

APÉNDICES

APÉNDICE A: CÁLCULO DE LA CONCENTRACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, ANTOCIANINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

- EJEMPLO DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

EXTRACTOS FLOR DE JAMAICA

Datos extracto con agua:

Absorbancia a 765 nm: 0.2455

Volumen de extracto de flor de jamaica empleado: 0.05 mL

Volumen total del matraz aforado: 50 mL

- 1) Se despeja x de la ecuación de la recta de ácido gálico y se sustituye el valor de absorbancia obtenido en el término y de la ecuación 2

$$y = 0.126x - 0.018 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$x = (y + 0.126)/0.018 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$x = \frac{0.2455 + 0.126}{0.018} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$x = 2.0913 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 0.0021 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = C1$$

- 2) Se despeja $C2$ de la siguiente relación:

$$C1V1 = C2V2 \quad (\text{Ec.4})$$

$$C2 = \frac{C1V1}{V2} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde:

$C1 = x$ = Concentración de compuestos fenólicos en el volumen total del matraz aforado (0.0021 mg/mL)

$V1$ = Volumen total en matraz aforado (50 mL)

$V2$ = Volumen del extracto de flor de jamaica empleado (0.05)

$C2$ = Concentración de compuestos fenólicos en el volumen de extracto de flor de jamaica empleado

- 3) Se introducen todos los términos conocidos en la ecuación 6 y se resuelve la ecuación

$$C2 = \frac{50 \text{ mL} * 0.0021 \text{ g/mL}}{0.05 \text{ mL}}$$

$$C2 = 2.0913 \text{ mg de ácido gálico/mL de extracto}$$

$$C2 = 209.12 \text{ mg de ácido gálico/100 mL de extracto}$$

- 4) Para expresar el resultado por 100g de cálices de flor de jamaica se emplea la siguiente relación

$$\frac{209.13 \text{ mg ácido gálico}}{100 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}} \times \frac{25 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}}{2.5 \text{ g de cálices de flor de jamaica}} =$$

$$= 20.913 \text{ mg ácido gálico/g de cálices de flor de jamaica}$$

$$= 2091.3 \text{ mg ácido gálico/100 g de cálices de flor de jamaica}$$

MICROENCAPSULADOS

Datos microencapsulado 1% de goma

Preparación disolución (muestra líquida): 0.1 g de polvo disueltos en 3 mL de agua destilada

Volumen de muestra líquida empleado: 0.15 mL

Volumen total del matraz aforado: 50 mL

Absorbancia a 765 nm: 0.4734

- 1) Se despeja x de la ecuación de la recta de ácido gálico y se sustituye el valor de absorbancia obtenido en el término y de la ecuación 2

$$y = 0.126x - 0.018 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$x = (y + 0.126)/0.018 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$x = \frac{0.4734 + 0.126}{0.018} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$x = 3.900 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 0.0039 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = C1$$

- 2) Se despeja $C2$ de la siguiente relación:

$$C1V1 = C2V2 \quad (\text{Ec.4})$$

$$C2 = \frac{C1V1}{V2} \quad (\text{Ec.5})$$

Donde:

C1= x = Concentración de compuestos fenólicos en el volumen total del matraz aforado (0.0021 mg/mL)

V1= Volumen total en matraz aforado (50 mL)

V2= Volumen muestra líquida empleado (0.15)

C2= Concentración de compuestos fenólicos en el volumen de muestra líquida

- 3) Se introducen todos los términos conocidos en la ecuación 6 y se resuelve la ecuación

$$C2 = \frac{50 \text{ mL} * 0.0039 \text{ g/mL}}{0.15 \text{ mL}}$$

C2 = 1.3 mg de ácido gálico/mL de muestra líquida

C2 = 130.00 mg de ácido gálico/100 mL muestra líquida

- 4) Para expresar el resultado por g de polvo (microencapsulado) se emplea la siguiente relación

$$\frac{130 \text{ mg ácido gálico}}{100 \text{ mL de muestra líquida}} \times \frac{3 \text{ mL de muestra líquida}}{0.1 \text{ g de polvo (microencapsulado)}} =$$

= 39 mg ácido gálico/g de polvo (microencapsulado)

- 5) Para expresar el resultado por g de sólidos solubles se emplea la siguiente relación tomando en cuenta los siguientes datos para cada microencapsulado; el cálculo se basa en que se tiene un gramo de polvo (microencapsulado), conformado por la humedad, la goma y los sólidos solubles de jamaica, como lo muestra la figura.



Por lo que por medio de relaciones se va eliminando, la humedad, la goma y por último se obtienen los sólidos solubles de jamaica.

Datos microencapsulados

(g) goma en el polvo	humedad b.h polvo	°Bx extracto-goma	g de polvo obtenidos
1	2.99	19.1	14.00
2	2.84	19.9	14.70
3	2.01	20.7	15.50
4	2.94	21.5	16.10
5	2.3	22.5	16.05
Extracto concentrado		18.4	

Datos microencapsulado 1% de goma:

Gramos de polvo obtenidos: 14 g

Humedad: 2.99 % (b.h) (2.99 g de agua en 100 g de polvo, 97.01 g de sólidos secos en 100g de polvo)

Sólidos solubles mezcla extracto concentrado-goma (1%): 19.1 (°Bx)

Sólidos secos= sólidos solubles

$$14 \text{ g de polvo} * \frac{97.1 \text{ g sólidos secos}}{100 \text{ g polvo}} * \frac{1 \text{ g goma}}{19.1 \text{ sólidos solubles}}$$

=0.71 g de goma

∴ 14 g de polvo – 0.71 g de goma = 13.29 g de sólidos solubles

- 6) Usando el valor de compuestos fenólicos obtenido anteriormente (mg de ácido gálico/g de polvo) se hace la siguiente relación:

$$\frac{39 \text{ mg de ácido gálico}}{\text{g de polvo}} * \frac{14 \text{ g de polvo}}{13.29 \text{ g de sólidos solubles}}$$

$$= \frac{41.09 \text{ mg de ácido gálico}}{\text{g de sólidos solubles de jamaica}}$$

- EJEMPLO DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES

EXTRACTOS FLOR DE JAMAICA

Datos extracto con agua:

Solución buffer pH=1

Absorbancia a 520 nm: 0.2818

Absorbancia a 700 nm: 0.006

Absorbancia 520- Absorbancia 700nm= 0.2757

Solución buffer pH=4.5

Absorbancia a 520 nm: 0.0614

Absorbancia a 700 nm: 0.0091

Absorbancia 520- Absorbancia700nm= 0.0522

Volumen de extracto de flor de jamaica empleado: 0.2mL

Volumen total del tubo de ensayo: 7.2mL

PM cianidina-3-glucósido: 449.2 g/mol

FD factor de dilución (vol. Total/vol. Extracto): 36

ϵ absorptividad cianidina-3-glucósido: 26900 L/mol*cm

- 1) Con los datos obtenidos se calcula la absorbancia final de acuerdo a la siguiente ecuación

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$A = 0.2757 - 0.0522 = 0.2235$$

- 2) Con la absorbancia final obtenida, se sustituyen los datos en la ecuación 2:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * 1} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{0.2235 * 449.2 * 36 * 1000}{26900 * 1}$$

$$\begin{aligned} \text{Antocianinas monoméricas} &= 136.68 \text{ mg/L} \\ &= 13.67 \text{ mg de cianidina-3-glucósido/100 mL de extracto} \end{aligned}$$

- 3) Para expresar los resultados por 100g de cálices de flor de jamaica, se empleó la siguiente relación

$$\frac{13.67 \text{ mg de cianidina} - 3 - \text{glucósido}}{100 \text{ mL extracto de flor de jamaica}} \times \frac{25 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}}{2.5 \text{ g de cálices de flor de jamaica}}$$

=1.37 mg de cianidina-3-glucósido/ g de cálices de flor de jamaica

= 13.7 mg de cianidina-3-glucósido/100 g de cálices de flor de jamaica

MICROENCAPSULADOS

Datos microencapsulado 1% de goma

Preparación disolución (muestra líquida): 0.1 g de polvo disueltos en 3 mL de agua destilada

Volumen de extracto de muestra líquida empleado 0.8mL

Volumen total del tubo de ensayo: 7.8 mL

FD factor de dilución (vol. Total/vol. Extracto): 9.75

PM cianidina-3-glucósido: 449.2 g/mol

ϵ absortividad cianidina-3-glucósido: 26900 L/mol*cm

Solución buffer pH=1

Absorbancia a 520 nm: 1.0298

Absorbancia a 700 nm: 0.0829

Absorbancia 520- Absorbancia 700nm= 0.947

Solución buffer pH=4.5

Absorbancia a 520 nm: 0.337

Absorbancia a 700 nm: 0.0885

Absorbancia 520- Absorbancia700nm= 0.2485

- 1) Con los datos obtenidos se calcula la absorbancia final de acuerdo a la siguiente ecuación

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$A = 0.947 - 0.2485 = 0.6985$$

- 2) Con la absorbancia final obtenida, se sustituyen los datos en la ecuación 2:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * 1} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{0.6985 * 449.2 * 36 * 1000}{26900 * 1}$$

$$\begin{aligned} \text{Antocianinas monoméricas} &= 113.72 \text{ mg/L} \\ &= 11.37 \text{ mg de cianidina-3-glucósido/100 mL de muestra} \\ &\text{líquida} \end{aligned}$$

- 3) Para expresar los resultados por g de polvo (microencapsulado), se empleó la siguiente relación

$$\frac{11.37 \text{ mg de cianidina} - 3 - \text{ glucósido}}{100 \text{ mL muestra líquida}} \times \frac{3 \text{ mL de muestra líquida}}{0.1 \text{ g de polvo (microencapsulado)}}$$

$$= 3.41 \text{ mg de cianidina-3-glucósido/ g de polvo (microencapsulado)}$$

- 4) Para expresar el resultado por g de sólidos solubles se emplea la siguiente relación tomando en cuenta los siguientes datos para cada microencapsulado; el cálculo se basa en que se tiene un gramo de polvo (microencapsulado), conformado por la humedad, la goma y los sólidos solubles de jamaica, como lo muestra la figura.



Por lo que por medio de relaciones se va eliminando, la humedad, la goma y por último se obtienen los sólidos solubles de jamaica.

Datos microencapsulado 1% de goma:

Gramos de polvo obtenidos: 14 g

Humedad: 2.99 % (b.h) (2.99 g de agua en 100 g de polvo, 97.01 g de sólidos secos en 100g de polvo)

Sólidos solubles mezcla extracto concentrado-goma (1%): 19.1 (°Bx)

Sólidos secos= sólidos solubles

$$14 \text{ g de polvo} * \frac{97.1 \text{ g sólidos secos}}{100 \text{ g polvo}} * \frac{1 \text{ g goma}}{19.1 \text{ sólidos solubles}}$$

=0.71 g de goma

$$\therefore 14 \text{ g de polvo} - 0.71 \text{ g de goma} = 13.29 \text{ g de sólidos solubles}$$

- 5) Usando el valor de antocianinas monoméricas totales obtenido anteriormente (mg de cianidina-3-glucósido/g de polvo) se hace la siguiente relación:

$$\frac{3.41 \text{ g de cianidina} - 3 - \text{glucósido}}{\text{g de polvo}} * \frac{14 \text{ g de polvo}}{13.29 \text{ g de sólidos solubles}}$$

$$= \frac{3.59 \text{ mg de cianidina} - 3 - \text{glucósido}}{\text{g de sólidos solubles de jamaica}}$$

- EJEMPLO DE CÁLCULO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS IDENTIFICADAS EN EL PERFIL ANTOCIÁNICO

Datos extracto con agua

Área bajo la curva a 520 nm ($\mu\text{V} \cdot \text{s}$) obtenidos del cromatograma

Pico A: 3591043 (delfinidina-3-sambubiósido)

Pico B: 200454 (delfinidina-3-glucósido)

Pico C: 2010760 (cianidina-3-sambubiósido)

Vol. extracto purificado en el cartucho Sep-pack: 0.25mL

Vol. total el que se redisolvieron las antocianinas purificadas: 0.5

Factor de dilución (Vol. total/vol. extracto purificado): 2

Datos del estándar

ÁREA DEL ESTANDAR	ÁREA DEL ESTÁNDAR/PUREZA (95%)	CONCENTRACIÓN ESTÁNDAR mg/mL
21766486	22912090.53	0.2
21862093	23012729.47	0.2
21814289	22962409.47	0.2
MEDIA	22962409.82	0.2

- 1) Se relaciona el área del estándar y su concentración con el área obtenida y así se obtiene la concentración deseada. Esta última se multiplica por el factor de dilución empleado.

Para el pico A:

$$22962409.82 = 0.2$$

$$3591043 = x$$

$$x = 0.031 * 2 = 0.0625 \text{ mg/mL} = 6.25 \text{ mg/100 mL}$$

Para el pico B:

$$22962409.82 = 0.2$$

$$200454 = x$$

$$x = 0.0017 * 2 = 0.00349 \text{ mg/mL} = 0.349 \text{ mg/100 mL}$$

Para el pico C:

$$22962409.82 = 0.2$$

$$2010760 = x$$

$$x = 0.0175 * 2 = 0.035 \text{ mg/mL} = 3.5 \text{ mg/100 mL}$$

- 1) Para obtener la concentración total de las antocianinas identificadas en el perfil antociánico se suman las concentraciones obtenidas para las antocianinas A, B y C.

Concentración total antocianinas:

= 0.1009 mg de cloruro de cianidina-3-O glucósido/mL de extracto de flor de jamaica

= 10.09 mg de cloruro de cianidina-3-O glucósido/100mL de extracto de flor de jamaica

- 2) Para expresar el resultado anterior por 100g de cálices, se emplea la siguiente relación:

$$= \frac{10.09 \text{ mg de cloruro de cianidina} - 3 - O - \text{ glucósido}}{100 \text{ mL extracto de flor de jamaica}} \times \frac{25 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}}{2.5 \text{ g de cálices de flor de jamaica}}$$

- EJEMPLO DE CÁLCULO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

EXTRACTOS FLOR DE JAMAICA

Datos extracto con agua

Abs. Inicial: 0.7009

Abs. Final: 0.3357

Volumen de extracto de flor de jamaica diluido en etanol: 1mL

Volumen de etanol absoluto empleado: 13 mL

Factor de dilución (Vol. de etanol/vol. de extracto de flor de jamaica): 13

Volumen total en la celda de cuarzo: 1 mL

Volumen de extracto de flor de jamaica añadido a la celda de cuarzo: 0.20 mL

1) Se calcula el % de inhibición del radical con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final}}{\text{Abs. inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{0.7009 - 0.3357}{0.7009} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 52.1044$$

2) Se despeja x de la ecuación de la recta de Trolox, se sustituye el valor del porcentaje de inhibición obtenido y se resuelve la ecuación

$$y = 5.045x + 2.362$$

$$x = \frac{y - 2.362}{5.045}$$

$$x = \frac{52.1044 - 2.362}{5.045}$$

$$X = 9.866 \mu\text{M} = C1$$

3) Se despeja C2 de la siguiente ecuación y se introducen todos los términos conocidos en la Ec. 3.

$$C1V1 = C2V2 \quad (\text{Ec.2})$$

$$C2 = \frac{C1V1}{V2} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

C1= actividad antioxidante equivalente a Trolox (μM de Trolox) en el volumen total de la celda (1mL)

V1= Volumen total en la celda (1mL)

V2=Volumen del extracto de flor de jamaica (diluido en etanol), empleado en la celda (0.02 μL)

C2= actividad antioxidante equivalente a Trolox (μM de Trolox) en el volumen de extracto empleado en la celda (0.02 mL)

$$C2 = \frac{(9.866 \mu\text{M})(1\text{mL})}{(0.02 \text{ mL})}$$

$$C2 = 493.3 \mu\text{M}$$

4) El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución del extracto de flor de jamaica

$$= 493.3 \mu\text{M} * 13$$

$$= 6412.9 \mu\text{M} = 641.29 \mu\text{mol de Trolox}/100 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}$$

5) Para expresar el resultado por 100g de cálices de flor de jamaica se emplea la siguiente relación:

$$\frac{641.29 \mu\text{mol de Trolox}}{100 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}} \times \frac{25 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}}{2.5 \text{ g de cálices de flor de jamaica}} =$$

$$= 64.129 \mu\text{mol equivalente a Trolox/g de cálices de flor de jamaica}$$

$$= 6,412.9 \mu\text{mol equivalente a Trolox}/100\text{g de cálices de flor de jamaica}$$

MICROENCAPSULADOS

Datos microencapsulado 1% de goma

Abs. Inicial: 0.7192

Abs. Final: 0.2333

Preparación disolución (muestra líquida): 0.1 g de polvo disueltos en 3 mL de agua destilada

Volumen de extracto de muestra líquida diluido en etanol: 1 mL

Volumen de etanol absoluto empleado: 30 mL

Factor de dilución (Vol. de etanol/vol. de extracto de flor de jamaica): 30

Volumen total en la celda de cuarzo: 1 mL

Volumen de extracto de flor de jamaica añadido a la celda de cuarzo: 0.20 mL

1) Se calcula el % de inhibición del radical con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. inicial} - \text{Abs. final}}{\text{Abs. inicial}} \times 100$$

(Ec.1)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{0.7192 - 0.2333}{0.7192} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 51.95$$

- 2) Se despeja x de la ecuación de la recta de Trolox, se sustituye el valor del porcentaje de inhibición obtenido y se resuelve la ecuación

$$y = 5.045x + 2.362$$

$$x = \frac{y - 2.362}{5.045}$$

$$x = \frac{51.95 - 2.362}{5.045}$$

$$X = 9.84 \mu\text{M} = C1$$

- 3) Se despeja $C2$ de la siguiente ecuación y se introducen todos los términos conocidos en la Ec. 3.

$$C1V1 = C2V2 \quad (\text{Ec.2})$$

$$C2 = \frac{C1V1}{V2} \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

$C1$ = actividad antioxidante equivalente a Trolox (μM de Trolox) en el volumen total de la celda (1mL)

$V1$ = Volumen total en la celda (1mL)

$V2$ =Volumen de muestra líquida (diluida en etanol), empleada en la celda (0.02 μL)

$C2$ = actividad antioxidante equivalente a Trolox (μM de Trolox) en el volumen de muestra líquida empleada en la celda (0.02 mL)

$$C2 = \frac{(9.84 \mu\text{M})(1\text{mL})}{(0.02 \text{ mL})}$$

$$C2 = 491.79 \mu\text{M}$$

- 4) El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución del extracto de flor de jamaica

$$=493.3\mu\text{M}\cdot 30$$

$$=14,753.94\mu\text{M} = 641.29\mu\text{mol de Trolox}/100 \text{ mL de extracto de flor de jamaica}$$

- 5) Para expresar el resultado por g de polvo (microencapsulado) se emplea la siguiente relación:

$$\frac{14\,753.94 \mu\text{mol de Trolox}}{100 \text{ mL de muestra líquida}} \times \frac{3 \text{ mL de muestra líquida}}{0.1 \text{ g de polvo (microencapsulado)}} =$$

$$= 442.62 \mu\text{mol equivalente a Trolox/g de polvo (microencapsulado)}$$

- 6) Para expresar el resultado por g de sólidos solubles se emplea la siguiente relación tomando en cuenta los siguientes datos para cada microencapsulado; el cálculo se basa en que se tiene un gramo de polvo (microencapsulado), conformado por la humedad, la goma y los sólidos solubles, como lo muestra la figura.



Por lo que por medio de relaciones se va eliminando, la humedad, la goma y por último se obtienen los sólidos solubles de jamaica.

Datos microencapsulado 1% de goma:

Gramos de polvo obtenidos: 14 g

Humedad: 2.99 % (b.h) (2.99 g de agua en 100 g de polvo, 97.01 g de sólidos secos en 100g de polvo)

Sólidos solubles mezcla extracto concentrado-goma (1%): 19.1 (°Bx)

Sólidos secos= sólidos solubles

$$14 \text{ g de polvo} * \frac{97.1 \text{ g sólidos secos}}{100 \text{ g polvo}} * \frac{1 \text{ g goma}}{19.1 \text{ sólidos solubles}}$$

$$= 0.71 \text{ g de goma}$$

$$\therefore 14 \text{ g de polvo} - 0.71 \text{ g de goma} = 13.29 \text{ g de sólidos solubles}$$

- 7) Usando el valor de actividad antioxidante obtenido anteriormente (μmol de Trolox/g de polvo) se hace la siguiente relación:

$$\frac{442.62 \mu\text{mol de Trolox}}{\text{g de polvo}} * \frac{14 \text{ g de polvo}}{13.29 \text{ g de sólidos solubles}}$$

$$= \frac{466.30 \mu\text{mol de Trolox}}{\text{g de sólidos solubles de jamaica}}$$