



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**CONTROL DE CALIDAD DE LA PLANTA MEDICINAL *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling CONOCIDA POPULARMENTE COMO TORONJIL MORADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LIZBETH RENDÓN ALONSO

**ASESORA:**

**Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez**

**COASESORES:**

**Q. Mario Arturo Morales Delgado**

**Q.F.B. María Guadalupe Rebollar Barrera**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HEICHERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y a Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Control de calidad de la planta medicinal Agastache mexicana (Kunth.) Lind. & Epling conocida popularmente como toronjil morado

Que presenta la pasante: Lizbeth Rendón Alonso

Con número de cuenta: 302310889 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de junio de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Dra. Flora Adriana Genem Romero</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>QFB. Brígida del Carmen Camacho Márquez</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>M. en C. Georgina Franco Martínez</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>M. en C. Ma. Guadalupe Nava Arzalluz</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dr. Fernando Ortega Jiménez</u>	

NOTA: los suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127)

## **Agradecimientos**

### **A la vida**

Gracias a la vida que me ha dado tanto, me dio dos grandes luceros que cuando los abro, perfecto distingo el negro del blanco y en el alto del cielo su fondo estrellado y en las multitudes el hombre que yo amo.

Gracias a la vida que me ha dado tanto, me ha dado el sonido y el abecedario, con él las palabras que pienso y declaro madre, amigo, hermano y la luz alumbrando, la ruta del alma que estoy amando.

Gracias a la vida que me ha dado tanto, me ha dado la marcha de mis pies cansados, con ellos anduve ciudades y charcos, playas y desiertos, montañas y llanos.

Gracias a la vida que me ha dado tanto, me dio el corazón que agita su marco cuando miro el fruto del cerebro humano, cuando miro al bueno tan lejos del malo, cuando miro al fondo de los ojos claros.

Gracias a la vida que ha dado tanto, me ha dado la risa y me ha dado el llanto, así yo distingo dicha de quebranto los dos materiales que forman mi canto y el canto de ustedes que es el mismo canto, y el canto de todos que es mi propio canto. *Violeta Parra (1917 - 1967)*.

### **A mi madre**

El mundo es un montón de gente, un mar de fueguitos. No hay dos fuegos iguales. Eres una persona que brilla y se eleva entre todas las demás. Tu fuego es grande y de todos los colores que florecen en el universo, llenas mi aire de chispas, ardes a la vida con tantas ganas que no puedo mirarte sin parpadear, me acerco y también me enciendes. No hubiera podido llegar a este punto del camino sin ti, porque soy parte de tu ser y esa esencia valerosa es mi mejor herencia.

Gracias por la luz, gracias por la libertad de espíritu, por todas las enseñanzas, por compartir alegrías y tristezas... gracias por todo el amor.

### **A mi hermano Hugo**

Mi compañerito de toda la vida. ¿Qué es el espacio, qué la distancia, o los altos montes? Ni qué son esos turbios horizontes que miro desde aquí; sí a través del espacio de las cumbres, de ese ancho mar y de ese firmamento, vuela por el azul mi pensamiento y vive siempre junto a ti.

### **A mis hermanos y cómplices**

Ustedes ya saben quiénes son la familia con la que he compartido los diferentes ciclos de esta existencia, no tendría con que pagarles todo eso que han hecho por mí, solamente con el amor de mi alma puedo agradecerles el que me hayan alumbrado en el camino recorrido con todos y cada uno. Espero que siga siendo largo y loco el viento que pasa por las banderas de nuestras vidas y que las raíces que tenemos en el corazón continúen emergiendo cuando levantemos los brazos a buscar otras tierras.

### **A la UNAM**

A la institución que me ha brindado los recursos con los que ahora cuento para comenzar con la siguiente etapa de mi vida profesional. Por su gente llena de energía y conocimiento, por todo el aprendizaje adquirido dentro y fuera del campo de los planes de estudio. Al Colegio de Ciencias y Humanidades Naucalpan que fue imprescindible para despertar esa nueva visión del mundo y a la FES-Cuautitlán que me ayudó a comprender otra pequeña parte acerca de los secretos de nuestro cuerpo y del universo.

### **A mis profesores**

Gracias a todos los profesores que han formado parte de todas estas experiencias de conocimiento.

A los profesores Brígida, Guadalupe y Mario por su confianza, y sobre todo por aceptar ser mis guías en este cierre de ciclo. Gracias infinitas por apoyarme en la realización este trabajo.

**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
ÍNDICE DE FIGURAS .....	11
ABREVIATURAS .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. MARCO TEÓRICO .....	21
3.1. TORONJIL MORADO .....	21
3.1.1. Botánica.....	21
3.1.1.1. Taxonomía.....	21
3.1.1.2. Sinonimia popular .....	21
3.1.1.3. Sinonimia botánica.....	21
3.1.2. Morfología.....	22
3.1.3. Hábitat .....	22
3.1.4. Historia .....	22
3.1.5. Usos en la medicina tradicional mexicana .....	24
3.2. ENSAYOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS Y ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES .....	24
3.2.1. Control de calidad de las plantas medicinales .....	24
3.2.2. Estandarización de extractos vegetales.....	25
3.2.3. Criterios para control de calidad de plantas medicinales y estandarización de extractos vegetales.....	26
3.2.3.1. Ensayos organolépticos.....	26
3.2.3.2. Ensayos botánicos .....	27

3.2.3.3.	Ensayos fisicoquímicos.....	29
3.2.3.2.1.	Métodos analíticos.....	29
3.2.3.2.1.1.	Técnicas cromatográficas.....	29
3.2.3.2.1.2.	Espectroscopia.....	30
3.2.4.	Obtención, recolección y conservación de drogas.....	33
3.2.4.1.	Obtención de drogas vegetales.....	33
3.2.4.2.	Recolección.....	34
3.2.4.3.	Conservación.....	35
3.3.	FITOQUÍMICA.....	36
3.3.1.	Terpenos.....	36
3.3.2.	Lactonas.....	37
3.3.3.	Saponinas.....	38
3.3.4.	Fenoles.....	38
3.3.5.	Azúcares reductores.....	40
3.4.	ACEITES ESENCIALES.....	40
3.4.1.	Definición.....	40
3.4.2.	Distribución.....	40
3.4.3.	Propiedades físicas.....	41
3.4.4.	Composición química.....	41
3.4.4.1.	Terpenos.....	41
3.4.4.2.	Compuestos aromáticos.....	42
3.4.5.	Métodos de obtención.....	42
3.4.5.1.	Por arrastre de vapor de agua.....	42
3.4.5.1.1.	Hidrodestilación.....	42
3.4.5.1.2.	Destilación con vapor saturado.....	43
3.4.5.1.3.	Hidrodifusión.....	43
3.4.5.1.4.	Expresión.....	43
3.4.5.2.	Enfleurage.....	44
3.4.5.3.	Extracción con gases supercríticos.....	44
3.4.5.4.	Otros procedimientos.....	44

---

---

3.4.6.	Factores de variabilidad de los aceites esenciales .....	44
3.4.7.	Ensayos de calidad.....	45
4.	OBJETIVOS.....	47
4.1.	OBJETIVO GENERAL .....	47
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	47
5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	49
5.1.	PREPARACIÓN DE MATERIA PRIMA .....	49
5.1.1.	Recolección de material biológico .....	49
5.1.2.	Herborización e identificación del material biológico .....	49
5.1.3.	Desecación a la sombra .....	49
5.2.	CONTROL DE CALIDAD .....	50
5.2.1.	Materia extraña.....	50
5.2.2.	Determinación de agua y materia volátil.....	50
5.2.3.	Material extraíble.....	51
5.2.4.	Tamizaje fitoquímico.....	52
5.2.4.1.	Preparación de la muestra .....	52
5.2.4.2.	Pruebas a extracto hexánico .....	53
5.2.4.3.	Pruebas a extracto de acetato de etilo.....	54
5.2.4.4.	Pruebas a extracto hidroalcohólico .....	55
5.2.5.	Extracción y cuantificación de aceite esencial .....	55
5.2.6.	Caracterización del aceite esencial.....	56
5.2.6.1.	Características físicas .....	56
5.2.6.2.	Índice de refracción a 25° C.....	56
5.2.6.3.	Densidad a 20° C.....	56
5.2.6.4.	Espectro infrarrojo del aceite esencial y de los marcadores químicos de sus principales componentes.....	56
5.2.7.	Cuantificación de compuestos con capacidad reductora .....	56
5.2.7.1.	Preparación de soluciones .....	56



---

---

5.2.7.1.1. Reactivo Folin-Ciocalteu .....	56
5.2.7.1.2. Solución de carbonato de sodio 20% .....	56
5.2.7.1.3. Solución de referencia de ácido tánico. ....	57
5.2.7.2. Preparación de la solución problema .....	58
5.2.7.3. Preparación del sistema problema.....	59
5.2.7.4. Preparación de la curva de calibración.....	59
6. RESULTADOS .....	61
6.1. Recolección del material biológico .....	61
6.2. Identificación del material biológico .....	61
6.3. Materia extraña .....	63
6.4. Determinación de agua y materia volátil .....	63
6.5. Material extraíble .....	64
6.6. Tamizaje fitoquímico .....	65
6.7. Aceite esencial .....	65
6.8. Cuantificación de compuestos reductores.....	67
7. DISCUSIÓN.....	70
8. CONCLUSIONES .....	80
9. REFERENCIAS .....	83
10. PROSPECTIVAS .....	87
11. ANEXOS.....	89
ANEXO I. Certificado de identidad .....	89
ANEXO II. Glosario botánico .....	90
ANEXO III. Preparación de muestra y reactivos para tamizaje fitoquímico e identificación de pigmentos .....	92
ANEXO IV. Fundamento de la prueba Folin-Ciocalteu .....	94
ANEXO V. Barrido, curva de calibración y cálculos para cuantificación de materia con capacidad reductora.....	95

ANEXO VI. Estandarización de la preparación del extracto crudo para la  
cuantificación de materia con capacidad reductora ..... 97

**ÍNDICE DE TABLAS**

1. Propiedades organolépticas de diferentes plantas medicinales .....	27
2. Métodos fisicoquímicos utilizados comúnmente en fitoquímica .....	29
3. Ejemplos de metabolitos estudiados por técnicas cromatográficas.....	30
4. Propiedades espectrales de las diferentes clases de pigmentos vegetales .....	32
5. Métodos de inhibición e inactivación enzimática.....	36
6. Ensayos para el control de calidad de los aceites esenciales .....	45
7. Preparación de la solución blanco y el sistema problema .....	59
8. Preparación de los sistemas para la curva de calibración.....	59
9. Lotes rechazados por contaminación.....	63
10. Contenido de agua y materia volátil obtenidos por el método azeotrópico.....	64
11. Porcentaje de material extraíble con solventes de diferente polaridad.....	64
12. Pruebas fitoquímicas .....	65
13. Porcentaje, densidad e índice de refracción del aceite esencial .....	66
14. Resultados de la curva de calibración de ácido tánico .....	67
15. Porcentaje de materia con capacidad reductora.....	68
16. Metabolitos identificados en tres extractos crudos de diferente polaridad.....	72
17. Principales bandas características identificadas en el aceite esencial de toronjil.....	75
18. Comparación del método propuesto por la FHEUM en 2001 y el método estandarizado para la cuantificación de materia con capacidad reductora .....	77
19. Comparación de las ventajas y desventajas de los métodos propuestos.....	78
20. Parámetros estadísticos de la curva de calibración.....	96
21. Comparación de las absorbancias entre los dos extractos crudos .....	97
22. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora de tres pesos diferentes de muestra .....	98
23. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora, centrifugando a tres tiempos distintos.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. <i>Brugmansia arborea</i> , planta sagrada de la diosa de Tepantitla.....	16
2. Atochietl nombre náhuatl del toronjil morado .....	23
3. Tipos de forma, margen y venación de diferentes hojas .....	28
4. Estructura básica de los flavonoides.....	39
5. Dispositivo de hidrodestilación .....	42
6. Destilación con vapor saturado .....	43
7. Metodología para la cuantificación de material extraíble .....	51
8. Metodología para la obtención de tres extractos por gradiente de polaridad .....	52
9. Identificación fitoquímica del extracto hexánico. ....	53
10. Identificación fitoquímica del extracto de acetato de etilo.....	54
11. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico.....	55
12. Preparación de la solución estándar de ácido tánico. ....	57
13. Metodología para la extracción de la muestra problema.....	58
14. <i>Agastache mexicana</i> (Kunth.) Lint. & Epling “Toronjil morado” .....	61
15. Arquitectura foliar .....	62
16. Espectro infrarrojo del aceite esencial.....	66
17. Gráfico de la curva de calibración de ácido tánico.....	67
18. Componentes principales del aceite esencial del toronjil morado.....	73
19. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar metil chavicol (derecha).....	74
20. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar limoneno (derecha).....	74
21. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar linalool (derecha).....	75
22. Gráfico del barrido espectrofotométrico de “azul de molibdeno”.....	95
23. Gráfico del porcentaje de desviación relativa.....	95

## ABREVIATURAS

As= Ácido silicotúngstico.

CV= Coeficiente de variación.

D= Dragendorff.

FHEUM= Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

GLC= Cromatografía de gases líquidos.

H= Hager.

HPLC= Cromatografía de líquidos de alta resolución.

IR= Infrarrojo.

L-B= Lieberman-Burchard.

msnm= Metros sobre el nivel del mar.

MS= Espectroscopia de masas.

NaOH= Hidróxido de sodio.

NMR= Resonancia Magnética Nuclear.

PC= Cromatografía en papel.

TLC= Cromatografía en capa fina.

# PARTE 1.

# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes el hombre ha buscado de forma instintiva en las plantas alivio para sus dolores, de la misma manera que alimento y protección. “El consumo sistemático de plantas con atributos medicinales se remonta posiblemente a 2 millones de años en algún lugar de África, cuna de la humanidad”(Chife, 2010).

Los resultados de su experimentación derivaron en una estrecha relación entre el mundo vegetal y el organismo humano, por el descubrimiento de algunas plantas que no sólo curaron sus enfermedades físicas, sino que en particular influyeron en las profundidades de su mente y espíritu, por medio de alucinaciones que lo alejaban de su existencia mundana, adjudicándoles propiedades mágicas o sobrenaturales.

Thompson en 1980, asegura que en Shanidar un sitio arqueológico en Irak de 60, 000 años de antigüedad, poblado por el *Homo neanthertalensis*, se encontraron restos de *Achillea*, *Centaurea* y *Ephedra*, géneros de plantas que hoy en día tienen uso medicinal, lo que sugiere que el homínido empleaba estas plantas para atender sus males.

Las evidencias históricas más antiguas son los ideogramas sumerios los cuales datan desde el año 2,500 a.C., el primer documento que enumera varias plantas curativas es el Códice de Hammurabi (1728-1686 a.C.) rey de Mesopotamia quien legó su código escrito en piedra donde se detalla el uso de algunas plantas como hoja sen, beleño, regaliz y menta (Sumner, 2001); otras culturas que se desarrollaron en Babilonia, Egipto, India, China, Grecia y Roma cuentan con registros disponibles de plantas que contienen numerosas referencias medicinales.

Los chinos en 2500 a.C. en su farmacopea folklórica describen el uso de diferentes plantas como tratamiento para distintas afecciones, como la utilización de la efedra para las afecciones pulmonares; el aceite de chaulmoogra (un producto de las semillas de varias especies de *Hydnocarpus*) se aplicaba para la lepra, en otras preparaciones.

Los Papiros Ebers, el pergamino más famoso data del año 1500 a.C., estos son una compilación egipcia de obras anteriores, que contienen 877 apartados recogidos en sus más de 20 metros de longitud y 110 páginas. Los remedios que se mencionan son muy variados como el uso de azafrán, mirra, ricino, incienso o elementos extraídos de insectos (Heredia & al., 2004).

En la antigua India los registros datan de hace 3500 años, el Rig-Veda (el libro más antiguo de los Vedas) que contiene mil himnos sagrados habla del Soma (*Amanita muscaria*) en 120 de ellos (Schultes & Hofmann, 2000), el hongo era ingerido por los arios en sus ceremonias mágico-religiosas, se comportaba como un alucinógeno, además, se aseguraba que aliviaba el dolor y aumentaba las fuerzas vitales.

La Biblia en el Antiguo y Nuevo Testamento, refiere al uso medicinal de las plantas. Si bien, el número de plantas es muy bajo (aproximadamente 300), menciona específicamente vid, ajo, cebolla, adelfa, comino, laurel, menta, ortiga, entre otras.

Los griegos hicieron uso extensivo de drogas vegetales. Entre los botánicos más importantes se encuentran: Hipócrates (460-375 a.C.), quien mencionó de 300 a 400 plantas medicinales; por otro lado, Aristóteles (384-322 a.C.) del cual ninguno de sus escritos sobre Botánica Médica se conserva, pero se sabe que dejó su biblioteca a su discípulo Teofrasto (372-287 a.C.), conocido como el padre de la Botánica; y Dioscórides (primer siglo d.C.), quien escribió *De Materia Medica*, recoge más de 600 variedades de plantas medicinales, 90 minerales y unas 30 especies de procedencia animal, sienta las bases para el conocimiento herbolario europeo de la Edad Media y además se convirtió en el modelo de nuestras grandes farmacopeas (Lindberg, 2002).

Plinio fue un oficial romano, militar, naturalista e historiador, en su trabajo *Naturalis historiae* que consta de 37 libros, compila todo el conocimiento de su época, y refiere a la naturaleza del universo físico, la geografía, la antropología, la zoología, la botánica, incluidos los usos de las plantas medicinales, la mineralogía, los usos de pigmentos y una historia de las bellas artes (Biblioteca de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, 2012).



En lo que es hoy el territorio mexicano, los primeros registros del uso de plantas medicinales datan de la prehistoria en una cueva habitada, hace 8000 años (Lozoya, 1999), en Coahuila, donde encontraron restos de *Lophophora williamsi* (peyote) y *Sophora secundiflora* (pitol); en otras cuevas en Chihuahua se recuperaron raíces de sangre de drago, *Jatropha* sp y en Tehuacán Puebla, fragmentos de doradilla, *Selaginella* sp, que quizá tuvieron uso medicinal.

El registro pictográfico más antiguo sobre plantas medicinales de Mesoamérica se encontraba en el mural de Tepantitla, se piensa fue pintado hacia el año 650 de nuestra era y representa al Tlalocán, paraíso mitológico de Tláloc ubicado en Teotihuacán. En él se pueden ver plantas como el floripondio (Figura 1), planta sagrada de la diosa de Tepantitla (Zoltán, 2007), éste se empleaba para aliviar el dolor reumático de las articulaciones, padecimientos relacionados con males fríos y acuosos. Los Teotihuacanos también conservaron sus plantas al natural, en cultivos y en especies de jardines botánicos cuya construcción dispusieron los gobernantes para preservar el conocimiento (Lozoya, 1999).



**Figura 1. *Brugmansia arborea*, planta sagrada de la diosa de Tepantitla.**

Fuente: Zoltán, P. (2007). La diosa de Tepantitla en Teotihuacán: una nueva interpretación. (ENAH, Ed.) *Cuicuilco*, 14 (41), 245.

Los españoles demostraron interés y respeto por los conocimientos que poseían los indígenas de México. Entre los herbolarios más sobresalientes figuran:

La obra *Nova Plantarum, Animalium et Mineralium Mexicanorum*, publicada por Francisco Hernández, protomédico personal de Felipe II quien, entre 1571 y 1576 recorrió parte de México reuniendo datos de más de 3000 plantas (Hernández, 1942).

El Códice de la Cruz-Badiano es un libro indígena ilustrado, escrito en náhuatl y realizado en 1552 en el Colegio Católico de Santa Cruz, México. Sus autores fueron Martín de la Cruz médico azteca del siglo XVI y Juan Badiano quien lo tradujo al latín hace casi medio milenio como *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (De la Cruz, 1991).

La medicina tradicional mexicana actual, es una mezcla de la medicina mesoamericana, de la medicina negra (proveniente de los esclavos africanos), y de la medicina popular española.

Hoy en día, toda la información sobre drogas vegetales está reunida en volúmenes enciclopédicos, las Farmacopeas. En 1820 aparece la primera en los Estados Unidos; estos documentos deben contener la siguiente información: 1°) estándares para las drogas de utilidad terapéutica; 2°) establecer pruebas para identificación, cantidad y pureza; 3°) pruebas para el aseguramiento de uniformidad en las propiedades físicas y químicas. Muchos países tienen farmacopeas, tales como: Inglaterra, Alemania, Francia, Egipto, México, Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, Venezuela, entre otros. En el 2001 en México, la Secretaría de Salud Pública edita la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

# PARTE 2

# JUSTIFICACIÓN



## 2. JUSTIFICACIÓN

En México, el conocimiento empírico sobre las prácticas tradicionales de curación se ha visto limitado porque la mayor parte ha sido transmitida en forma oral y no existe una metodología consistente que permita su validación científica e integración a los sistemas oficiales de salud. Los éxitos obtenidos por la fitoquímica ejercen un papel decisivo en la generalización del empleo de plantas medicinales y de medicamentos elaborados a base de éstas en la medicina moderna. Surge así el interés de estudiar en el laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia ubicado en el L-324 de la FES Cuautitlán al toronjil morado (*Agastache mexicana* (Kunth.) **Lint. & Epling**) debido a que es reconocido desde la época mesoamericana y a su extenso uso en la medicina tradicional, el propósito de aplicar pruebas para control de calidad del toronjil morado es por un lado evitar falsificaciones y por otro regular y uniformar el contenido vegetal para su uso medicinal mediante pruebas botánicas y fisicoquímicas que forman parte de la identidad (estandarización) de la planta.

# PARTE 3.

# MARCO TEÓRICO



### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. TORONJIL MORADO

##### 3.1.1. Botánica

###### 3.1.1.1. *Taxonomía*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Agastache*

Especie: *mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling

###### 3.1.1.2. *Sinonimia popular*

Toronjil de casa, toronjil de monte, toronjil morado, toronjil rojo, olotillo, abejera, cidronela y melisa; pinkil (tepehua), tama (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009), torojí, toronjé (otomí) (Santillán & al., 2008), atochietl (náhuatl) (Hernández, 1942).

###### 3.1.1.3. *Sinonimia botánica*

*Cedronella mexicana* (Kunth) Briq (Santillán & al., 2008).

### 3.1.2. Morfología

El toronjil es una hierba perenne de 40 cm hasta 1.5 m de altura; tallos erectos, ramificados y cuadrangulares. Sus hojas tienen forma de lanza y los bordes son dentados. Las flores están agrupadas en racimos terminales interrumpidos, en número de 5 hasta 20, con forma tubular, de color rojo vivo o rojo-morado.

### 3.1.3. Hábitat

El toronjil es originario de México; está presente en climas cálidos, semicálidos y templados entre el nivel del mar hasta 780 msnm y desde 1600 msnm a 3900 msnm. Hierba asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio y a bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino-encino, de pino y mixto. La especie se encuentra distribuida en los estados de Puebla, Estado de México, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009).

### 3.1.4. Historia

Francisco Hernández en 1492, describe cuatro tipos diferentes de atochietl que significa “tabaco del conejo de agua” (Figura 2), el primer atochietl que menciona es identificado en su documento como *Cedronella mexicana* Benth. (sinónimo botánico del toronjil), señala “cura la parálisis y es remedio contra las disenterías y otras enfermedades ocasionadas por el frío”, añade, “vulgarmente se usa la planta fresca en infusión teiforme como estomáquico y antiespasmódico”.

En el siglo XVI, de la Cruz alude “quien tenga catarro o coriza, debe de oler las hierbas de atochietl y tzonpilihuiz xihuitl, y de esta manera se aliviará del catarro”.



**Figura 2. Atochietl nombre náhuatl del toronjil morado**

Fuente: De la Cruz, M. (1991). *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (Segunda ed.). Distrito Federal: Fondo de Cultura Económica.

Por su parte Gregorio López, en el siglo XVII relata que “las hojas bebidas con vino y aplicadas como emplasto son contra mordeduras de perro rabioso y picaduras de alacrán. Su cocimiento en fomentación provoca menstruación, quita dolor de dientes. Las hojas son útiles a los que no pueden resollar, purifican llagas, mitigan el dolor de juntas y son útiles al estómago. Comido despierta el sentido, fortifica el corazón y cerebro, quita tristezas y temor que procede de melancolía, ataja imaginaciones extrañas y despierta de sueños horribles”. Más adelante, la Sociedad Farmacéutica de México en el siglo XIX señala su uso como antiespasmódico y estimulante.

En el siglo XX, Alfonso Herrera la describe como antiespasmódico y sucedáneo del toronjil europeo. Posteriormente, Maximino Martínez la refiere como antiespasmódico. Luis Cabrera cita que es antirreumático, diaforético, digitálico, eupéptico, que sirve para las contusiones y provoca parálisis de la respiración. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México consigna su uso como antiespasmódico, diaforético, estimulante y eupéptico (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009).



### **3.1.5. Usos en la medicina tradicional mexicana**

La infusión de “los tres toronjiles” (morado, blanco y azul) es utilizada para problemas gastrointestinales, nerviosos y cardiovasculares (Linares & al., 1995). Otros curanderos recomiendan darlos junto con canela (*Cinnamomum zeylanicum*), flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) y tila (*Tilia mexicana*).

Los mixes, zapotecos y totonacos, lo emplean en la curación del mal de ojo, la caída de mollera, problemas gástricos como dolor de estómago, cólico de estómago, corajes, dolor intestinal, empacho y para la digestión. También se usa en alteraciones cardiovasculares como dolor de corazón y cuando se tapan las venas (Universidad Nacional Autónoma de México, 2009).

El grupo otomí considera el toronjil como una planta de calidad caliente porque cura el enfriamiento. Los otomíes emplean toronjil en el tratamiento de dolor de estómago, aire, tos, bilis, vómito, nervios, pero principalmente para el susto o espanto (Santillán & al., 2008).

## **3.2. ENSAYOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LAS DROGAS Y ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES**

### **3.2.1. Control de calidad de las plantas medicinales**

La calidad de una planta medicinal es definida como el estado óptimo de una droga que es determinado por la identidad, modo de conservación, contenido de principios activos y otras propiedades químicas, físicas, y biológicas. El control de calidad es un término que refiere a los procesos involucrados en el mantenimiento de la calidad y validez de un producto.

En general el control de calidad está basado en tres importantes definiciones farmacopeicas: identidad, pureza y cantidad de principios activos.

- **Identidad:** la correcta autenticación de una droga cruda, es el criterio número uno en la importancia del proceso, permitiendo la detección de falsificaciones.
- **Pureza:** está estrechamente ligada con el uso seguro de la droga, se debe legitimar que no ha sufrido alteraciones, adulteraciones, ni excede los límites de materia extraña orgánica, sustancias nocivas, u otros contaminantes.
- **Cantidad de principios activos:** consiste en certificar que la droga contenga la dosis necesaria para asegurar la actividad farmacológica sin llegar a valores tóxicos (Kuklinsky, 2000).

### **3.2.2. Estandarización de extractos vegetales**

La calidad de los extractos vegetales es influenciada por parámetros tales como el método de extracción, líquido extractor, granulometría del material vegetal y proporción de la droga con respecto al disolvente (Miranda, 1994). La uniformidad de esos parámetros en la obtención de extractos es de gran importancia para garantizar la calidad de los mismos.

La estandarización de los extractos vegetales o fitopreparados hace referencia a la identificación y cuantificación de los principales constituyentes activos. Ésta se puede llevar a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1. Caracterización del perfil fitoquímico e identificación de los componentes activos. En este caso, el método de estandarización debe considerar la cuantificación de los compuestos bioactivos más importantes según las investigaciones farmacológicas.
2. Aislamiento y elucidación estructural de los constituyentes químicos mayoritarios que puedan ser responsables de su actividad farmacológica y eficacia terapéutica.
3. En la medicina herbaria varias plantas pueden ser utilizadas juntas en la misma preparación. Esto significa que deben aplicarse pruebas de control de calidad para cada extracto por separado y asegurar la calidad del producto (Wolfender & Hostettman, 1995).

El objetivo de la estandarización de extractos vegetales o formulaciones fitofarmacéuticas, es permitir que éstos cumplan con los requisitos internacionales actuales de calidad, seguridad y eficacia (Bauer & Tittel, 1996). Es muy importante que sea establecido un control de calidad para todas las plantas medicinales en el mercado debido a la enorme variación para diferentes lotes de las mismas (Ekka & al., 2008; Ahmad & al., 2006).

### **3.2.3. Criterios para control de calidad de plantas medicinales y estandarización de extractos vegetales**

En drogas enteras o troceadas generalmente es suficiente el control de las características botánicas macroscópicas y organolépticas para establecer la identidad de la droga, mientras que el análisis de las drogas pulverizadas requiere de métodos microscópicos. Los ensayos fisicoquímicos proporcionan información sobre los principios activos y sustancias no deseables. Las pruebas farmacodinámicas y biológicas evalúan las posibles acciones farmacológicas o toxicidad de una droga.

A continuación se explicarán los ensayos realizados para el control de calidad de plantas medicinales y para la estandarización de sus extractos.

#### **3.2.3.1. *Ensayos organolépticos***

Una inspección visual provee una simple y rápida medida para identificar el material, pureza y posiblemente calidad. Si una muestra es encontrada significativamente diferente, en términos de color, consistencia, olor o textura, con respecto a las especificaciones, se considera una inconformidad en los requerimientos.

Tal como se muestra en la Tabla 1, estas pruebas consisten en comprobar las características de las plantas medicinales apreciables con los sentidos.

**Tabla 1. Propiedades organolépticas de diferentes plantas medicinales**

Color	Sabor	Olor
<i>Rojo:</i> quina	<i>Dulce:</i> palo dulce	Plantas con aceites esenciales:
<i>Anaranjado:</i> ruibarbo	<i>Amargo:</i> Santa María y el	ajo, melisa, orégano, eucalipto,
<i>Castaño:</i> canela, clavo	huereque	papaloquelite
<i>Blanco:</i> goma arábica	<i>Aromático:</i> anís, menta	

Fuente: Kuklinsky, C. (2000). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal. Barcelona, España: Omega.

### 3.2.3.2. *Ensayos botánicos*

Las características macroscópicas son útiles para determinar la identidad y la pureza de la droga examinada. Sin embargo, como la determinación de las características macroscópicas y organolépticas es bastante subjetiva, deben realizarse comparaciones con muestras auténticas.

Los términos macroscópicos para describir a una planta son individuales (clase I) y colectivos (clase II).

**Clase I.** Los términos individuales, a su vez, se dividen en *absolutos* que se utilizan para hacer referencia de manera individual a los caracteres propios de cada órgano; y *relativos* que expresan la relación que guardan las plantas, o sus órganos, con otro órgano u organismo.

Los **términos individuales absolutos** se refieren a:

1. *Aspecto y figura.* Forma general o tridimensional, contornos, ápice y base.
2. *División.* Margen, incisión y ramificación.
3. *Superficie.* Marcas o lisura, indumento o protuberancias y brillo o textura.
4. *Textura.*
5. *Tamaño.*
6. *Duración del ciclo vegetativo.*
7. *Color.*
8. *Variegación.*
9. *Nervadura.*

Los **términos individuales relativos** son agrupados en tres apartados:

1. *Estivación*, o la relación que mantienen los órganos con respecto a otros en la yema.
2. *Dirección*, es la relación que los órganos guardan con la superficie de la tierra, o con el tallo de la planta que constituye un eje.
3. *Inserción*, o el modo en que una parte se inserta o adhiere a otra.

La Figura 3 muestra algunos de ejemplos de forma, margen y nervadura de las hojas.

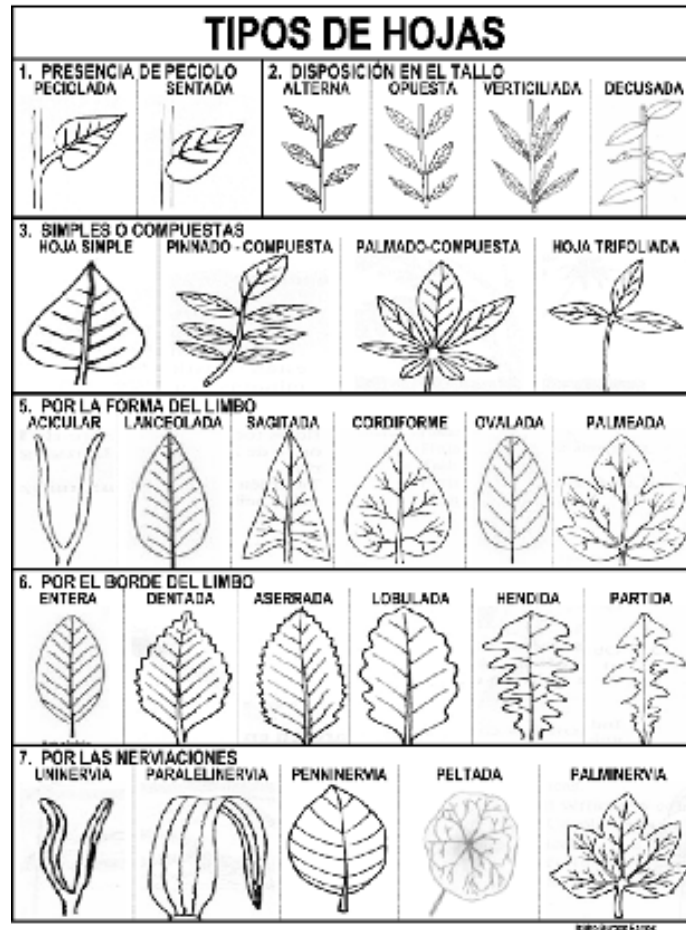


Figura 3. Tipos de forma, margen y venación de diferentes hojas

Fuente: [http://yhonrobert.blogspot.mx/2010\\_09\\_01\\_archive.html](http://yhonrobert.blogspot.mx/2010_09_01_archive.html) en septiembre de 2012.

**Clase II.** Los términos colectivos, son aquellos que se refieren a los órganos tomados de manera conjunta. Con esta condición, cuando se dice que las hojas son *opuestas*, este término se emplea cuando son varias hojas; y cuando se dice que una panícula es laxa o floja, quiere decir que las flores de la panícula, en todo su conjunto, están dispuestas flojamente, o de forma poco densa (Stearn, 2006).

### 3.2.3.3. *Ensayos fisicoquímicos*

Como se indica en la Tabla 2, los ensayos fisicoquímicos son aquellos métodos que se utilizan para identificar a los componentes de extractos vegetales y determinar la cantidad en que se encuentran.

**Tabla 2. Métodos fisicoquímicos utilizados comúnmente en fitoquímica**

Métodos cualitativos	Métodos cuantitativos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pruebas de solubilidad en diferentes disolventes</li> <li>• Reacciones químicas para detectar grupos funcionales concretos basadas en precipitaciones, apariciones de color, desprendimiento gaseoso, etc.</li> <li>• Métodos de fluorescencia</li> <li>• Métodos cromatográficos:</li> <li>• PC, TLC, GLC, HPLC</li> <li>• Métodos espectrofotométricos:</li> <li>• MS, IR, NMR, UV-Vis</li> <li>• Métodos cromatográficos acoplados a métodos espectrofotométricos</li> <li>• Electroforesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valoración de la cantidad de principio activo: volumetrías, gravimetrías, espectrofotometría, métodos cromatográficos</li> <li>• Material extraíble con diferentes solventes</li> <li>• Determinación de contenido agua y materia volátil</li> <li>• Cuantificación de aceite esencial</li> <li>• Cuantificación de cenizas</li> <li>• Determinación de índices de acidez, yodo, saponificación, hinchamiento, etc.</li> <li>• Control de pesticidas y residuos tóxicos</li> <li>• Otros: control de radiactividad, etc.</li> </ul>

#### 3.2.3.2.1. *Métodos analíticos*

##### 3.2.3.2.1.1. *Técnicas cromatográficas*

El análisis cuantitativo y cualitativo de los metabolitos secundarios de una planta se puede realizar mediante cuatro técnicas cromatográficas, ya sea individualmente o por una combinación de ellas: cromatografía en papel (PC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases líquido (GLC), y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Harborne, 1998).

Como se muestra en la Tabla 3, la elección de la técnica depende de las propiedades de solubilidad y de volatilidad de los compuestos a ser separados.

**Tabla 3. Ejemplos de metabolitos estudiados por técnicas cromatográficas**

Técnica	Tipo de compuestos estudiados
PC	Compuestos solubles en agua, carbohidratos, aminoácidos, bases de ácidos nucleicos, ácidos orgánicos o compuestos fenólicos
TLC	Componentes liposolubles, esteroides, carotenoides, quinonas simples, clorofilas y otros lípidos Así como componentes hidrosolubles
GLC	Valoración de aceites volátiles, mono- y sesquiterpenos, hidrocarburos y compuestos azufrados
HPLC	Compuestos menos volátiles tanto hidrosolubles como liposolubles

Fuente: Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. (Fifth ed.). London, England: Chapman & Hall.

#### 3.2.3.2.1.2. Espectroscopia

Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en la espectroscopia atómica y molecular. La espectroscopia es un término general para la ciencia que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia. Se denomina espectrofotometría a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las mediciones a una determinada longitud de onda.

#### Espectrofotometría UV-Vis

La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda del espectro electromagnético está asociada con fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía.

La espectroscopia de absorción molecular en el rango ultravioleta-visible (región de 180 a 800 nm del espectro electromagnético) se basa en la medición de la transmitancia ( $T$ ) o la absorbancia ( $A$ ) de radiación resultante de la atenuación de una radiación con potencia inicial

( $P_o$ ) que incide por una disolución que contiene moles por litro de soluto absorbente ( $C$ ) contenida en una celda transparente de longitud conocida ( $b$ ) (Skoog & al, 2001).

La concentración de un analito es directamente proporcional a la absorbancia, como se explica en la ecuación 3 que es una representación matemática de la Ley de Bouguer–Lambert-Beer:

$$\text{Transmitancia (\%T)}. T = \frac{P}{P_o} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Absorbancia (A)}. A = \frac{P_o}{P} = -\log T \quad (2)$$

$$A = \epsilon^\lambda b C \quad (3)$$

Donde:

$A$ =absorbancia

$P_o$ =radiación incidente

$\epsilon$  = coeficiente de absortividad molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

$b$  = camino óptico (cm)

$T$ =transmitancia

$P$ = radiación emergente

$\lambda$ = longitud de onda.

$C$ = Concentración

### Ley de Bouguer–Lambert-Beer

Es un medio matemático que explica cómo la materia absorbe a la energía radiante incidida. Esta ley dice que tres fenómenos son responsables de disminuir la potencia de una radiación monocromática:

1. La absorción energética de una disolución es directamente proporcional a su concentración manteniendo el paso óptico constante.
2. El detrimento de la transmitancia es directamente proporcional al aumento de la longitud del camino óptico.
3. La probabilidad de que el fotón de cierta longitud de onda sea absorbido por el material (coeficiente absorción o de extinción molar del material) (Buriel, 2008).



## Especies absorbentes

La absorción de la energía ultravioleta o visible resulta generalmente de la excitación de los electrones de enlace, es decir, ésta puede promocionar a un electrón de un orbital  $\pi$  o  $n$  de enlace o antienlace, a un orbital de antienlace vacío.

Las especies absorbentes contienen electrones  $\pi$  y  $n$ , incluyen a los cromóforos que son compuestos orgánicos que poseen dobles enlaces y a los iones metálicos de transición (Harborne, 1998).

La espectroscopia UV-Vis es de gran utilidad debido a que, el espectro de absorción de los constituyentes vegetales puede ser medido en disoluciones poco concentradas. Para compuestos que no tienen color, las mediciones son hechas en un rango de 200 a 380 nm; para compuestos coloridos es de 380 a 800 nm (Skoog & al, 2001).

Como se puede observar en la Tabla 4, los valores del espectro UV-Vis en la identificación de constituyentes están relacionados con la complejidad del espectro y en general con la posición de la longitud de onda máxima.

**Tabla 4. Propiedades espectrales de las diferentes clases de pigmentos vegetales**

Pigmento	Rango visible(nm) <sup>a</sup>	Rango UV(nm)
Clorofilas (Verde)	640-660 y 430-470	Corta absorción UV por la presencia de proteínas
Ficobilinas (rojo y azul)	615-650 y 540-570	Corta absorción UV por la presencia de proteínas
Citocromos (amarillo)	545-605	Corta absorción UV por la presencia de proteínas
Antocianinas (malva o rojo)	505-535	ca.275
Betacianinas (color malva)	532-554	250-270
Carotenoides (amarillo a naranja)	400-500	---
Antraquinonas (amarillo)	420-460	3-4 picos intensos entre 220-290
Chalconas y auronas (amarillo)	365-430	240-260
Flavonoides (amarillo)	365-390	250-270

<sup>a</sup> Valores aproximados: los valores actuales varían de acuerdo al disolvente utilizado, el pH y el estado físico del pigmento. Fuente: Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. (Fifth ed.). London, England: Chapman & Hall.

## Espectroscopia Infrarroja (IR)

La aplicación más habitual de la espectroscopia de infrarrojo en química orgánica es de tipo cualitativo y reside en la identificación de grupos funcionales de una molécula, para los que se observan bandas características en determinadas regiones del espectro.

La espectroscopia IR se utiliza para confirmar la identidad de un compuesto particular y como una herramienta para ayudar a determinar la estructura química de una molécula recientemente sintetizada (junto con resonancia magnético nuclear y espectrometría de masas).

La absorción infrarroja no tiene la suficiente energía para inducir una transición electrónica como la UV. La absorción de infrarrojo se restringe a compuestos con pequeñas diferencias de energía en los posibles estados vibracionales y rotacionales. La alternancia entre el campo eléctrico de la radiación interactúa con otras fluctuaciones en el momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia vibratoria de la molécula entonces la radiación se absorbe, causando un cambio en la amplitud de la vibración molecular (Raaman, 2006).

### **3.2.4. Obtención, recolección y conservación de drogas**

#### ***3.2.4.1. Obtención de drogas vegetales***

Las drogas vegetales se obtienen a partir de las plantas medicinales de dos tipos: silvestres o cultivadas. Las plantas también son clasificadas de acuerdo a su origen en:

- Especies autóctonas o indígenas: que son originarias de una zona, región o país.
- Especies alóctonas: que son propias de varias zonas regiones o países.

### 3.2.4.2. *Recolección*

#### Plantas silvestres

Originalmente todas las especies colectadas eran silvestres, sin embargo, el uso de plantas silvestres para la obtención de drogas vegetales tiene una serie de inconvenientes:

- Baja producción.
- Crecimiento irregular. Diferentes estadios de crecimiento.
- Gran dispersión geográfica. Zonas de crecimiento extensas.
- Gran variabilidad en contenido de principios activos.
- Confusiones de identidad.
- Riesgos de contaminación por diferentes sustancias y recolección no selectiva.

El uso de plantas silvestres está recomendado, a pesar de sus inconvenientes cuando:

- La población natural es abundante y de fácil acceso.
- La recolección es rentable.
- No es posible o resulta muy caro el cultivo de una especie determinada.

#### Plantas cultivadas

El cultivo de las plantas medicinales resulta adecuado para la mayoría de los casos por diversas razones:

- Permite conseguir cosecha abundantes y de buena calidad.
- Se obtienen todas las plantas en un estadio de crecimiento similar.
- La producción está localizada en una zona definida.
- Reduce la posibilidad de adulteraciones o falsificaciones.
- No atenta contra la población natural de plantas. Incluso, permite dar continuidad, recuperar y mejorar ciertas especies (Kuklinsky, 2000).

El momento de la recolección condiciona notablemente la calidad y cantidad de principio activo de la especie y es preciso tener en cuenta una serie de factores que afectaran la droga como son:

1. La edad del vegetal.
2. La época del año.
3. Momento del día.
4. El estadio del vegetal.

#### **3.2.4.3. Conservación**

Los vegetales al ser removidos de su medio natural, ven perturbado su equilibrio metabólico y proliferan en reacciones y fenómenos que degradan la droga vegetal recolectada.

Las causas de alteración pueden ser internas y externas.

a) Causas internas:

Reacciones enzimáticas: la actividad enzimática se promueve cuando la droga posee cantidades de agua superiores al 10%. Dentro de este tipo de reacciones existen: oxidaciones, condensaciones, polimerizaciones, isomerizaciones, racemizaciones y autooxidaciones; incluso pueden ocurrir reacciones entre los diferentes componentes de la planta.

b) Causas externas:

El calor, las radiaciones, la humedad, el ataque de parásitos, microorganismos, insectos, etc. (Bruneton, 1991).

Como se muestra en la Tabla 5, existen dos procedimientos fundamentales para evitar la activación enzimática y conservar las drogas vegetales: la inhibición enzimática y la inactivación enzimática.

### Inhibición enzimática

Esta técnica consiste en eliminar el agua del vegetal hasta valores inferiores al 10% (que llega a ser hasta de un 70% en las partes más carnosas y en menor cantidad en otras partes).

### Inactivación enzimática

Este proceso radica en la destrucción de las enzimas, que pierden así su capacidad catalizadora. También recibe el nombre de estabilización de la droga.

**Tabla 5. Métodos de inhibición e inactivación enzimática en vegetales**

Denominación	Inhibición enzimática	Inactivación enzimática
Características	<i>Reversible</i>	<i>Irreversible</i>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desecación natural               <ul style="list-style-type: none"> <li>-al sol</li> <li>-a la sombra</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sumergimiento en alcoholes a ebullición</li> <li>• Con vapores               <ul style="list-style-type: none"> <li>-vapor de agua en autoclave</li> <li>-vapores alcohólicos</li> <li>-calor seco</li> </ul> </li> </ul>
Procedimientos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desecación artificial               <ul style="list-style-type: none"> <li>- aire caliente</li> <li>-estufa al vacío</li> <li>-lámpara de IR</li> </ul> </li> <li>• Liofilización o criodesecación</li> </ul>	

Nota. Fuente: Kuklinsky, C. (2000). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal. Barcelona, España: Omega.

## 3.3. FITOQUÍMICA

### 3.3.1. Terpenos

Constituyen el grupo más abundante en los aceites esenciales, en conjunto son responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas.

Los terpenos están conformados por unidades isoprenoides (unidad formada por 5 átomos de carbono), generalmente la unión es cabeza-cola; pueden contener desde una (hemiterpenos) ocho unidades isoprenoides (tetraterpenos), e incluso entre 3000 y 6000 unidades isoprenoides (politerpenos) como por ejemplo el caucho. El arreglo de las unidades puede ser lineal (como en el escualeno) o cíclico (como en el limoneno) o varios ciclos (Vázquez, 2003).

Los terpenos son clasificados de acuerdo a su número de unidades de 5 carbonos que contienen:

1. Hemiterpenos  $C_5$ . Alcohol isoamílico, isovaleraldehído, ácido angélico.
2. Monoterpenos  $C_{10}$ . Mirceno, geraniol, linalool.
3. Sesquiterpenos  $C_{15}$ . Farnesol, acorona, humuleno, lanceol.
4. Diterpenos  $C_{20}$ . Zoapatanol, clerodanos.
5. Sesterterpenos  $C_{25}$ . Ofiobolinas, furanosesterterpenos.
6. Triterpenos  $C_{30}$ . Escualeno, lanosterol, friedelina.
7. Tetraterpenos  $C_{40}$ . Encontramos comúnmente a los carotenoides y xantofilas (Bruneton, 1991).

### 3.3.2. Lactonas

Las lactonas son ésteres cíclicos que se obtienen mediante la esterificación intramolecular a partir de hidroxiaácidos mediante la pérdida de agua. Esta ciclación forma ciclos de 5 o 6 miembros.

Pueden existir:

- Lactonas sesquiterpénicas como por ejemplo: partenolida (Santa María), absintina (ajenjo).
- Glucósidos cardioactivos, por ejemplo digoxina (Digital), bufalina (sapo del género *Bufo*) (Hasegawa & Marcano, 2002).

### 3.3.3. Saponinas

Las saponinas son heterósidos (azúcar + aglicón) que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agitan en una solución acuosa. Las unidades de azúcar pueden ser neutras o ácidas.

Según el número de enlaces glucosídicos al aglicón se denominan:

1. Saponinas monodesmosídicas: el azúcar se une al OH de la posición 3.
2. Saponinas bidesmosídicas: el azúcar se une en dos puntos al aglicón.

De acuerdo a la naturaleza de aglicón se clasifican en:

- Saponinas esteroídicas.
- Saponinas triterpénicas. Se subdividen a su vez en:
  - Saponinas triterpénicas pentacíclicas.
  - Saponinas triterpénicas tetracíclicas.

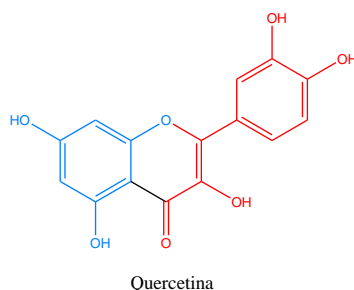
### 3.3.4. Fenoles

La vasta mayoría de los compuestos aromáticos de los productos naturales son fenoles. Existen numerosas categorías de estos compuestos: fenoles simples, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas.

1. Fenoles simples. La mayoría son componentes monoméricos de los polifenoles poliméricos y ácidos que promueven el crecimiento de los tejidos vegetales, incluyendo lignanos, hidroquinonas y taninos.
2. Éteres de fenoles. Muchos de los fenoles también existen como metil éteres (Kaufman & al., 2000).
3. Fenilpropanoides. Contienen una cadena de tres carbonos lateral unida a un grupo fenólico. Son derivados de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina. Los más extensamente distribuidos son los ácidos hidroxicinámicos, cuatro tipos son los más

comunes incluyendo los ácidos ferúlico, sinápico, cafeíco y cumárico. Otros ejemplos comunes de estos son: hidróxicumarinas, fenilpropenos, y lignanos (Harborne, 1998).

4. Flavonoides. Los flavonoides son pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estructuralmente son compuestos  $C_6-C_3-C_6$  (Figura 4) que provienen de dos rutas biosintéticas: Ácido shikímico ( $C_6-C_3$ ) y la ruta de los policétidos o acetogeninas ( $C_6$ ) (Camacho & al., 2011).



**Figura 4. Estructura básica de los flavonoides**

Las diferentes clases dentro del grupo son distinguidas mediante el heterociclo oxigenado y los grupos hidroxilo que contienen. Estos involucran catequinas, leucoantocianinas, flavanonas, flavanonoles, flavonas, antocianinas, flavonoles, chalconas, auronas e isoflavonas. Las catequinas y leucoantocianinas son estructuralmente similares y sólo se encuentran raramente como sus glicosilados. Se pueden polimerizar y formar taninos condensados.

Las flavanonas y los flavanonoles son bastante raros y normalmente existen como sus glicosilados. Las flavonas y flavonoles son los más extensamente distribuidos. Las antocianinas son los pigmentos comunes rojos y algunos azules de las flores. Las chalconas, como la buteína, carecen del anillo de pirano encontrado en los flavonoides. Las auronas son pigmentos amarillos comunes en ciertas flores.

5. Quinonas. Son pigmentos muy coloreados que cubren todo el espectro visible. Se han encontrado en regiones internas de las plantas y así imparten el color para el exterior de la planta. Generalmente, las quinonas son derivados de benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas (Kaufman & al., 2000).



### **3.3.5. Azúcares reductores**

Los azúcares están clasificados en tres grupos dependiendo de su composición: monosacáridos, como glucosa, galactosa, fructosa; disacáridos como la sacarosa; y oligosacáridos, formados por monosacáridos, por ejemplos: la inulina y la oligofructosa; los polisacáridos incluyen largas moléculas como la celulosa (Cseke & al., 2006).

Los azúcares reductores están constituidos por un conjunto de monosacáridos o disacáridos con función cetónica (-CO-) o aldehídica (-CHO-) determinados por capacidad de ceder electrones a otras moléculas (Oxford-Complutense, 2003). Los azúcares reductores se pueden unir de forma inespecífica a otras moléculas (Berg, 2008).

## **3.4. ACEITES ESENCIALES**

### **3.4.1. Definición**

Bajo la denominación de aceites esenciales se agrupan las sustancias volátiles obtenidas mediante procesos químicos y físicos a partir de especies vegetales aromáticas, caracterizados por una composición compleja en la que predominan derivados terpénicos (mono- y sesquiterpenos) y fenilpropánicos (Villar del Fresno, 1999).

### **3.4.2. Distribución**

Los aceites esenciales se encuentran en prácticamente vegetales superiores, según Lawrence, 17.500 especies aromáticas. Los géneros capaces de elaborar los constituyentes que componen los aceites esenciales están repartidos en un número limitado de familias particularmente ricas en aceites esenciales son: Compositae (manzanilla), Labiatae (menta), Myrtaceae (eucalipto), Pinaceae (pino), Rosaceae (rosas), Lauraceae (laurel), Rutaceae (*Citrus*), y Umbelliferae (anís, alcaravea, comino, eneldo, etc.) (Harborne, 1998).

Los aceites esenciales pueden almacenarse en todos los órganos vegetales: flores, hojas y, aunque menos habitual, en cortezas, leños, raíces, rizomas, frutos y, semillas. Aunque todos los órganos de una especie pueden contener aceite esencial, la composición de éste puede variar según su localización.

Cuantitativamente los contenidos en aceite esencial son bajos, frecuentemente inferiores a los 10 mL/kg. Contenidos elevados como en los botones de florales del árbol de clavo (150 mL/kg o más en la droga seca) son excepcionales (Cseke & al., 2006).

### **3.4.3. Propiedades físicas**

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, volátiles (lo que les diferencia de los aceites “fijos”), muy raramente son coloreados. En general, su densidad es inferior a la del agua (los aceites esenciales de safrán y clavo constituyen excepciones). Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada. Son liposolubles, insolubles en agua y solubles en los disolventes orgánicos habituales (Villar del Fresno, 1999).

### **3.4.4. Composición química**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos pertenecientes de manera casi exclusiva a dos grupos: terpenos y fenilpropanoides.

#### **3.4.4.1. Terpenos**

En los aceites esenciales se encontrarán únicamente los terpenos más volátiles, es decir, aquellos cuya masa molecular no es muy elevada: mono y sesquiterpenos.

- Monoterpenos. Éstos pueden ser: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos y fenoles.
- Sesquiterpenos. Siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas.

### 3.4.4.2. *Compuestos aromáticos*

Los derivados del fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) son menos frecuentes (Bruneton, 1991).

## 3.4.5. Métodos de obtención

### 3.4.5.1. *Por arrastre de vapor de agua*

#### 3.4.5.1.1. Hidrodestilación

La hidrodestilación simple consiste en sumergir directamente el material vegetal en un matraz lleno de agua acoplado a una trampa tipo Clevenger (Figura 5) que a continuación se somete a ebullición. Los vapores heterogéneos se condensan sobre una superficie fría del refrigerante, el aceite esencial se recolecta en el tubo graduado de la trampa (Miranda, 1994) y es separado por diferencia de densidad.

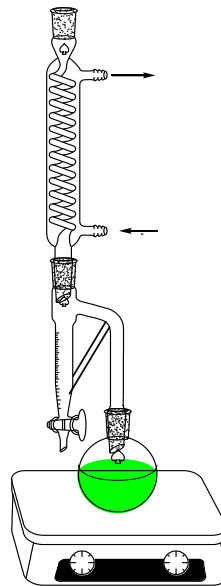
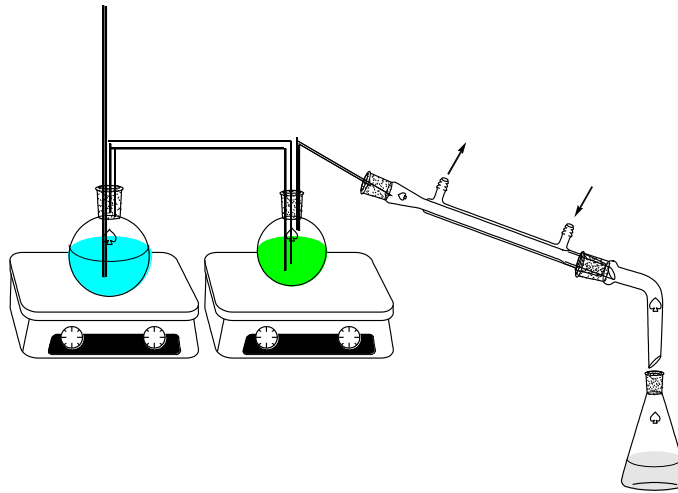


Figura 5. Dispositivo de hidrodestilación

#### 3.4.5.1.2. Destilación con vapor saturado

Como muestra la figura 6 en la destilación con vapor saturado, el vegetal no está en contacto con el agua: el vapor de agua (matraz azul) se inyecta a través de la masa vegetal (matraz verde). Para acortar el tiempo del tratamiento, limitar la alteración de los constituyentes del aceite esencial y economizar energía, se puede trabajar a presión moderada (1 a 3 bar) (Ahmad & al., 2006).



**Figura 6. Destilación con vapor saturado**

#### 3.4.5.1.3. Hidrodifusión

La hidrodifusión consiste en impulsar el vapor de agua a muy baja presión (0,02-0,05 bar) a través de la masa vegetal, de arriba a abajo. La composición de los productos obtenidos es sensiblemente diferente de los productos obtenidos por los métodos clásicos, desde un punto de vista cualitativo (Kuklinsky, 2000).

#### 3.4.5.1.4. Expresión

Este método consiste en despedazar el epicarpio de algunos frutos (cítrico) ejerciendo una fuerza abrasiva y el contenido de las glándulas secretoras que se han roto se recupera bajo una corriente de agua. Después de eliminar los desechos sólidos, el aceite esencial se separa de la fase acuosa por centrifugación (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicana, 2001). Otros procedimientos rompen las glándulas por depresión y recogen directamente el aceite esencial, lo que evita las degradaciones debidas a la acción del agua.

#### **3.4.5.2. *Enfleurage***

La extracción con grasa fría es un método antiguo. Este procedimiento aprovecha la liposolubilidad de los compuestos olorosos de vegetales. Una capa delgada de grasa inodora se extiende sobre una lámina de vidrio y se colocan varias capas de pétalos frescos. Una vez que la grasa ha absorbido toda la fragancia posible, el aceite se extrae mediante disolventes orgánicos, generalmente etanol. Una variante de ésta es la “digestión” se practica en caliente, por inmersión de los órganos vegetales. El producto obtenido es una pomada *floral* (Miranda, 1994).

#### **3.4.5.3. *Extracción con gases supercríticos***

Un fluido puede tener la densidad de un líquido y la viscosidad de un gas, por tanto tener una buena capacidad de difusión en los sólidos y un buen poder disolvente. En teoría se pueden utilizar varios gases, sin embargo, el interés se centra casi exclusivamente en el dióxido de carbono. Aunque los inconvenientes tecnológicos son considerables (el punto crítico se sitúa a  $P=73,8$  bares y  $T=31,1^{\circ}\text{C}$ ) las ventajas son numerosas; capacidad de proporcionar extractos de composición muy próxima a la original de los vegetales, posibilidad de hacer variar la selectividad, la viscosidad, etc., variando la temperatura y la presión (extracción y fraccionamiento simultáneos), ausencia de hidrólisis y de reagrupamientos (Kuklinsky, 2000).

#### **3.4.5.4. *Otros procedimientos***

La hidrodestilación por microondas a vacío, es un procedimiento donde la planta se calienta selectivamente por una radiación de microondas en un recinto cuya presión se reduce de forma secuencial: el aceite esencial es arrastrado en la mezcla azeotrópica formada con el vapor de agua propio de la planta (sin añadir agua para los productos en fresco) (Kuklinsky, 2000).

### **3.4.6. Factores de variabilidad de los aceites esenciales**

- Existencia de quimiotipos.
- Influencia del ciclo vegetativo.

- La temperatura, humedad relativa, duración de insolación y el régimen de los vientos.
- Las prácticas de cultivo.
- Otro elemento fundamental es el régimen hídrico.
- Influencia del proceso de obtención (Harborne, 1998).

### 3.4.7. Ensayos de calidad

Como se alude en la Tabla 6, para controlar la calidad de los aceites esenciales deben determinarse diferentes parámetros.

**Tabla 6. Ensayos para el control de calidad de los aceites esenciales**

Determinaciones físicas	Determinaciones espectroscópicas	Características organolépticas	Contenido de la esencia	Análisis cromatográfico
-Densidad a 20°C	-Espectroscopia	-Sabor	-Por destilación	-Cromatografía de capa fina
-Viscosidad	UV-Vis	-Olor		-Cromatografía de gases
-Índice de refracción	-Espectro de IR	-Color		
-Desviación óptica				
-Solubilidad en mezclas alcohol-agua				

# PARTE 4.

# OBJETIVOS



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad de la especie *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling (toronjil morado), usado en la medicina tradicional mexicana, mediante la estandarización de los extractos obtenidos por gradiente de polaridad para contribuir y complementar lo descrito por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer los criterios de calidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) para diseñar la metodología de estandarización.
- Identificar el material vegetal en el herbario etnobotánico IZTA de la FES-Iztacala UNAM.
- Aplicar las diferentes técnicas de extracción y obtener la más adecuada para la estandarización de los extractos.
- Proponer y complementar los parámetros analíticos planteados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).
- Extraer y caracterizar el aceite esencial del toronjil morado.



# PARTE 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL



## **5. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **5.1. PREPARACIÓN DE MATERIA PRIMA**

#### **5.1.1. Recolección de material biológico**

Adquirir la planta medicinal conocida popularmente como “toronjil morado o rojo”, en el mercado de Sonora ubicado en Calle Fray Servando y Teresa de Mier, delegación Venustiano Carranza, Distrito Federal, CP 06840.

#### **5.1.2. Herborización e identificación del material biológico**

Una vez obtenida la materia prima (toronjil morado):

Herborizar colocando un ejemplar de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) entre dos hojas de papel desecante. Posteriormente llevar al Herbario etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, para la identificación botánica de la planta medicinal.

#### **5.1.3. Desecación a la sombra**

Colocar los ejemplares en disposición de capas delgadas entre papel desecante. Desecar a temperatura ambiente, protegiendo del polvo y luz solar a la materia prima.

## 5.2. CONTROL DE CALIDAD

### 5.2.1. Materia extraña

Pesar aproximadamente 50 gramos de las partes aéreas del toronjil morado ( $\pm 0.05$  g). Examinar macroscópicamente y comprobar que los órganos vegetales estén exentos de signos visibles de contaminación, por hongos o insectos y otros contaminantes de origen animal o vegetal, incluyendo heces. Así mismo, cambios de coloración, olor o algún deterioro de otro tipo. Clasificar los grupos de materia extraña.

La porción del material extraño no debe ser mayor a 0,5 g. Calcular el contenido de cada grupo por cada 100 gramos de muestra secada al aire (World Health Organization, 1998).

### 5.2.2. Determinación de agua y materia volátil

*Método azeotrópico.* Trasvasar a un matraz bola de fondo plano 100 mL de tolueno y adicionar 1 mL de agua destilada, colocar sobre una parrilla con temperatura controlada, y poner en reflujo hasta que el volumen de agua en el tubo colector de la trampa permanezca constante.

Enfriar y separar al agua del tolueno (tolueno saturado). Subsecuentemente, pesar 5 g aproximadamente bien conocidos de materia pulverizada seca, con un error máximo de  $\pm 0.5$  g, y transferir al matraz que contiene el tolueno saturado; se coloca nuevamente el equipo sobre la parrilla y se deja en reflujo hasta que el volumen de agua permanezca constante (Miranda, 1994).

Anotar el volumen de agua y calcular su peso en gramos. El porcentaje de agua se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agua} = \frac{\text{peso agua}}{\text{peso muestra}} (100\%)$$

### 5.2.3. Material extraíble

Este método se utiliza para determinar la cantidad de componentes extraídos por gradiente de polaridad y se emplea a plantas medicinales cuyo contenido químico no ha sido determinado (World Health Organization, 1998).

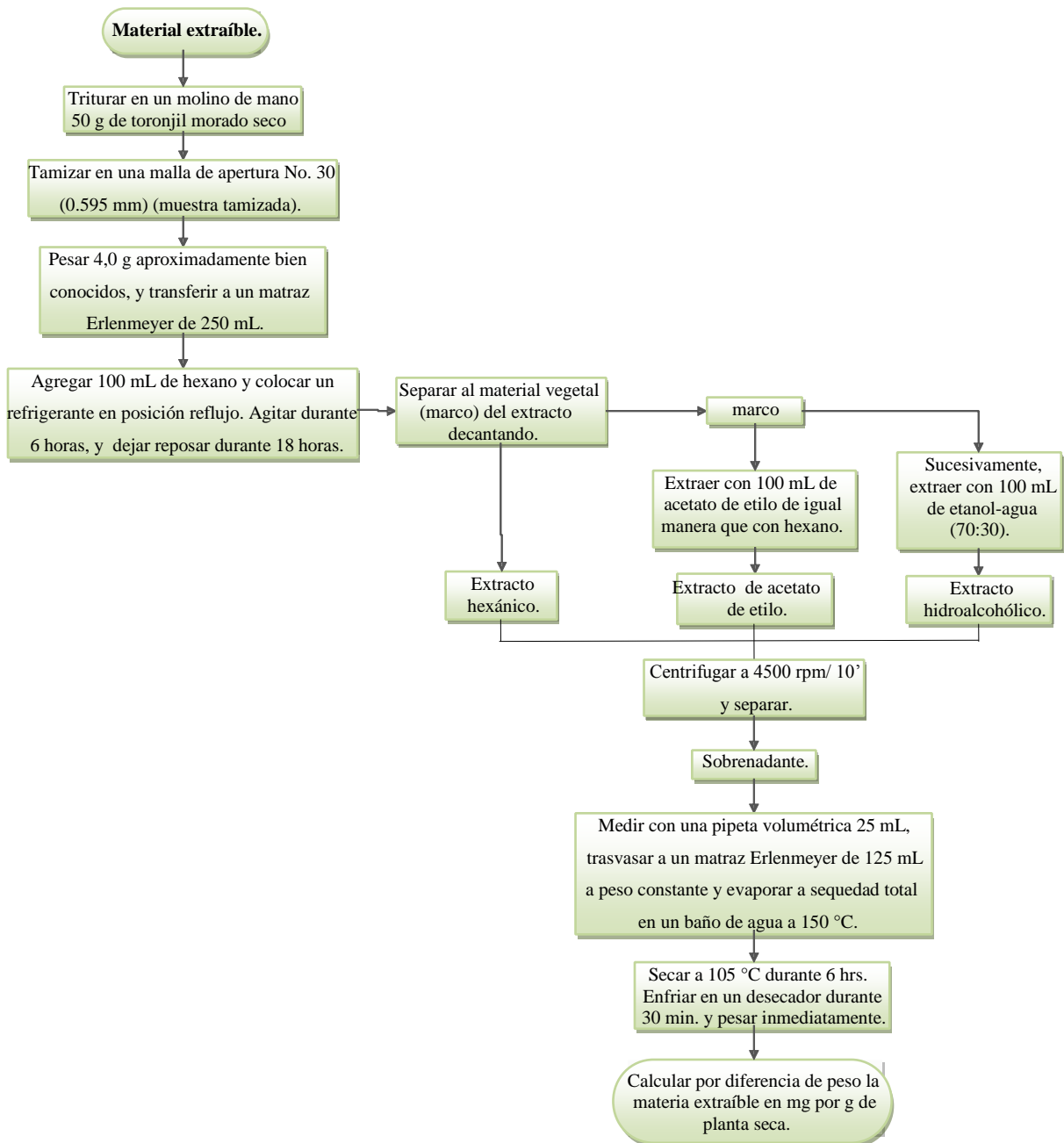


Figura 7. Metodología para la cuantificación de material extraíble

### 5.2.4. Tamizaje fitoquímico

La aplicación de un tamizaje tiene como objetivo conocer la composición química general, de una forma rápida, económica y segura, de una planta medicinal (Miranda, 1994).

#### 5.2.4.1. Preparación de la muestra

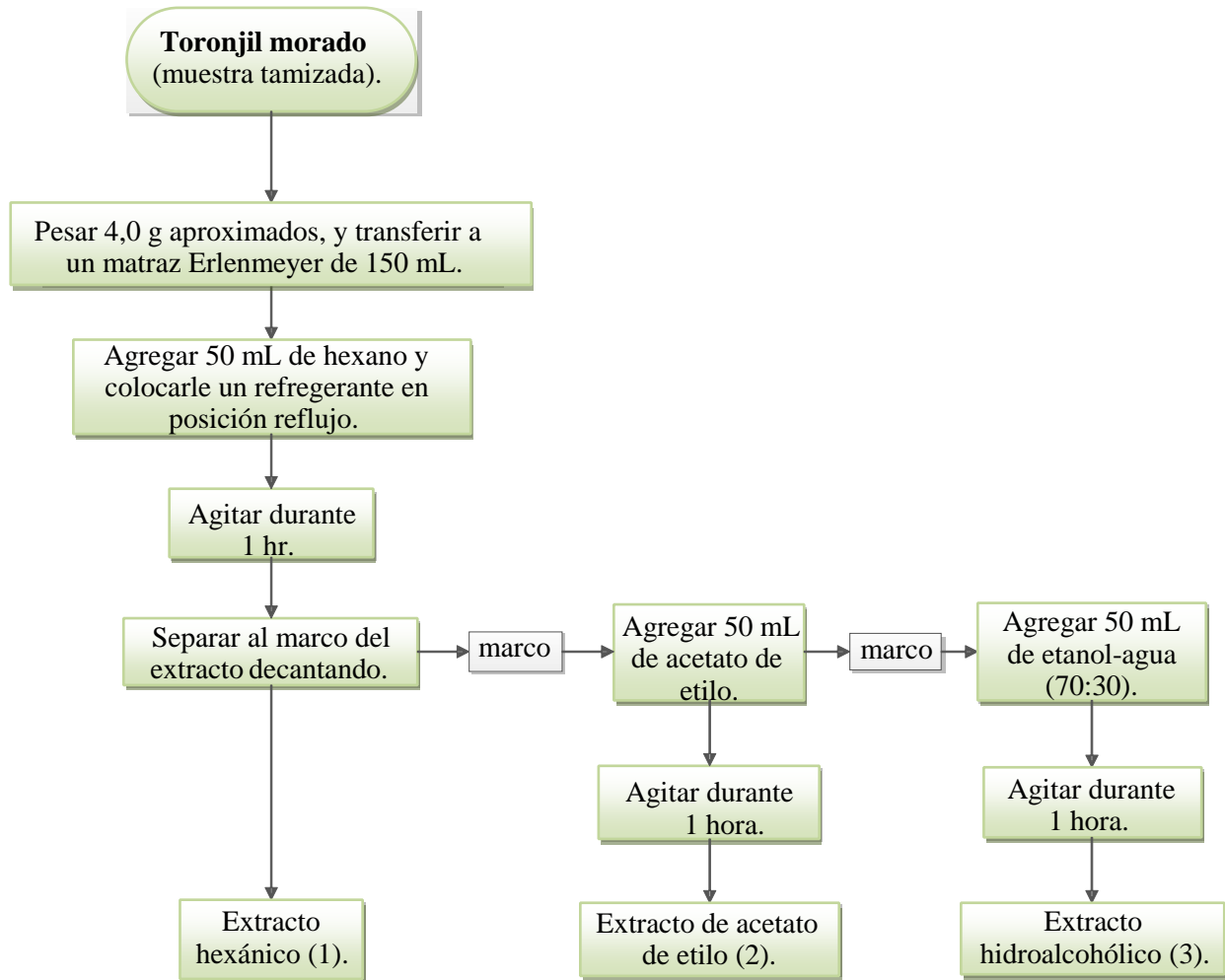


Figura 8. Metodología para la obtención de tres extractos por gradiente de polaridad

De acuerdo a la preparación de cada prueba descrita en el anexo 2, realizar los siguientes ensayos:

#### 5.2.4.2. Pruebas a extracto hexánico

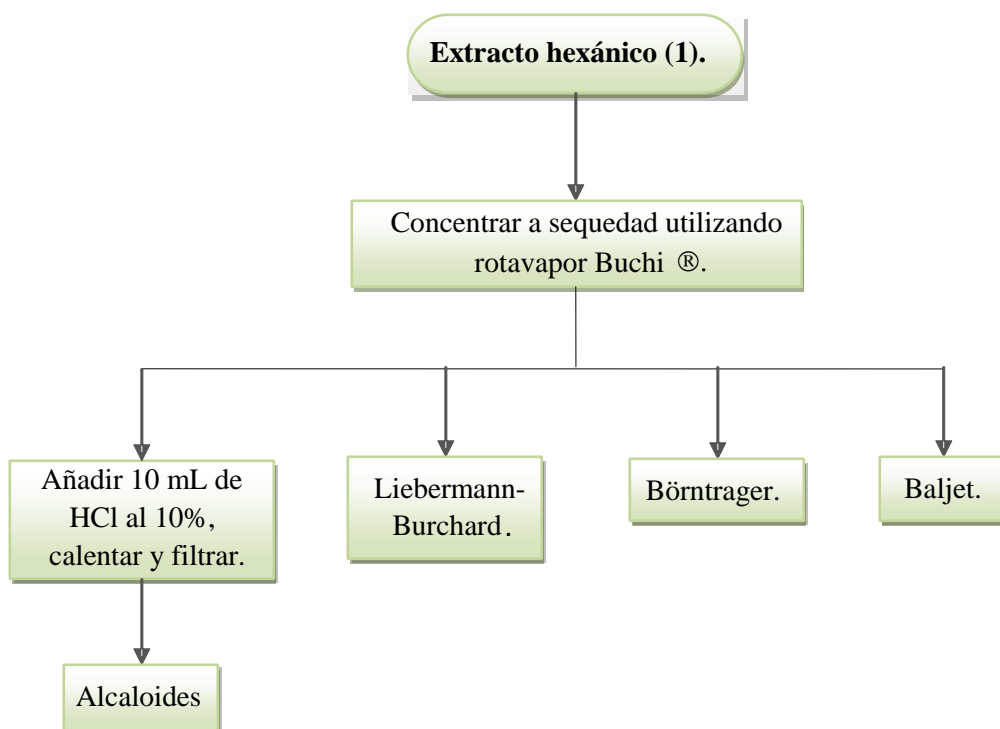


Figura 9. Identificación fitoquímica del extracto hexánico

## 5.2.4.3. Pruebas a extracto de acetato de etilo

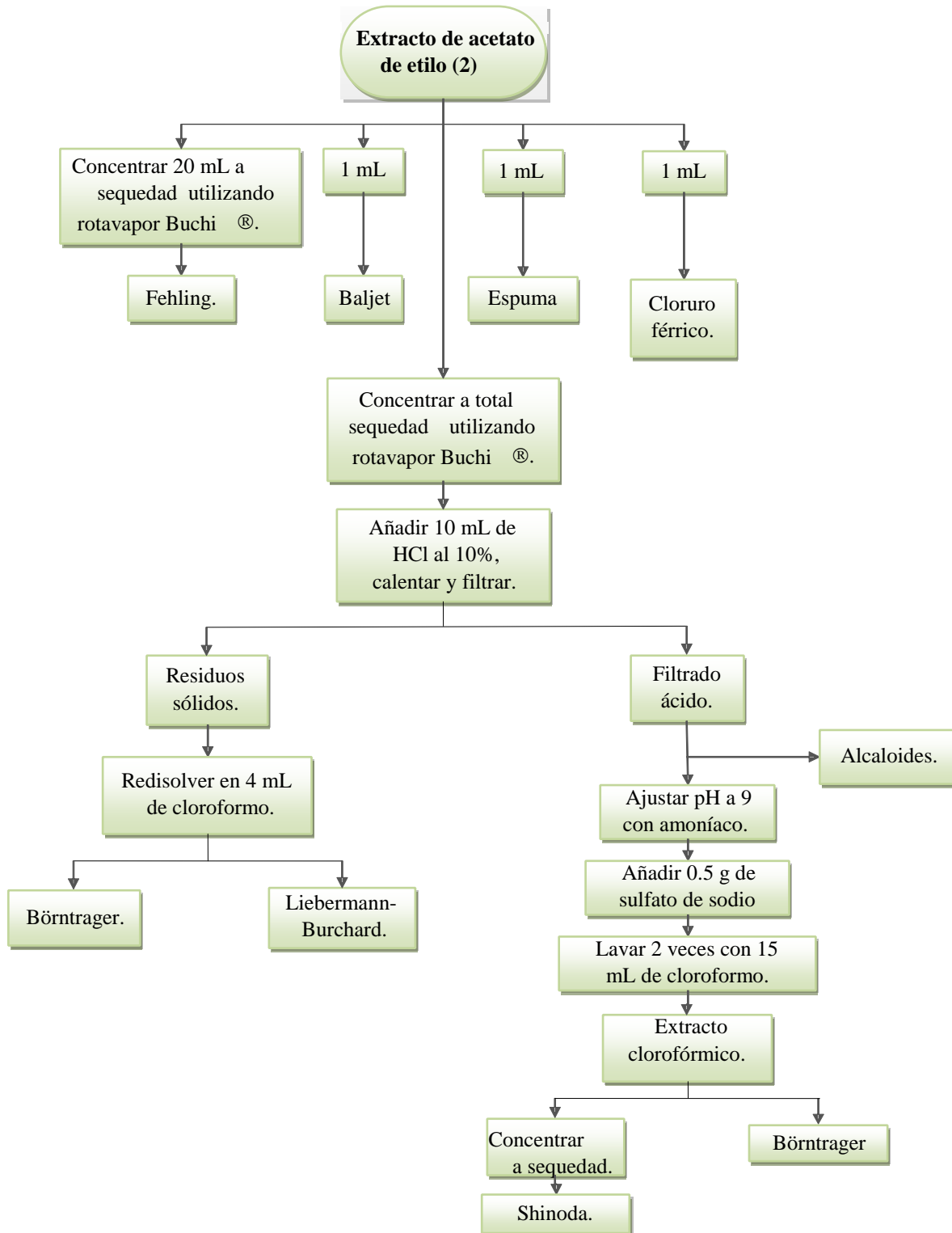


Figura 10. Identificación fitoquímica del extracto de acetato de etilo

#### 5.2.4.4. Pruebas a extracto hidroalcohólico

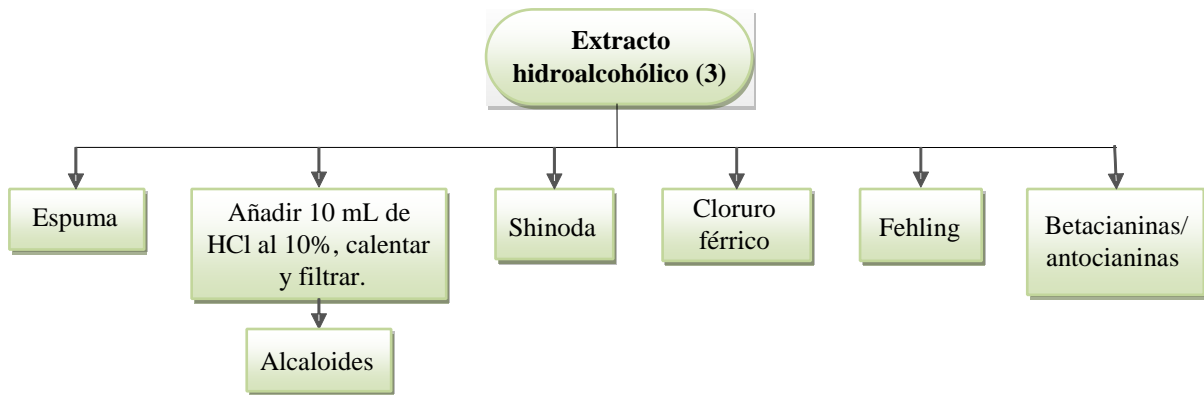


Figura 11. Identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico

#### 5.2.5. Extracción y cuantificación de aceite esencial

Pesar aproximadamente 100 g de toronjil morado seco molido y colocar en un matraz bola de 1000 mL, adicionar 500 mL de agua destilada y montar el equipo de hidrodestilación conectando una trampa de aceite Clevenger al matraz y enseguida de éste se acopla un refrigerante. Colocar sobre una parrilla con agitación y calentamiento suficiente para mantener la ebullición destilando a razón de 4 mL/min durante 3 horas. Tomar la lectura del peso del aceite obtenido. Este valor no deberá ser menor a 0.35% (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicana, 2001).

Calcular el porcentaje de aceite obtenido:

$$\% \text{ de Aceite Esencial (AE)} = \frac{\textit{pesoAE}}{\textit{pesomuestra}} (100\%)$$



## 5.2.6. Caracterización del aceite esencial

### 5.2.6.1. *Características físicas*

Propiedades organolépticas. Color, sabor y olor.

### 5.2.6.2. *Índice de refracción a 25° C*

### 5.2.6.3. *Densidad a 20° C*

### 5.2.6.4. *Espectro infrarrojo del aceite esencial y de los marcadores químicos de sus principales componentes* (Kuklinsky, 2000).

## 5.2.7. Cuantificación de compuestos con capacidad reductora<sup>1</sup>

### 5.2.7.1. *Preparación de soluciones*

5.2.7.1.1. Reactivo Folin-Ciocalteu. El reactivo comercial se compró al laboratorio HYCEL DE MÉXICO S.A DE C.V., que contiene: wolframato de sodio (5,5-10%), ácido fosfomolibdico (4-6%), ácido orto-fosfórico 85% (5-10%), ácido clorhídrico (1-6%) y bromo (0,1-0,5%).

5.2.7.1.2. Solución de carbonato de sodio 20%. Pesar 10 g de carbonato de sodio y disolver en 50 mL de agua desionizada.

---

<sup>1</sup>En la FHEUM de 2001 se establece que para el toronjil se debe cuantificar la cantidad total de taninos expresados como ácido tánico. Sin embargo, se observó que el método es inespecífico, y que, los componentes de la planta que se cuantifican son todos aquellos que cuentan con capacidad reductora; por lo que se decidió cambiar el nombre al ensayo.

## 5.2.7.1.3. Solución de referencia de ácido tánico.

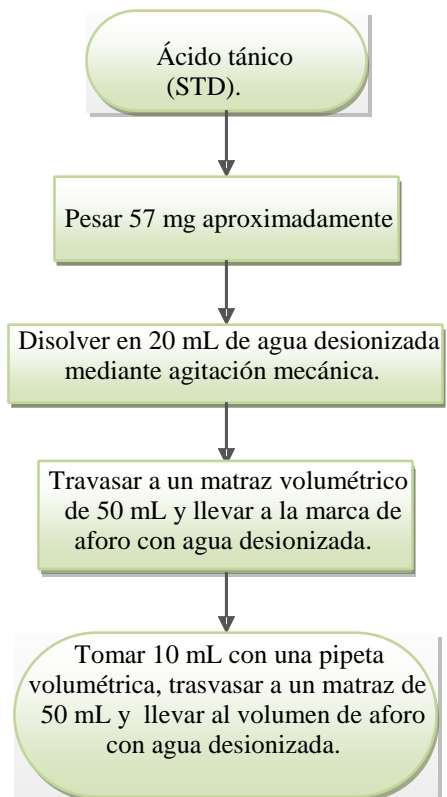


Figura 12. Preparación de la solución estándar de ácido tánico

### 5.2.7.2. Preparación de la solución problema

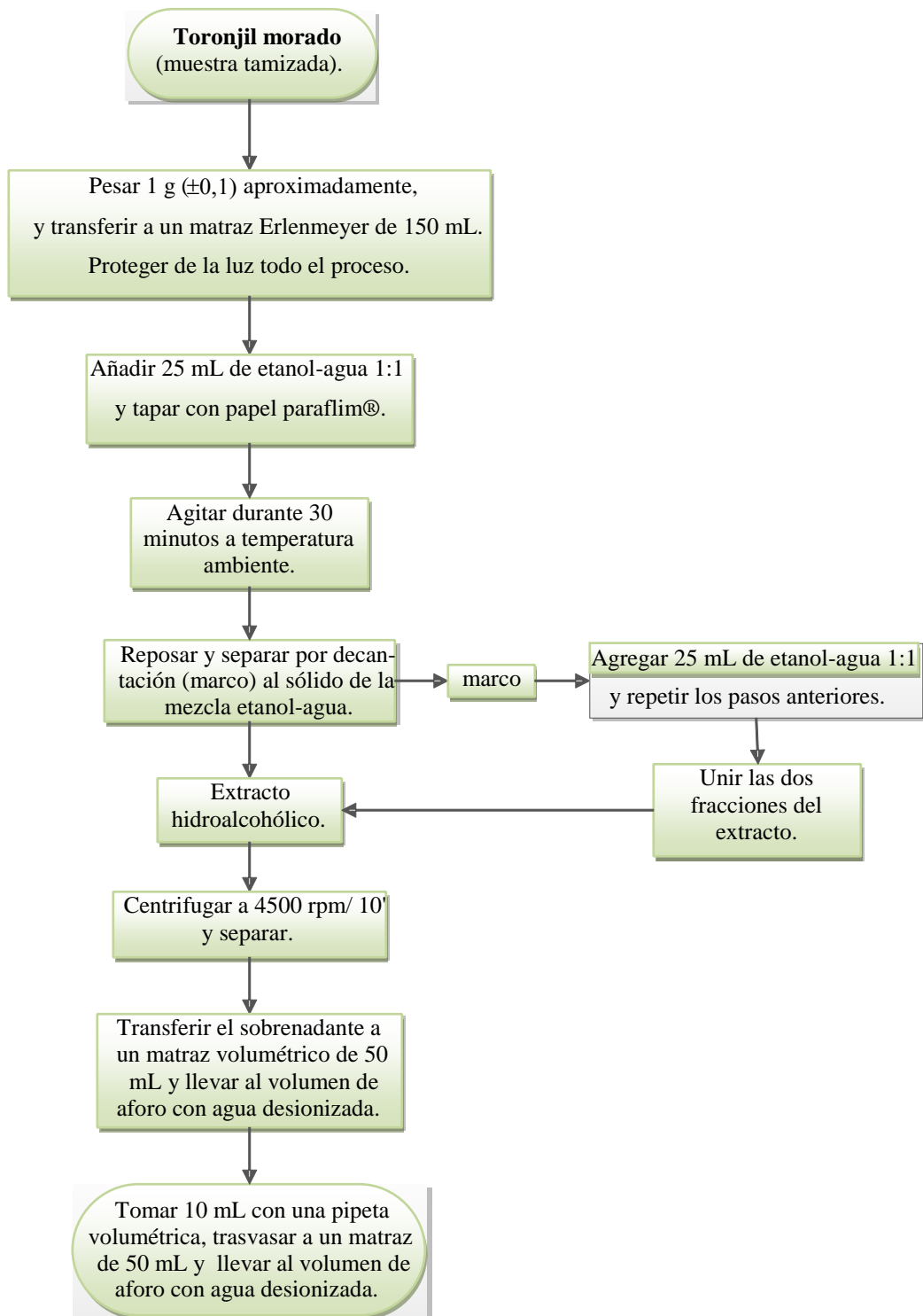


Figura 13. Metodología para la extracción de la muestra problema

### 5.2.7.3. Preparación del sistema problema

Colocar en un matraz aforado de 10 mL, los siguientes reactivos en el orden que a continuación se muestra:

**Tabla 7. Preparación de la solución blanco y del sistema problema**

Reactivos	Blanco	Problema
Solución problema	---	100 µL
Solución de ácido tánico	---	---
Agua destilada	5 mL	1000 µL
Reactivo Folin-Ciocalteu	---	100 µL
Agitar y reposar 1 min	---	✓
Sol. NaHCO <sub>3</sub>	---	300 µL
Aforar a 10 mL	---	✓
Reposar por lo menos 2 horas y leer inmediatamente a 760 nm	✓	✓

### 5.2.7.4. Preparación de la curva de calibración

Colocar en matraces volumétricos de 10 mL, las siguientes cantidades de las soluciones en el orden en que se mencionan en la Tabla 8.

**Tabla 8. Preparación de los sistemas para la curva de calibración**

Reactivos	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3	Sistema 4	Sistema 5	Sistema 6
Solución de ácido tánico (sol. STD)	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL	600 µL
Agua desionizada	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Reactivo Folin-Ciocalteu	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar y reposar 1 min	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sol. NaHCO <sub>3</sub>	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
Llevar a la marca de aforo con agua desionizada.	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reposar por 2 horas y leer inmediatamente a 760 nm	✓	✓	✓	✓	✓	✓

# PARTE 6.

# RESULTADOS



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Recolección del material biológico

La planta medicinal toronjil morado, se obtuvo en el mercado de Sonora, donde el productor directo mencionó que el lugar de cultivo de la especie es el municipio de Amecameca, ubicado al sureste del Estado de México. Además, que se cosecha de 11:00 a 12:00 horas de día.

### 6.2. Identificación del material biológico

La autenticación e identidad de la planta medicinal fueron realizadas por la M. en C. Edith López Villafranco, el ejemplar de referencia se encuentra depositado en la colección etnobotánica del Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y registrada con el número **2063 IZTA** en el que se refiere como nombre científico de la planta, *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling y como nombre común “**Toronjil morado**” (Figura 14).



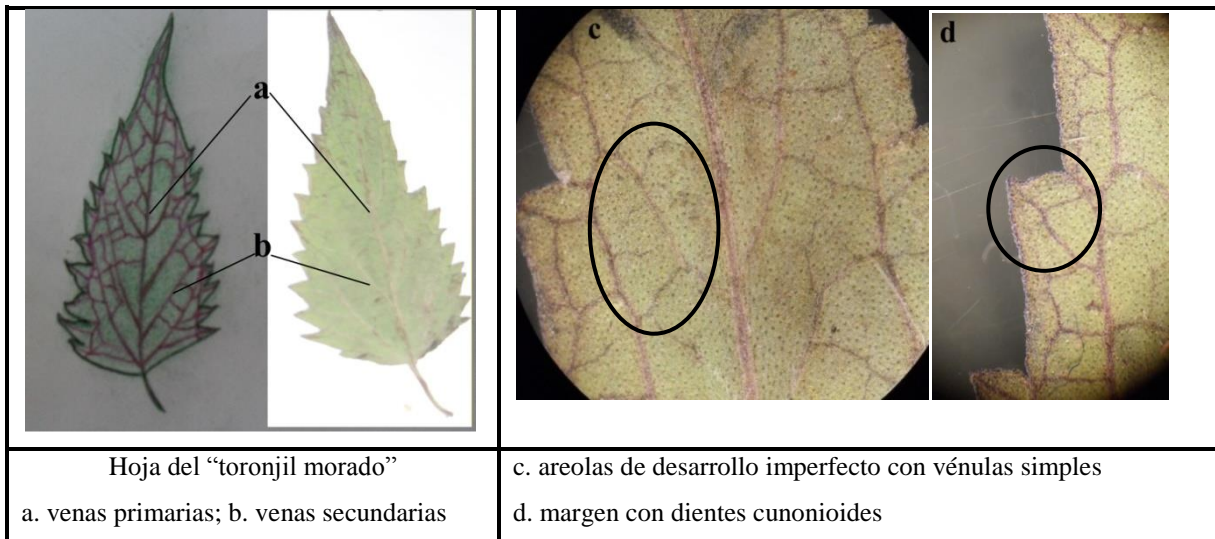
**Figura 14.** *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling “Toronjil morado”

Nota: Fotografía tomada en el laboratorio de Farmacognosia L-324, ubicado en la FES-Cuautitlán.

## Descripción macroscópica

Las flores están agrupadas de 5 hasta 20 racimos terminales interrumpidos, con forma tubular, de color rojo vivo o rojo-morado (Figura 14).

Como se muestra en la Figura 15, la arquitectura foliar se describe como una lámina entera, de forma ovado-lanceolada, con 4.4-6.3 cm de largo y 2.1-2.5 cm de ancho. Ápice atenuado y base redondeada. Textura cartácea. El pecíolo mide 1 cm de largo. Venación acródroma. La vena primaria (a) tiene un recorrido recto no ramificado. Las venas secundarias (b) tienen un ángulo agudo moderado, de divergencia casi uniforme, su recorrido es ligeramente curvado provisto de venas secundarias externas. Las venas intersecundarias son compuestas por venas terciarias muy finas. Areólas (c) de forma y tamaño irregular, con una disposición al azar y vénulas simples. Margen dentadoserrado, con dientes cunonioides (d) y en ángulo apical agudo.



**Figura 15. Arquitectura foliar**

Nota: Fotografías tomadas en laboratorio de Farmacognosia L-324, ubicado en la FES-Cuautitlán.

El tallo es cuadrangular en sección transversal; la parte basal y media del tallo es de color morado. La cutícula es lisa, pero en los ángulos se observa crenada.

### 6.3. Materia extraña

La cuantificación del material extraño realizado a una muestra representativa de una especie medicinal debe ser menor a 2.0% según lineamientos de la OMS y la FHEUM, este criterio sirve para determinar si el sujeto de prueba es apto para ser utilizado en estudios posteriores.

El rechazo de tres lotes (Tabla 9) se debió a que presentaron una cantidad excesiva de materia de diferente naturaleza.

**Tabla 9. Lotes rechazados por contaminación**

Número de lote y día de adquisición	% de materia extraña	Naturaleza
Lote 1. 09 de marzo de 2011	Incuantificable	Contaminación por insectos color naranja de un tamaño aproximado de 4 mm
Lote 2. 16 de marzo de 2011	17.54%	Cambios de coloración en hojas y otros contaminantes de origen vegetal
Lote 3. 23 de marzo de 2011	66.6%	Mezcla de los tres toronjiles

### 6.4. Determinación de agua y materia volátil

La prueba se efectuó con toronjil morado secado a la sombra y a temperatura ambiente, el propósito de este ensayo es demostrar que la técnica de secado es lo suficientemente efectiva para la conservación de la especie medicinal. Ejemplificando con la muestra 1, el porcentaje agua se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agua} = \frac{0.3 \text{ g de agua}}{5.0100 \text{ g de mtra.}} (100\%) = 5.9880\%$$



Como lo indica la Tabla 10 se realizaron 3 réplicas del ensayo, obteniéndose un porcentaje de humedad promedio de 5.9942%.

**Tabla 10. Contenido de agua y materia volátil obtenida por el método azeotrópico**

Peso muestra húmeda	Peso del agua <sup>a</sup>	Porcentaje de agua y materia volátil	Promedio
5.0100 g	0.30 g	5.9880%	5.9942%
5.0009 g	0.30 g	5.9989%	
5.0036 g	0.30 g	5.9957%	

<sup>a</sup> En cada muestra se obtuvieron 0.3 mL de agua, para convertirlos a gramos se multiplicó por la densidad (1 g/mL).

### 6.5. Material extraíble

La cuantificación del material extraíble es un método útil para determinar grosso modo el contenido químico de una planta a diferentes gradientes de polaridad.

**Tabla 11. Porcentaje de material extraíble con solventes de diferente polaridad**

Disolvente utilizado	Peso de la muestra seca <sup>a</sup>	Peso del extracto totalmente seco	Cantidad de material extraíble	Cantidad promedio de material extraíble	Apariencia
Hexano	3.7829 g	0.02158 g	5.7063%	5.7461%	Color naranja de aspecto aceitoso
	3.8234 g	0.02249 g	5.8823%		
	3.7947 g	0.02144 g	5.6497 %		
Acetato de etilo	3.7829 g	0.01185 g	3.1330%	3.2550%	Color verde olivo
	3.8234 g	0.01279 g	3.3456%		
	3.7947 g	0.01247 g	3.2859%		
Etanol-agua 7:3	3.7829 g	0.01791 g	4.7350%	4.8348%	Color rojizo-violeta
	3.8234 g	0.01905 g	4.9834%		
	3.7947 g	0.01817 g	4.7861%		

<sup>a</sup> Valores calculados a partir del peso conocido de la planta menos el 5.9942 % de agua y material volátil.

## 6.6. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos fitoquímicos (Tabla 12) presentes en una planta.

**Tabla 12. Pruebas fitoquímicas**

Extracto	Alcaloides			Börn- trager	Baljet	L-B	FeCl <sub>3</sub>	Espuma	Fehling	Shinoda	Betacianinas		
	D	H	As								NaOH	HCl	TLC (Rf)
Hexánico	-	-	-	-	+++	+++	x	x	x	x	X	x	x
Acetato de etilo	-	+	-	-	+++	+++	+	-	x	x	X	x	x
Etanol- agua (7:3)	x	x	X	X	x	x	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Alto

+++ Resultado positivo    + Resultado dudoso    x No se efectuó el ensayo  
 ++ Resultado mesurado    - Resultado negativo

## 6.7. Aceite esencial

Cumple con los requisitos establecidos por la FHEUM, obteniéndose en promedio un porcentaje del **1.03 %**, con las siguientes características:

### *Propiedades físicas:*

- Líquido transparente de color amarillo claro.

### *Propiedades organolépticas:*

- Sabor especiado agradable.
- Posee un aroma especiado, ligeramente a anís.

Se llevaron a cabo ensayos de caracterización complementarios a los propuestos por la FHEUM como son densidad, índice de refracción (Tabla 13) y espectro infrarrojo (Figura 16).

**Tabla 13. Porcentaje, densidad e índice de refracción del aceite esencial**

Peso de la muestra seca <sup>a</sup>	Peso de aceite esencial	Porcentaje de aceite esencial	Densidad a 25 °C (d <sup>25</sup> )	Índice de refracción a 20 °C (n <sup>20</sup> )
94.3258 g	1.01 g	1.07 %	0.9206 g/mL	1.511
94.1258 g	0.97 g	1.03 %	0.9207 g/mL	1.511
94.0258 g	0.94 g	1.00 %	0.9207 g/mL	1.511

<sup>a</sup> Valores calculados a partir del peso conocido de la planta menos el 5.9942 % de agua y material volátil.

### Espectro Infrarrojo:

La espectrometría de infrarrojos es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. La Figura 16 nos muestra a los diferentes grupos funcionales identificados en el aceite esencial.

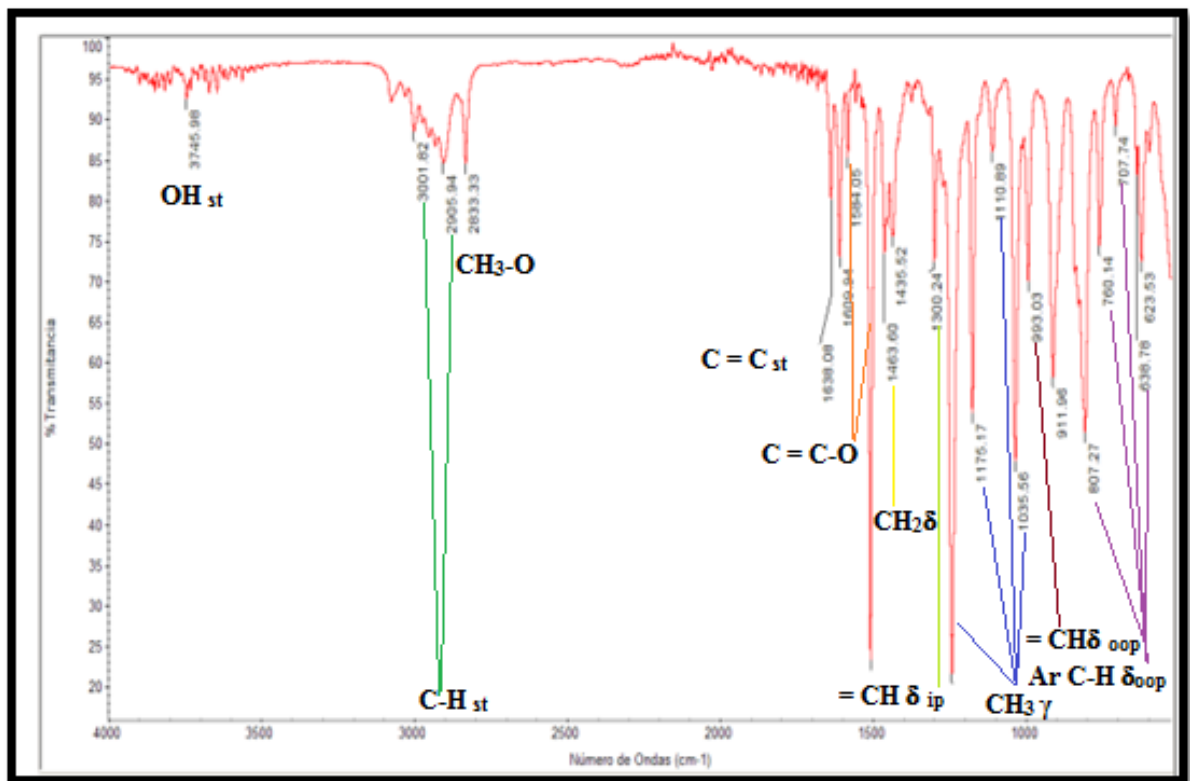


Figura 16. Espectro infrarrojo del aceite esencial.

## 6.8. Cuantificación de compuestos reductores

La cuantificación de materia con capacidad reductora presente en las partes aéreas de la planta se realizó mediante la estandarización a microescala del método Folin-Ciocalteu (ver anexos IV, V y VI), que se efectuó empleando espectrofotometría UV-Vis por medio de la elaboración de una curva de calibración (ver Figura 17 y Tabla 14) y utilizando como estándar ácido tánico. Obteniéndose el siguiente gráfico:

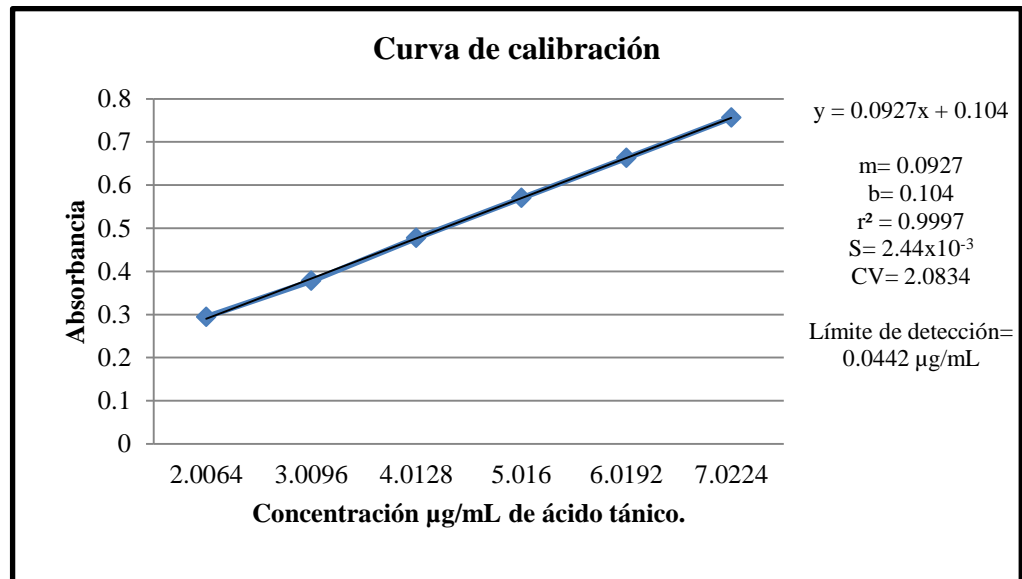


Figura 17. Curva de calibración de ácido tánico

Tabla 14. Resultados de la curva de calibración de ácido tánico

Sistema	1	2	3	4	5	6
Concentración						
µg/mL	2.0064	3.0096	4.0128	5.016	6.0192	7.0224
Curva 1 (Abs)	0.2909	0.3817	0.4802	0.5636	0.6618	0.7611
Curva 2 (Abs)	0.2942	0.3715	0.4658	0.5766	0.6603	0.7564
Curva 3 (Abs)	0.2977	0.3798	0.4855	0.5699	0.6664	0.7504
Abs Promedio	0.2943	0.3777	0.4772	0.5700	0.6628	0.7559

Como muestra se empleó el extracto etanol-agua al 50%. Cuantificándose un promedio **0.2394%** de compuestos reductores por cada gramo de planta totalmente seca (Tabla 15).

**Tabla 15. Porcentaje de materia con capacidad reductora**

Peso de la muestra (planta seca <sup>a</sup> )	Absorbancia de la muestra	Porcentaje de compuestos reductores	Porcentaje promedio de compuestos reductores
0.9404 g	0.5210	0.2388 %	0.2389 %
	0.5206	0.2387 %	
	0.5219	0.2394 %	
0.9436 g	0.5226	0.2389 %	0.2386 %
	0.5202	0.2376 %	
	0.5232	0.2393 %	
0.9469 g	0.5281	0.2413 %	0.2407 %
	0.5254	0.2398 %	
	0.5269	0.2406 %	

<sup>a</sup> Valores calculados a partir del peso conocido de la planta menos el 5.9942 % de agua y materia volátil.

#### **Cuantificación de muestra 1:**

- Peso conocido de la planta + H<sub>2</sub>O: 1.0004 g  
 1.0004 g \_\_\_\_\_ 100%  
 X \_\_\_\_\_ 5.9942% de H<sub>2</sub>O; X= 0.05997 g de H<sub>2</sub>O  
**Peso planta seca: 1.0004 g - 0.05997 g de H<sub>2</sub>O= 0.9404 g**
- Interpolando la absorbancia:  
 Absorbancia= 0.5210; X = **4.4930µg/mL**
- Regresando en las diluciones:  
 4.4930µg/mL (10mL) (50mL/10mL)= **224.65 µg** totales en el extracto crudo.
- Determinando el porcentaje de materia con capacidad reductora en la planta seca:  
 94.04 mg de planta \_\_\_\_\_ 100%  
 0.22465mg \_\_\_\_\_ X; **X= 0.2388%**

# PARTE 7.

# DISCUSIÓN



## 7. DISCUSIÓN

Los órganos de la planta que tienen uso tradicional del toronjil son las partes aéreas, por lo que es el segmento que se seleccionó para realizar el estudio.

### 7.1. Identificación del material biológico

La primera etapa del estudio consiste en la identificación botánica de la especie, como se describió en párrafos anteriores se llevó a cabo en la FES Iztacala, esta institución expide un certificado (ver anexo 1) con los siguientes datos:

- Nombre de la especie: *Agastache mexicana* (Kunth.) Linth. & Epling
- Familia: Lamiaceae
- Número de espécimen: **2063 IZTA**
- Nombre común: toronjil morado

La relevancia de contar con un ejemplar de herbario para el estudio de las plantas medicinales es que, para poder iniciar el estudio científico de cualquier ser vivo, se debe conocer con certeza su denominación científica. Todo trabajo que pretenda constituir una fuente de material fiable, debe respaldarse en una buena preparación de los ejemplares para que puedan depositarse en un herbario y que sirvan como referencia para el usuario.

Conociendo la identidad del material botánico podemos tener la certeza de utilizar la información vertida en las fuentes bibliográficas y poder establecer criterios de control de calidad, como por ejemplo la descripción macroscópica que establece la FHEUM (2001), que incluye forma de la hoja, tallo y flores. Estos criterios se consideran con el fin de evitar posibles adulteraciones y/o falsificaciones, debidas a razones diversas como:

- El desconocimiento de la planta por parte del vendedor.
- La persona deliberadamente proporcione una especie por otra.

## **7.2. Materia extraña**

Con el conocimiento de las características físicas de la planta medicinal se puede efectuar la determinación de materia extraña en la que se observó la siguiente situación:

Se inspeccionaron los órganos vegetales de tres lotes distintos de toronjil morado, donde en uno de ellos se encontró materia vegetal que no correspondía a las características del toronjil morado además de hojas con cambios de coloración en una proporción del 17.54%, asimismo, otro de ellos se detectó invadido por insectos.

Lo cual indica que:

- El producto está siendo adulterado de manera premeditada con las plantas que crecen en el mismo cultivo como por ejemplo pasto, diente de león, etc.
- No se está teniendo el cuidado de recolectar de manera selectiva la planta en cuestión.
- Se está recolectando la planta en edad madura debido a la gran cantidad de hojas amarillas.
- El control de plagas es ineficiente.

Considerando las especificaciones establecidas por la OMS (1998) y la FHEUM (2001) que fijan 2.0% como el valor del límite máximo, en este apartado y analizando los hechos anteriormente descritos, podemos decir que el material no cumple con los requisitos de calidad y que sí este material se vendiera a un laboratorio se etiquetaría como rechazado.

## **7.3. Determinación de agua y de materia volátil**

Un exceso de agua en el material vegetal puede promover crecimiento bacteriano, propiciar enmohecimiento, presencia de insectos y signos de deterioro por hidrólisis de componentes.

La FHEUM (2001) establece como especificación no más del 10% y el material vegetal presentó una humedad del 5.9942% por lo que se puede asegurar que la técnica de conservación (secado a la sombra) es apropiada.



#### 7.4. Material extraíble

Este método determina la cantidad de compuestos químicos extraídos en cada uno de los disolventes utilizados. Se emplea para materiales que aún no tienen ensayos químicos y biológicos adecuados, características como apariencia, color y porcentaje del material extraído, nos pueden indicar si la planta ha sido adulterada.

De acuerdo a los resultados tenemos que:

La mayoría del contenido de compuestos químicos son no polares (hexano), de menor cantidad los de mediana polaridad (acetato de etilo) y en mediana proporción los de naturaleza polar (etanol-agua 70:30).

#### 7.5. Tamizaje fitoquímico

El efecto biológico de las drogas vegetales utilizadas con fines medicinales, depende de su composición química. La composición química de una planta medicinal se puede apoyar de manera general en la técnica de tamizaje fitoquímico. Esta técnica permite una evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

En la Tabla 16 se muestran a los grupos fitoquímicos revelados en esta prueba.

**Tabla 16. Metabolitos identificados en tres extractos crudos de diferente polaridad**

Extracto	Apariencia	Pruebas positivas	Metabolitos que identifica
Hexánico	Naranja de consistencia aceitosa, por lo que se presume la existencia de algunos carotenos y aceites fijos	Baljet  Lieberman- Burchard	Grupos lactónicos  Saponinas triterpénicas Saponinas esteroideas Esteroles

*Continuación de la Tabla 16. Metabolitos identificados en tres extractos crudos de diferente polaridad*

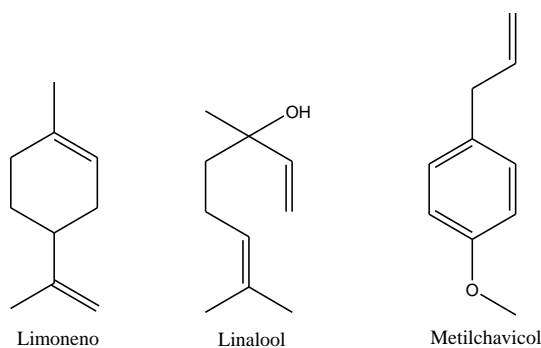
Extracto	Apariencia	Pruebas positivas	Metabolitos que identifica
Acetato de etilo	Verde, originado por la clorofila	Baljet Lieberman-Burchard	Grupos lactónicos Saponinas triterpénicas Saponinas esteroideas Esteroles.
Hidroalcohólico	Rojizo-morado, son responsables del color los pigmentos de las flores	Cloruro férrico Shinoda Espuma Fehling Betacianinas	Fenoles Flavonoides Saponinas triterpénicas Azúcares reductores Betacianinas

El tamizaje fitoquímico es un estudio preliminar que orienta a la localización cualitativa de uno o varios metabolitos presentes en el material vegetal que constituyen, así parte de la identidad química de la especie en cuestión, y por lo tanto un criterio de control de calidad.

## 7.6. Aceite esencial

El toronjil morado es una planta que se caracteriza por un aroma especiado y agradable, estas características son proporcionadas por el aceite esencial presente en sus flores y hojas, el cual se obtuvo por hidrodestilación. La FHEUM (2001) establece en la monografía de la planta “contiene no menos del 0.35%”, por lo que se encuentra dentro de la especificación.

De acuerdo con Estrada-Reyes et al. (2004) los componentes principales del aceite esencial de toronjil son: limoneno, linalool y metil chavicol (Figura 18).



**Figura 18. Componentes principales del aceite esencial de toronjil morado**

En la Figuras 19, 20 y 21 se hace una comparación entre los infrarrojos de los estándares de cada componente y del aceite esencial se pueden observar en el espectro del aceite las bandas características de cada uno de ellos.

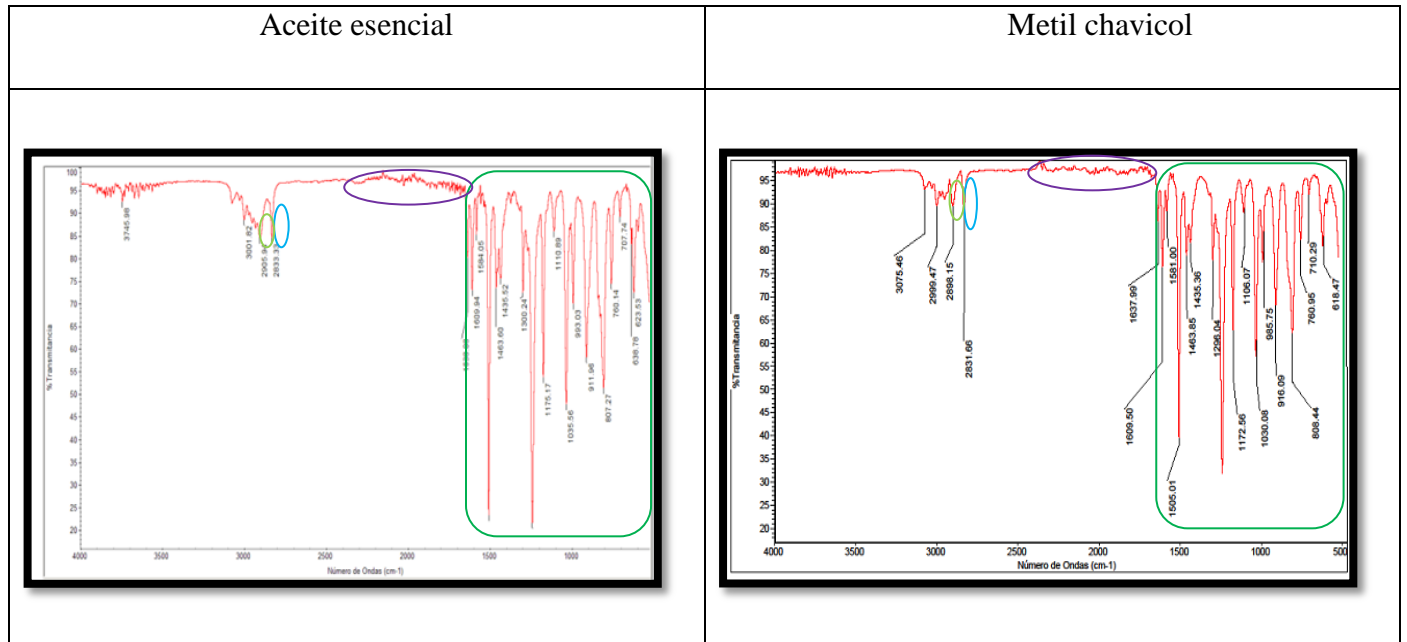


Figura 19. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar metil chavicol (derecha)

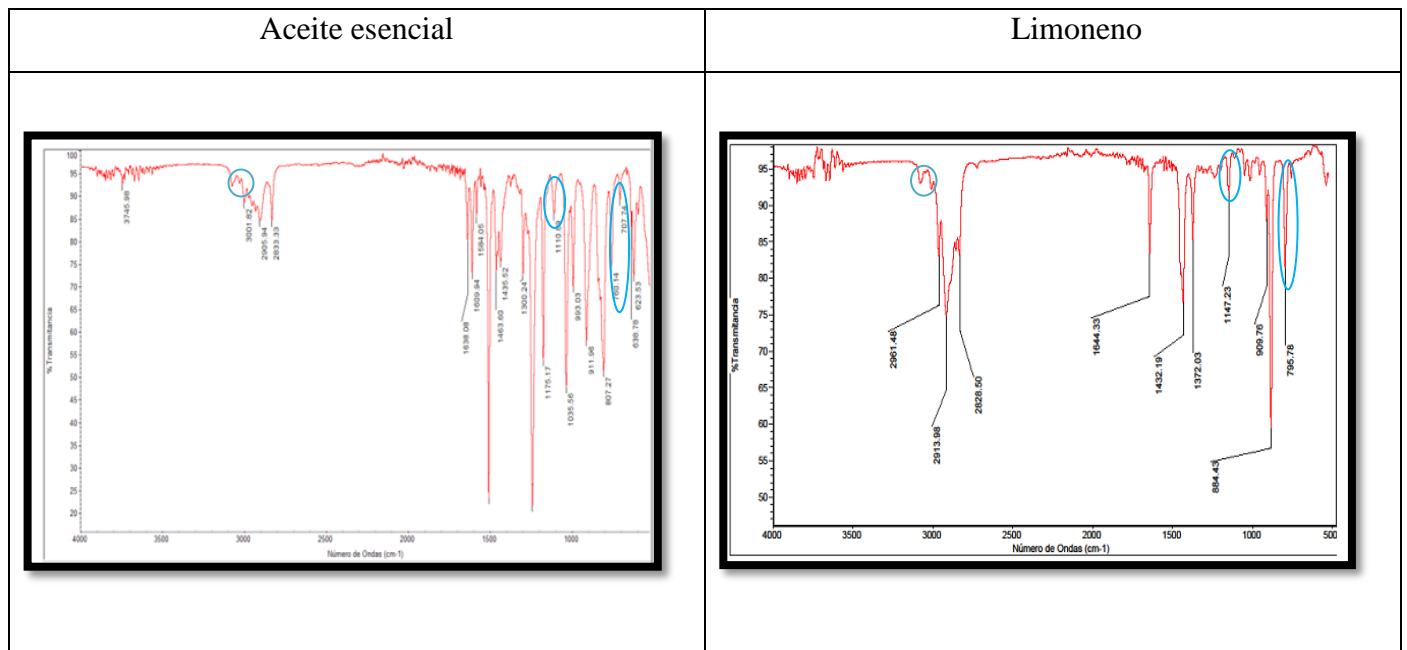


Figura 20. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar limoneno (derecha)

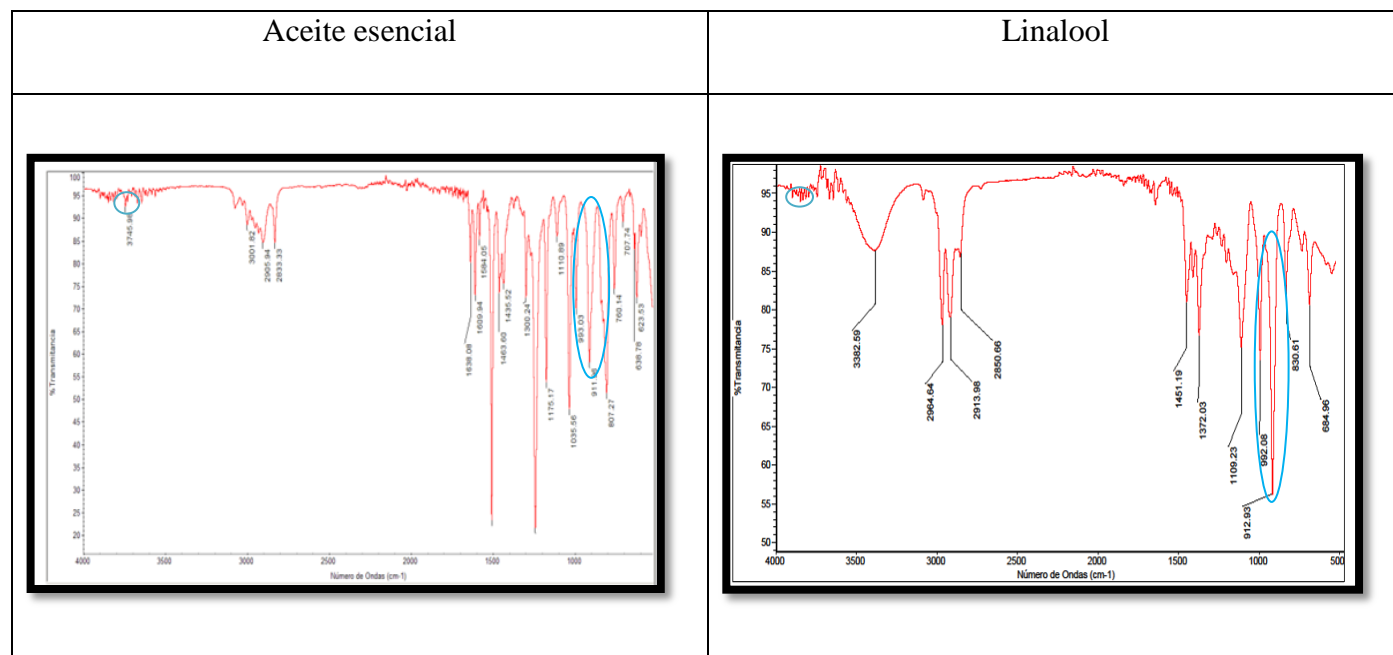


Figura 21. Infrarrojos de la muestra (izquierda) y del estándar linalool (derecha)

En la Tabla 17 observamos a las bandas correspondientes de los grupos funcionales identificados en los tres componentes principales del aceite esencial. La presencia de algunos de estos grupos no es muy evidente debido a que se encuentran en menor proporción con respecto a los demás.

Tabla 17. Principales bandas características identificadas en el aceite esencial de toronjil

Grupo funcional	% de transmitancia en $\text{cm}^{-1}$ para las bandas del aceite esencial	% transmitancia en $\text{cm}^{-1}$ para las bandas del metil chavicol	% transmitancia en $\text{cm}^{-1}$ para las bandas del limoneno	% transmitancia en $\text{cm}^{-1}$ para las bandas del linalool	Intervalo de frecuencias en $\text{cm}^{-1}$
<i>Alcanos</i>					
C-H <sub>st</sub>	3001.82		3010.0		
	2905.8	2898.15			3000-2840
CH <sub>3</sub> -O	2833.33	2831.66			2850-2815
CH <sub>2</sub> δ	1463.60	1463.85	Coincide con		
	1436.52	1435.36	CH <sub>3</sub> δ <sub>as</sub>		1475-1450

Continuación de la Tabla 17. Principales bandas características identificadas en el aceite esencial de toronjil

	1250	1250	
	1140.59		1147.23
$\text{CH}_3 \gamma$	1175.17	1172.56	1250-800
	1110.89	1106.07	
	1035.58	1030.08	
<i>Alquenos</i>			
$= \text{CH} \delta_{\text{ip}}$	1300.24	1296.04	1420-1290
$= \text{CH} \delta_{\text{oop}}$	993.03		992.08 1005-675
$\text{C} = \text{C}_{\text{st}}$	1638.08	1637.99	1690-1635
$\text{C} = \text{C-O}$	1584.05	1581.00	Debajo de
	1500	1500	≈1590
<i>Alcoholes</i>			
$\text{OH}_{\text{st}}$	3745.00		3750.00 3650-3200
<i>Aromáticos</i>			
	1609.99	1609.50	
$\text{Ar C-C}$	1584.00	1581.00	1625-1575
	1500.00	1505.01	
	807.27	808.44	
$\text{Ar C-H} \delta_{\text{oop}}$	760.14	760.95	900-650
	710.24	707.74	

Este análisis no se considera en la FHEUM, pero se debería incluir como un criterio de identidad química de la especie. Además, el espectro infrarrojo en conjunto con otros datos como densidad e índice de refracción puede establecer la base para las normas que determinen sus requisitos mínimos de calidad.

## 7.7. Cuantificación de compuestos reductores

En la FHEUM (2001) se establece que para el toronjil morado se debe cuantificar la cantidad total de taninos expresados como ácido tánico, mediante una curva de calibración con el reactivo de Folin-Denis recién preparado en laboratorio. Cuando se hizo la preparación de éste, se observa que el reactivo no es estable, esto nos puede conducir a un resultado erróneo en la cantidad de polifenoles, por este motivo se toma la decisión de cambiar el reactivo de preparado de acuerdo a la FHEUM por uno de un proveedor de reactivos. El reactivo que tuvimos disponible fue Folin-Ciocalteu que se reporta en la literatura para la cuantificación de polifenoles, por lo que se realizó la cuantificación con éste. En las Tablas 18 y 19, se hace un comparativo entre los dos métodos ensayados:

**Tabla 18. Comparación del método propuesto por la FHEU Mexicano en 2001 y el método modificado para la cuantificación de materia con capacidad reductora.**

Método FHEUM	Método estandarizado
Reactivo Folin-Denis.	Reactivo Folin-Ciocalteu.
Preparación de 100 mL de solución de carbonato de sodio al 35%.	Preparación de 50 mL de solución de carbonato de sodio al 20%
Preparación de 1 litro de solución estándar de ácido tánico (0,1 mg/mL)	Preparación de 100 mL solución estándar de ácido tánico (0,1 mg/mL)
Preparación de 250 mL de solución problema, filtrando la solución	Preparación de 50 mL de solución problema, separando por medio de centrifugación
Elaboración de la curva de calibración con 10 sistemas de un volumen total de 100 mL	Elaboración de la curva de calibración con 6 sistemas de un volumen total de 10 mL
Longitud onda utilizada: 760 nm	Longitud onda utilizada: 760 nm

**Tabla 19. Comparación de las ventajas y desventajas de los métodos propuestos**

Ventajas del método propuesto por la FEHUM	Ventajas del método estandarizado	Desventajas del método propuesto por la FHEUM
Se considera que este método no tiene ninguna ventaja debido a que necesita mayor cantidad de reactivos.	Requiere hasta 10 veces menos de la cantidad de reactivos utilizados en el método de la FHEUM.	Es poco específico. Los reactivos Folin-Denis y Folin-Ciocalteu son altamente tóxicos.
Genera grandes cantidades de residuos, llegando a ser hasta 3 litros por ensayo.	Cuenta con una respuesta lineal. Es reproducible. Reduce en un 94% los residuos.	Efectos peligrosos para la salud: -En contacto con la piel y ocular: irritaciones, quemaduras. -Por absorción: Irritaciones, efectos en el sistema nervioso central, quemaduras, ansiedad, espasmos, ataxia (trastornos de la coordinación motriz).  Cancerígeno en ensayos sobre animales.  Ecotoxicidad <sup>b</sup> :  - Test EC <sub>50</sub> (mg/l): Peces (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) = 100 mg/l; Clasificación: Extremadamente tóxico. Peces (HCl) = 25 mg/l; Clasificación: Extremadamente tóxico. -Medio receptor: Riesgo para el medio acuático = Alto Riesgo para el medio terrestre = Medio -Observaciones: La ecotoxicidad se debe a la desviación del pH. Ecotoxicidad aguda en la zona de vertido.

<sup>a,b</sup> Fuente: <http://www.analytyka.com.mx/spanish/FDS/R/251567.htm>, 15 de Febrero de 2013

PARTE 8.

CONCLUSIONES



## 8. CONCLUSIONES

En base al trabajo experimental realizado a la especie medicinal *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling, conocida popularmente como toronjil morado, se concluye lo siguiente:

- La especie medicinal es *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling conocida comúnmente como toronjil morado, identificada de acuerdo a sus características macroscópicas y comparadas con el espécimen de referencia depositado en el herbario etnobotánico IZTA de la FES-Iztacala.
- El presente trabajo de investigación constituye una aportación original a la estandarización de la droga vegetal, contribuyendo así al aseguramiento de la calidad de la especie en cuestión, un recurso de amplio uso en la medicina tradicional de México, la cual aún es un área de investigación en desarrollo.
- La estandarización de la droga vegetal principia con la correcta identidad de la muestra, la evaluación organoléptica, valoración farmacognóstica, cantidad y características del aceite esencial (materia volátil), material extraíble y evaluación fitoquímica.
- La estandarización fitoquímica abarca toda la información posible generada en consideración a los componentes químicos presentes en una droga vegetal. De ahí, que la evaluación para propósitos de estandarización incluya: (1) tamizaje fitoquímico, para la determinación de la presencia de diferentes grupos químicos, (2) cuantificación de grupos químicos o marcadores de interés que esgrime como un parámetro adicional en el aseguramiento de la calidad de la muestra, (3) establecer el perfil de huellas digitales.
- Se propone que el aceite esencial se caracterice por medio de pruebas físicas e instrumentales, como los ensayos expuestos en este trabajo: características físicas y organolépticas, índice refracción, densidad e infrarrojo.

- 
- Al efectuar el ensayo de polifenoles pudimos constatar que el método de Folin-Ciocalteu no es específico, ya que cuantifica todo aquel compuesto químico que tiene capacidad reductora.
  - Por lo que planteamos que para el control de calidad de *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling se tomen los siguientes parámetros:
    - Identidad botánica macroscópica y microscópica.
    - Porcentaje de materia extraña.
    - Cuantificación de material extraíble.
    - Tamizaje fitoquímico.
    - Extracción y cuantificación de aceite esencial.
    - Caracterización del aceite esencial.
    - Determinación de humedad.
    - Cuantificación de compuestos fenólicos.
    - Cuantificación de arsénico y metales pesados.
    - Determinación de residuos de pesticidas.
    - Evaluación de la calidad microbiológica.

Esta lista aporta nuevos criterios para el control de calidad de una planta medicinal.

# PARTE 9.

# REFERENCIAS



## 9. REFERENCIAS

- Ahmad, I., & al. (2006). *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*. Morlenbach, Federal Republic of Germany: WILEY-VCH. pp. 30-32
- Bauer, R., & Tittel, G. (1996). Quality assessment of herbal preparations as a prediction of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine*, 15 (63), 1-14.
- Berg, J. M. (2008). *Bioquímica*. Barcelona: Reverté. pp. 309
- Biblioteca de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires*. (2012). Recuperado el 12 de Abril de 2013, de <http://www.biblioteca.anm.edu.ar/plinio.htm>
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, S.A. pp. 15, 23-25, 39-43
- Buriel, F. (2008). *Química Analítica Cualitativa*. Madrid, España: Thomsom Editores. pp. 348
- Camacho, B., & al. (2011). *Manual de farmacognosia y fitoquímica*. Cuautitlán Izcalli: UNAM. pp. 98
- Chife, C. (2010). La perspectiva social de la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* ,8 (4), 242-245
- Cseke, L. J., & al., e. (2006). *Natural Products from Plants* (Second ed.). Boca Raton: Francis & Taylor. pp. 27
- De la Cruz, M. (1991). *Libellus de medicinalibus indorum herbis* (Segunda ed.). Distrito Federal: Fondo de Cultura Económica. pp. 7, 17
- Ekka, N. R., & al. (2008). Standardization Strategies for Herbal Drugs-An Overview. *Journal of Pharmacology and Technology*, 4 (1), 310-312.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicana. (2001). Distrito Federal: Secretaria de Salud Pública. pp. 25-29
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. (Fifth ed.). London, England: Chapman & Hall. pp. 4-11

- Hasegawa, M., & Marcano, D. (2002). *Fitoquímica orgánica* (Segunda ed.). Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. pp. 283-285
- Heredia, J., & al. (2004). *La Historia de la Medicina*. Cuenca: Facultad de Ciencias Médicas. pp. 8-9
- Hernández, F. (1942). *Historia de las Plantas de la Nueva España*. Distrito Federal: Imprenta Universitaria. pp. 35
- Kaufman, P. B., & al., e. (2000). *Natural Products from Plants*. Washington, D.C.: CRC Press. pp. 9-26
- Kuklinsky, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal*. Barcelona, España: Omega. pp. 7-10, 14-17, 20-23
- Linares, E., & al. (1995). *Plantas medicinales de México: usos y remedios tradicionales*. México: Centro de Tecnología Electrónica e Informática. pp. 155
- Lindberg, D. (2002). *Los inicios de la ciencia occidental*. Barcelona, España: Gráficas. pp. 54-59
- Lozoya, X. (1999). *La Herbolaria en México*. Distrito Federal.: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. pp. 12-13
- Miranda, M. (Abril de 1994). Aceites esenciales. *Curso-Taller "Utilización de productos Naturales en la Industria Farmacéutica"*. La Habana, Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos. pp.5, 10-11, 27
- Oxford-Complutense. (2003). *Diccionario de Química* (Tercera ed.). Madrid: Complutense S.A. pp. 66
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical Techniques*. New Delhi, India: New India. pp. 102
- Santillán, M., & al. (2008). Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79, 513- 524.

- Schultes, R., & Hofmann, A. (2000). *Plantas de los Dioses*. Distrito Federal: Fondo de Cultura Económica. pp. 82
- Skoog, D., & al. (2001). *Principios de análisis instrumental*.(Quinta ed.). Madrid: Mc GrawHill. pp. 122-126
- Stearn, W. T. (2006). *Latín botánico. Historia, gramática, sintaxis, terminología y vocabulario*. Barcelona, España: Omega. pp. 15-22
- Sumner, A. (2001). *The Natural history of Medicinal Plants*. Portland: Timber Press. pp. 235
- Thomson, W. A. (1980). *Guía práctica ilustrada del uso de plantas medicinales*. Barcelona: Blume. pp. 5
- Universidad Nacional Autónoma de México. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 13 de Septiembre de 2011, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Toronjil&id=743>  
3
- Vázquez, E. (15 de octubre de 2003). *Bioquímica y biología molecular en línea*. Recuperado el 2012 de septiembre de 13, de <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>
- Villar del Fresno, Á. M. (1999). *Farmacognosia General*. Madrid: Síntesis. pp. 87, 154
- Wolfender, L., & Hostettman, K. (1995). Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in the investigation of medicinal plants. *Phytochemistry of medicinal plants*, 13 (52), 189-215.
- World Health Organization. (1998). *Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials*. Geneva: WHO Library Cataloging. pp 14, 16, 35-36.
- Zoltán, P. (2007). La Diosa de Tepantitla en Teotihuacan: una nueva interpretación. (Escuela Nacional de Historia, Ed.) *Cuicuilco*, 14 (41), 245.

PARTE 10.

PROSPECTIVAS

## 10. PROSPECTIVAS

Para lograr un control de calidad adecuado y una estandarización de extractos vegetales se deben tener en cuenta los lineamientos de la OMS y de las farmacopeas en nuestro caso la FHEUM en las que describen una serie de requisitos a cumplir y que en la presente tesis por tiempo y falta de recursos no se pudieron lograr, por lo que se propone lo siguiente:

- Elaborar el estudio botánico a nivel microscópico de la planta para profundizar aún más en la identidad del material vegetal.
- Efectuar estudios de residuos tóxicos como metales pesados Hg, Cd, Pb, As, y la determinación de pesticidas.
- Cuantificar cenizas totales para conocer la cantidad de materia inorgánica en la planta.
- Desarrollar un método específico para cuantificar polifenoles.
- Desarrollar un método específico para cuantificar flavonoides utilizando un marcador biológicamente activo.
- Evaluar la calidad microbiológica de la materia prima.
- Cuantificar los componentes principales del aceite esencial.
- Realizar la caracterización de los extractos y del aceite esencial para obtener las huellas digitales del material vegetal.



PARTE 11.

ANEXOS

## 11. ANEXOS

## ANEXO I. Certificado de identidad



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
HERBARIO IZTACALA



FESI/IZTA/006/2012

LIZBETH RENDÓN ALONSO  
FES-CUAUTILÁN, UNAM  
PRESENTE.

Por medio de este conducto me permito entregarte la identificación taxonómica del material botánico de Respaldo del Proyecto de Tesis titulado: "Control de calidad de la planta medicinal *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling conocida popularmente como toronjil morado", realizado en el Laboratorio de de Productos Naturales de la sección de Tecnología Farmacéutica del departamento de Ingeniería y Tecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (Campo 1) y bajo la dirección de la Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez, así mismo, te informo que las plantas y las muestras de mercado han sido integradas en la **Colección Etnobotánica** del Herbario Iztacala con el siguiente número de registro:

**Nombre científico:** *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling  
**Familia:** Lamiaceae/Labiatae  
**Nombre común:** Torojil morado  
**No. De registro:** 2063 IZTA

Sin otro particular, te envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Los Reyes Iztacala, Méx., 6 de marzo de 2012

  
M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILAFRANCO  
RESPONSABLE DEL HERBARIO IZTA



Cop: Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez, Presente.

## ANEXO II. Glosario botánico

**Apical** (*del latín Apicalis*). La punta de un órgano.

**Ápice** (*del latín Apex*). Propio de la base o relativo a ella.

**Aréolas**. Las últimas venas configuran la venación menor, y al unirse entre sí determinan áreas de mesófilo que se llaman aréolas.

**Basal** (*del latín Basalis*). Propio de la base o relativo a ella (Facultad de Agronomía).

**Cartáceo, a** (*del latín Cartaceous*). De la consistencia del papel o del pergamino

**Coalescentes, fusionado, da** (*del latín Coalescens*). Que se juntan durante el crecimiento.

**Crenado, da.** (*del latín Crenatus*). Crena, muesca, diente redondeado del margen de una hoja.

**Cunonioide**. Que se parece a la figura cuneiforme, pero no a una verdadera.

**Dentado, da** (*del latín Dentatus*). Aquella cuyos bordes presentan dientes (que normalmente apuntan hacia afuera) puntiagudos y bordes cóncavos (o rectos).

**Foliar**. Relativo a la hoja.

**Entero, ra**. Se dice del borde íntegro, sin divisiones; limbo no lobado ni dividido.

**Glanduloso, sa** (*del latín Glandulosus*). Que posee glándulas.

**Lámina**. Porción más o menos aplanada de una hoja que se une al tallo directamente o por medio de un pecíolo.

**Lanceado o lanceolado, da** (*del latín Lanceolatus*). Angostamente elíptico, que se estrecha (por igual) hacia cada extremo (longitud:anchura = de 6:1 a 3:1).

**Liso, sa** (*del latín Laevis, glaber*). Desprovisto de asperezas (*laevis*) o de pelos (*glaver*), o de cualquier tipo de irregularidad.

**Marco**. Aquella planta medicinal que ha sido sometida a procesos de extracción y por lo tanto ya no se puede considerar materia prima como tal.

**Nervado, da** (*del latín Nervosus, nervatus*). Que tiene varios nervios o venas principales.

**Ovado, da** (*del latín Ovatus*): oblongo o elíptico, más ancho en extremo inferior de manera que se parece a la sección longitudinal del huevo (longitud:anchura = de 2:1 a 3:2, más ancho por debajo de la mitad de proporción).

**Pecíolo o peciolo** (*del latín petiolus*), forma diminutiva de *pespedis*, pie, tronco de una planta) es el rabillo que une a la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.

**Perenne**(del latín *perennis*). Se trata de un adjetivo que refiere a aquello incesante o continuo. Para la botánica, una planta perenne es la que vive más de dos años. El adjetivo se usa además para nombrar a la planta cuyo follaje se mantiene verde en todas las estaciones del año.

**Reticulado, da**(del latín *Reticulatus*). Con nervios o venas formando una red.

**Serrada, da** (del latín *Serratus*). Aquella cuyo borde tiene dientes agudos (más o menos) rectos que miran hacia el ápice, como las de la violeta.

**Venación o nervadura:** La disposición de las venas.

**Venoso, sa** (del latín *Venosus*). Cuando los nervios laterales se dividen en varias formas (Stearn, 2006).

**Venación acródroma:** dos o más venas primarias o venas secundarias fuertemente desarrolladas formando arcos no recurvos que convergen hacia el ápice.

**Venas primarias** son haces vasculares sencillos o varios haces asociados. Generalmente, las venas más gruesas son salientes o hundidas en el envés y prominentes en el haz.

**Venas secundarias** son aquellas parten de las venas primarias. El ángulo que determinan en su unión con ellas recibe el nombre de **ángulo de divergencia**. De las venas secundarias divergen las venas terciarias, y así sucesivamente.

---

### **ANEXO III. Preparación de muestra y reactivos para tamizaje fitoquímico e identificación de pigmentos**

#### **Reactivos para tamizaje fitoquímico:**

**Alcaloides.** Una porción del extracto concentrado, se disolvió con ácido clorhídrico 1%. Colocar unas gotas de ésta solución en 5 tubos de ensaye y se agregaron 2 gotas aproximadamente de los siguientes reactivos por separado en cada tubo:

- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de ácido silicotúngstico.
- Reactivo de Hager.

**Baljet.** A la fracción disuelta en 1 mL de etanol, se le añade una mezcla recién preparada de ácido pícrico al 1% en etanol y 1 mL de hidróxido de sodio al 10% en agua. Un color o precipitados de rojo a naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos.

**Börntrager.** Agitar la fracción disuelta en 1 mL de cloroformo con 1 mL de hidróxido de sodio al 5%. Si la fase alcalina se colorea de rojo-rosa esto indica la presencia de quinonas.

**Cloruro férrico.** Añadir 0.5 mL de cloruro férrico al 5% en solución salina a la fracción disuelta en 1 mL de etanol. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos. En el extracto acuoso se adiciona acetato de sodio previo al ensayo.

**Espuma.** A la fracción disuelta en 1 mL de etanol se le adicionar 10 mL de agua y se agitar la mezcla fuertemente durante 2 minutos. Si aparece una espuma jabonosa que se mantiene por más de 5 minutos esto indica la presencia de saponinas.

**Fehling.** Tratar con una mezcla recién preparada de 1 mL de la solución A del reactivo de Fehling y 1 mL de la solución B del reactivo de Fehling a una fracción del concentrado. Se calienta en baño de agua durante 15-30 minutos. La aparición de un color o precipitado rojo arroja la presencia de azúcares reductores.

**Lieberman- Burchard.** Una alícuota disolver en 1 mL de cloroformo añadir 1 mL de anhídrido acético y mezclar. Por la pared del tubo dejar caer 3 o 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Un color verde-verde oscuro indica la presencia de triterpenos y/o esteroides.

**Shinoda.** Se disuelve una fracción del extracto en 2 mL de etanol, se adiciona 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de magnesio metálico. Cuando la reacción termina, se colorea de amarillo, naranja, rojo o carmelita, el ensayo indica la presencia de flavonoides.

**Pruebas para identificación de pigmentos en flores:**

**Betacianinas y antocianinas HCl 2 N.** Calentar una porción del extracto con otra de HCl 2 N por 5 minutos a 100° C. La prueba es positiva para betacianinas si el color se desvanece. Se trata de antocianinas si el color es estable.

**Betacianinas y antocianinas NaOH.** Adicionar gota a gota NaOH a 1 mL del extracto. El ensayo es positivo para betacianinas si el color cambia a amarillo. Si, cambia el color del extracto a azul-verde y lentamente desaparece, entonces son antocianinas.

**Betacianinas y antocianinas por cromatografía con HCl al 1%.** Se efectúa una cromatografía en capa fina al extracto, utilizando como fase móvil una solución acuosa de HCl al 1%. El Rf debe ser alto para betacianinas y de bajo a intermedio para antocianinas.

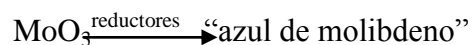
## ANEXO IV. Fundamento de la prueba Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu, ha estado utilizándose durante muchos años, como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. El reactivo de Folin-Ciocalteu, contiene ácido fosfomolibdico y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez, Mendoza, & Ortiz, 2008).

La oxidación de los fenoles, presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 760 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una curva de calibración generalmente de ácido gálico o ácido tánico.

Las estructuras son complicadas conteniendo átomos en entornos octaédricos y tetraédricos.

- La estructura de  $\text{MoO}_3$  está constituida por capas de  $\text{MoO}_6$ .
- La de  $\text{WO}_3$  es una red tridimensional de  $\text{WO}_6$  compartiendo vértices, tiene siete formas alotrópicas, con transiciones que ocurren a temperatura ambiente



Los “azules de molibdeno” son óxidos o hidróxidos con mezclas de valencia comprendidas entre  $\text{Mo}^{\text{VI}}\text{O}_3$  y  $\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_3$ .

**ANEXO V. Barrido, curva de calibración y cálculos para cuantificación de materia con capacidad reductora.**

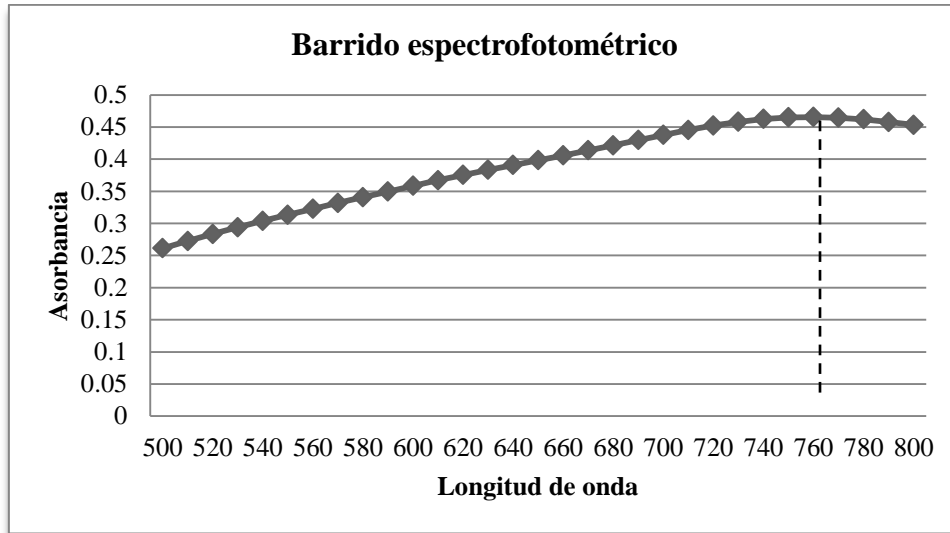


Figura 22. Gráfico barrido espectrofotométrico de “azul de molibdeno”

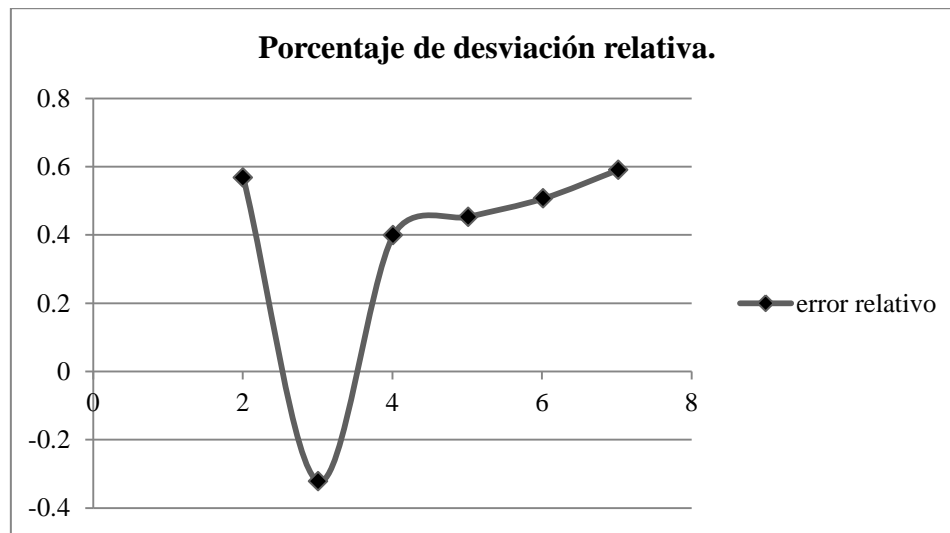


Figura 23. Gráfico del porcentaje de desviación relativa



Tabla 20. Parámetros estadísticos de la curva de calibración

		Parámetro			Valor			
		$r^2$			0.9997			
		M			0.0927			
		B			0.104			

Sistema	Concentración µg/mL (x)	Abs Experi- mental (y <sub>i</sub> )	(x- $\bar{x}$ )	(x- $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>	Abs Teórica ( $\hat{y}_i$ )	Abs/conc ( $\bar{x}_i$ )	(x <sub>i</sub> - $\bar{x}_i$ ) <sup>2</sup>	(y <sub>i</sub> - $\hat{y}_i$ ) <sup>2</sup>
1	2.0064	0.2943	-2.5080	6.2901	0.2885	0.1256	7.39x10 <sup>-6</sup>	3.36x10 <sup>-5</sup>
2	3.0096	0.3777	-1.5048	2.2644	0.3808	0.1255	7.22x10 <sup>-6</sup>	9.61x10 <sup>-6</sup>
3	4.0128	0.4772	-0.5016	0.2516	0.4732	0.1189	3.61x10 <sup>-7</sup>	1.60x10 <sup>-5</sup>
4	5.0160	0.5700	0.5016	0.2516	0.5655	0.1136	1.15x10 <sup>-6</sup>	2.03x10 <sup>-5</sup>
5	6.0192	0.6628	1.5048	2.2644	0.6578	0.1101	4.76x10 <sup>-6</sup>	2.50x10 <sup>-5</sup>
6	7.0224	0.7559	2.5080	6.2901	0.7501	0.1076	8.83x10 <sup>-6</sup>	3.36x10 <sup>-5</sup>
$\sum_i$	27.0864	---	0	17.6122	---	0.7013	2.97x10 <sup>-5</sup>	1.38x10 <sup>-4</sup>
Promedio	4.5144	---	0	---	---	0.1170	---	---

**CÁLCULOS:**

$$\text{Desviación estándar. } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x}_i)^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{2.97 \times 10^{-5}}{6-1}} = 2.4372 \times 10^{-3}$$

$$\text{Coeficiente de variación. } CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100 = \frac{2.44 \times 10^{-3}}{0.1170} * 100 = 2.0834$$

**Límite de detección.**

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{1.38 \times 10^{-4}}{6-2}} = 5.8736 \times 10^{-3}$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{(x-\bar{x})^2}} = \frac{5.87 \times 10^{-3}}{\sqrt{17.6122}} = 1.3987 \times 10^{-3}$$

$$LOD = Y_b + 3 S_b$$

$$LOD = 0.104 + 3(1.3987 \times 10^{-3}) = 0.1081$$

$$LOD = mx + b;$$

**Para calcular el límite de detección:**

$$\text{Despejando X: } (LOD-b)/m = x$$

$$X = (0.1081 - 0.104) / 0.0927 = 0.0442 \text{ µg/mL}$$

## ANEXO VI. Estandarización de la preparación del extracto crudo para la cuantificación de materia con capacidad reductora

1. Determinación del tiempo de extracción. Se planteó una extracción discontinua mediante agitación a temperatura ambiente con 50 mL de la mezcla etanol-agua 1:1 durante 1 hora, al término de este tiempo efectuó un lavado al marco con la misma mezcla, y a este lavado se le realizó la prueba para revelar la presencia de compuestos fenólicos ( $\text{FeCl}_3$ ) y se le hizo reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, las cuales arrojaron resultados negativos.
2. Como se muestra en la Tabla 21, para descartar la interferencia en la absorbancia del sistema de la muestra problema que pudiera ser causada debido a la presencia de algunos pigmentos de la droga, se compararon dos muestras: a 5 mL del extracto número 1 se trataron lavándolos con 5 mL de éter de petróleo en un embudo de separación las veces necesarias hasta obtener una fase éterea incolora; y al extracto número 2 no se le realizó tratamiento alguno anterior a la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

**Tabla 21. Comparación de las absorbancias entre los dos extractos crudos**

Peso en gramos de la muestra húmeda	Absorbancias del extracto crudo sin tratamiento <sup>a</sup>	Absorbancias promedio	Absorbancias del extracto crudo con tratamiento (fase acuosa) <sup>b</sup>	Absorbancias promedio
1.0345	0.2222	0.2243	0.2181	0.2179
	0.2245		0.2151	
	0.2263		0.2207	
1.0077	0.2237	0.2259	0.2338	0.2307
	0.2234		0.2278	
	0.2278		0.2301	
1.0191	0.2243	0.2218	0.2220	0.2247
	0.2215		0.2289	
	0.2197		0.2233	

<sup>a,b</sup>Estas son las únicas pruebas preliminares que se efectuaron utilizando el reactivo de Folin-Denis preparado en el laboratorio L-324 y se trabajó con una muestra problema más diluida, posteriormente se observó mucha inestabilidad en la reducción del molibdeno.

Por cuestiones de estabilidad se decidió trabajar con el reactivo comercial Folin-Ciocalteu, haciendo las lecturas en el espectrofotómetro DU 800®.

3. Fijando un **rango** de error para el peso de la muestra de  $\pm 0.1$  g, se efectuó el mismo método centrifugando a 4500 rpm/15 minutos con 0.9, 1.0 y 1.1 g de toronjil morado en sistemas de pH=9 y a 760 nm. Obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 22. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora de tres pesos diferentes de muestra**

Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>a</sup> )	Absorbancia de la muestra	Porcentaje de materia con capacidad reductora por cada 0.9 g	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
0.8472	0.4932	0.2475	0.2442
	0.4817	0.2402	
	0.4893	0.2449	
0.8467	0.4858	0.2429	0.2400
	0.4757	0.2364	
	0.4824	0.2407	
0.8477	0.4882	0.2441	0.2412
	0.4729	0.2344	
	0.4898	0.2452	
Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>b</sup> )	Absorbancia de la muestra	Porcentaje de materia con capacidad reductora por cada 1.0 g	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
0.9436	0.5226	0.2389	0.2386
	0.5202	0.2376	
	0.5232	0.2393	
0.9404	0.5281	0.2388	0.2389
	0.5254	0.2387	
	0.5269	0.2394	
0.9469	0.5281	0.2413	0.2407
	0.5254	0.2398	
	0.5269	0.2406	
	0.5920	0.2535	
	0.5894	0.2521	

*Continuación de la Tabla 22. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora de tres pesos diferentes de muestra*

Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>c</sup> )	Absorbancia de la muestra	Porcentaje de materia con capacidad reductora por cada 1.1 g	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
1.0366	0.5268	0.2197	0.2359
	0.5765	0.2456	
	0.5702	0.2423	
1.0373	0.5830	0.2489	0.2507
	0.5920	0.2536	
	0.5834	0.2492	
1.0394	0.5988	0.2570	0.2542
	0.5920	0.2535	
	0.5894	0.2521	

<sup>a,b,c</sup> Valores calculados a partir del peso conocido de la planta menos el 5.9942 % de agua y materia volátil.

5. Estableciendo el tiempo óptimo de centrifugación, se efectuó el mismo método con muestras de 1 g de materia prima, a 4500 rpm durante 10, 15 y 20 minutos bajo condiciones de reacción idénticas. Obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 23. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora centrifugando a tres tiempos distintos**

Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>a</sup> )	Absorbancia de la muestra a 4500 rpm/10'	Porcentaje de materia con capacidad reductora	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
0.9436	0.5124	0.2332	0.2326
	0.5098	0.2317	
	0.5117	0.2328	
0.9477	0.5274	0.2407	0.2376
	0.5167	0.2346	
	0.5218	0.2375	
0.9405	0.5196	0.2380	0.2345
	0.5067	0.2307	
	0.5135	0.2347	

*Continuación de la tabla 23. Comparación del porcentaje de materia con capacidad reductora centrifugando a tres distintos tiempos*

Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>b</sup> )	Absorbancia de la muestra a 4500 rpm/15'	Porcentaje de materia con capacidad reductora	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
0.9436	0.5226	0.2389	0.2386
	0.5202	0.2376	
	0.5232	0.2393	
0.9404	0.5281	0.2388	0.2389
	0.5254	0.2387	
	0.5269	0.2394	
0.9469	0.5281	0.2413	0.2406
	0.5254	0.2398	
	0.5269	0.2406	
Peso en gramos de la muestra (planta seca <sup>c</sup> )	Absorbancia de la muestra a 4500 rpm/20'	Porcentaje de materia con capacidad reductora	Porcentaje promedio de materia con capacidad reductora
0.9426	0.5375	0.2478	0.2472
	0.5387	0.2483	
	0.5336	0.2455	
0.9432	0.5258	0.2409	0.2313
	0.5282	0.2423	
	0.5257	0.2408	
0.9414	0.5308	0.2442	0.2406
	0.5219	0.2392	
	0.5205	0.2383	

<sup>a,b,c</sup> Valores calculados a partir del peso conocido de la planta menos el 5.9942 % de agua y materia volátil.