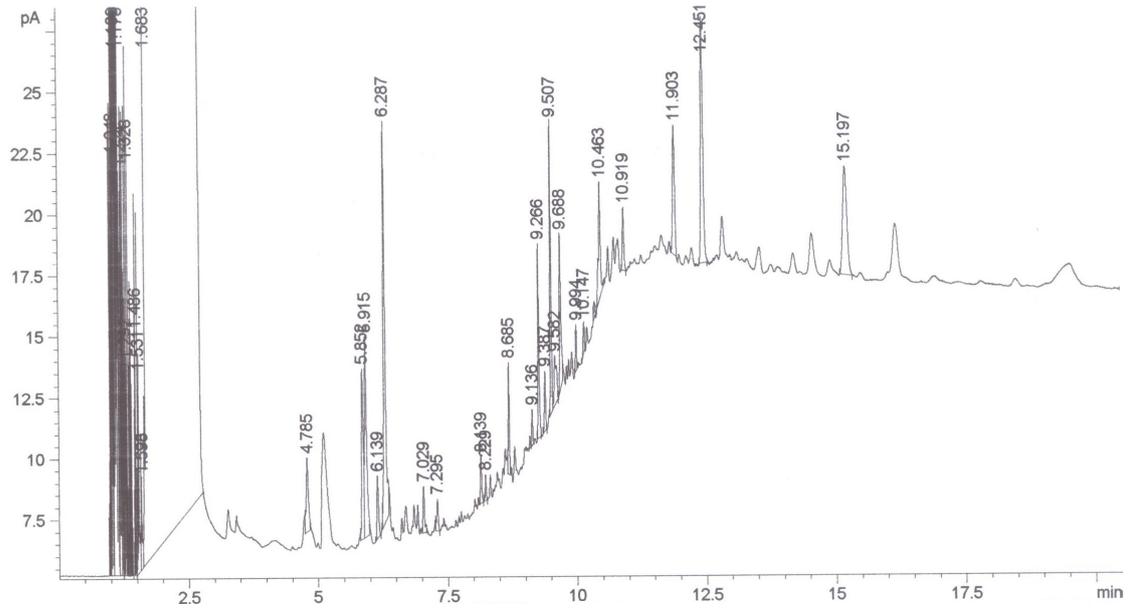


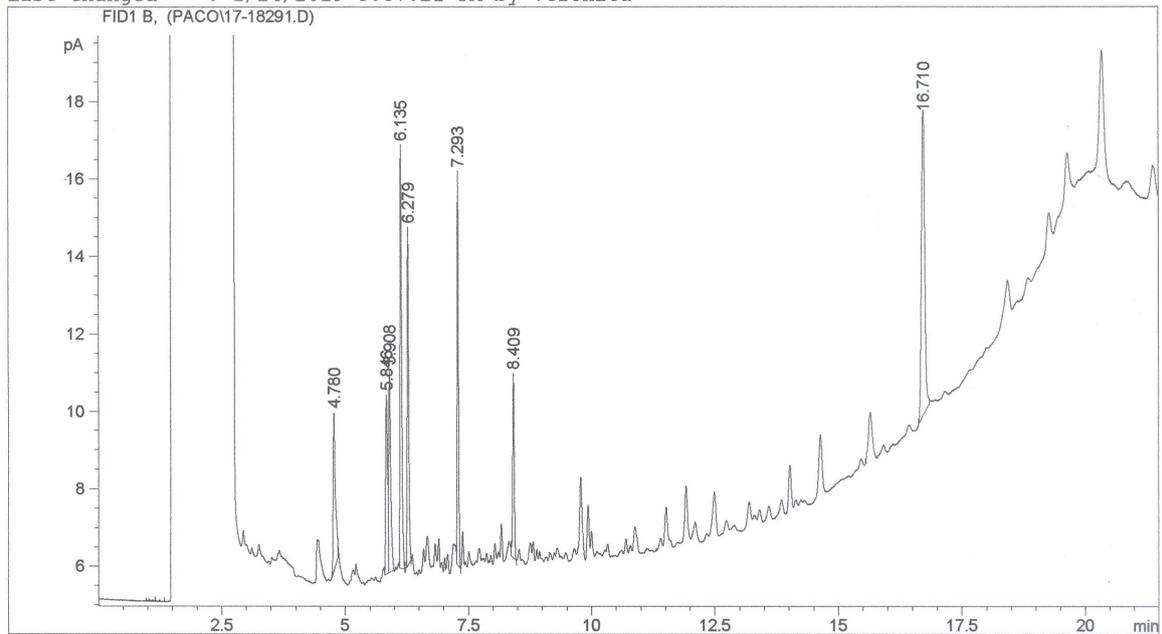
Figura 21: Extracto en metanol mediante Soxhlet de *Polygonum Punctatum* La rampa utilizada consiste en una única rampa de 20°C/min partiendo de 80°C y llegando hasta 250°C.

Extracto Hexano catay + patrón 80ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/24/2019 5:08:18 PM
Sample Name     : A.Patron_Hex_1
Acq. Operator  :
Location       : Vial 101
Inj           : 1
Inj Volume    : 0.2 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 4/24/2019 5:02:51 PM by
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.780	PB	0.0426	12.26738	4.13705	8.99502
2	5.842	BV	0.0373	10.75892	4.42846	7.88894
3	5.905	VB	0.0413	13.75996	4.96576	10.08945
4	6.135	BB	0.0339	23.31555	10.51341	17.09606
5	6.279	BP	0.0308	17.00141	8.32633	12.46623
6	7.293	BP	0.0278	17.02645	9.54877	12.48459
7	8.409	BP	0.0343	9.77335	4.51178	7.16628
8	16.706	PB	0.0966	32.47670	6.60466	23.81344

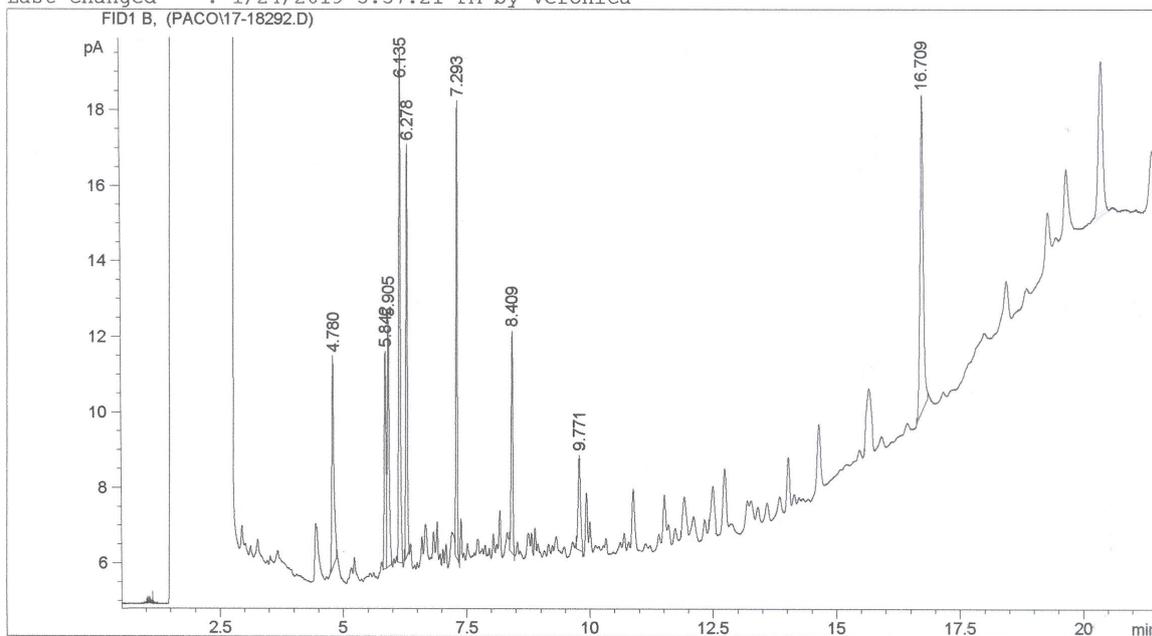
Figura 22: Cromatograma de extracto en hexano. Adición 1, total concentración de patrón de 10 ppm

Extracto Hexano catay + patron 40ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/24/2019 6:05:33 PM
Sample Name     : A.Patron_Hex_2
Acq. Operator   :
Location       : Vial 101
Inj           : 1
Inj Volume    : 0.2 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 4/24/2019 5:02:51 PM by
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By       : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.780	PB	0.0408	14.21771	5.05662	7.41655
2	5.842	BV	0.0358	12.45231	5.21761	6.49564
3	5.905	VB	0.0394	15.86539	5.89490	8.27604
4	6.135	BB	0.0339	27.12371	12.21894	14.14885
5	6.278	BB	0.0303	19.71424	9.88748	10.28376
6	7.293	BP	0.0290	19.80814	10.97976	10.33274
7	8.409	BP	0.0333	11.51779	5.30695	6.00816
8	9.771	BB	0.0504	7.63712	2.25953	3.98384
9	16.709	PB	0.1021	41.74692	8.81498	21.77692

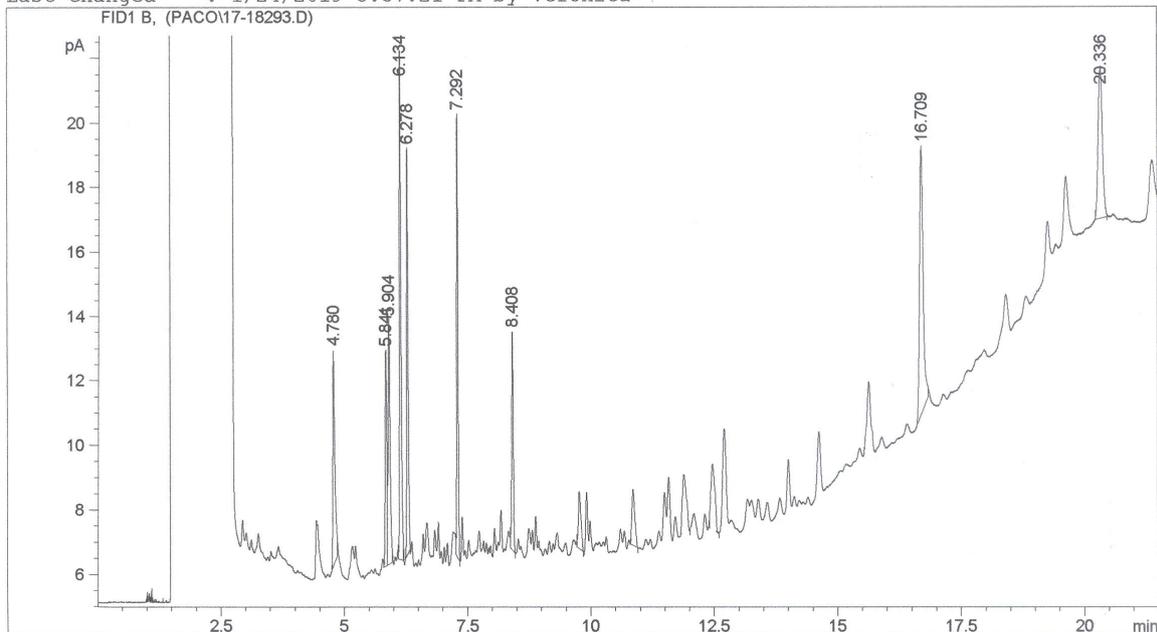
Figura 23: Cromatograma de extracto en hexano. Adición 2, total concentración de patrón de 20 ppm

Extracto Hexano catay + patron 60ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/24/2019 6:33:24 PM
Sample Name     : A.Patron_Hex_3
Acq. Operator   :
Location        : Vial 101
Inj             : 1
Inj Volume      : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 4/24/2019 5:02:51 PM by
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
    
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount    : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B,

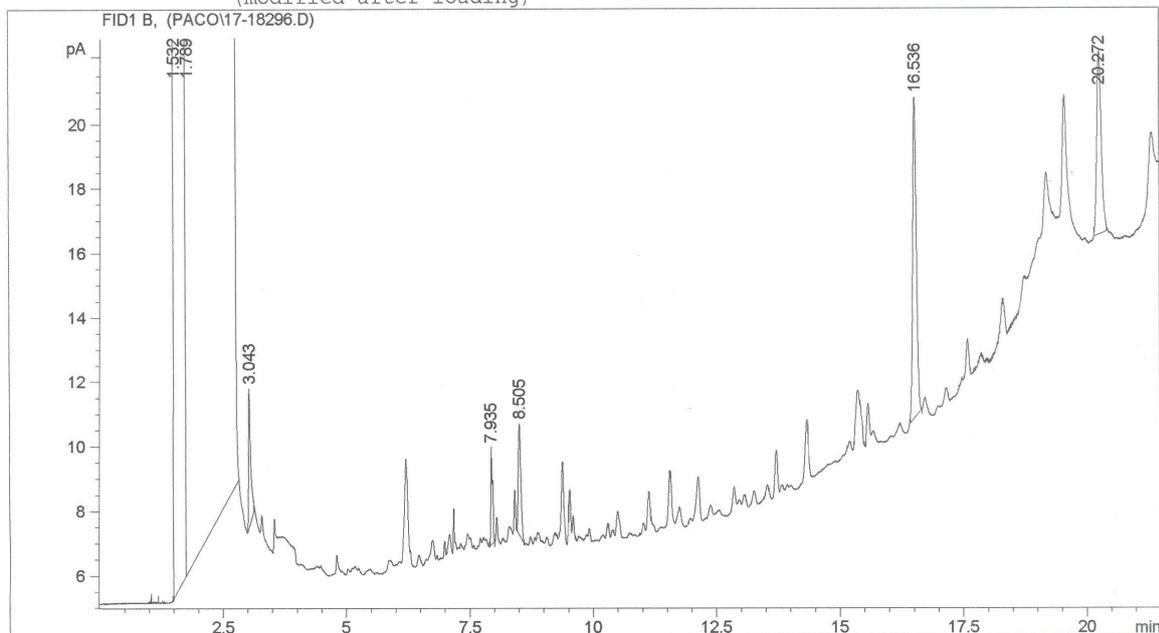
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.780	PB	0.0386	13.94234	5.15318	6.99704
2	5.841	BV	0.0356	12.20761	5.15869	6.12646
3	5.904	VB	0.0386	15.33381	5.83853	7.69536
4	6.134	BB	0.0335	26.49875	12.14166	13.29855
5	6.278	BP	0.0310	19.20468	9.73365	9.63797
6	7.292	BP	0.0283	19.36173	10.60941	9.71679
7	8.408	BP	0.0345	11.39770	5.22167	5.72000
8	16.709	PB	0.1358	59.66981	11.32232	29.94563
9	20.336	BB	0.0755	21.64408	3.63528	10.86220

Figura 24: Cromatograma de extracto en hexano. Adición 3, total concentración de patrón de 30 ppm

Extracto Hexano catay + patron 80ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date : 4/25/2019 10:07:00 AM
Sample Name    : A.Patron_Hex_4
Acq. Operator :
Location       : Vial 101
Inj           : 1
Inj Volume    : 0.2 µl
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed  : 4/25/2019 10:04:44 AM by
                (modified after loading)
=====
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

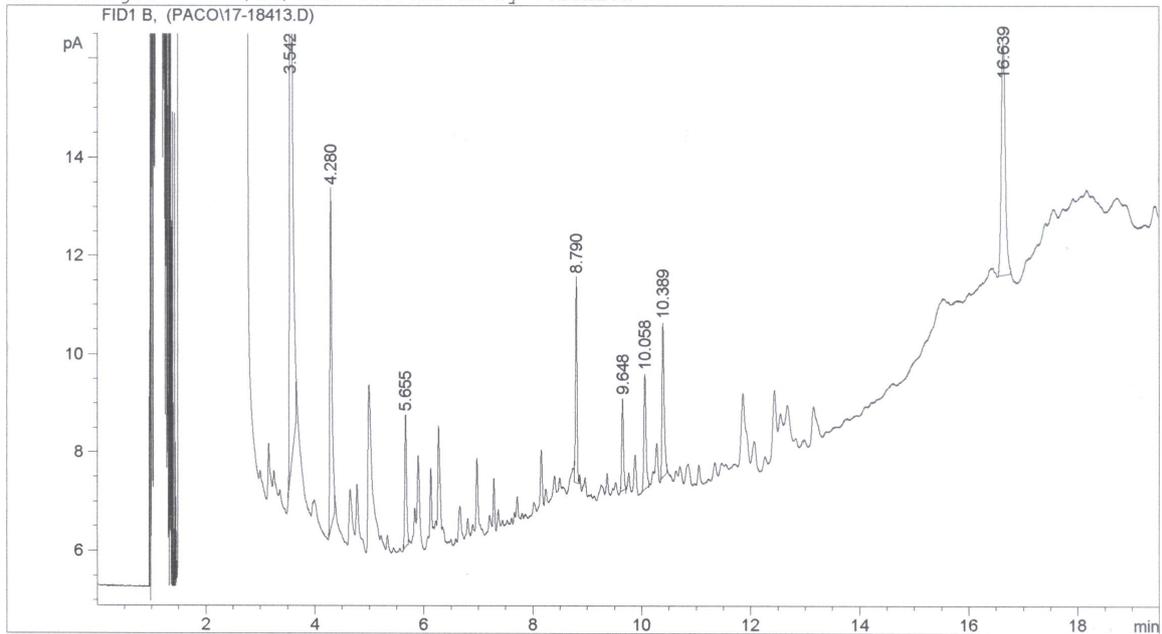
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.532	PV	0.0732	1.09727e4	1994.58228	0.51534
2	1.789	VB S	0.1520	2.11803e6	2.32293e5	99.47475
3	3.043	PB	0.0411	9.15779	3.22934	0.00043
4	7.935	PP	0.0347	5.62369	2.28951	0.00026
5	8.505	BP	0.0557	9.37222	2.62386	0.00044
6	16.536	PP	0.0842	73.49257	14.53791	0.03145

Figura 25: Cromatograma de extracto en hexano. Adición 4, total concentración de patrón de 40 ppm

Injection Date : 6/13/2019 5:02:09 PM
 Sample Name : AP MeOH_S.1 Location : Vial 101
 Acq. Operator : PACO Inj : 1
 Inj Volume : 0.2 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
 Last changed : 6/13/2019 4:31:17 PM by PACO
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
 Last changed : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.542	PB	0.0441	57.01984	17.91504	41.24109
2	4.280	PB	0.0375	18.12472	6.93607	13.10918
3	5.655	PB	0.0350	6.21680	2.68273	4.49646
4	8.790	BB	0.0305	8.02171	4.16605	5.80191
5	9.648	PP	0.0353	4.20590	1.86496	3.04203
6	10.058	PB	0.0413	6.29251	2.34214	4.55122
7	10.389	PB	0.0399	8.52396	3.12187	6.16518
8	16.639	PB	0.1150	29.85434	5.32613	21.59293

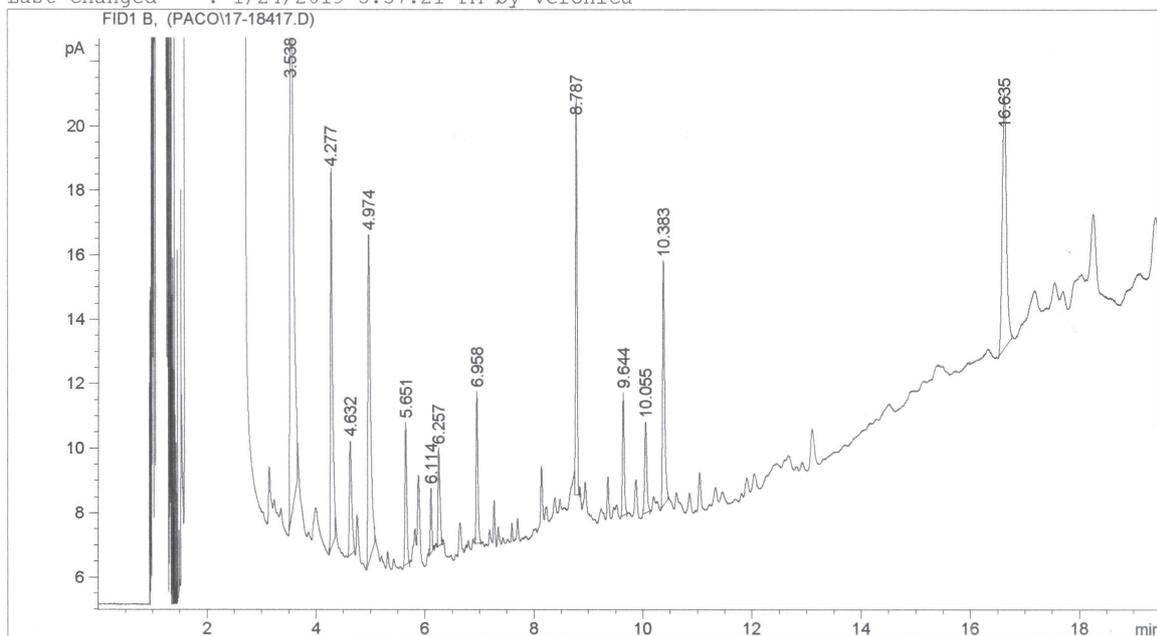
Figura 26: Cromatograma de extracto en metanol. Adición 1, total de concentración de patrón de 10 ppm

Extracto sohxlet catay + 80 ppm

```

=====
Injection Date   : 6/13/2019 6:22:37 PM
Sample Name     : AP MeOH_S.4
Acq. Operator   : PACO
Location        : Vial 101
Inj             : 1
Inj Volume      : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 6/13/2019 4:31:17 PM by PACO
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.538	PB	0.0472	69.82084	20.80391	33.02565
2	4.277	PB	0.0368	21.35454	8.36744	10.10082
3	4.632	PB	0.0428	7.27514	2.51437	3.44118
4	4.974	PB	0.0487	23.94748	7.22194	11.32730
5	5.651	PB	0.0343	7.06686	3.13949	3.34266
6	6.114	BB	0.0302	2.69905	1.41833	1.27667
7	6.257	PB	0.0346	5.06729	2.14358	2.39686
8	6.958	BB	0.0333	7.31645	3.37332	3.46072
9	8.787	BB	0.0291	18.26696	9.62870	8.64038
10	9.644	PB	0.0352	6.12136	2.72208	2.89544
11	10.055	PB	0.0420	5.52659	2.01385	2.61411
12	10.383	PB	0.0407	14.21843	5.40194	6.72540

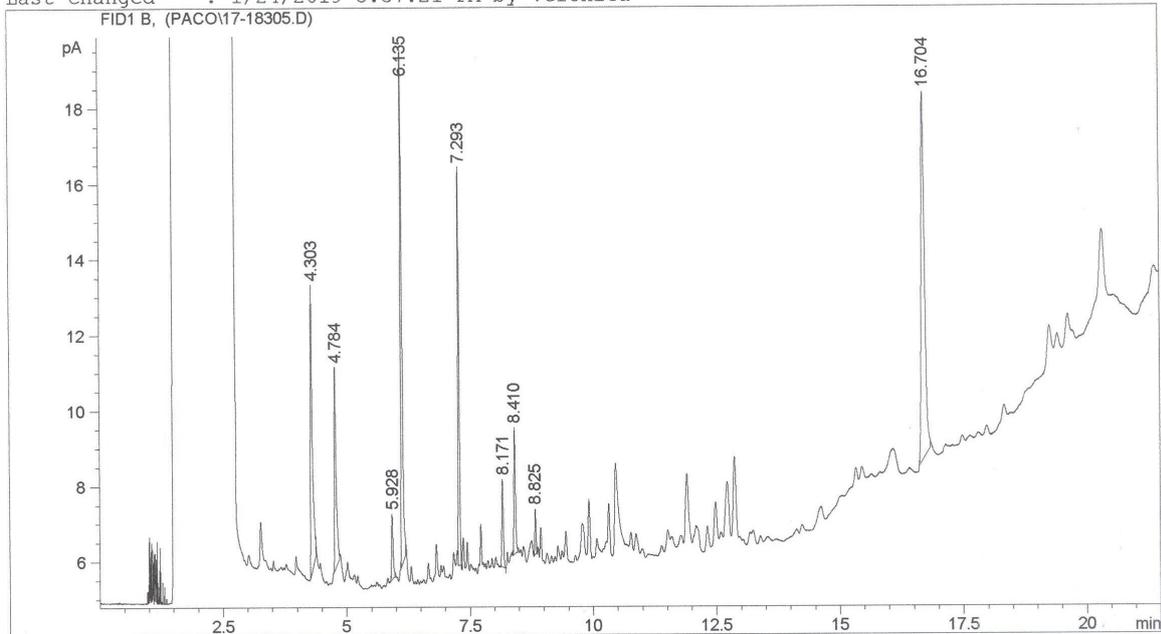
Figura 27: Cromatograma de extracto en metanol. Adición 4, total de concentración de patrón de 40 ppm

Extracto Metanol catay mediante macerado + 20ppm
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/25/2019 5:01:30 PM           Location : Vial 101
Sample Name     : A.P_MeOH_M.1                   Inj      : 1
Acq. Operator   :                               Inj Volume : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 4/25/2019 4:31:04 PM by
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

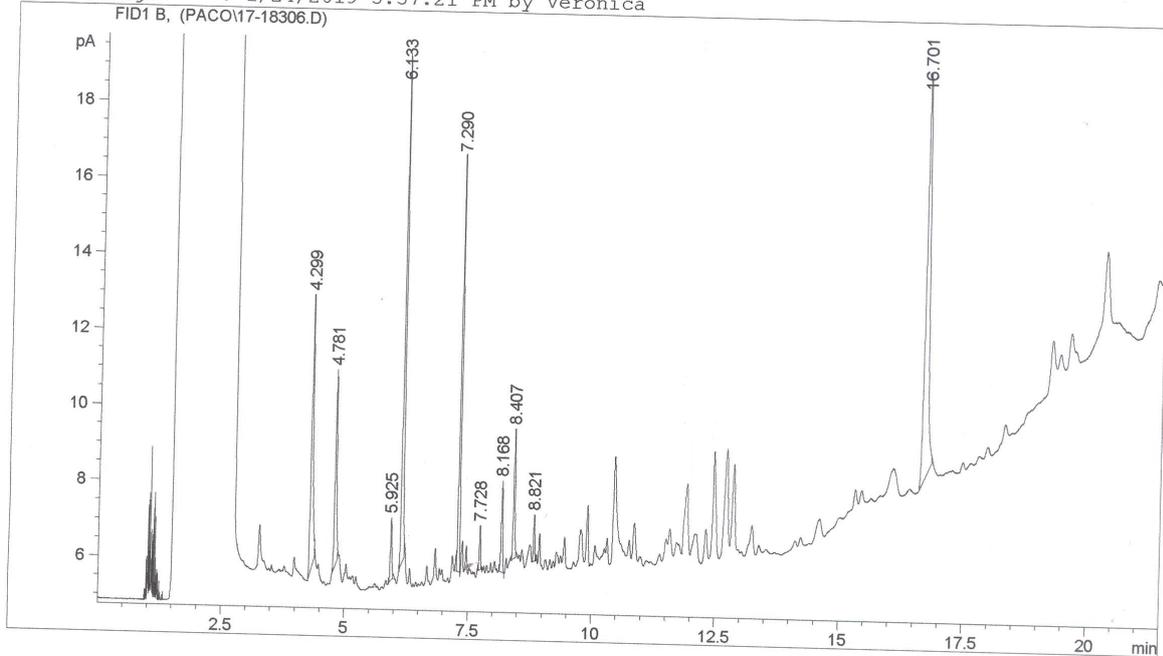
Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.303	PB	0.0368	19.32142	7.56064	12.11919
2	4.784	PB	0.0360	12.66107	5.28203	7.94155
3	5.928	PB	0.0303	3.41572	1.71219	2.14248
4	6.135	BB	0.0308	27.60545	13.52704	17.31528
5	7.293	BP	0.0271	18.08499	10.51262	11.34366
6	8.171	BP	0.0326	4.84576	2.30251	3.03946
7	8.410	BB	0.0336	7.02371	3.33188	4.40556
8	8.825	PB	0.0263	1.98880	1.20210	1.24746
9	16.704	PB	0.1046	64.48132	12.27675	40.44536

Figura 28: Cromatograma de extracto en metanol. Adición 1, total de concentración de patrón de 10 ppm

Extracto Metanol catay mediante macerado + 40ppm
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```
=====
Injection Date : 4/25/2019 5:30:15 PM
Sample Name    : A.P_MeOH_M.2
Acq. Operator  :                               Location : Vial 101
                                                Inj       : 1
                                                Inj Volume: 0.2 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed  : 4/25/2019 4:31:04 PM by
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed  : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
=====
```



```
=====
Area Percent Report
=====
```

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.299	PB	0.0380	19.34859	7.29071	10.92139
2	4.781	PB	0.0364	12.63332	5.18898	7.13093
3	5.925	PB	0.0308	3.39133	1.66350	1.91425
4	6.133	PB	0.0311	27.81071	13.43995	15.69787
5	7.290	BP	0.0260	18.72572	10.92314	10.56981
6	7.728	BB	0.0263	1.92591	1.16503	1.08709
7	8.168	BP	0.0328	5.06275	2.38088	2.85769
8	8.407	BB	0.0323	7.08644	3.40394	3.99997
9	8.821	PB	0.0258	1.96863	1.21928	1.11120

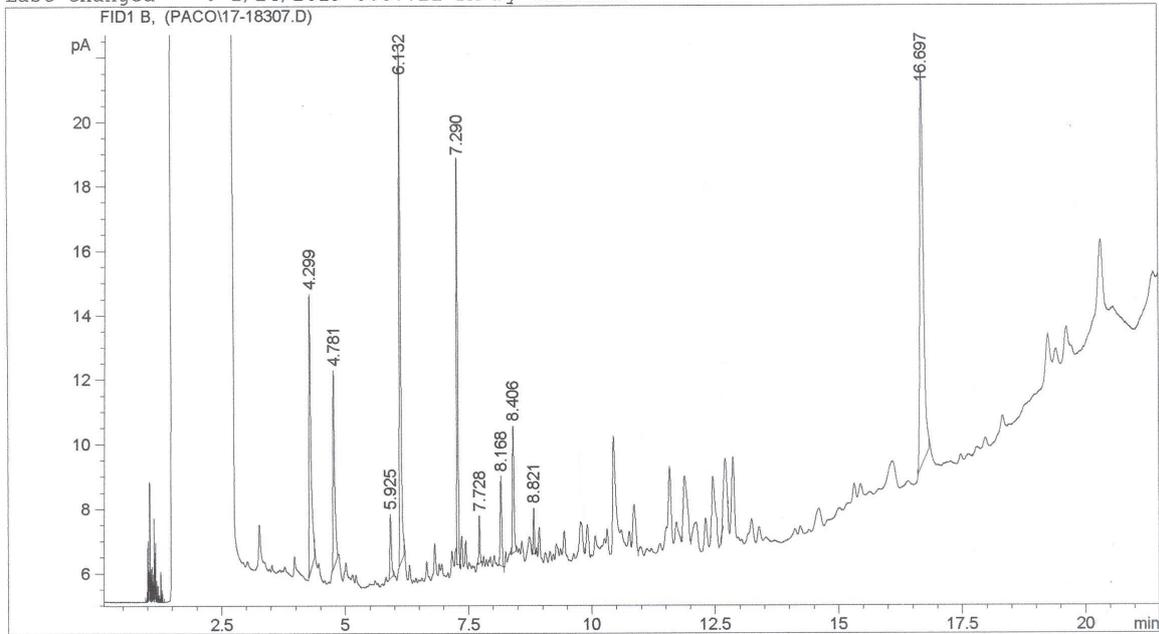
Figura 29: Cromatograma de extracto en metanol. Adición 2, total de concentración de patrón de 20 ppm

Extracto Metanol catay mediante macerado + 60ppm
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/25/2019 5:58:33 PM
Sample Name     : A.P_MeOH_M.3
Acq. Operator   :
Location        : Vial 101
Inj             : 1
Inj Volume      : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 4/25/2019 4:31:04 PM by
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



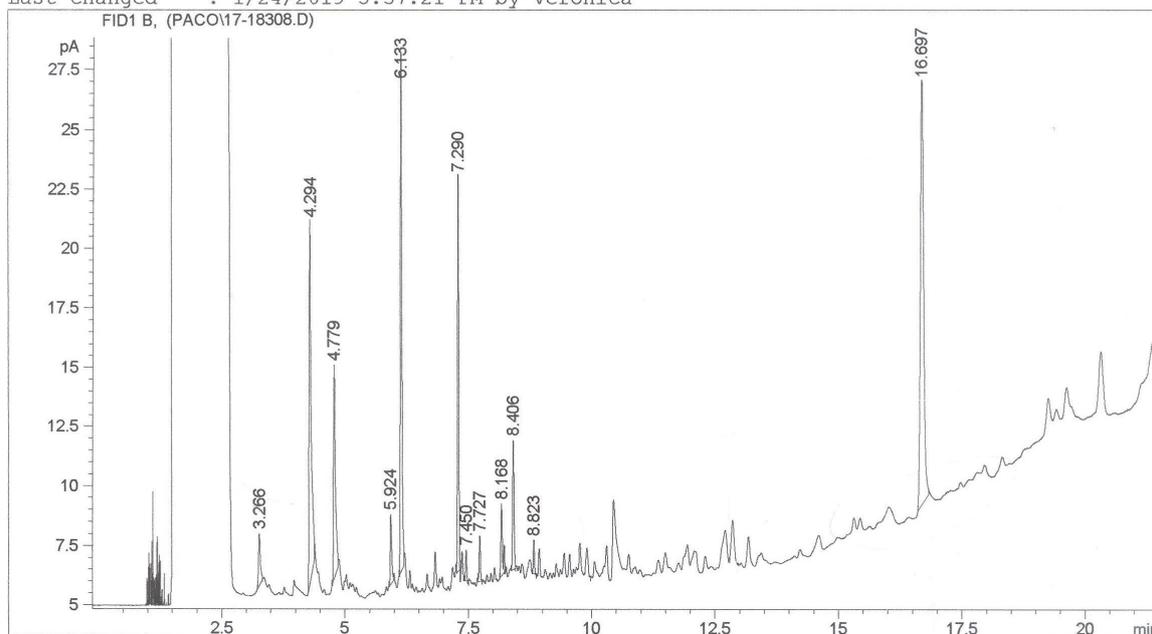
=====
 Area Percent Report
 =====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.299	PB	0.0375	20.08291	7.68650	10.23436
2	4.781	PB	0.0361	12.98355	5.39797	6.61649
3	5.925	PB	0.0307	3.58649	1.76398	1.82770
4	6.132	BB	0.0308	29.07645	14.22575	14.81752
5	7.290	BP	0.0270	19.24141	11.23277	9.80553
6	7.728	BB	0.0255	2.07736	1.30663	1.05863
7	8.168	BP	0.0342	5.33630	2.46796	2.71941
8	8.406	BB	0.0341	7.55212	3.51109	3.84860
9	8.821	PB	0.0251	1.95048	1.25826	0.99398
10	16.697	PB	0.1309	94.34312	17.01263	48.07778

Figura 30: cromatograma de extracto en metanol. Adición 3, total de concentración de patrón de 30 ppm

Extracto Metanol catay mediante macerado + 80ppm
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

=====
 Injection Date : 4/25/2019 1:22:36 PM
 Sample Name : A.P_MeOH_M.4 Location : Vial 101
 Acq. Operator : Inj : 1
 Inj Volume : 0.2 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
 Last changed : 4/25/2019 10:04:44 AM by
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
 Last changed : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica



=====
 Area Percent Report
 =====

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	4.300	PB	0.0360	18.21165	7.33516	9.50076
2	4.781	PB	0.0352	11.77356	5.05165	6.14210
3	5.925	PB	0.0304	3.25112	1.61924	1.69607
4	6.132	BB	0.0312	27.00673	13.03912	14.08902
5	7.290	BP	0.0275	16.94119	10.11605	8.83798
6	7.727	BP	0.0256	1.98165	1.24468	1.03380
7	8.168	BP	0.0330	4.96042	2.31269	2.58778
8	8.406	BB	0.0327	6.90124	3.26239	3.60028
9	8.820	PB	0.0235	1.85615	1.23422	0.96833
10	16.697	PB	0.1420	98.80259	18.59315	51.54390

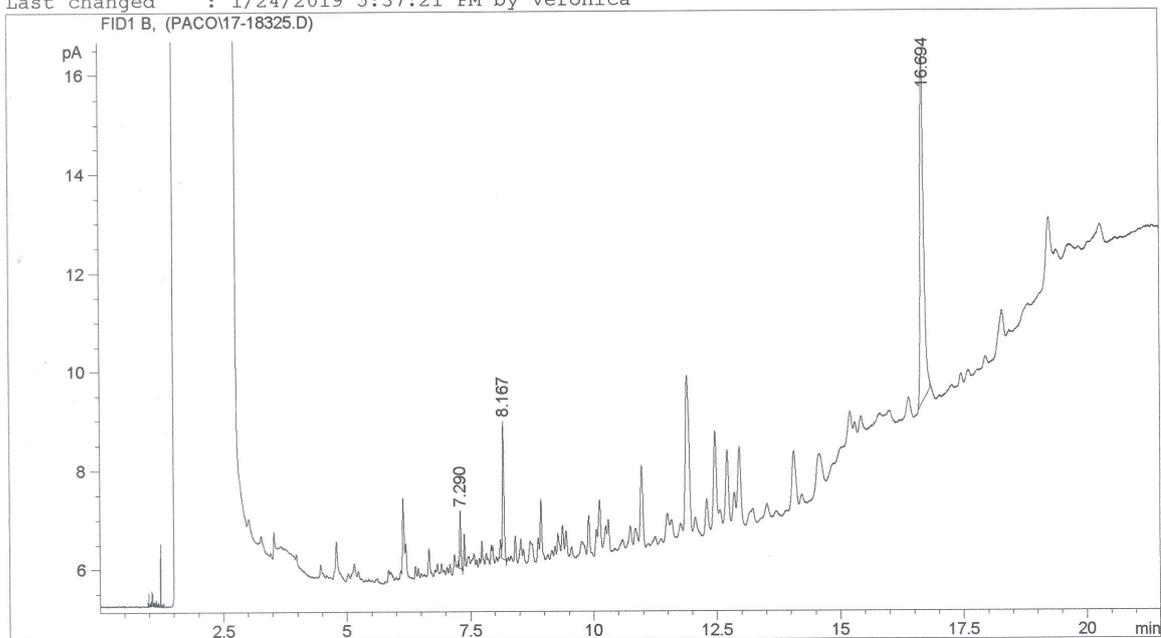
Figura 31: Cromatograma de extracto en metanol. Adición 4, total de concentración de patrón de 40 ppm

Extracto DCM catay (macerado) + patron 20ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/30/2019 10:48:32 AM
Sample Name     : A.P_DCM_M.1.1
Acq. Operator  :
Location       : Vial 101
Inj           : 1
Inj Volume    : 0.2 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 4/30/2019 9:43:50 AM by
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	7.290	BP	0.0283	2.00362	1.15064	4.61522
2	8.167	BP	0.0330	5.94238	2.77176	10.98058
3	16.694	BP	0.0731	33.00362	7.73709	84.40420

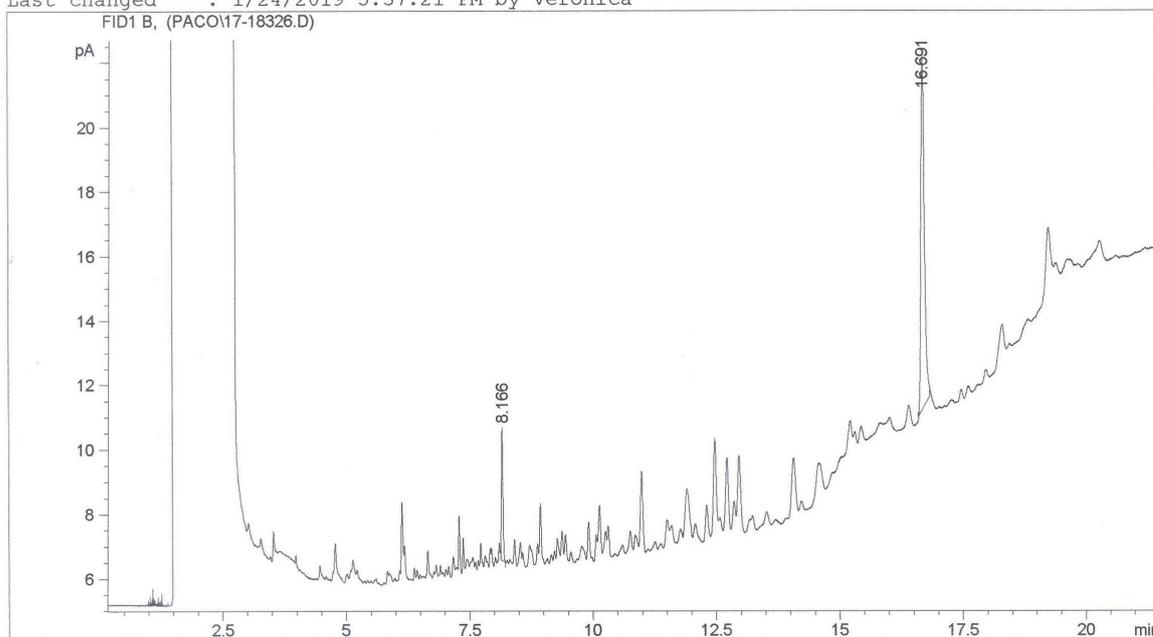
Figura 32: Cromatograma de extracto diclorometano. Adición 1, total de concentración de patrón de 10 ppm

Extracto DCM catay (macerado) + patron 40ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/30/2019 11:17:12 AM
Sample Name     : A_P_DCM_M.2.1
Acq. Operator   :
Location        : Vial 101
Inj             : 1
Inj Volume      : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 4/30/2019 9:43:50 AM by
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	8.166	BP	0.0326	5.78749	2.74461	11.94013
2	16.691	PP	0.0727	53.68322	11.11788	88.05987

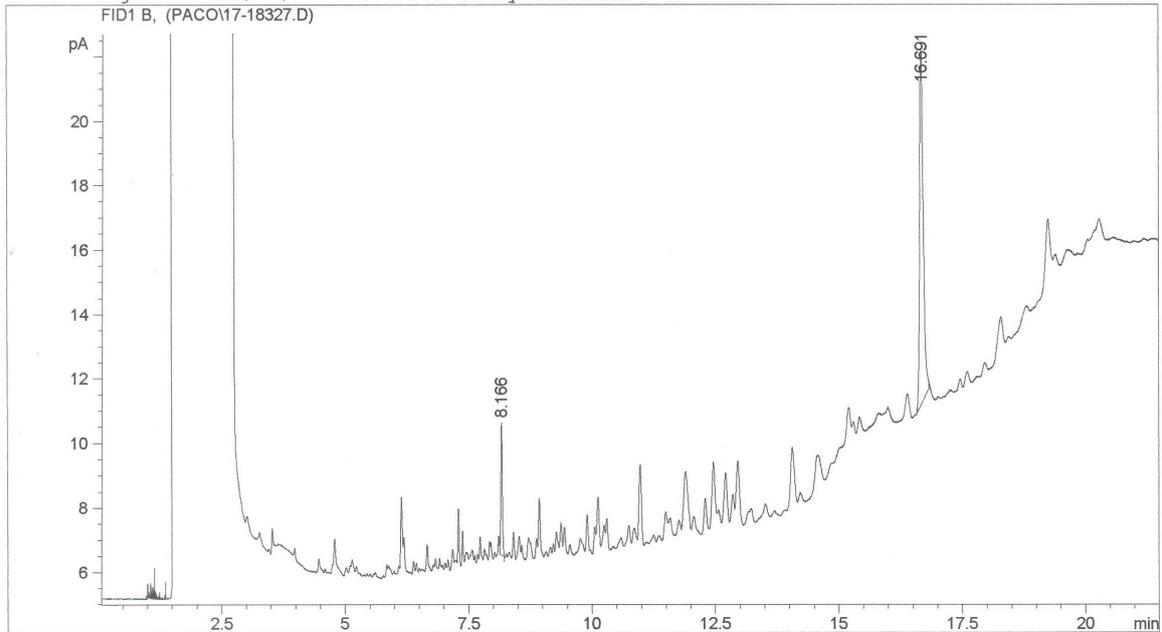
Figura 33: Cromatograma de extracto diclorometano. Adición 2, total de concentración de patrón de 20 ppm

Extracto DCM catay (macerado) + patron 60ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/30/2019 11:45:05 AM
Sample Name     : A.P_DCM_M.3.1
Acq. Operator  :
Location       : Vial 101
Inj           : 1
Inj Volume    : 0.2 µl

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 4/30/2019 9:43:50 AM by
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed   : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By           :      Signal
Multiplier          :      1.0000
Dilution            :      1.0000
Sample Amount       :      1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	8.166	BP	0.0329	5.81052	2.71777	8.61720
2	16.691	PB	0.1385	61.61886	11.41417	91.38280

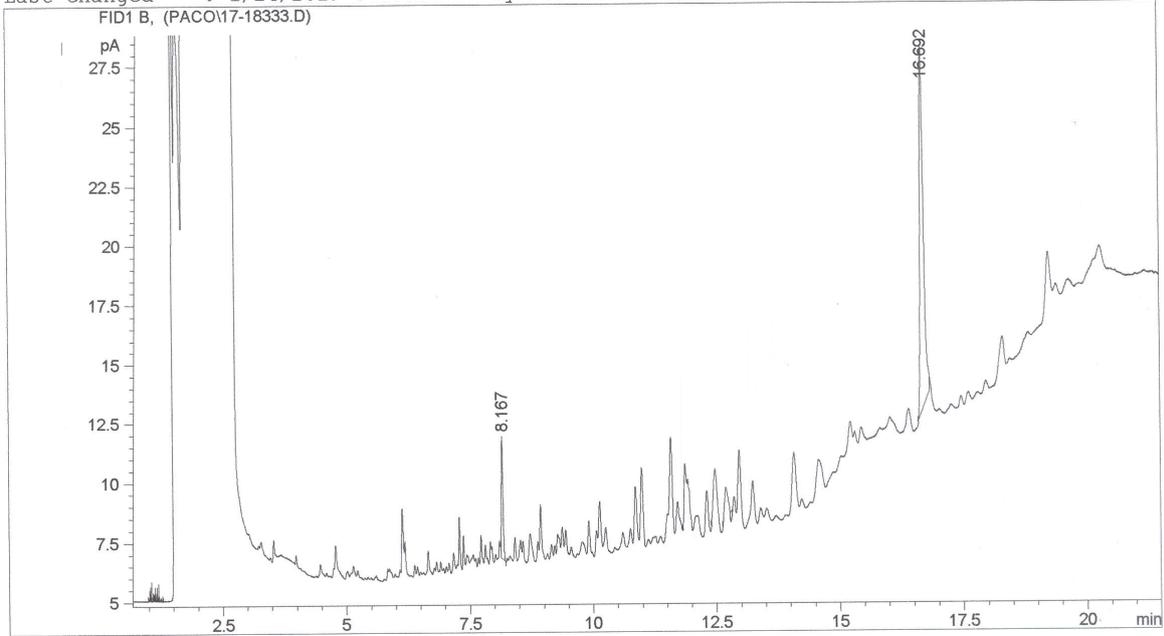
Figura 34: Cromatograma de extracto diclorometano. Adición 3, total de concentración de patrón de 30 ppm

Extracto DCM catay (macerado) + patron 80ppm EtOH
 80°C - 190 °C rampa 20°C/min
 190°C - 250°C rampa 5°C/min
 mantengo 2 minutos

```

=====
Injection Date   : 4/30/2019 6:05:32 PM
Sample Name     : A.P_DCM_M.4.2
Acq. Operator   :
Location        : Vial 101
Inj             : 1
Inj Volume      : 0.2 µl

Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 4/30/2019 9:43:50 AM by
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\METIL1.M\METIL1.M
Last changed    : 1/24/2019 5:37:21 PM by Veronica
    
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount   : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	8.167	BP	0.0337	5.67068	2.56995	7.11421
2	16.692	PP	0.0689	74.78457	12.84489	92.88572

Figura 35: cromatograma de extracto diclorometano. Adición 4, total de concentración de patrón de 40 ppm