



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Análisis de los principales compuestos antioxidantes en el extracto etanólico de Damiana (*Turnera diffusa*) por Electroforesis Capilar y su actividad antifúngica sobre el microorganismo fitopatógeno de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su aplicación en productos comerciales**

**T E S I S**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**DULCE CAROLINA MARCOS SEGOVIANO**

**ASESOR: DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE.

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

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

Análisis de los principales compuestos antioxidantes en el extracto etanólico de Damiana (*Turnera diffusa*) por Electroforesis Capilar y su actividad antifúngica sobre el microorganismo fitopatógeno de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su aplicación en productos herbolarios comerciales.

Que presenta la pasante: Dulce Carolina Marcos Segoviano

Con número de cuenta: 304346460 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Mayo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Elia Granados Enriquez	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Brigida del Carmen Camacho Enriquez	
2do. SUPLENTE	Dr. Julio César Botello Pozos	

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

BHM/mngm\*

# Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la FES-C1 por ser parte de esta gran familia, por permitirme ser de una generación de triunfadores "Q.F.B. 34" , por darme las herramientas necesarias para ser una gran profesional productiva y por llevar en mi corazón "por mi raza hablara mi espíritu" -orgullosamente UNAM-.

Al comité de aprobación

Q.F.B. Brigida del Carmen Camacho Enríquez

Q.F.B. Elia Granados Enríquez

Q.F.B. Martha Patricia Zuñiga Cruz

Dr. Julio César Botello Pozos

Por la confianza brindada en mí y en su dedicación de la revisión del presente trabajo y por todas sus aportaciones para que este trabajo realce, les agradezco mucho.

## *Al proyecto*

*Al financiamiento del proyecto PAPIIT:  
"Desarrollo de envases activos para la  
conservación de productos frescos y  
mínimamente procesados" (IT201513), de  
la Dirección General de Asuntos del  
Personal Académico, UNAM.*

## *Dedicarotorías*

### *A mis Padres*

#### *Gracias Dios:*

*“Por permitirme vivir la alegría de terminar con esta faceta de mi vida, dándome la fortaleza basada en el desvelo, sudor y cansancio de mi Padre Guillermo, y el temperamento infundido por el sacrificio de mi Madre ROSA, porque en sus rodillas esta mi triunfo y en su presencia mi recompensa. No tengo como agradecerle, ni como pagarte por prestarme a dos ángeles que me guían, pero te prometo amarlos aún más allá de mi existencia pasajera, porque sin ellos no seré y sin ellos no sería.”*

#### *A mis hermanos:*

*A Tony, Many y Lulis porque siempre he contado con ellos para todo, gracias a la confianza que siempre nos hemos tenido, gracias por aguantar a su hermana, saben que siempre estaré ahí incondicionalmente para ustedes los quiero mucho HERMANOS.*

*Y obvio a Kamy, Peque, Mirrus 😊*

#### *A mi compañero de vida:*

*Luis Enrique Robles Toral por tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor, gracias por estar siempre a mi lado por ser la persona con la que quiero compartir mis éxitos y sueños de mi vida ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí, gracias*

#### *A mis amigos de Universidad:*

*Por ser parte de esta faceta importante de Universidad, Rodolfo, Tony, Aurelio, Violeta, Nery, Eli, Toel, Chava y a todos los demás BUGAS por compartir grandes risas en este ciclo y por todos los recuerdos de grandes anécdotas que contar y por siempre apoyarnos, los quiero mucho.*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	10
CAPÍTULO 1 .....	13
INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 <i>Damiana de Baja California</i> .....	14
1.1.1. Taxonomía.....	14
1.1.2. Sinonimia popular .....	15
1.1.3. Distribución Geográfica .....	15
1.1.4. Recolecta.....	15
1.1.5. Usos tradicionales .....	17
1.1.6. Usos comercializados .....	17
1.1.7. Composición de Damiana de Baja California ( <i>Turnera diffusa</i> ) .....	17
1.1.8. Interacciones farmacológicas .....	18
1.1.9. Farmacología .....	18
1.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	18
1.2.1. Taxonomía.....	19
1.3. <i>Generalidades de los Polifenoles</i> .....	19
1.3.1. Clasificación de polifenoles .....	20
1.3.2. Extracción de Polifenoles .....	21
CAPÍTULO 2 .....	24
OBJETIVOS.....	24
2.1. <i>Objetivo General</i> .....	25
2.1.1. Objetivos Particulares .....	25
CAPÍTULO 3 .....	27
FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....	27
3.1 <i>Antioxidantes</i> .....	28
3.1.1. Estrés oxidativo. ....	28
3.1.2. Radicales libres. ....	29
3.1.3 Fenoles Totales por Folin Ciocalteu.....	29
3.2 <i>Electroforesis Capilar</i> .....	30
3.2.1. Definición y principios de la técnica .....	31
3.2.2. Separación Electroforética .....	32
3.2.3. Flujo electroosmótico (FEO) .....	35
3.2.4. Instrumentación .....	36
3.2.5. Capilares .....	37
3.2.6. Sistema de detección .....	38
CAPÍTULO 4 .....	40
METODOLOGÍA .....	40
4.1 <i>Materias primas</i> .....	41
4.1.1. Colecta de la Materia Prima .....	41
4.1.2. Registro e identificación de la planta utilizada .....	41
4.1.3. Parte utilizada de la planta .....	41

4.2. Obtención del extracto etanólico: .....	42
4.2.1. Procedimiento para la Extracción de los compuestos fenólicos de Damiana de Baja California .....	42
4.2.2. Procedimiento de Manejo de muestra en los productos comerciales. ....	42
4.2.3. Conservación del extracto etanólico: .....	42
4.3. Equipos utilizados.....	43
4.4. Estándares primarios .....	43
4.4.1. Preparación de soluciones: .....	44
4.5. Pruebas in vitro .....	44
4.5.1. Medición de Fenoles Totales .....	44
4.5.2. Envenenamiento del PDA.....	44
4.5.3. Inoculación al medio envenenado.....	45
4.9. Metodología de Electroforesis Capilar (CE).....	45
4.9.1. Pre-acondicionamiento de lavado de capilar al inicio del día .....	45
4.9.2. Condiciones de separación y detección .....	46
4.9.3. Análisis Estadístico .....	46
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>48</b>
<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
5.1. Resultados de fenoles totales.....	49
5.1.1. Análisis de fenoles totales. ....	49
5.2. Resultados de pruebas in-vitro.....	51
5.2.1. Envenenamiento del medio (PDA) con extracto etanólico de damiana de Baja California .....	51
5.3. Optimización del pre-tratamiento para la extracción de los compuestos fenólicos en Damiana de Baja California.....	53
5.3.1. Estudio de la proporción óptima de etanol: agua para la extracción .....	54
5.3.2. Estudio para la selección del método óptimo de extracción.....	55
5.3.3. Condiciones finales para la obtención del perfil de polifenoles (huella digital)de <i>Turnera diffusa</i> .....	56
5.3.4. Identificación de polifenoles por CE .....	58
5.4. Selección de estándar interno para el perfil de Damiana de Baja California .....	57
5.5. Estudio estadístico y Pre-validación .....	58
5.5.1. Especificidad del método .....	58
5.5.2. Precisión del sistema en tiempos y áreas.....	60
5.5.3. Linealidad del Sistema e Intervalo.....	60
5.5.4. Cuantificación de los compuestos identificados en el material vegetal .....	65
5.6. Aplicación del método analítico de Electroforesis Capilar (CE) en productos Comerciales Herbolarios.....	67
5.6.1. Análisis físico de Productos Comerciales de Damiana .....	67
5.6.2. Cuantificación y resultado de Calidad de Muestras Comerciales De Damiana de Baja California.....	69
5.6.3. Clasificación de los productos herbolarios usando el Análisis de Conglomerados (Clusters) .....	72
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>77</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
6.1. Conclusiones .....	78
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFÍAS</b> .....	<b>80</b>
7.1. Bibliografías .....	81

CAPÍTULO 8 .....	86
ANEXOS .....	86
8.1. Anexo A .....	87
8.1.1. Índice de tablas .....	87
8.1.2. Índice de figuras .....	89
8.1.3. Índice de gráficos .....	91
8.1.4. Índice de ecuaciones .....	91
8.2. Anexo B.....	92
8.2.1 Hojas de registro del espécimen Damiana (Turnera diffusa) .....	92
8.3. Anexo C.....	94
8.3.1 Metodología de soluciones.....	94
8.4. Anexo D .....	96
8.4.1. Identificaciones de compuestos de Damiana (Turnera diffusa) por fortificación de estándar.....	97
8.4.2. Precisión de Sistema.....	101
8.4.3. Curvas de Calibración de los compuestos identificados .....	104



# Abreviaturas

μ	Movilidad electroforética
μm	micrómetros
AIS	Área de Estándar Interno
AS	Área de estándar
cm	centímetros
EC	Electroforesis Capilar
EROS	Especies reactivas de oxígeno
CZE	Electroforesis Capilar de Zona
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
% DER	Porcentaje de Desviación Estándar Relativa
DZP	Diagrama de Zona de Predominio
E	Campo Eléctrico
FEO	Flujo electroosmótico
g	gramo
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
SI	Estándar Interno
ISO	Organización Internacional de Estandarización
kV	kilovolts
M	Molar
m.o.	microorganismo
mg	miligramo
min	minuto(s)

mM	milimolar
nm	nanómetros
PDA	Agar Papa Dextrosa
PE	Polifenoles Extraíbles
pH	inverso del logaritmo de la actividad de los iones hidronio $[H_3O]^+$
pp	precipitado
ppm	Partes por millón
S	Desviación Estándar
s	Segundos
UV-Vis	Ultravioleta- Visible
V	Velocidad del ión

# Resumen

# Resumen

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica, antibacterial, etc. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: los flavonoides, los fenoles, glucósidos de fenoles, saponinas, etc. (Salazar, 2008).

La investigación realizada en esta tesis se basa en el estudio de muestras vegetales de la planta Damiana de Baja California Sur. Sus propiedades afrodisiacas la han convertido en una planta de gran interés para la población y la han hecho ser un arbusto muy famoso en la herbolaria mexicana, ya que los productos comercializados y la planta seca son muy importantes como remedio natural en nuestro país. Sus usos principales son para la impotencia sexual, cólicos, infertilidad, entre otras, comercializándose en cápsulas, bolsitas para infusión y como material vegetal como tal (Alcaraz-Melendez, 2004). En los últimos años se han publicado grandes innovaciones sobre la Damiana de Baja California Sur (*Turnera diffusa*), actuando como un agente antioxidante-antibacterial con grandes usos potenciales.

Durante el inicio de investigación de tesis, se muestran 2 apartados el cual consta del estudio de pruebas biológicas y el estudio del análisis químico; el primer apartado demuestra el poder antioxidante de ésta planta, con resultados de pruebas *in-vitro* hechas por envenenamiento con extracto contra (*Colletotrichum gloeosporioides*), manifestando así, que la variedad Damiana de Baja California presenta moléculas biológicamente activas. Estos resultados positivos nos confirmaron la importancia de iniciar una investigación sobre los componentes presentes en la planta que le dan las propiedades antioxidantes.

El segundo apartado habla sobre el análisis químico implementando la técnica de Electroforesis Capilar (EC), donde se estudió lo siguiente:

- Estudio de la composición del diluyente
- Estudio de la extracción óptima de los polifenoles
- Identificación de los compuestos bioactivos
- Cuantificación de los compuestos identificados
- Pre-validación del método analítico
- Aplicación del método analítico en remedios herbolarios
- Análisis estadístico para la comparación de la calidad de los remedios herbolarios

Se llevó a cabo la cuantificación de los polifenoles encontrados en las muestras, por la interpolación de sus áreas en las curvas de calibración obtenidas. La metodología desarrollada fue aplicada al análisis de diversos productos herbolarios comerciales, pudiéndose constatar su autenticidad utilizando el perfil electroforético de los picos típicos obtenidos para Damiana de Baja California por EC.

México el consumo de remedios herbolarios por la población se da de la siguiente forma: el 74.19 % de los usuarios que consumen remedios herbolarios utilizan hierbas medicinales diversas, preparadas en forma de té o infusión para su consumo. De estos usuarios el 35.04 % recomiendan principalmente el té; el 17.74 % recomiendan licuados o jugos a base de frutas o verduras, y el 8.06 % restante recomienda remedios caseros y/o terapias alternativas diversas. Los remedios herbolarios son consumidos solamente una vez por el 37.90 % de la población en estudio, el 31.45 % los consumen hasta que se les quitan los síntomas del padecimiento y el 32.24 % lo consume de formas diversas. (OMS, 2003)

La situación actual, es que en México la venta de remedios herbales se realiza libremente, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de análisis que asegure la autenticidad de la planta y que ésta no sea adulterada con producto de una variedad más barata (como son las Damianas de San Luis Potosí y Guerrero).

El método desarrollado por Electroforesis Capilar para Damiana de Baja California es rápido, barato, con un mínimo gasto en disolventes, aditivos, de ahí los casi nulos daños al ambiente en comparación con otras técnicas analíticas donde se tienen que procesar una gran cantidad de residuos tóxicos, por lo que esta técnica brinda una excelente opción para el control de calidad de remedios herbolarios como Damiana (*Turnera Diffusa*) además de dar pie a la estandarización que además de reportar el tipo y contenido de cada polifenol presente, le dé seguridad al consumidor sobre su autenticidad.

Asegurar también la eficacia de dicho remedio herbolario con su monitoreo de control de calidad para que el consumidor no obtenga –gato por liebre- y obtenga los efectos deseados.

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## 1.1 Damiana de Baja California

Uno de los arbustos más abundantes del semidesierto mexicano es la planta conocida comúnmente como Damiana, cuyo nombre científico es *Turnera diffusa*, y el uso tradicional se describe como “Afrodisíaca”. El género *Turnera* está compuesto por más de 10 especies.

Es una planta con hojas y ramas cuyos extremos son velludos y blancos. Además, pueden verse flores amarillentas que surgen individualmente de las hojas, y cápsulas aovadas que contienen las semillas, su olor es característico y aromático, y su sabor aromático, amargo y balsámico (Salazar, 2008).

Referencias recientes han demostrado la actividad antioxidante de Damiana sobre células cancerígenas gracias a su gran contenido de antioxidantes y que en mayoría estos metabolitos secundarios son compuestos fenólicos, el extracto de Damiana de Baja California ha tenido resultados significativos en la inhibición bacteriana y cancerígena.

La investigación tiene como objetivo demostrar que dicho extracto de Damiana puede actuar como antifúngico sobre un microorganismo fitopatógeno (*Colletotrichum gloeosporioides*) y así contribuir con el *Desarrollo de envases activos para la conservación de frutos frescos y mínimamente procesados*, además de obtener los perfiles específicos para *Turnera diffusa* que permitan su identificación y cuantificación de los principales componentes fenólicos que actúan como antioxidantes en el material vegetal y le dan su poder antifúngico.

### 1.1.1. Taxonomía

Tabla 1. Taxonomía

Reino	<i>Plantea</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Malpighiale</i>
Familia	<i>Turneráceas</i>
Género	<i>Turnera</i>
Especie	<i>T. diffusa</i>

Fuente: (Villasana, 2013)

### **1.1.2. Sinonimia popular**

La Damiana es bien conocida también como, Damiana amarilla, damiana americana, damiana de California, garañona, hierba de la mora, hierba de la pastora, hierba del venado, itamo real, jícamo real, mezquitillo, oreja de venado, paraleña, pastorcita, San Nicolás. (UNAM, 2015)

### **1.1.3. Distribución Geográfica**

Chihuahua, Querétaro, Guerrero, Oaxaca, Baja California Sur, San Luis Potosí, Coahuila, Sinaloa, Nayarit, Zacatecas, Tamaulipas, y Puebla. Se desarrolla en zonas semiáridas y arenosas o rocosas. Pero principalmente la de más comercialización y con más propiedades de efecto afrodisíaco es la Damiana de Baja California Sur. (UNAM, 2015)

En Baja California Sur se encuentran los principales productores de Damiana, específicamente de la región denominada de Los Cabos, ubicada en el sur de la península. La importancia económica a nivel industrial se debe a que se utiliza como bebida de infusión, como saborizante de diferentes tipos de licores y para la elaboración de productos herbolarios medicinales (Alcaraz, 1999). Ver Figura No.1.

La Damiana es una de las pocas plantas que se distingue por portar en su nombre latín o científico su uso tradicional; *Turnera diffusa aphrodisiaca*.

### **1.1.4. Recolecta**

La planta se recolecta del medio silvestre en varias regiones de México para su venta tanto nacional como de exportación. La Damiana más nombrada y apreciada es la de California, sin embargo la calidad de la planta depende mucho de la estación en que se colecta. Por ejemplo, la calidad de la Damiana de San Luis, la de Nuevo León o la de Tamaulipas es excelente cuando se recolecta después de las lluvias de verano y su precio normalmente es más bajo que el de la de California (Meléndez, 2006).



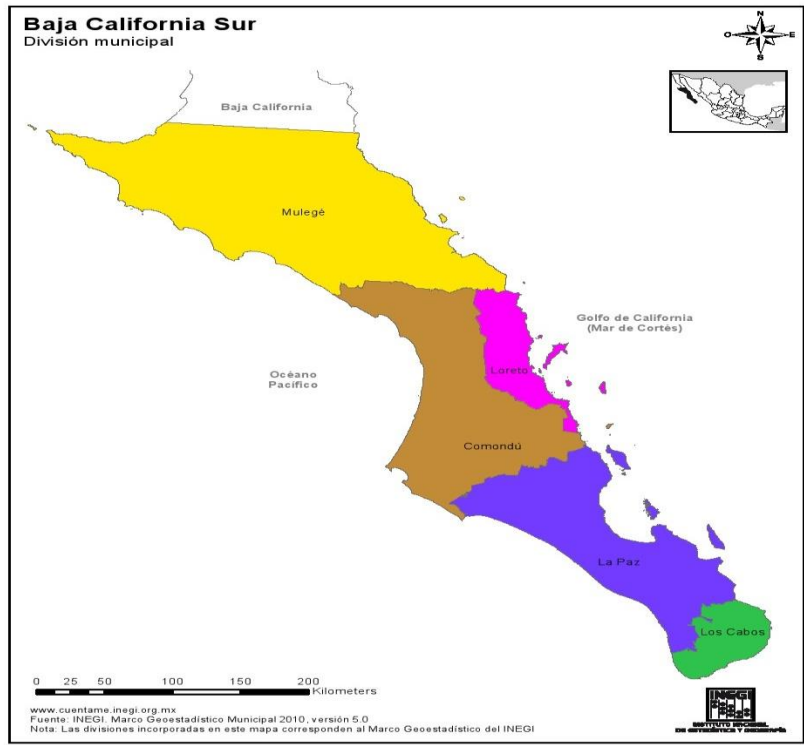


Figura 1. Ubicación geográfica de la Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*).  
Fuente: (INEGI, 2014)



Figura 2. Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*)  
Fuente: (Villasana, 2013)

### **1.1.5. Usos tradicionales**

Son frecuentes los usos que se hacen de la Damiana para atender variados problemas de tipo ginecológico y sexual, tales como la debilidad e impotencia sexual, en dolores de postparto en la espermatorreya, para promover la fertilidad, también para fortificar el útero y en caso de orquitis (inflamación de los testículos); así como afrodisíaca y conceptiva (Zhao, 2007).

Sin embargo, es la tos el padecimiento en el que más se emplea, bebiendo el vino vegetal; o el té de las ramas con hojas el cual se ingiere caliente varias veces al día (Baja California Sur).

Otros usos medicinales que se le confieren son contra el dolor de estómago, para el catarro y el pulmón contaminado por tabaquismo, en la debilidad muscular y general. También se aprovecha en picadura de escorpión, reumas, diabetes, inflamación de la vejiga; así como para estimular el apetito y reforzar la sangre.

Estimulante, antidepresivo, digestivo, contra los dolores de cabeza, controla la enuresis, estimula el movimiento de los intestinos, tónico yang, antiséptico urinario, bueno para el sistema hormonal masculino, para tratar la orchitis (inflamación del testículo) y la eyaculación prematura, contra la nefritis (inflamación del riñón), contra la infertilidad, levanta el espíritu, renueva la energía del riñón, inflamación de la próstata, menopausia.

### **1.1.6. Usos comercializados**

La Damiana ha sido utilizada como un tónico medicinal desde tiempos remotos, ya que en la antigua civilización Maya la recomendaban para la debilidad y por sus efectos afrodisiacos. Su reputación como afrodisíaca ha recorrido todo el mundo y sigue siendo hoy en día uno de los afrodisiacos herbales más famosos.

### **1.1.7. Composición de Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*)**

Composición química: Las hojas contienen entre un 0.5 a 1% de aceite esencial, un glicósido nombrado gonzalitosina, arbutina, taninos y damianina (principio amargo), cineol, flavonas, albuminoides,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -pineno, arbutina, ácido ascórbico,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -sitosterol, clorofila, cromo, magnesio, manganeso, niacina, potasio, resina, riboflavina, selenio, sílice, tiamina, tymol (Piacente, Camargo, & Zampelli, 2002).

La presencia del  $\beta$ -sitosterol pudiera explicar la acción estimulante en los órganos sexuales, las hojas contienen un aceite esencial, resina, taninos y un principio amargo.

### **1.1.8. Interacciones farmacológicas**

Debido a su posible efecto hipoglucémico no se recomienda su uso en pacientes insulino dependientes sin una vigilancia médica. El consumo de la Damiana puede interferir con la absorción del hierro (Sandoval, 1982).

### **1.1.9. Farmacología**

El extracto etanólico obtenido de las ramas de esta planta sólo presentó actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y recientemente los hallazgos indican su poder antioxidante contra algunos otros microorganismos (Henrique, 2009), (Avelino, 2011).

## **1.2. *Colletotrichum gloeosporioides***

El agente causal de antracnosis *Colletotrichum* sp ha tomado gran importancia en cultivos a nivel mundial, intentándose desarrollar sistemas que modelen los procesos de infección y mecanismos de resistencia bioquímica para tener mayor conocimiento que sustente el manejo del patógeno (Oliveira, 2014).

El *Colletotrichum gloeosporioides*, dicho hongo es el agente causal de una diversidad de daños y síntomas en diferentes frutales trópicas y subtropicales en México, y afecta diferentes órganos vegetales de la planta, así como en distintas etapas fenológicas del cultivo. En aguacate ocasiona pérdidas del 4-7% de postcosecha; en cítricos reduce el rendimiento hasta el 49% y en mango, las pérdidas fluctúan de 15-50% (Pérez, 2003).

La sintomatología se presenta en las hojas o tallos, las lesiones crecen en forma irregular y se unen entre sí ocasionando necrosis total de la hoja, Ver Figura No. 3. En cuanto a las condiciones predisponentes, tenemos que la enfermedad es favorecida durante los periodos de inviernos por lluvias intensas y fuertes con alta humedad relativa, ocasionando en muy poco tiempo brotes epidémicos severos que comprometen a casi toda la planta en desarrollo. La severidad de la antracnosis ha llevado a los productores a

realizar aplicaciones exageradas de fungicidas causando contaminación ambiental un aumento en los costos de producción y en algunos casos el abandono total del cultivo ante el fracaso de esta práctica (Alonso, 2001).



Figura 3. Frutos con antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)

Fuente: (Allende, 2015)

### 1.2.1. Taxonomía

Tabla 2. Taxonomía de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi,
Phylum	Ascomycota
Clase	Ascomycetes
Subclase	Sordariomycetidae
Familia	Glomerellaceae

Fuente: (Hernández C. , 2015)

## 1.3. Generalidades de los Polifenoles

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, si no monofenoles (Woljgast, 2000).

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas (Mattarei, 2008).

Los polifenoles son sustancias que se producen en diversas partes de las plantas, como son: corteza, frutos, hojas, raíces y semillas; a pesar de tener un origen común, la especificidad de las plantas le da a los polifenoles diferencias en color, calidad y concentración (Raj, 2001).

Los fenoles son sintetizados por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (p. ej. los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Carril, 2009).

Los polifenoles están presentes en las plantas como una mezcla y no como componentes aislados, un hecho que con frecuencia es ignorado en la realización de estudios experimentales. Varios miles de estos fitoquímicos ya han sido identificados. Los compuestos fenólicos pueden clasificarse de diversas formas, por ejemplo, respecto a su unidad base o a la naturaleza de los grupos funcionales ligados a esta unidad base. La más utilizada es la clasificación que los divide en ácidos fenólicos, flavonoides y los menos abundantes, estilbenos y lignanos, aunque existen muchos más tipos de estructuras (Raj, R., Chaluvadi, & Krishina, 2001).

### **1.3.1. Clasificación de polifenoles**

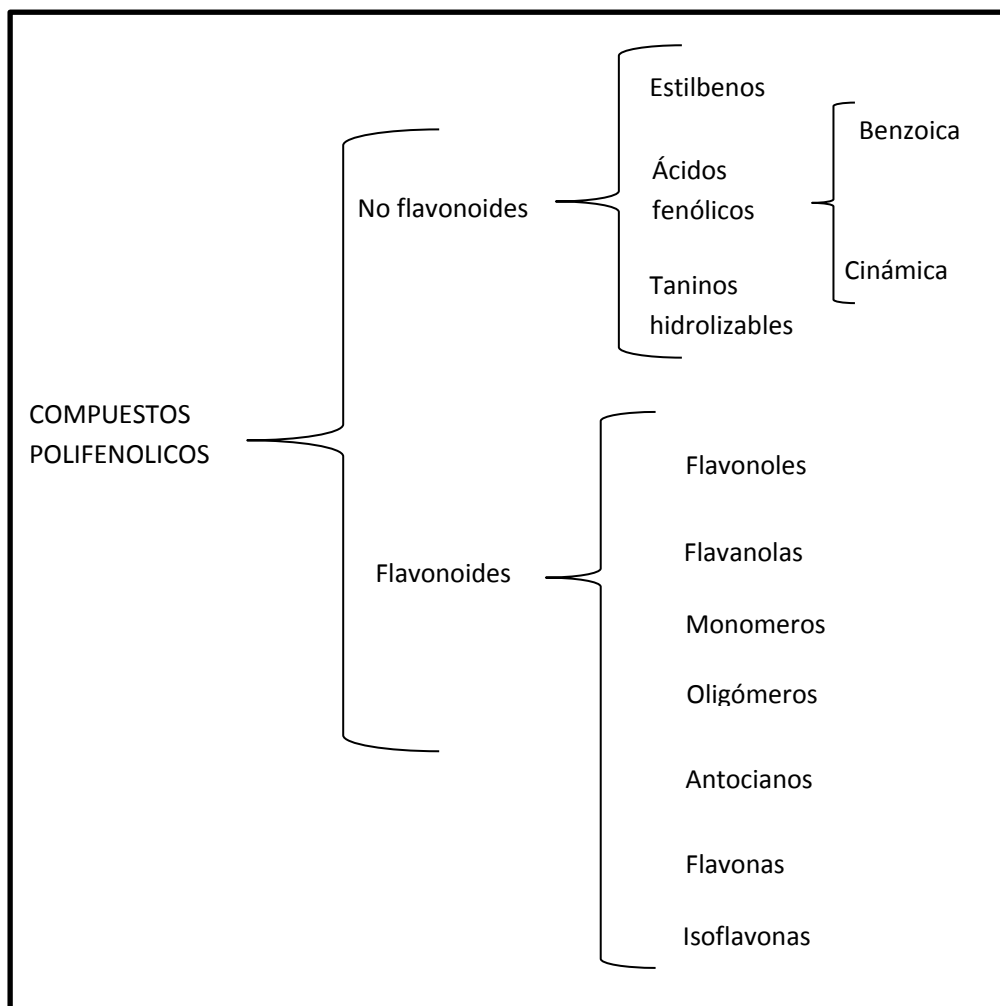
Entre los compuestos fenólicos existentes en los alimentos, se pueden distinguir dos grandes familias (no flavonoides y flavonoides), constituidas cada una de ellas por diferentes subfamilias de compuestos, como se detalla en la Figura 4.

Desde un punto de vista estructural, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en fenoles simples y polifenoles. Estos últimos se caracterizan por tener uno o más de un grupo fenol, y se dividen a su vez en xantonas, estilbenos, antraquinonas, lignanos (y polímeros de estos) y los más abundantes, los flavonoides (Riviére, 2009).

### 1.3.2. Extracción de Polifenoles

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-alcohólicos orgánicos (ver Tabla 3). La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia (Ju & Howard, 2003 a), (Khanna, Viswanathan, Krishnan, & Sanwal, 1980). A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en nuestros análisis (grasa, carbohidratos, clorofilas) normalmente mediante extracción en fase sólida (Handique & Baruah, 2002).

Figura 4. Clasificación de Polifenoles.



Fuente: (Hu, 2010)

En general, cualquier proceso está basado en una primera extracción con agua o disolventes orgánicos polares o la mezcla entre ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, dimetilformamida, acetato de etilo, n-Hexano, isooctano, éter de petróleo, éter dietílico) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (Ignat, Volf, & Popa, 2011).

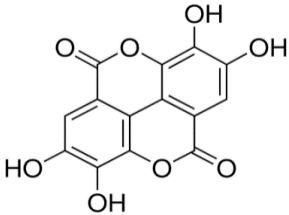
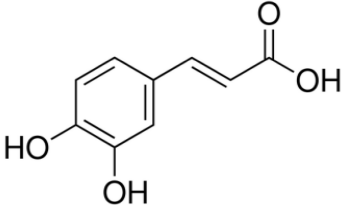
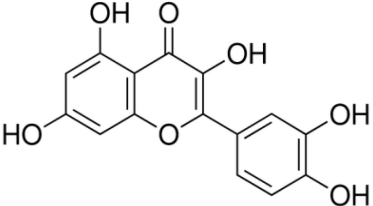
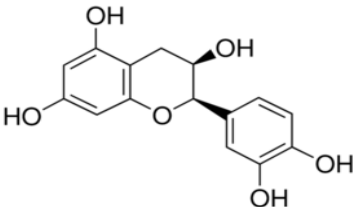
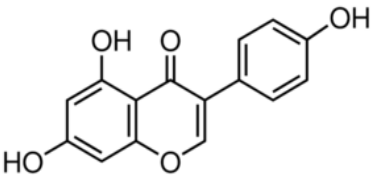
Además de los disolventes, también el tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto a 24 horas. Teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones, que se minimizan añadiendo agentes reductores (Bennett, 2004).

Las condiciones de extracción y la selección de los disolventes dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos que queramos extraer. Así otra referencia (Cacace, 2002) nos indica que la extracción en dos pasos secuenciales con acetona al 70% era suficiente para la extracción de taninos. Deshpande publicó que el tiempo óptimo de extracción de polifenoles es de 50-60 minutos, mientras que otros autores utilizaron la mezcla de metanol/acetona/agua a temperatura ambiente para la extracción de compuestos polifenólicos libres y esterificados (Deshpande, 1985). También es habitual encontrar en bibliografía la utilización de disolventes acidificados (metanol/HCl) para una mayor extracción y estabilidad de compuestos como las antocianidinas y para la extracción de flavonoides de material vegetal con metanol acuoso al 62.5% acidificado con HCl (1:4) para hidrolizar los enlaces éster de glicósidos de flavonoides (Antolovich, 2000).

Otros autores proponen el uso de agua/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para la extracción de antocianinas. La aplicación de altas temperaturas con disolventes acidificados también puede ser efectiva para la extracción de este tipo de polifenoles. Algunas proantocianidinas de bajo peso molecular son extraídas con disolventes acuosos orgánicos acidificados. Como ejemplos encontramos el uso de diferentes mezclas acetona/agua (70:30; 60:40) o metanol al 1% HCl (Naczka, 1992). Para la extracción de taninos hidrolizables se han utilizado como disolventes agua (temperatura ambiente o 90 °C), 50% metanol, 50-70% acetona o etanol/agua en diferentes proporciones (Cacace, 2002), (Georgé, 2005). Ya que los fenoles se pueden encontrar también en múltiples formas conjugadas, con azúcares, ácidos y otros compuestos fenólicos y además pueden existir en forma de complejos con otras macromoléculas como proteínas y componentes celulares (Robbins, 2003).

Su extracción depende del grado de polimerización de este tipo de compuestos y del tipo de matriz. Independientemente del tipo de disolventes que se utilicen, la extracción siempre es incompleta y una cantidad de compuestos polifenólicos puede quedar en los residuos. Por ello, de acuerdo a lo anteriormente expuesto, los compuestos polifenólicos se pueden dividir en polifenoles extraíbles (PE), aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos polares (Hellström, 2008), (Okuda, 1990).

Tabla 3. Estructura de algunos polifenoles extraíbles.

POLIFENOLES EXTRAÍBLES	ESTRUCTURA
<p><b>ÁCIDOS BENZOICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido vanílico</li> <li>• Ácido gálico</li> <li>• Ácido elágico</li> <li>• Ácido tánico</li> </ul>	
<p><b>ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido clorogénico</li> <li>• Ácido cafeico</li> <li>• Ácido ferúlico</li> <li>• Ácido trans-cinámico</li> </ul>	
<p><b>FLAVONOLES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rutina</li> <li>• Quercetina</li> <li>• Miricetina</li> <li>• kaemferol</li> </ul>	
<p><b>FLAVANOLES</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Catequina</li> <li>• Epicatequina</li> </ul>	
<p><b>ISOFLAVONAS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Daicina</li> <li>• Genestina</li> <li>• Daiseína</li> <li>• Genisteína</li> </ul>	

Fuente: (Arranz, 2010)



# Capítulo 2

## Objetivos

## 2.1. Objetivo General

Demostrar la actividad antifúngica de Damiana (*Turnera diffusa*) sobre pruebas biológicas (*in vitro*) en *Colletotrichum gloeosporioides*, posteriormente mediante la Técnica de Electroforesis Capilar realizar la identificación y cuantificación de polifenoles que pudieran ser los responsables de dicha actividad inhibitoria. Finalmente utilizando el perfil electroforético modelo de Damiana de Baja California, realizar la comparación en diversos remedios herbolarios con la finalidad de asegurar su autenticidad.

### 2.1.1. Objetivos Particulares

- Demostrar la actividad antifúngica de Damiana (*Turnera diffusa*) sobre el microorganismo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, mediante pruebas *in-vitro* (método de envenenamiento) con ayuda de la cuantificación de los fenoles totales, por el método de Folin-Ciocalteu
- Optimizar el método de extracción de los polifenoles de *Turnera diffusa* realizándola por maceración, agitación, ultrasonido y con variación de la temperatura.
- Optimizar la proporción de la mezcla de disolventes de extracción (mezclas de etanol:agua) para la extracción de los polifenoles de *Turnera diffusa*.
- Seleccionar el estándar interno adecuado para realizar la cuantificación de los polifenoles libres en los extracto de Damiana por CE.
- Identificar los compuestos polifenólicos libres por la técnica de Electroforesis Capilar de Zona (CE) por adición de estándar y por comparación de sus espectros de absorción con los de estándares.
- Realizar las curvas de calibración para cada uno de los polifenoles encontrado así como la evaluación de algunos parámetros de validación, con la finalidad de cuantificar éstos compuestos de forma confiable en las muestras vegetales estudiadas.

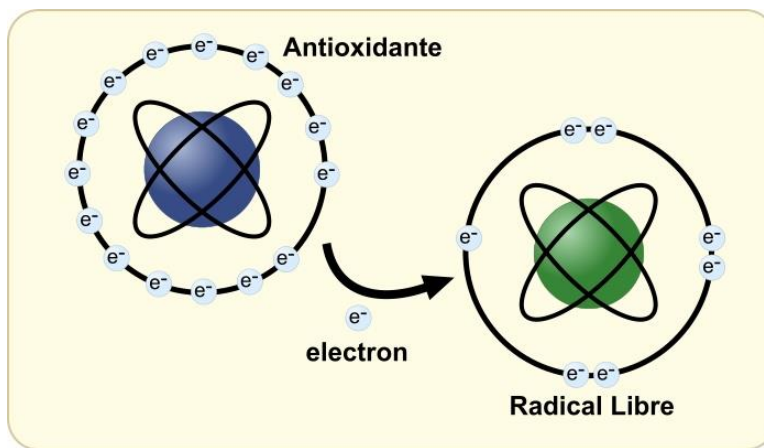
- Obtener el perfil electroforético de Damiana de Baja California y con esto compararlo con productos comerciales herbolarios para ser aplicado como control de calidad en la autenticidad de Damiana de Baja California.
- Contribuir al proyecto de: DGAPA, UNAM, PAPIIT IT201513: Desarrollo de envases activos para la conservación de frutos frescos y mínimamente procesados.

**Capítulo 3**  
**Fundamentos**  
**teóricos**

## 3.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de estabilizar a los radicales libres, neutralizando los efectos dañinos, éstas pueden ser de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas). La figura No. 5 se muestra el esquema de un antioxidante y un radical libre (Singh , Zamboni, & Mahajan, 2009)

Figura 5. Esquema de antioxidante y radical libre



Fuente: (IVOT, 2015)

### 3.1.1. Estrés oxidativo.

El oxígeno es esencial para la vida humana, paradójicamente este elemento también está involucrado en reacciones tóxicas siendo una amenaza para la salud humana. Se cree que los efectos más dañinos del oxígeno resultan en la formación y actividad de especies reactivas de oxígeno (EROS). Estas actúan como oxidantes y son los mayores contribuyentes al envejecimiento, incluyendo enfermedades cardíacas, cáncer, cataratas y enfermedades degenerativas del sistema nervioso como Parkinson y Alzheimer (Venero, 2002).

### 3.1.2. Radicales libres.

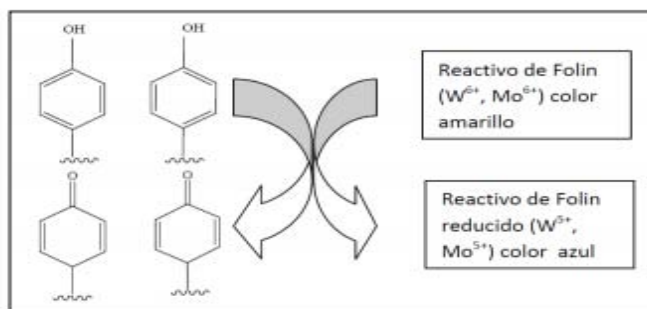
Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman (Cheesman & Slater, 1998). Se producen en la cadena respiratoria, la cadena de transporte de electrones, en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación.

Tienen funciones fisiológicas en el organismo participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno y prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular. Las especies reactivas por del oxígeno (EROS) incluyen a los radicales libres y a otras especies que participan en reacciones que elevan la cantidad de los agentes prooxidantes (Naqui, Britton, & Cadenas, 1996). Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son: Radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), oxígeno nítrico (NO), peróxido (ROO) semiquinona (Q), ozono (Diplock, 1991).

### 3.1.3 Fenoles Totales por Folin Ciocalteu

El ensayo espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu (F-C) se utiliza para determinar los compuestos fenólicos totales (TPC-Total Phenolic Compounds). Se fundamenta en una reacción de oxidación/reducción que es el mecanismo básico; gracias a la reducción del reactivo F-C ocurrida en el proceso. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $\text{W}_8\text{O}_{26}$ ) y molibdeno.

El método original de Folin – Ciocalteu se desarrolló en 1927, en la cual la oxidación de los fenoles por los reactivos de molibdotungstanato permite una reacción coloreada a  $\lambda_{\text{máx}}$  a 745 – 750 nm:



**Figura 6. Reacción química del método de Folin Ciocalteu**

*Fuente: (Jiménez, 2012)*

Este método es simple, sensible y preciso. Sin embargo, la reacción es lenta a un pH ácido, por lo que pierde especificidad. Singleton y Rossi (1965) mejoraron el método con un reactivo heteropolianiónico molibdotungstosfosfórico que oxida a los fenoles de forma más específica; la  $\lambda_{\text{máx}}$  para el producto es 765 nm:

Sin embargo, debe tomarse en cuenta, que los distintos compuestos fenólicos utilizados para la construcción de la curva de calibración presentan diferente coeficiente de absorptividad ( $\epsilon$ ), específicamente en el caso de esta tesis se utilizó ácido gálico y que debe tomarse con reservas la interpolación de la suma de todos los polifenoles. Además de que muchos compuestos reductores que pueden estar presentes en las muestras pueden ser reactivos (i.e. hierro (II), bisulfito, sulfuro, cianuro, nitrito, fructosa, aminas, proteínas y otros antioxidantes) por lo que puede haber presencia de sustancias interferentes (Singleton, 1999).

## 3.2 Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar de zona (CZE) es la modalidad más utilizada a causa de su simplicidad operacional y versatilidad. El intervalo de aplicaciones de la CZE es diverso y las áreas de aplicación pueden ir desde problemas relacionados con la separación de especies pequeñas, hasta macromoléculas. Esto junto con el hecho que se requieren pequeños volúmenes de muestra, ha despertado una gran expectación en diferentes campos, tal como lo demuestra el incremento de publicaciones realizadas en el área de bioquímica y biotecnología, industria farmacéutica, análisis clínicos y medio ambiente (Castillo, Revilla, & López A., 2005)

### 3.2.1. Definición y principios de la técnica

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica de gran importancia, poco conocida en nuestro país con gran auge en el mercado internacional, utilizada en diversas áreas de la investigación para la separación y cuantificación de moléculas pequeñas incluyendo iones metálicos (libres o en forma de complejos), biomoléculas como aminoácidos, proteínas, péptidos, carbohidratos, y macromoléculas tales como fragmentos de ADN, entre otros (Skoog, 2010). La EC comparada con otras técnicas analíticas por ejemplo cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ofrece grandes ventajas en términos de su alta resolución, eficiencia, bajo consumo de disolventes orgánicos y tiempos cortos de análisis. Además, cuenta con distintos modos de separación que pueden utilizarse según las necesidades del analista empleando el mismo instrumento.

Parte de la versatilidad y eficiencia de esta técnica, se debe a que combina elementos de otras técnicas analíticas; por ejemplo, utiliza detectores de alta sensibilidad como son: el de Arreglo de Diodos (DAD), fluorescencia inducida por láser y espectrometría de masas, además del uso de capilares de sílice fundida ( $\text{SiO}_2$ ) como en la cromatografía de gases (CG). Estos capilares permiten la aplicación de altos campos eléctricos con una alta eficiencia para la disipación de calor, evitando los efectos adversos del calentamiento de Joule, y permiten la detección *in situ*, debido a la baja absorción de la radiación visible, ultravioleta y a la baja fluorescencia. Estos capilares están recubiertos de un polímero (poliimida) que les confiere alta flexibilidad facilitando su manipulación (Castagnino, 2000).

Es importante hacer notar que aunque superficialmente este método se parece a la CLAR, los diferentes tipos de EC no se basan en fundamentos cromatográficos con excepción de la cromatografía capilar electrocinética micelar, debido a que las separaciones dependen de las diferencias entre las relaciones masa/carga de los analitos más de que las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria.

En EC, los componentes de una mezcla se transportan a través de un tubo capilar dispuesto horizontalmente (parcialmente enrollado) por efecto de una elevada diferencia de potencial eléctrico que se aplica a lo largo del tubo y entre dos electrodos.

El mecanismo de separación en la EC es el mismo que en la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas con la relación masa/carga y con la conformación de los analitos, La EC, consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras que se separan en función de su movilidad electroforética bajo la influencia de un campo eléctrico (Doroteo, 2012).



### 3.2.2. Separación Electroforética

La separación electroforética está basada en las diferencias de velocidades migratorias de los analitos en presencia de un campo eléctrico. La velocidad de un analito puede ser dada por la siguiente ecuación 1.

**Ecuación 1. Velocidad del analito.**

$$v = (\mu \pm \mu_{eo})E$$

Dónde:

$v$  = Velocidad del analito

$\mu$  = Movilidad electroforética

$\mu_{eo}$  = Movilidad electrosmótica

$E$  = Campo eléctrico

La movilidad electroforética depende de la especie iónica, del tamaño, de la carga, de la temperatura, de la concentración y de la naturaleza del analito, como se describe en la siguiente relación. Ecuación 2.

**Ecuación 2. Movilidad electroforética.**

$$\mu = \frac{q}{6\pi r\eta}$$

Dónde:

$\mu$  = Movilidad electroforética

$q$  = Carga del analito

$r$  = Radio molecular

$\eta$  = Viscosidad de la solución

De la Ecuación 2 es evidente que especies o analitos cargados y pequeños tienen alta movilidad, mientras especies cargadas con gran peso molecular muestran baja movilidad.

Un constituyente fundamental de la EC es el llamado flujo electrosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra

en contacto un electrolito con una superficie solida cargada. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido presenta carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol a pH mayores a 4 y conjuntamente con sus contraiones formando una doble capa eléctrica (Cela, 2002).

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol, H<sup>+</sup> bajo influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo de acuerdo a su carga y arrastran disolvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado FEO, dicho flujo está dado por las variables viscosidad, potencial zeta y la constante dieléctrica del medio Ecuación 3.

### Ecuación 3. Movilidad electroosmótico

$$\mu_{eo} = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi\eta}$$

Dónde:

$\mu_{eo}$  = *Movilidad electroosmótica*

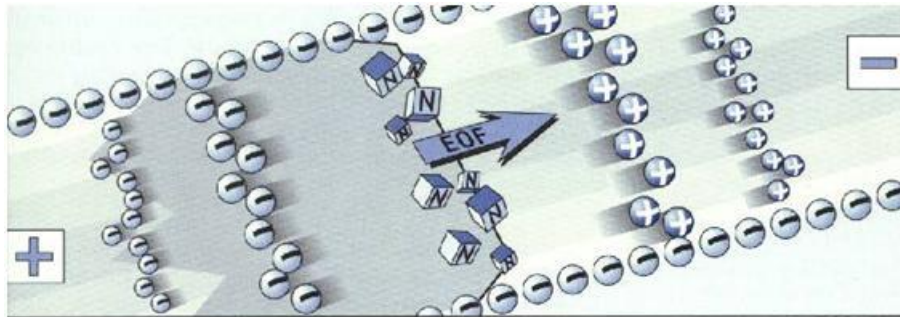
$\zeta$  = *Potencial zeta*

$\eta$  = *Viscosidad de la solución*

$\varepsilon$  = *Constante dieléctrica de la solución*

La electroforesis realizada en tubos capilares (Figura 6) ha aumentado el interés en esta técnica desde el punto de vista analítico, mejorando realmente la modalidad clásica de electroforesis, ampliando increíblemente el campo de aplicación de esta técnica. Sus principales ventajas son: la alta resolución, alta eficiencia de separación, corto tiempo de análisis, pequeñas cantidades de muestra y separación de un sin número de compuestos, y una gama de mecanismos que proporcionan una separación selectiva (R. A. Ames, 2000).

Esta técnica electroforética es conocida como EC, electroforesis capilar de zona (CZE) o en ocasiones electroforesis capilar de alta resolución (ECAR).

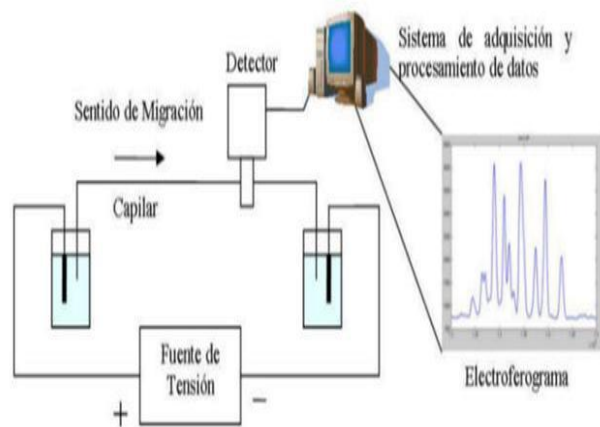


**Figura 7. Separación Electroforética**

*Fuente: (Heiger, 2000)*

El sistema de EC (Figura 7 y 8) consiste básicamente en las siguientes partes básicas:

- Dos electrodos de platino (ánodo y cátodo).
- Fuente de poder de alto voltaje (0 a 30,000 V) autoreversible.
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos y el electrolito soporte respectivamente.
- Capilar (compartimiento donde se lleva a cabo la separación).
- Un sistema de enfriamiento del capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido recirculante).
- Un sistema que introduce la muestra y buffers (automuestreador).
- Un detector.
- Sistema de adquisición de datos (computadora con software).



**Figura 8. Equipo y Sistema general de Electroforesis Capilar**

*Fuente: (Castillo, 2005)*

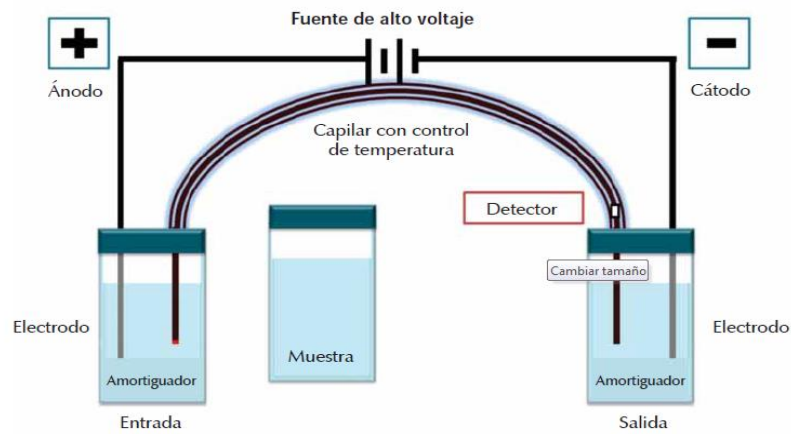


Figura 9. Representación de los elementos del sistema CE

Fuente (Chopin, 2012)

### 3.2.3. Flujo electroosmótico (FEO)

Un constituyente fundamental de la electroforesis capilar es el llamado flujo electroosmótico (FEO). Este flujo se origina por la presencia de una pared cargada (pared del capilar) que está en contacto con un electrolito y donde se genera un campo eléctrico. Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la pared se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido posee carga negativa debido al aumento en la ionización de los grupos silanol (a pH mayor de 4) y conjuntamente con los contra iones del buffer forman una doble capa eléctrica, como se aprecia en la figura 8.

Así las especies catiónicas migran hacia el cátodo, las especies aniónicas tratan de migrar hacia el ánodo, pero a un alto pH son arrastrados por el FEO y las neutras se desplazan con el FEO sin importar que no tengan carga, haciendo posible la separación.

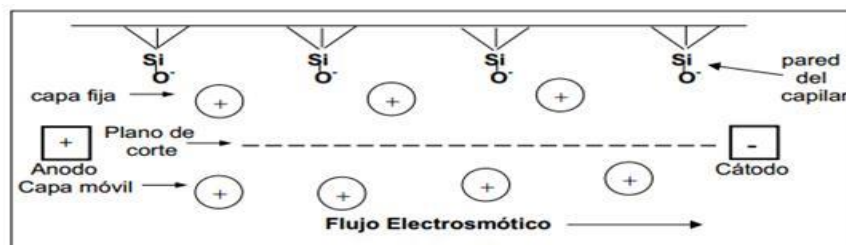


Figura 10. Representación del flujo electroosmótico en un capilar de sílice

Fuente: (Castillo, 2005)

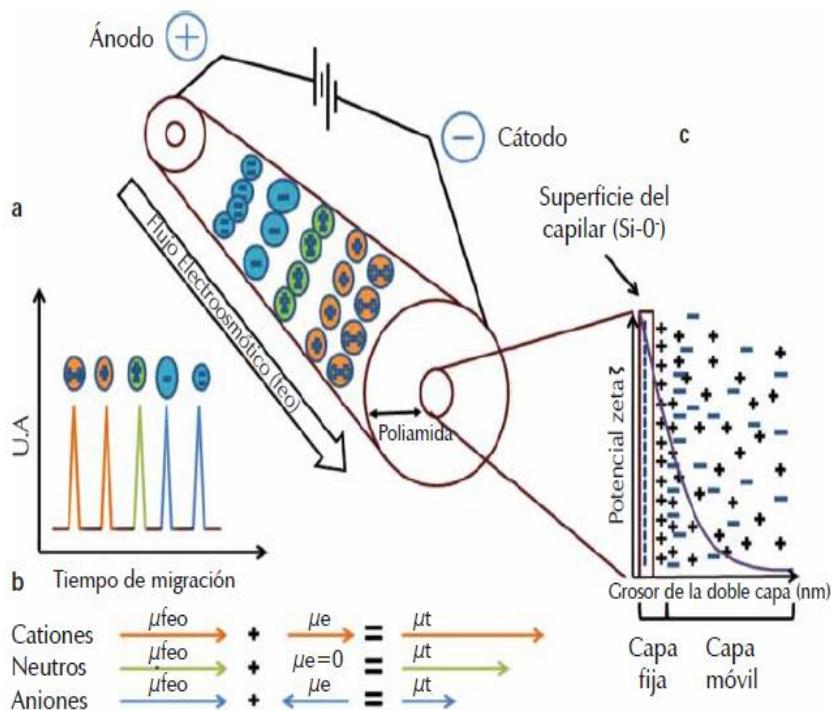
Los contra iones en la mayoría de los casos cationes, los cuales se localizan cerca de la superficie para mantener el balance de la carga, forman una doble capa con su característico potencial zeta. El espesor de la doble capa difusa es inversamente proporcional a la concentración del electrolito. El pH del electrolito, también posee influencia sobre el potencial Z. Para el capilar de sílice, un aumento en el pH conlleva un aumento en el flujo electroosmótico, ya que un mayor pH produce un aumento en la disociación de los grupos silanol en la pared interna del capilar y el potencial Z es proporcional a la superficie cargada en la pared interna del capilar.

### **3.2.4. Instrumentación**

La configuración instrumental, para la electroforesis capilar de alto rendimiento es relativamente simple. Antes de 1988, todos los trabajos se realizaron con un sistema casero de un diseño similar al del trabajo original de Jorgenson y Lukacs.

Un esquema de este sistema se observa en la figura 7, el sistema consiste de una fuente de poder de alto voltaje, contenedores de buffer, un detector ultravioleta para CE, capilares, y una cabina de fibra de vidrio, cuando la cabina está abierta se puede emplear un dispositivo de seguridad para prevenir la activación del alto voltaje (Castanon, Steyertha, & J., 2006).

En la actualidad los componentes básicos (Vallejo & Vargas, 2007) de un equipo de electroforesis capilar, son una computadora la cual controla la fuente de poder y la señal del detector. La muestra se introduce al capilar, generalmente por presión. La entrada y salida del capilar deben estar inmersas en el buffer que realiza la separación. Los electrodos, que están conectados a la fuente de poder, se encuentran en cada extremo del capilar. La corriente se establece de cátodo a ánodo como se puede observar en la figura No. 10.



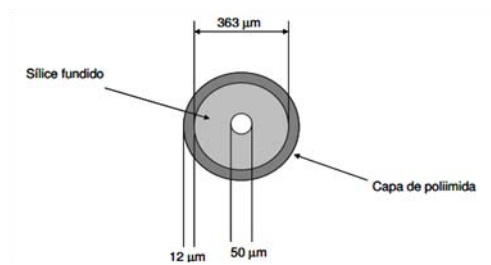
**Figura 11. Desarrollo del FEO en un capilar de sílice, a) Separación relación carga-masa, b) Movilidad de los analitos, c) Representación de la doble capa eléctrica**

*Fuente: (Chopin, 2012)*

### 3.2.5. Capilares

Idealmente, los capilares deben disipar bien el calor, ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV-Vis, ya que facilitarán la detección en línea, flexibles, robustos y de precio económico.

Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones y por ello son los más ampliamente utilizados. Para aumentar su flexibilidad y resistencia son recubiertas de una capa externa de poliimida. Una pequeña sección del recubrimiento de poliimida (ventana de detección) es eliminada para hacer viable la detección.



**Figura 12. Corte transversal de capilar de sílice fundida**

*Fuente: (Castillo, 2005)*

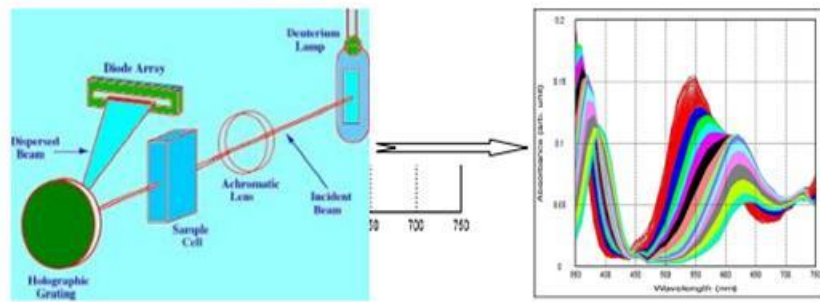
Esta sección del capilar es cilíndrica y sus dimensiones oscilan entre 50 y 100 cm de longitud y entre 10 y 200 μm de diámetro interno (DI).

Aunque la sílice fundida es el material más utilizado también se pueden utilizar otros materiales como el teflón y el cuarzo, en la figura No. 11, se puede observar el corte transversal de un tubo capilar de sílice fundida.

### **3.2.6. Sistema de detección**

La detección es uno de los mayores retos de la técnica de ECZ, ya que el reducido diámetro interno de los capilares, la pequeña cantidad de muestra inyectada y el hecho que la detección se realiza en el mismo capilar, obliga al uso de detectores sensibles y de respuesta rápida. El detector UV-Vis con diodos en línea como elemento fotosensible es el detector más usado debido a su universalidad, bajo costo, rapidez de medida y la gran cantidad de información espectral que genera aunque también presenta el inconveniente de una baja sensibilidad.

La utilización de un detector de diodos en línea (DAD) en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas. La luz procedente de la lámpara de deuterio es enfocada en el capilar por medio de un sistema de lentes y tras pasar por el capilar es difractada hacia un detector de diodos en línea, cada uno de los cuales mide un cierto intervalo de longitud de onda, como se muestra en la figura No. 12 (Vallejo & Vargas, 2007).



**Figura 13. Detector UV-Vis con arreglo de Diodos (DAD)**

*Fuente: (Rodríguez, 2010)*

Las ventajas en todo momento del análisis son: obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, además de que se puede realizar el análisis de pureza de picos.



# **Capítulo 4**

## **Metodología**

## 4.1 Materias primas

### 4.1.1. Colecta de la Materia Prima

Se utilizó Damiana de Baja California, adquirida como ejemplares secos en las bodegas de Atizapán en (Marzo del 2013). Se desconoce la localidad exacta en estado de Baja California.

### 4.1.2. Registro e identificación de la planta utilizada

Dicha materia prima fue enviada al Herbario IZTA de F.E.S. Iztacala U.N.A.M., en donde se tomó una cantidad aproximada de 100 g para enviar el espécimen a su identificación en frascos de plástico conteniendo hojas, tallos y flor del espécimen seco. Siendo registrado e identificado como Damiana de Baja California (*Turnera diffusa* Willd. ex Schult). (Ver documento de identificación de materia prima en anexo No. B)



**Figura 14. Muestra Seca y Molida de Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*)**

*Fotografías tomadas en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la FES-Cuautitlán*

### 4.1.3. Parte utilizada de la planta

Hojas, tallos y flor

## **4.2. Obtención del extracto etanólico:**

### **4.2.1. Procedimiento para la Extracción de los compuestos fenólicos de Damiana de Baja California**

1. Pesar 1 g de muestra de *Turnera diffusa* en un vaso de pp agregando 10 mL de etanol al 70%. La extracción siempre será 1:10 v/v (previamente tamizada la muestra por malla No. 40).
2. Tapar el vaso de precipitados (pp) y sonicar por 90 minutos, cuidando que la temperatura no rebase los 60 °C.
3. Transvasar el extracto a tubos de centrifuga de polisulfona, equilibrarlos en una balanza granataria Harvardtrip, para después centrifugar a 7,500 rpm durante 15 min en un equipo Beckman Coulter.
4. Al obtener el sobrenadante, filtrar la solución con papel filtro de poro fino.
5. Aforar el extracto etanólico a 2 mL.
6. Evaporar la cantidad a sequedad y reconstituir aforando a 1 mL con solución etanólica al 70%

### **4.2.2. Procedimiento de Manejo de muestra en los productos comerciales.**

Producto Oasis:

1. Abrir con cuidado las cápsulas hasta obtener la cantidad
2. Utilizar con el procedimiento descrito en el apartado No. (4.2.1.)

Té Azteca y Té Calafia:

1. Abrir con cuidado los sobres de infusión y obtener la cantidad deseada
2. Utilizar con el procedimiento descrito en el apartado No. (4.2.1.)

### **4.2.3. Conservación del extracto etanólico:**

1. El extracto filtrado y previamente aforado se burbujea con Nitrógeno y se almacena en un tubo con tapa y se sella con parafilm llevándose a congelación en la obscuridad (se almacena no más de 5 días a -20 °C).

### 4.3. Equipos utilizados

El desarrollo del método analítico para la presente investigación se realizó con el equipo de Electroforesis Capilar P/ACE MQD, con detector de arreglo de diodos y software Karat 3.2, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA)

Para la preparación de la muestra y soluciones se utilizó la Centrifuga Allegra™ 21, Beckman Coulter (Fullerton, CA., USA), el evaporador Turbo Vap LV, Caliper Life Science (Hopkinton, MA., USA); un potenciómetro, Hanna Instruments (Padua, Italia); una balanza analítica, Boeco, (Alemania); un sonicador Transsonic 570, Elma (USA); un vórtex, Thermolyne/Barnstead (Iowa, USA); un equipo de Desionización de agua Milli-Q (Millipore, MA, USA) y una parrilla eléctrica con agitador magnético Thermolyne (USA).

### 4.4. Estándares primarios

En el presente proyecto se utilizaron una serie de patrones puros de polifenoles que fueron adquiridos a diversas casas comerciales (tabla en ANEXO C.). Para la disolución de los patrones se usa una mezcla de etanol:agua (70:30) y en algunos casos (como apigenina y rutina hidratada) el etanol se sustituyó por metanol para mejorar la solubilidad. El listado de estándares primarios utilizados para el análisis de identificación se puede ver en el ANEXO C.



Figura 15. Estándares primarios utilizados en el análisis

*Fotografías tomadas en el Laboratorio de Investigación de Química Analítica de la FES-C1.*

#### **4.4.1. Preparación de soluciones:**

(Ver anexo C)

- Solución Buffer de Boratos 50 mM, pH 9.4
- Solución de NaOH 0.1 N
- Solución mezcla de estándares
- Solución de estándar interno (IS) para adición de muestra

### **4.5. Pruebas *in vitro***

#### **4.5.1. Medición de Fenoles Totales**

Esta determinación se realiza por el método de Follin-Ciocalteu, utilizando una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se toma volúmenes de 0  $\mu$ L a 200  $\mu$ L en intervalos de 20  $\mu$ L y se completó el volumen de cada uno a 1500  $\mu$ L con agua destilada. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adiciona 100  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y se sónica por 5 minutos. Posteriormente se adiciona 200  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y se reposa por 30 min. La absorbancia es medida a 765 nm. Los resultados son expresados en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

#### **4.5.2. Envenenamiento del PDA**

Pesar 25 g de polvo PDA (Agar dextrosa papa) disolver en agua destilada y finalmente aforar a 500 mL. Tapar con una gaza el matraz Erlenmeyer para llevarlo a esterilizar durante 30 minutos en una autoclave. Proseguir, descendiendo la temperatura del medio PDA hasta llegar a una temperatura aproximada de 40 °C y adicionar el extracto etanólico de *Turnera diffusa* (de concentración conocida de fenoles totales), mezclando bien durante 2 minutos y vaciar en cajas Petri, esperando que solidifique el medio, las concentraciones se muestran en la tabla No. 4.

Tabla 4. Sistemas de pruebas in-vitro sobre el microorganismo de *Colletotrichum gloeosporioides*

SISTEMAS	CONTENIDO DE SISTEMAS	REPLICAS
<b>Control 1</b>	PDA	3 por cada sistema
<b>Control 2</b>	PDA + Solución etanólica 70%	
<b>Concentración 1</b>	1000 ppm (extracto DBC*)	
<b>Concentración 2</b>	2000 ppm (extracto DBC)	
<b>Concentración 3</b>	3000 ppm (extracto DBC)	

\*DBC, Damiana de Baja California

### 4.5.3. Inoculación al medio envenenado

Posteriormente de la solidificación del medio PDA, con ayuda de un sacabocado de 0.6 mm de diámetro se tomó un disco de muestra de cultivo de hongo y se inoculó en el centro de la caja Petri con el medio PDA envenenado del extracto etanólico de *Turnera diffusa*, hasta completar el número de placas de diferentes concentraciones a estudiar, tabla No. 4. Las placas se incubaron a 25 °C durante 6 días.

## 4.9. Metodología de Electroforesis Capilar (CE)

### 4.9.1. Pre-acondicionamiento de lavado de capilar al inicio del día

El acondicionamiento de la columna capilar al inicio del día, se llevó a cabo según la tabla No 5. Esta serie de lavados tienen como objetivo activar los grupos silanol y equilibrar las paredes del capilar con el buffer, para así asegurar la repetitibilidad del análisis. Se procedió a un lavado rutinario del capilar al inicio de cada sesión como lo muestra la tabla No 5.

Tabla 5. Lavado rutinario de columna capilar en EC al inicio del día

Solución	Tiempo	Presión	Temperatura
<b>H<sub>2</sub>O desionizada</b>	5 min	30 psi	25 °C
<b>NaOH (0.1N)</b>	5 min	40 psi	25 °C
<b>NaOH (0.1N) reversa</b>	2 min	50 psi	25 °C
<b>H<sub>2</sub>O desionizada</b>	5 min	40 psi	25 °C
<b>Buffer</b>	20 min	30 psi	25 °C

En seguida de realizar el procedimiento de la tabla anterior, se prosigue a verificar la corriente del medio conductor (buffer), imponiendo un campo eléctrico con igual valor al que se utilizará durante la separación, de esta forma se asegura la repetibilidad en la composición del buffer de corrida y el pH.

#### 4.9.2. Condiciones de separación y detección

Las condiciones óptimas en Electroforesis Capilar para la identificación y cuantificación de Damiana de Baja California son las descritas en la Tabla 6, (González, 2010) con algunas modificaciones.

**Tabla 6. Condiciones utilizadas para la separación y detección de compuestos fenólicos en Damiana de Baja California por la Técnica de EC.**

Nombre	Condición
<b>Buffer de boratos</b>	50 mM, pH= 9.4
<b>Voltaje</b>	28 kV
<b>Inyección de la muestra</b>	0.5 psi / 5 s
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Longitud Total del Capilar</b>	54 cm
<b>Longitud efectiva</b>	43.5 cm
<b>Diámetro interno</b>	50 µm

#### 4.9.3. Análisis Estadístico

Tanto la obtención de los gráficos, así como la obtención de los modelos lineales por mínimos cuadrados y los cálculos de concentración (interpolación) de las muestras, se llevaron a cabo utilizando el software Excel de Office 2013. Mientras que los residuales estudentizados\* se obtuvieron usando el software Statgraphics Centurion XVI, versión 16.1.11, StatPoint, Technologies, Inc. y SigmaStat, versión 3.5.

Los cálculos para la obtención de los límites de detección y cuantificación se realizaron con la utilización de las siguientes ecuaciones.

**Ecuación 4. Límite de Detección**

$$LD = \frac{3.3(s_{y/x})}{m}$$

**Ecuación 5. Límite de Cuantificación**

$$LC = \frac{10(s_{y/x})}{m}$$

Dónde:

LD= Límite de Detección

LC= Límite de cuantificación

$S_{y/x}$ =Error sistemático de la regresión lineal del parámetro de exactitud,

m= pendiente de la recta



# **Capítulo 5**

## **Resultados y análisis de resultados**

## 5.1. Resultados de fenoles totales

Para la realización de las pruebas *in vitro* fue necesario determinar la concentración adecuada de fenoles totales en el extracto obtenido de *Turnera diffusa* y de esta forma adicionar el volumen adecuado de extracto al medio PDA para no saturarlo. Para lo anterior se realizó una curva de calibración espectrofotométrica de fenoles totales con la cual se estandarizó el extracto y poder adicionarlo a las pruebas *in vitro* del medio envenenado de PDA.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato 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 ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

En la curva de calibración se observó una tendencia lineal, (ver Anexo D) con lo que posteriormente se interpoló la señal del extracto obtenido de *Turnera diffusa* para finalmente cuantificar los fenoles totales en las diferentes muestras de Damiana, Grafico 2 (Anexo D).

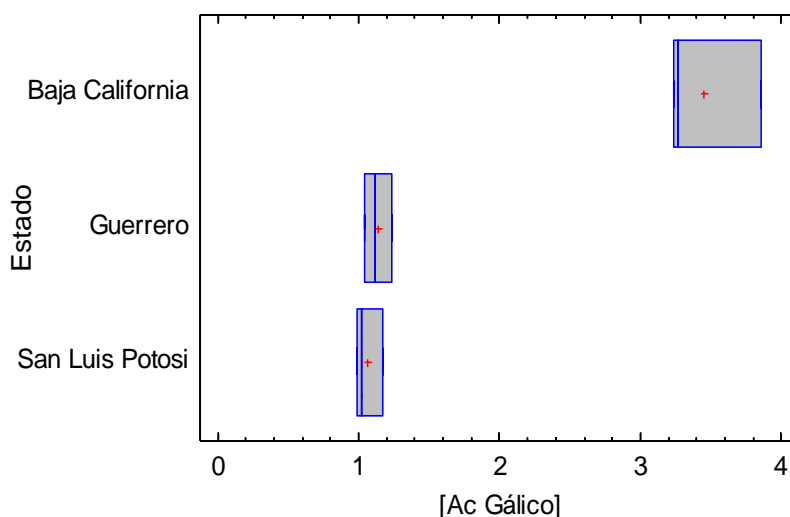
### 5.1.1. Análisis de fenoles totales.

La cuantificación de las muestras de *Turnera diffusa* mostró que la variedad de Baja California posee mayor cantidad de fenoles totales en relación a las variedades de San Luis Potosí y Guerrero Tabla 22, (Anexo D) la cual nos da una idea de la actividad antioxidante, sin embargo la reacción de Folin-Ciocalteu no es específica solo para polifenoles ya que cuantifica cualquier sustancia reductora.

Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: La existencia de agliconas libres y su incorporación a la determinación, además el hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. El sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbilo y ácido cítrico entre otros ya han sido reportado.

El grafico No. 1 (llamado de caja con bigotes), muestra el resultado del análisis de varianzas donde se realizó la comparación de los promedios de los equivalentes de Ácido Gálico en las Damianas de diferentes Estados de la República Mexicana (hipótesis nula,

Ho). El grafico muestra que la Damiana de Baja California posee la mayor concentración de fenoles totales (expresados como equivalentes de ácido gálico) teniendo una media significativamente diferente (mayor) a la de los otros dos estados (siendo esta la más utilizada por sus propiedades afrodisiacas). Por otro lado, no existe diferencia significativa entre las medias de los equivalentes de ácido gálico de las damianas de Guerrero y San Luis Potosí, por lo que sus concentraciones se pueden considerar iguales (ver Tabla de ANOVA en el anexo D).



**Gráfico 1. Comparación del contenido de Fenoles Totales de Damiana (*Turnera diffusa*) de diferentes estados de la República Mexicana**

Como se aprecia en el Gráfico No.1 el contenido de fenoles totales según la prueba de Follin Ciocalteu el resultado obtenido con mayor significativa es otorgada para Damiana de Baja California ya que el poder de la actividad antioxidante está ligada estrechamente con los compuestos fenólicos y con esto se argumenta la selección del tipo de origen de planta y así descartar Damiana de Guerrero, Damiana de San Luis Potosí para su posterior análisis químico.

## 5.2. Resultados de pruebas *in-vitro*

### 5.2.1. Envenenamiento del medio (PDA) con extracto etanólico de damiana de Baja California

La actividad antifúngica de las plantas es de mucho interés hoy en día, ya que el control de enfermedades de los cultivos y la generación de resistencia a los fungicidas comerciales, ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales, varios de los cuales se han mostrado efectivos contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Las referencias (Henrique, 2009), (Salazar, 2008) más recientes sobre Damiana de Baja California muestran su poder antioxidante sobre bacterias y células cancerígenas. Esto apoya nuestra afirmación a comprobar, que el material vegetal utilizado de *Turnera diffusa* puede ser utilizados sobre un microorganismo fitopatógeno y comprobar así si existe un efecto antiproliferativo, en este caso específico será aplicado sobre *Colletotrichum gloeosporoides*, que es el agente causal de la antracnosis en frutos.

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas. Ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc.

Las pruebas *in-vitro* planteadas en esta tesis, tienen como objetivo demostrar la actividad antifúngica de Damiana (*Turnera diffusa*) sobre el microorganismo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizando el envenenamiento del medio de cultivo PDA con el extracto de Damiana que a partir de este momento lo llamaremos como auténtico por ser identificado y registrado según el apartado (4.1.2.). Para analizar y comprobar el efecto antifúngico del extracto de Damiana de Baja California se realizó un envenenamiento del medio PDA, agregando una cantidad conocida del extracto etanólico de Damiana al medio de cultivo PDA. Cabe aclarar que en el extracto fue previamente cuantificados los fenoles totales por la técnica de Follin Ciocalteu, con la finalidad de tener una idea la concentración de los polifenoles que pudieran estar participando en la inhibición del microorganismo (m.o.).

Subsecuentemente, se observó su efectividad antifúngica inoculando el microorganismo a estudiar, usando la metodología del apartado 4.5.3.

La descripción de los sistemas preparados se observa en la tabla No. 7 así como las placas inoculadas y el crecimiento del m.o. Ver también figura No. 15.

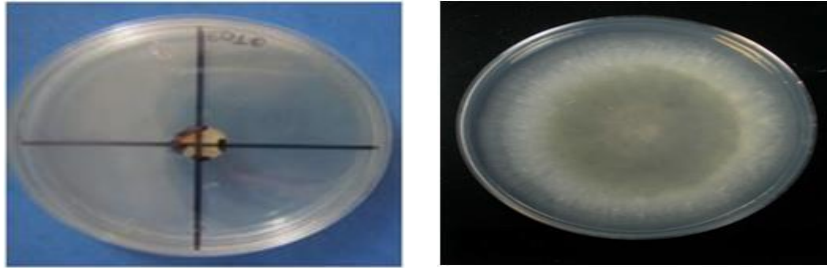


Figura 16. Inoculación del medio envenenado de extracto de Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*)






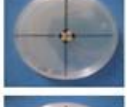








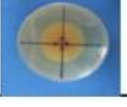
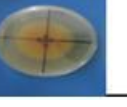



**Fotografías tomadas en el Laboratorio de Postcosecha de productos vegetales FES-Cuautitlán**

En los resultados anteriores se observa que la placa del control 1 (Tabla 7) con el m.o. creció totalmente en la caja Petri a los 7 días; sin embargo el control 2 adicionado con una solución etanólica al 70% v/v como blanco (sin extracto de damiana) creció hasta el día 8, mostrando una leve retraso de un día más en el crecimiento del m.o., por el efecto del agente desinfectante (Aulacio, 2013).

La tabla No.8 muestra los 3 diferentes sistemas de 1000, 2000 y 3000 ppm de fenoles totales con extracto de DBC, en donde se observó resultados más significativos en la inhibición del crecimiento del m.o., siendo más notorio este efecto en la concentración de 3000 ppm, ya que fue inhibido el crecimiento del m.o. Hasta por 5 días más que el control con etanol. Con lo anterior se demuestra que la Damiana de Baja California si posee propiedades antifúngicas.

Se evaluó la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* observándose por medio de las placas observándose el retardo del crecimiento del microorganismos en el medio envenenado con el extracto. Éste actuó como fungistático ya que se obtuvo un retardo en el crecimiento del m.o. y no una inhibición total.

Tabla 7. Resultados *in-vitro* de la inhibición en el crecimiento del m.o. fitopatógeno agente causal de la antracnosis en frutos en medio PDF envenenado con extracto del Damiana.

Sistemas	Día 0	Día 7	Día 8	Día 10	Día 12	Día 13
Control 1						
Control 2						
1000 ppm						
2000 ppm						
3000pmm						

Fotografías tomadas en el Laboratorio de Postcosecha de Ingeniería en Alimentos FES-C3

### 5.3. Optimización del pre-tratamiento para la extracción de los compuestos fenólicos en Damiana de Baja California

La extracción de los polifenoles de *Turnera diffusa*, se basa en la utilización de mezclas etanol-agua como disolvente para la extracción sólido líquido. Esto se propuso tomando en cuenta que los compuestos fenólicos pequeños se disuelven bien en disolventes polares como el agua, mientras que los más grandes como los flavonoides en disolventes menos polares como el etanol. Debido a lo anterior, se realizó entonces el estudio para la extracción de los polifenoles de la Damiana, utilizando diferentes proporciones de mezclas etanol-agua hasta encontrar la composición óptima que disuelva apropiadamente a los compuestos polifenólicos de diversas polaridades, otras ventajas del uso del etanol como agente extractante, es que es menos tóxico, más amigable con el medio ambiente y por ende más adecuado para la aplicación en la industria alimentaria.

### 5.3.1. Estudio de la proporción óptima de etanol: agua para la extracción

Se realizó el estudio para la obtención de la proporción óptima de mezclas (etanol: agua) para la extracción de Damiana de Baja California, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de polifenoles en el extracto. Por lo anterior, se prepararon mezclas de etanol: agua en diferentes proporciones, como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de disolvente para la extracción de fenoles en Damiana de Baja California

MEZCLA DE DISOLVENTES		
Sistema	Etanol %	Agua %
A	0	100
B	20	80
C	40	60
D	70	30

En el electroferograma de la Figura 15, se observan señales más altas al utilizar una mayor proporción de etanol: agua (70:30, trazo D) lo cual indica que existe una mayor disolución de los polifenoles al disminuir la polaridad de la mezcla de disolvente. Claramente podemos observar el incremento en la altura de las señales entre los minutos 4 a 20 al aumentar la proporción de etanol, que probablemente se deba a una mayor disolución de los componentes del extracto, específicamente los polifenoles grandes con menor polaridad como son los derivados de los flavonoides.

Debido a lo anterior se seleccionó la proporción de etanol: agua 70:30 para la realización de las extracciones posteriores de *Turnera diffusa*.

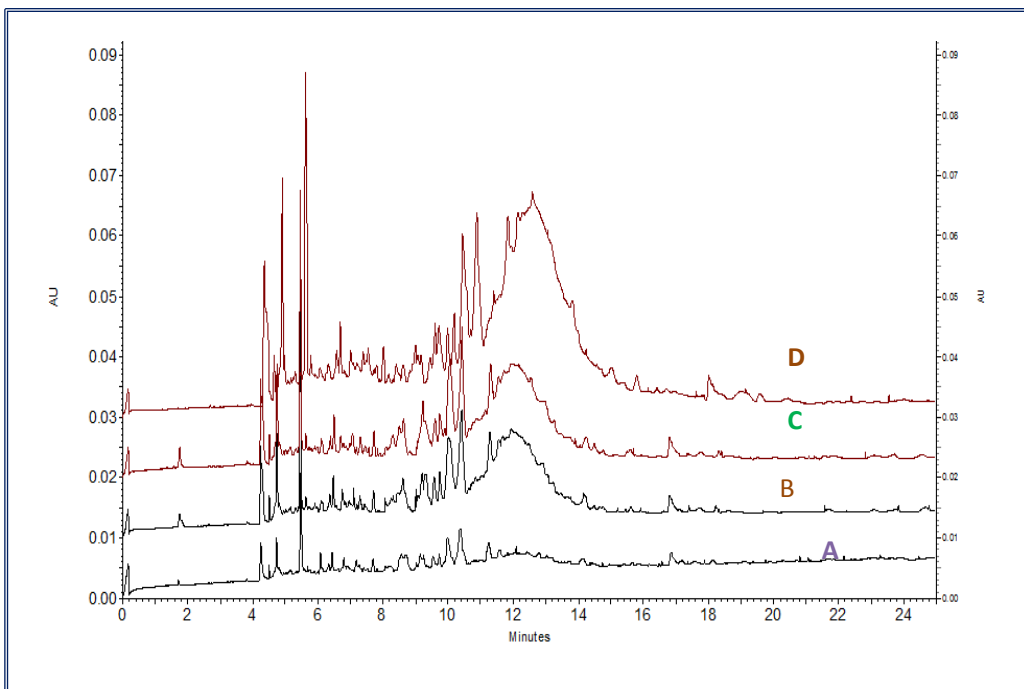


Figura 17. Electroferograma del extracto de Damiana realizado con diferentes proporciones de una mezcla etanol:agua. A. etanol:agua(0:100), B(20:80), C(40:60) y D(70:30)

### 5.3.2. Estudio para la selección del método óptimo de extracción

Los métodos utilizados para la extracción de los polifenoles durante la realización de esta tesis fueron tres, los cuales se describen en la tabla 9. Mediante la medición de los perfiles de los polifenoles por electroforesis capilar, se llevará a cabo la selección del método más adecuado para su extracción óptima.

Tabla 9. Diferentes métodos estudiados para la extracción de los polifenoles de *Turnera diffusa*

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA POLIFENOLES				
Método	Temperatura	Tiempo (h)	Extracción de polifenoles	Observaciones
Calentamiento	60	1	Alta	Problemas de control de temperatura
Maceración	30	8	Baja	Tiempo de extracción largo
Sonicación	60	1.5	Alta	Tiempo de extracción corto



De los diferentes métodos de extracción estudiados, el método de maceración resultó ser problemático al ser muy difícil el mantener la temperatura constante, siendo éste un factor crítico en la degradación de los polifenoles, ya que los picos muy posiblemente se degradaron por el efecto de la temperatura (ver Fig. 17A), como se reporta en diversos artículos. Por otro lado, utilizando la agitación por 8 h fue efectivo al extraer polifenoles observándose un crecimiento y aparición de señales teniendo como desventaja un tiempo de extracción largo. Por otro lado la sonicación como método de extracción mostró al igual que la agitación una alta extracción de polifenoles teniendo la ventaja de utilizar tiempos cortos y que es de fácil realización, por lo que éste último fue seleccionado.

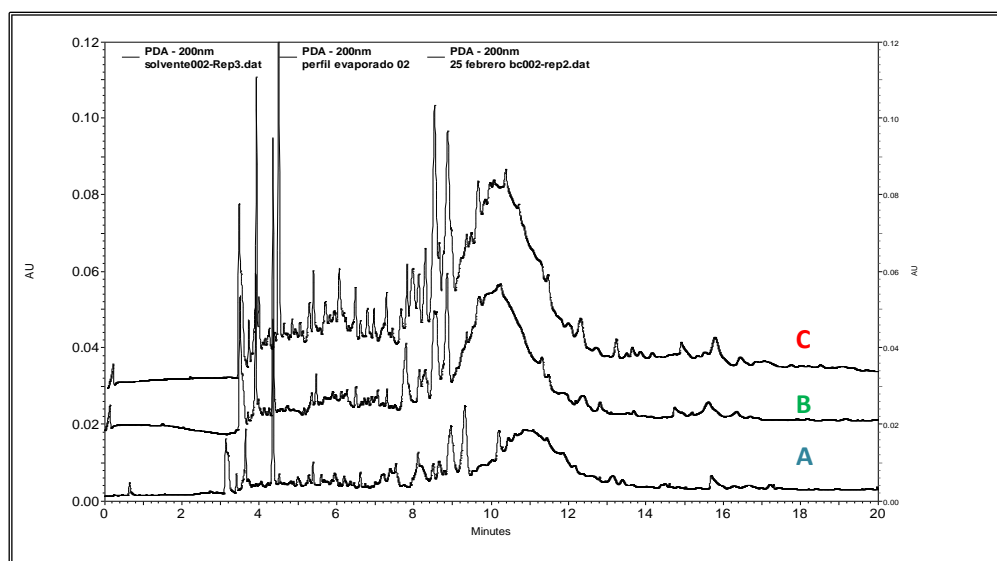
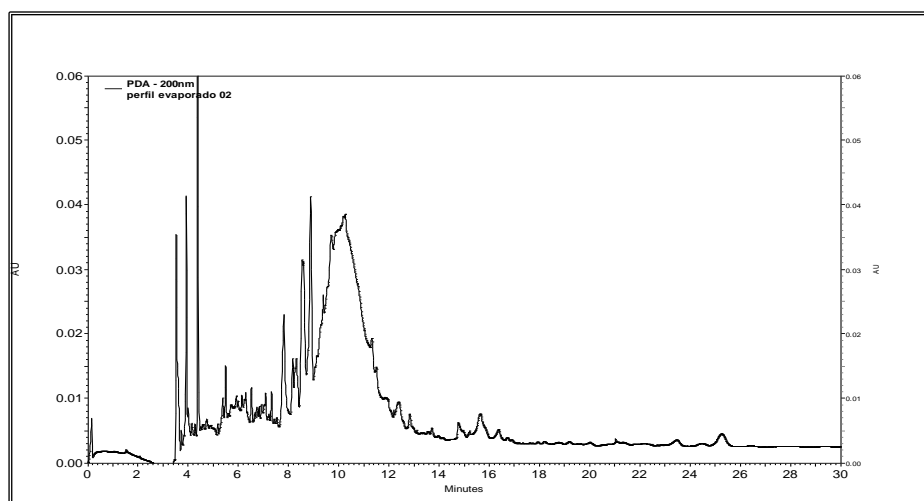


Figura 18. Electroferogramas de extractos de Damiana obtenidos usando la mezcla de disolventes seleccionada (etanol-agua 70:30) y los diferentes métodos de extracción: A. Calentamiento a 60 °C con agitación por 1h, B. Maceración con agitación 8 horas, C. Sonicación por 90 min.

### 5.3.3. Condiciones finales para la obtención del perfil de polifenoles (huella digital) de *Turnera diffusa*

Los resultados óptimos para la extracción de los polifenoles de Damiana (*Turnera diffusa*) se eligieron, tomando en cuenta la mayor altura de las señales, con el menor ruido. Por lo anterior, el electroferograma con las condiciones óptimas se muestra en la Figura. 17.



**Figura 19. Huella digital característica del extracto de Damiana de Baja California obtenida bajo las condiciones óptimas seleccionadas: disolvente etanol: agua (70:30) y utilizando ultrasonido (90 min) como método de extracción.**

Las condiciones utilizadas en el equipo de Electroforesis Capilar para la obtención del perfil de polifenoles de la Fig. 18 fueron tomadas de una investigación anterior de nuestro grupo de trabajo (Hernández, 2014).

Con las condiciones finales (óptimas) de extracción y de medición se realizó una comparación entre los electroferogramas de una mezcla de estándares de polifenoles y el perfil del extracto de *Turnera diffusa*, todo esto con el fin de darnos una idea (usando los tiempos de migración) de que polifenoles podrían estar contenidos en la muestra vegetal (Fig. 17). Cabe hacer mención que esta comparación se realiza con reservas, ya que la muy diferente viscosidad entre la solución de estándares de polifenoles y la muestra vegetal, en general provoca cambios importantes de los tiempos de migración de los analitos.

La figura 18 muestra que la totalidad de los picos obtenidas fueron a tiempos de migración mayores de 3.5 min. Considerando que el etanol usado para la extracción es una sustancia neutra, éste migra a la velocidad del flujo electroosmótico (FEO), por lo que la señal de éste a los 3.6 min nos servirá como referencia del FEO. Se puede observar que antes de los 3.6 min no existen picos presentes que corresponderían a sustancias catiónicas, mientras que la totalidad de los picos ocurren a tiempos mayores de 3.6 min, debidas a compuestos con carga negativa (aniones), como son los polifenoles.

El orden de elución de los polifenoles estándares (aniones), se observaron diferencias entre los tiempos de migración teóricos con los experimentales, lo anterior es muy probable a que se deba a que existen interacciones de algunos polifenoles con los boratos del medio formando complejos y ya que se utilizó buffer de boratos esto lo haría posible. Por lo que no sorprende que la movilidad de varios de los polifenoles se vea afectada por esta interacción (Sharron G. Penn, 1997).

**Tabla 10. Condiciones óptimas electroforéticas en el análisis del extracto etanólico de Damiana (*Turnera diffusa*)**

PARÁMETRO	VALOR
<b>Longitud total (cm)</b>	54.0
<b>Longitud efectiva (cm)</b>	43.5
<b>Diámetro interno (μm)</b>	50
<b>Material</b>	Sílice fundida
<b>Temperatura del capilar (°C) durante el análisis</b>	25
<b>Buffer de corrida</b>	Buffer de boratos (a partir de Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O), 50 mM, pH= 9.4
<b>Voltaje (kV)</b>	28
<b>Tipo de inyección</b>	Hidrodinámica
<b>Parámetros de inyección (presion, tiempo)</b>	0.5 psi, 5 s
<b>Longitud de onda de detección (nm)</b>	200

#### 5.3.4. Identificación de polifenoles por CE

La identificación de los polifenoles por CE fue uno de los principales objetivos en este proyecto y se realizó mediante el enriquecimiento de estándar sobre el extracto, aumentando significativamente el pico sospechoso por la adición del estándar correspondiente en los extractos de la Planta de Damiana de Baja California. La identificación se confirmó al observar el crecimiento de la misma señal que se sospechaba, además de ser corroborada comparando la similitud de los espectros obtenidos mediante un DAD del estándar con los de la señal en el extracto.

Los compuestos fenólicos identificados en el extracto etanol:agua 70:30, se observan en la figura 20. Siendo estos Arbutina, Rutina, Vainillina, Ácido ascórbico y Apigenina.

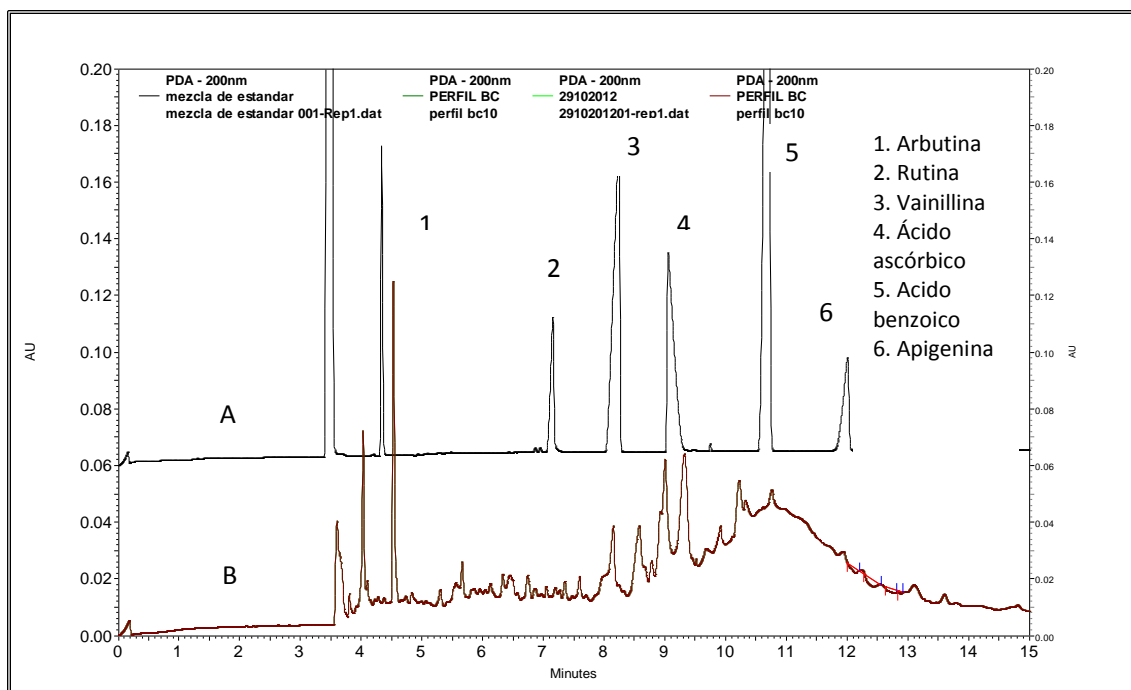


Figura 20. Electroferograma de la comparación de: A. La mezcla de estándares de polifenoles en una mezcla de etanol:agua (70:30) y B. El perfil del extracto de *Turnera diffusa*.

Las muestras vegetales analizadas para la identificación, fueron medidas por triplicado con la finalidad de corroborar su repetibilidad. Los detalles de la identificación de cada polifenol pueden verse en el Anexo D, en el punto 8.1.4.2. (Identificaciones de compuestos de Damiana (*Turnera diffusa*) por fortificación de estándar).

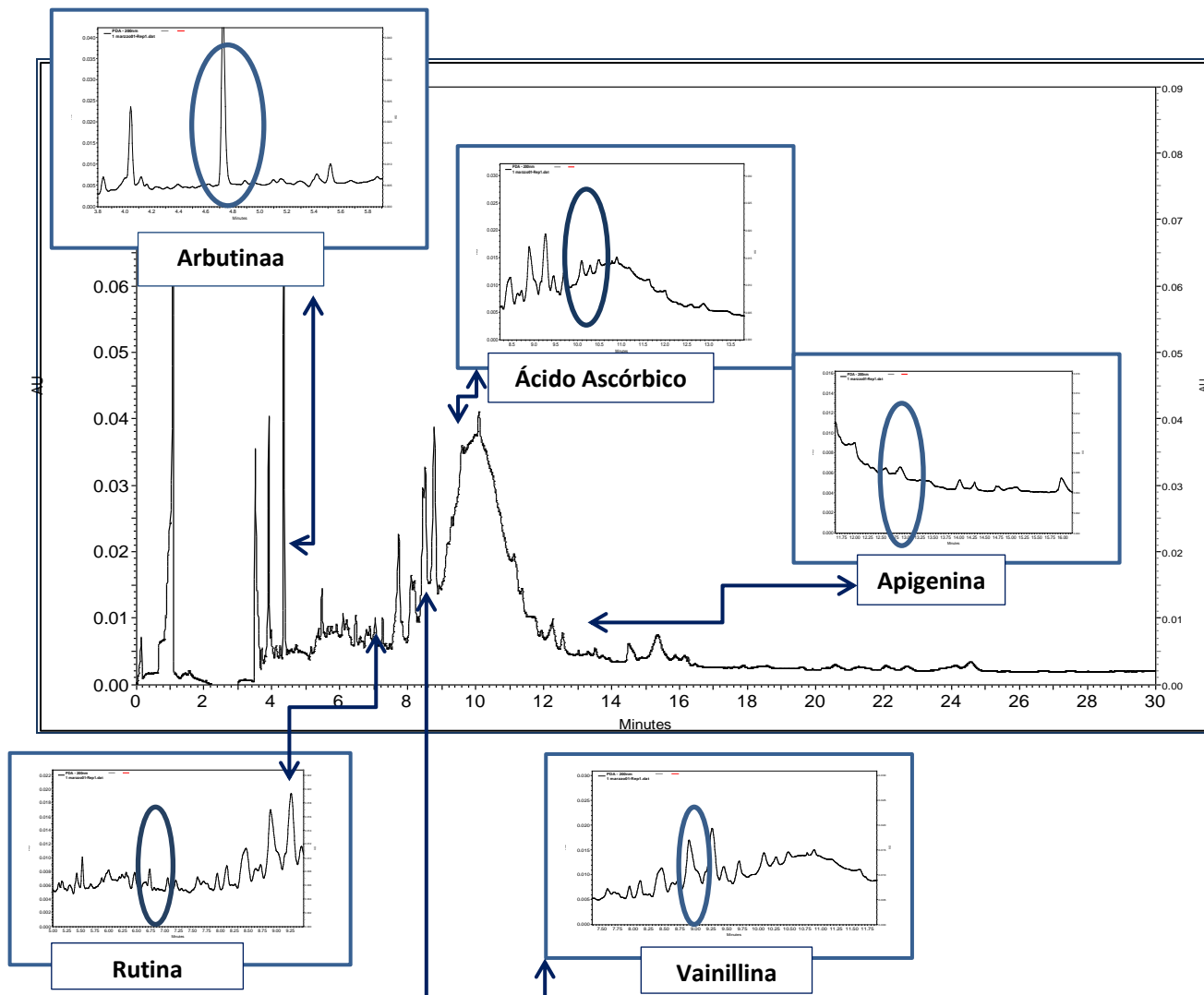
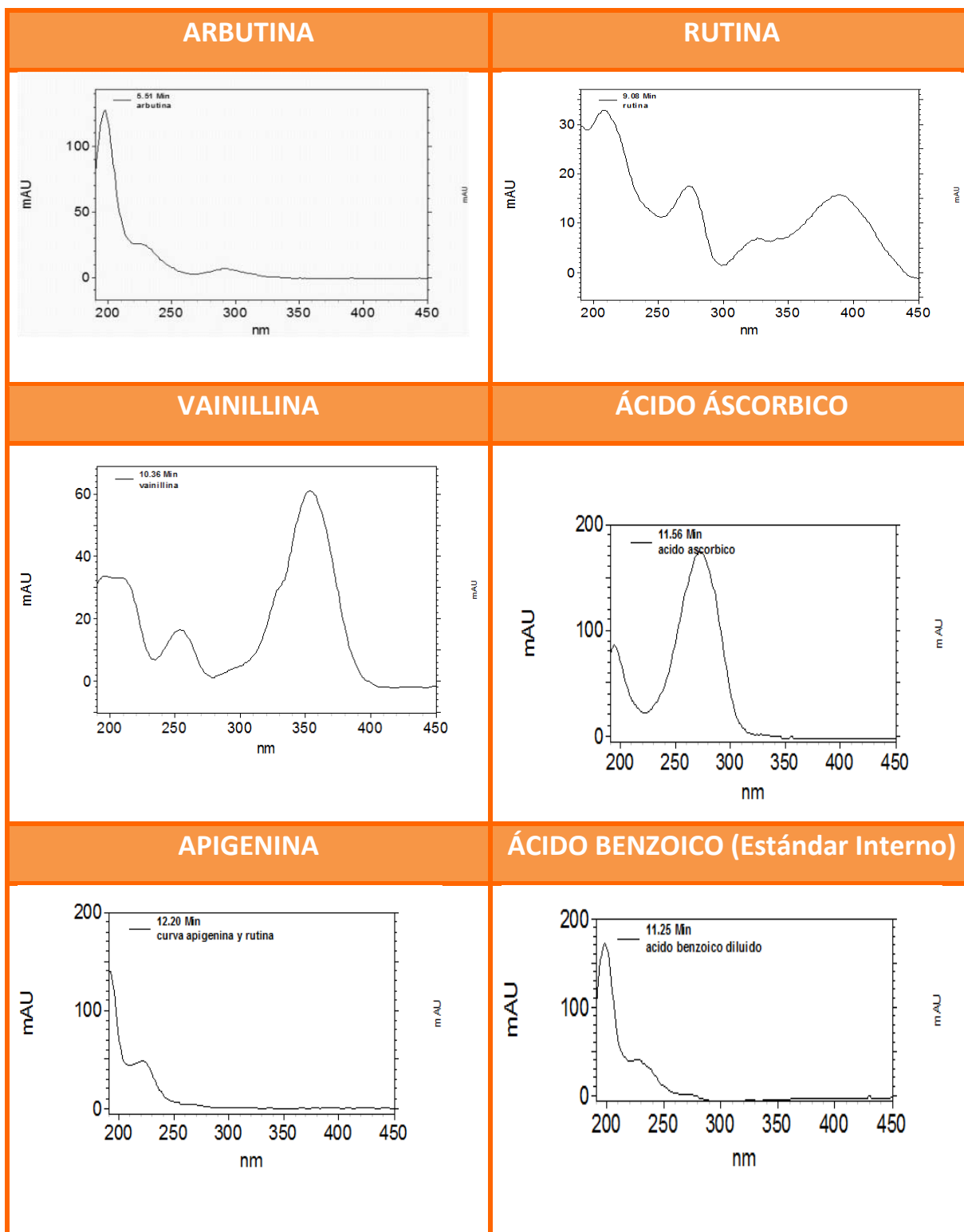


Figura 21. Electroferograma de la identificación de diferentes polifenoles en los extractos de *Turnera diffusa* por EC

Tabla 11. Espectros de absorción de los compuestos identificados



## 5.4. Selección de estándar interno para el perfil de Damiana de Baja California

Con la finalidad de llevar a cabo la validación del método para la determinación de los polifenoles de los extractos de *Turnera diffusa*, de tal forma que se obtenga un método confiable, se adicionó un estándar interno a la mezcla modelo de polifenoles de los estándares identificados, que contara con las características siguientes:

- ✓ El compuesto debe ser en lo posible parecido a nuestros analitos de interés (preferentemente) para que éste tenga una respuesta similar a la longitud de onda a trabajar en el UV-Vis.
- ✓ El compuesto debe ser de alta pureza
- ✓ El compuesto no debe interferir con ninguna señal de la muestra
- ✓ Que el analito no debe presentarse en la matriz

Con estas características principales se procedió a proponer un compuesto químico para tal fin como es el ácido benzoico, el cual cuenta con las características mencionadas y el cual nos servirá para corregir las variaciones en los tiempos de migración y áreas de las señales, debidos a los cambios de viscosidad intrínsecas de las muestras vegetales de Damiana de diferentes fuentes y localidades. Estas variaciones de viscosidad de las muestras provocan primeramente variaciones en el volumen de inyección (ya que ésta se realiza por diferencias de presión), además de que las variaciones en los tiempos de migración traen como consecuencia picos más anchos si estos tiempos se ven retrasados, aumentando por ende las áreas de los picos. Por lo que utilizando relaciones de áreas como parámetro de respuesta en función de la concentración del fenol correspondiente fue posible encontrar los modelos adecuados y su posterior validación.

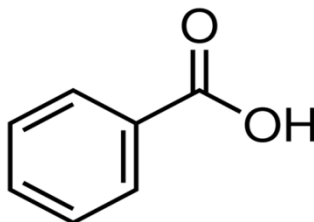


Figura 22. Estructura del Ácido benzoico

Una vez establecidas las condiciones se procedió a correr la mezcla de los 5 estándares identificados y el estándar interno para el estudio de precisión. Cabe mencionar que si se elige y se usa adecuadamente un estándar interno, se pueden compensar algunos errores aleatorios o sistemáticos.

## **5.5. Estudio estadístico y Pre-validación**

### **5.5.1. Especificidad del método**

El parámetro de especificidad indica la capacidad que tiene el método analítico para obtener una respuesta debida al analito de interés, la prueba confirma la identidad del compuesto.

Se evaluó el parámetro con el estudio de comparación del “Blanco” (agua-atanol 30:70) y de cada estándar identificado, como se muestra en la figura 22 los resultados adquiridos de la prueba realizando la inyección del blanco (22 B) para la identificación de alguna señal que pudiera interferir con algún estándar identificado, arrojando un resultado negativo ya que el blanco presentó ausencia de señales.

Siguiendo entonces con la comparación del diluyente y cada estándar de referencia (Arbutina, Rutina, Vainillina, Ácido Ascórbico, Acido benzoico y Apigenina), el resultado adquirido fueron admisibles en los 5 compuestos identificados y en el compuesto utilizado como (SI) observando así ningún pico presente que pudiera interferir.

Se realizó finalmente la comparación de mezcla de estándares (Arbutina, Rutina, Vainillina, Ácido ascórbico y apigenina) con el fin descartar alguna interacción de los picos de las sustancias de referencia (Figura 22A y B).

El análisis utilizado en la investigación se realizó con pruebas de identificación, las cuales demostró la capacidad de distinguir compuestos de estructuras estrechamente relacionadas.

Según la guía de Validación de métodos analíticos (Maria A. Gacia, 2002), el criterio de aceptación indica que la respuesta analítica del método se debe únicamente al analito y a la identificación de sustancias que pudieran interferir en la determinación con base en la estructura del analito.



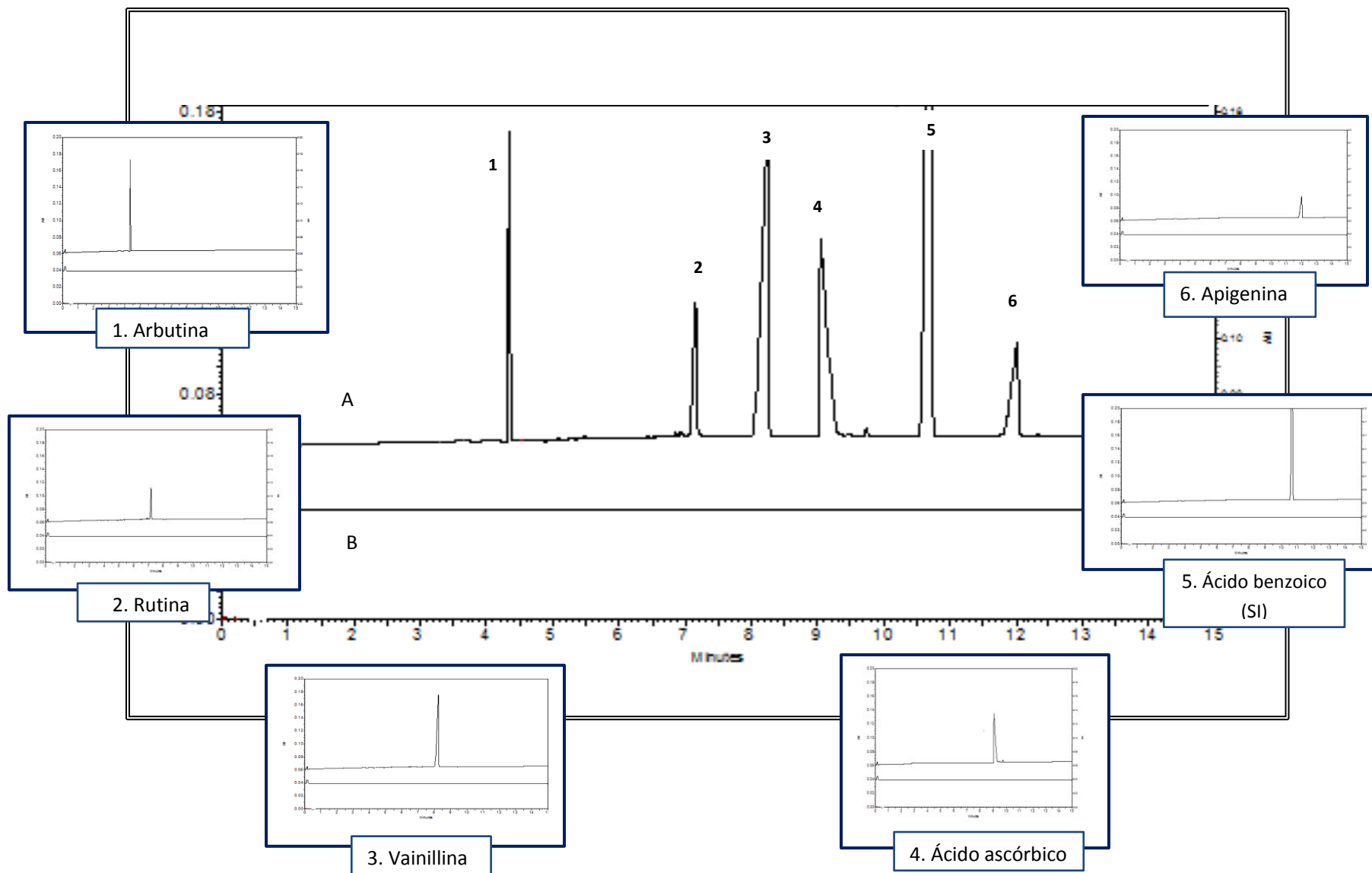


Figura 23. Electroferograma del parámetro de Especificidad A) Mezcla de estándares, B) Diluyente (etanol: agua 70:30)

### 5.5.2. Precisión del sistema en tiempos y áreas

El parámetro de precisión de un sistema habla sobre el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de concentración conocida. El sistema, instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc. originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica (absorbancia), que es el caso. En la Tabla 12, se observan los tiempos de migración ( $t_m$ ), las áreas de estándar identificado (AS), área de estándar interno (ASI) y la relación entre estas (AS/ASI) de cada uno de los compuestos de la mezcla de los 5 estándares (identificados con anterioridad en la muestra de *Turnera diffusa*), se calcula su respectiva desviación estándar (S) y su desviación estándar relativa (%DER) obtenido por réplicas de la medición de la mezcla por sextuplicado mostrándose los datos completos en el Anexo D, en el punto 8.1.4.3. Como se observa, se obtuvo un  $\%DER \leq 3\%$ , que es lo deseable para métodos biológicos (ver Tabla 12) que se considera cumple con la especificación de la *guía de validación de métodos analíticos* (Ma. Araceli Gacía, 2002), confirmando que el sistema (CE) no produce mayor variabilidad que pudiera afectar las lecturas con respecto al método utilizado. También puede notarse que se obtienen valores menores de %DER al utilizar la relación de áreas (AS/ASI) como respuesta, por lo que la precisión mejora en más de un 50% al utilizar un estándar interno para la cuantificación.

#### Ecuación 6. Cálculo de % DER

$$\%DER = (S / \bar{x}) * 100$$

%DER= Porcentaje de desviación;

Estándar relativa; S= Desviación Estándar;

$\bar{x}$  = promedio

La precisión se expresa en este trabajo como el %DER (Ecuación 6) ya que éste estadístico nos describe una variabilidad absoluta y es muy útil para la comparación de las medias de diferente magnitud como es en el caso del proceso de validación que se describe en esta tesis.

### 5.5.3. Linealidad del Sistema e Intervalo

La linealidad es un indicador de la proporcionalidad entre la concentración del analito en la solución y su respuesta medida en un instrumento determinado. Es estrictamente

necesaria cuando se trabaja con una sola concentración de estándares, cuando se trabaja con estándares múltiples de distinta concentración o curvas de calibración.

La planificación de la curvas de calibración, se realizó proponiendo 5 niveles de concentración, los cuales se planearon para que cada compuesto analizado se interpole en la zona de menor error (a la mitad de la curva) con 2 concentraciones equidistantes por debajo y 2 concentraciones por arriba del 100%. De esta manera se obtuvieron los rangos de concentración descritos en la Tabla 13, cuyas soluciones se midieron por triplicado (ver datos completos en el Anexo D).

**Tabla 12. Planeación de las concentraciones para la Curva de Calibración de los Polifenoles**

FENOL	Intervalo de concentración de la Curva de Calibración (%)	ARBUTINA	RUTINA	VAINILLINA	ÁCIDO ASCÓRBICO	APIGENINA
<b>SISTEMAS</b>		mg/L				
<b>1</b>	25	400	188	321	332	15.44
<b>2</b>	50	800	376	642	664	30.88
<b>3</b>	75	1200	564	963	996	46.32
<b>4</b>	100	1600	752	1285	1328	61.76
<b>5</b>	125	2000	940	1605	1660	77.2

El objetivo es obtener un modelo que describa con precisión la relación de la concentración vs respuesta (Relación de áreas) y que cumpla con algún ajuste al modelo. La respuesta seleccionada fue la Relación de áreas (área del fenol/área del E.I.).

Tabla 13. Estudio de la precisión, expresada como la desviación estándar relativa (DER%) de los tiempos de migración y áreas bajo la curva de las señales de una mezcla de estándares de fenoles y ácido benzoico.

Parámetro	ARBUTINA		RUTINA		VAINILLINA		ÁCIDO ASCÓRBICO		APIGENINA	
	Media	DER%	Media	DER%	Media	DER%	Media	DER%	Media	DER %
t.m. (min)	4.31 ±0.012	0.29 9	7.14 ±0.021	0.295	8.23 ±0.035	0.431	9.04 ±0.028	0.31 9	11.96 ±0.089	0.746
Área bajo la curva (AS)	139990.50 ±1477.008	1.05 5	134781.16 ±1834.970	1.361	336184.66 ±5709.621	1.698	63050.66 ±948.497	1.50 4	58461.33 ±1035.780	1.779
Área bajo la curva de (AIS)	626532.30 ±4016.874	0.64 1	626532.33 ±4016.874	0.641	626532.33 ±4016.874	0.641	626532.33 ±4016.874	0.64 1	626532.33 ±4016.874	0.641
Relación de áreas (AS/AIS)	0.223 ±0.0010	0.46 2	0.215 ±0.0016	0.765	0.536 ±0.0057	1.069	0.100 ±0.0008	0.89 3	0.092 ±0.0010	1.171

Tabla 14. Estudio de la precisión, expresada como la desviación estándar relativa (DER%) de los tiempos de migración y áreas bajo la curva de las señales de una mezcla de estándares de fenoles y ácido benzoico.

Nombre del fenol	y= mx + b					LD mg/L	LC mg/L
	y=	m(x)+b	S <sub>m</sub>	S <sub>b</sub>	r <sup>2</sup>		
Arbutina	Relación de áreas AS/AIS	0.000278 (x)+ (-0.051444)	±0.0000090	±0.0119	<b>0.9865</b>	234.44	710.42
Rutina		0.000229(x)+ (-0.00754)	±0.0000062	±0.0038	<b>0.9926</b>	91.18	276.30
Vainillina		0.000522(x)+ 0.00728977	±0.0000187	±0.0199	<b>0.9835</b>	208.45	631.67
Ácido ascórbico		0.000115(x)+ (-0.025471)	±0.0000034	±0.0037	<b>0.9886</b>	178.21	540.04
Apigenina		0.000937(x)+ (-0.00122461)	±0.00002800	±0.0014	<b>0.9886</b>	8.29	25.13

De acuerdo a las especificaciones de la guía de validación utilizada para este trabajo (Maria A. Gacía, 2002). Las curvas de calibración debe cumplir con las siguientes especificaciones:

Se puede observar en la Tabla 14 que los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) obtenidos para las curvas de calibración de los compuestos estudiados en todos los casos cumplen con la especificación de ser mayores al 0.98, con lo que observamos una muy fuerte relación entre las variables con una tendencia lineal. Por otro lado los intervalos de confianza tanto de las pendientes (m) obtenidas como de las ordenadas al origen (b) se pueden observar en la Tabla 15.

**Tabla 15. Intervalos de confianza (IC) en pendientes (m) de las Curvas de Calibración de los Polifenoles y el ácido ascórbico.**

Compuesto	IC (m) Dictamen	IC (b) Dictamen
Arbutina	0.00027302 a 0.00028298 CUMPLE	-0.058034 a -0.044854 NO CUMPLE
Rutina	0.00022557 a 0.00023243 CUMPLE	-0.00964437 a -0.00543563 NO CUMPLE
Vainillina	0.000511644 a 0.000532356 CUMPLE	-0.00373048 a 0.018310023 CUMPLE
Ac. Ascórbico	0.000113117 a 0.000116883 CUMPLE	-0.02751999 a -0.02342201 NO CUMPLE
Apigenina	0.000921494 a 0.000952506 CUMPLE	-0.0019999 a -0.00044932 NO CUMPLE

Los intervalos de confianza (IC) para las pendientes (m) de las curvas de calibración de los polifenoles y el ácido ascórbico cumplen la especificación de la guía de validación para todos los casos, mientras que en el caso de los IC para la ordenada al origen, solo se cumple para la ecuación obtenida para la Vainillina. Los demás compuestos poseen una clara ordenada al origen con valores negativos, lo cual se puede asociar a errores sistemáticos presentes durante las mediciones de las curvas de calibración.

#### 5.5.4. Cuantificación de los compuestos identificados en el material vegetal

Tabla 16. Cuantificación sobre 100g de Damiana de Baja California.

CUANTIFICACIÓN	
Nombre del Fenol	mg del fenol/100 g de material vegetal seco $\pm$ S
Arbutina	552.200 $\pm$ 11.56
Rutina	262.753 $\pm$ 2.97
Vainillina	433.431 $\pm$ 6.33
Ácido ascórbico	416.698 $\pm$ 3.70
Apigenina	22.449 $\pm$ 0.50

En la tabla 16 se observa la cuantificación de los polifenoles identificados en el espécimen de Damiana de Baja California. Se puede observar que la arbutina, la vainillina y el ácido ascórbico son los compuestos mayoritarios en esta planta. Éstos resultados obtenidos coinciden con estudios publicados recientemente, donde se reporta como compuesto mayoritario a la arbutina (sustancia característica de dicho arbusto) (YH Wang, 2009) y que según referencias es el responsable de las propiedades antibacterianas de éste arbusto, además de contribuir en gran manera en la actividad antioxidante de la planta (Piacente S. C., 2002).

Tabla 17. Tabla global de los parámetros analizados en la prevalidación del método analítico de Damiana (*Turnera diffusa*)

Parámetro de Desempeño	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS	VEREDICTO
<b>Especificidad</b>	Respuesta debido únicamente al analito de interés	La respuesta del método solo se debió a cada analito de referencia y a la mezcla de ellos.	Cumple
<b>Linealidad del Sistema e Intervalo</b>	- El coeficiente de determinación debe ser $\geq 0.98$ .	Arbutina: 0.9865 Rutina: 0.9926 Vainillina: 0.9835 Ác. ascórbico: 0.9886 Apigenina: 0.9886	Cumple
	- Los residuales debe ser $< \pm 3.0$ , consistentes y sin presencia de tendencia en su signo. <i>*(criterio de aceptación informativo)</i>	$< \pm 3.0$ y sin presencia de tendencia	
	- Intervalo de concentración lineal	25% – 125% (véase en tabla No. 13)	
<b>Precisión del Sistema</b>	El %DER para la precisión del sistema debe ser menor a 3.0%	Arbutina: 0.462 %DER Rutina: 0.765 %DER Vainillina: 1.069 %DER Ác. ascórbico: 0.893 %DER Apigenina: 1.171 %DER	Cumple
<b>LD</b>	informativo	Arbutina: 234.44 mg/L Rutina: 91.18 mg/L Vainillina: 208.45 mg/L Ác. ascórbico: 178.21 mg/L Apigenina: 8.26 mg/L	Cumple
<b>LQ</b>	Informativo	Arbutina: 710.42 mg/L Rutina: 276.30 mg/L Vainillina: 631.67 mg/L Ác. ascórbico: 540.04 mg/L Apigenina: 25.13 mg/L	Cumple



## 5.6. Aplicación del método analítico de Electroforesis Capilar (CE) en productos Comerciales Herbolarios

El método desarrollado por (CE) de Damiana de Baja California puede ser aplicado como Control de Calidad de Productos Herbolarios Comerciales. En México la venta de productos herbales se realiza libremente, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de control de calidad que asegure la autenticidad de la planta. Es por eso de suma importancia contribuir con un método que pueda ser aplicado a productos herbolarios. De esta forma se puede identificar el Perfil de Damiana de Baja California de forma certera, obteniendo la huella digital de Damiana de Baja California por la técnica de CE y comparándola con el perfil del material vegetal clasificado por el especialista botánico como *Turnera diffusa* (ver identificación en Anexo B). Después de su identificación se realiza el análisis cuantitativo por interpolación de las señales correspondientes en la Curva de Calibración reportadas en la Tabla 14.

### 5.6.1. Análisis físico de Productos Comerciales de Damiana

El análisis físico del espécimen de Damiana de Baja California en productos Comerciales se inició observando el color, olor y sabor de las muestras (Tabla 18), se utilizaron tres puntos observándose indicios sobre la similitud con respecto a la auténtica Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*).

Las muestras fueron procesadas de la misma manera que el espécimen analizado de referencia, observándose en la figura 23 la diferencia entre los tres productos en comparación a la muestra autentica. Las muestras de las Figura 23A y 23B capsulas oasis, presentaron una gran similitud de color, mientras que los productos de la Figura 22C y 23D (té celafia y té azteca) tienen una gran diferencia de color con la referencia.

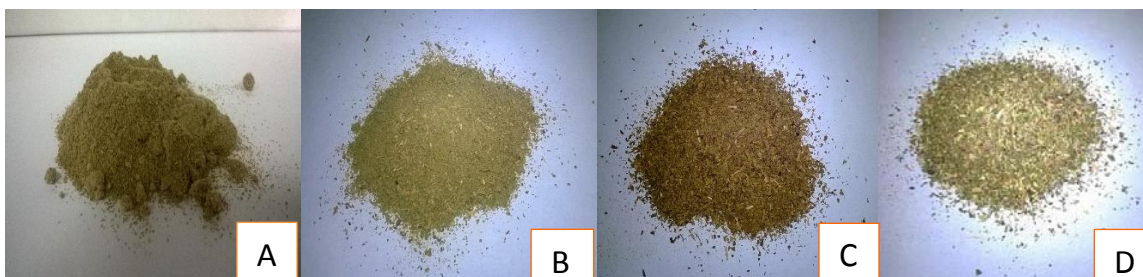


Figura 24. Muestras comerciales Herbolarias de Damiana de Baja California en donde: A) Muestra auténtica de Damiana B) cápsulas oasis C) té Calafia D) té Azteca



Figura 25. Productos Comerciales Herbolarios de Damiana (*Turnera diffusa*) estudiados para el control de Calidad.

Tabla 18. Análisis físico de Comparación de Muestras Comerciales de Damiana de Baja California sobre autentica Damiana de Baja California

MUESTRAS	OLOR(similar)	COLOR (similar)	SABOR DE TÉ (similar)
Capsulas Oasis	✓	✓	✓
Te Calafia	X	X	X
Te Azteca	✓	✓	✓

La figura 25 se expone la comparativa del perfil auténtico Damiana de Baja California (*Turnera diffusa*) mostrándose en la figura 25 A, analizado por la técnica de CE, utilizando tres productos comerciales para comparar su Calidad con respecto a dicho perfil estudiado en donde se observa la gran similitud de picos y tiempos de migración en la mayoría de los compuestos identificados en todos los productos “Cápsulas Oasis, Té Azteca y Té Calafia” así como el aumento de la línea base de 9-12 minutos, sin embargo Té Calafia muestra una gran disminución del pico (área) de los picos identificadas del perfil auténtico y la ausencia del pico de Apigenina.

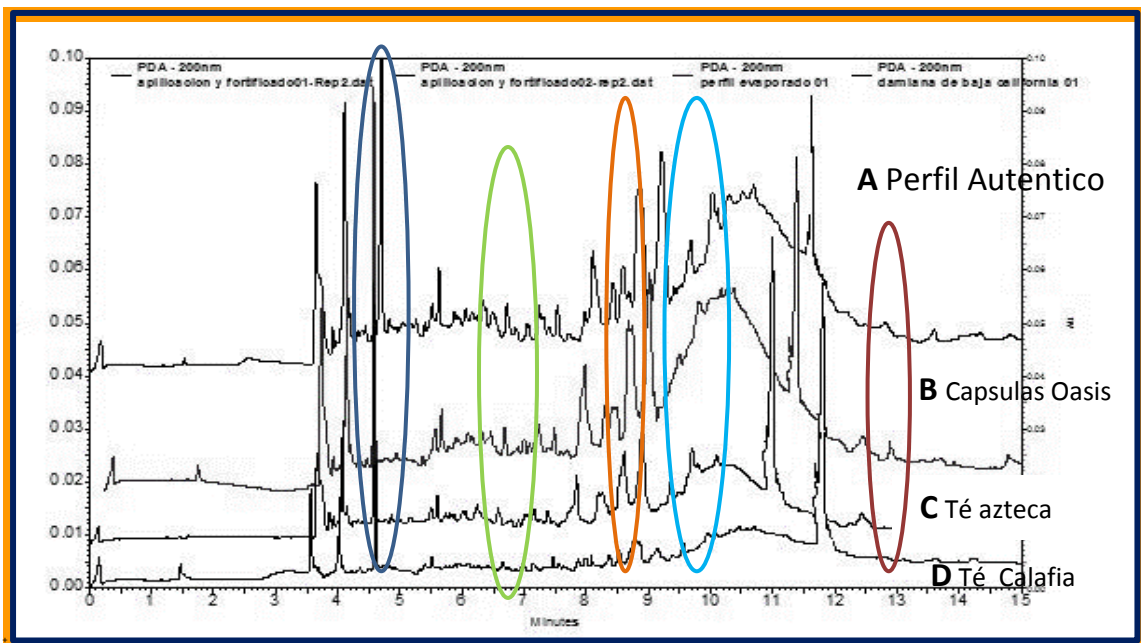


Figura 26. Electroferograma de Aplicación del método de Damiana con remedios comerciales. Los polifenoles encontrados se pueden identificar por sus tiempos de migración y por qué están identificados en óvalos de diferentes colores **Arbutina**, **Rutin**, **Vanillina**, **Ácido ascórbico**, **Apigenina**

### 5.6.2. Cuantificación y resultado de Calidad de Muestras Comerciales De Damiana de Baja California

El pretratamiento de cada uno de estos productos se llevó a cabo como se describe en el apartado 4.2.2 y las muestras fueron inyectadas al equipo de Electroforesis Capilar para ser analizados con el método desarrollado y descrito en el apartado 5.3.3, Tabla 10. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 19, junto con la comparación del contenido de polifenoles en la muestra de Damiana utilizada como estándar y denominada como “Damiana Auténtica” y cuantificada en el apartado 5.5.4, Tabla 16.

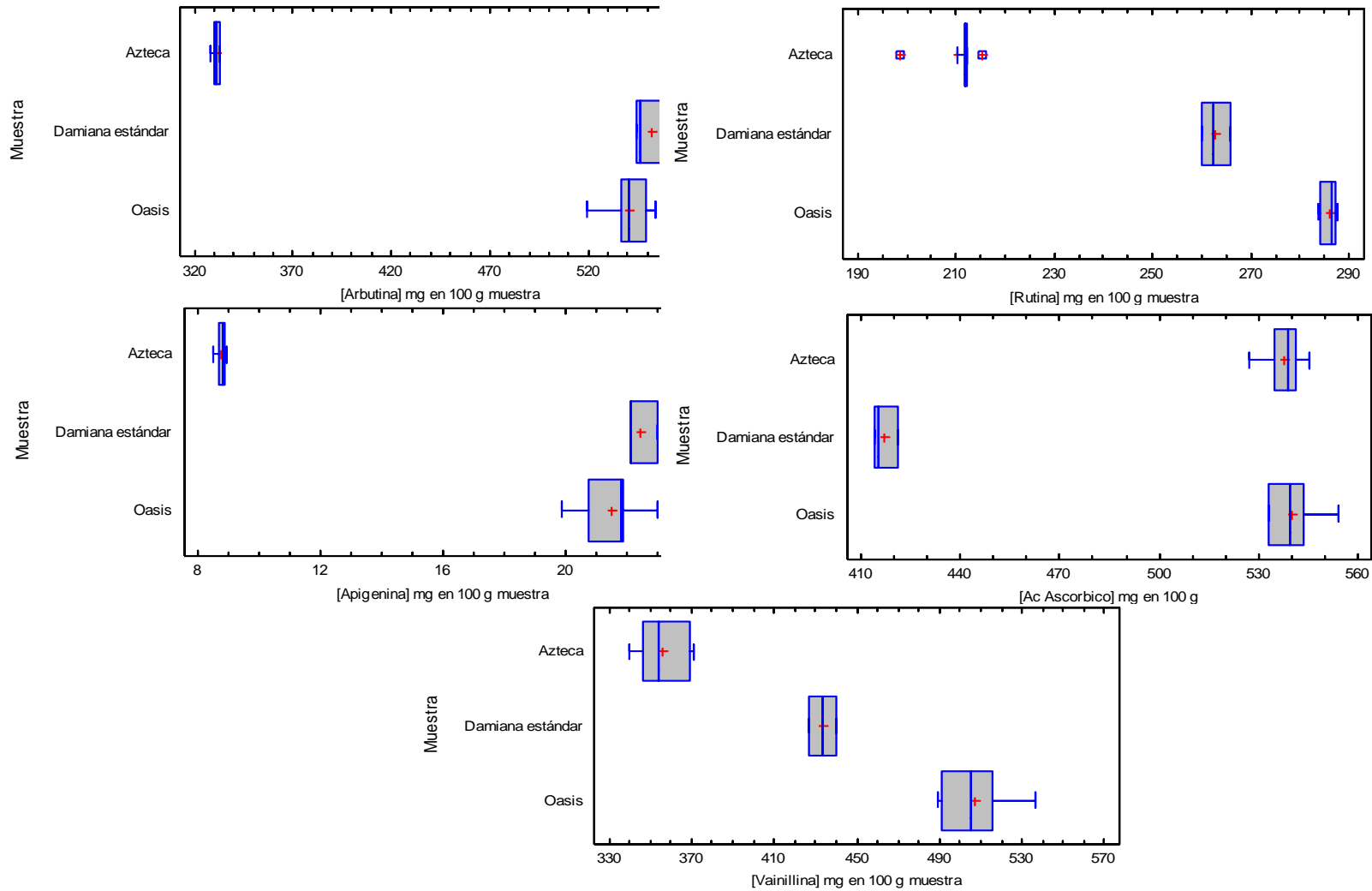
A primera vista se puede observar que las capsulas oasis y el té azteca contienen el mismo número y tipo de polifenoles que la Damiana auténtica, mientras que el té calafia no posee ninguno de éstos componentes por lo que podemos concluir que éste último es un producto falso y carece de autenticidad para ser llamado Damiana.

Posteriormente se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para identificar si existen semejanzas (diferencias significativas) en el contenido de polifenoles de las muestras comerciales con la Damiana auténtica. Estos resultados pueden verse resumidos en la Fig. 25, mientras que el análisis con toda la estadística completa puede consultarse en el Anexo 8.1.5.2. Como se puede observar en la Figura 25 las cápsulas oasis pueden considerarse iguales (con un 95% confianza) que la Damiana auténtica en cuanto al contenido de los polifenoles arbutina y apigenina, mientras que el té azteca posee un

contenido significativamente diferente de los polifenoles mencionados y contrastando con lo anterior se puede considerar igual al producto Oasis en contenido de ácido ascórbico (aunque este compuesto no es un polifenol).

**Tabla 19. Cuantificación de la aplicación de productos comerciales de Damiana de Baja California y su criterio de calidad. ND= no detectable dentro de los intervalos de la Curva de Calibración**

<b>MUESTRAS COMERCIALES</b>				
<b>Compuestos</b>	<b>Auténtica Damiana</b>	<b>Capsulas oasis</b>	<b>Té Azteca</b>	<b>Té Calafia</b>
			mg/ 100g	
<b>Arbutina</b>	552.2 ± 11.56	540.1 ± 0.121	331.1 ± 0.020	ND
<b>Rutina</b>	262.7 ± 2.97	285.9 ± 0.016	210.2 ± 0.057	ND
<b>Vainilina</b>	433.4 ± 6.33	506.9 ± 0.185	355.6 ± 0.128	ND
<b>Ácido Ascórbico</b>	416.6 ± 3.70	540.4 ± 1.528	537.8 ± 0.062	ND
<b>Apigenina</b>	22.4 ± 0.50	21.5 ± 0.010	8.7 ± 0.001	ND
<b>Perfil esperado</b>		Cumple	Cumple	No cumple



**Figura 27.** Diagramas de caja con bigote que resumen el análisis de varianza realizado a los resultados del análisis de polifenoles realizado (n=6) a las muestras comerciales té azteca y cápsulas oasis y su comparación con la Damiana auténtica (n=3). No se presentan resultados para el té calafia, ya que no contiene ningún polifenol de los identificados en la Damiana auténtica.

Para los polifenoles rutina y vainillina, las medias del contenido de éstos tanto en las muestras comerciales, como en la Damiana autentica difieren significativamente, por lo que éstos polifenoles se propone que no pueden ser utilizados como compuestos marcadores para llevar a cabo la autenticidad de la Damiana en muestras comerciales.

Las diferencias significativas encontradas, sobre todo las del té azteca con la Damiana auténtica, pudiesen estar relacionadas con diferentes factores no estudiados en esta investigación muy importantes como: la adulteración del producto con Damiana de otro origen que no es de Baja California (como son las de Guerrero o la de San Luis Potosí), o la posible influencia de factores no estudiados como el clima, tierra de sembrado, estación de sembrado, cosecha y forma de almacenaje.

Para la muestra del producto comercial del te Calafia, se observó en el análisis cualitativo que el producto mostraba diferente color y olor en comparación del espécimen autentico. En el análisis cuantitativo por EC ésta mostró un perfil diferente a la Damiana auténtica y sin señales detectables de polifenoles, por esta causa no se incluyó en el análisis ANOVA, evaluándose el producto herbolario como de dudosa procedencia.

### **5.6.3. Clasificación de los productos herbolarios usando el Análisis de Conglomerados (Clusters)**

El análisis cluster (llámese también análisis de conglomerados) es una técnica multivariante que utiliza la información de una serie de variables para cada sujeto u objeto y, conforme a estas variables, se mide la similitud entre ellos. Una vez medida la similitud, se agrupan en: grupos homogéneos internamente y diferentes entre sí. El objetivo fundamental del análisis de cluster en esta tesis es describir los grupos y sus relaciones de los resultados de la concentración obtenida de cada polifenol por EC, basándose en su similitud para un conjunto de características específicas, en este caso para el factor tipo de muestra (ya sea Damiana auténtica o muestras comerciales). Con ello se pretende obtener una descripción simplificada de los datos e identificar su relación.

Este análisis se realizó con el software statgraphics centurión e inicialmente utilizando:

1. Los datos completos de concentración de cada polifenol como respuesta y el tipo de muestra como variable.
2. Incluyendo solo los datos de concentración de arbutina y apigenina como respuesta y el tipo de muestra como variable.

Los resultados de este análisis se muestran en los dendogramas de las Figuras 25 y 28 a continuación:

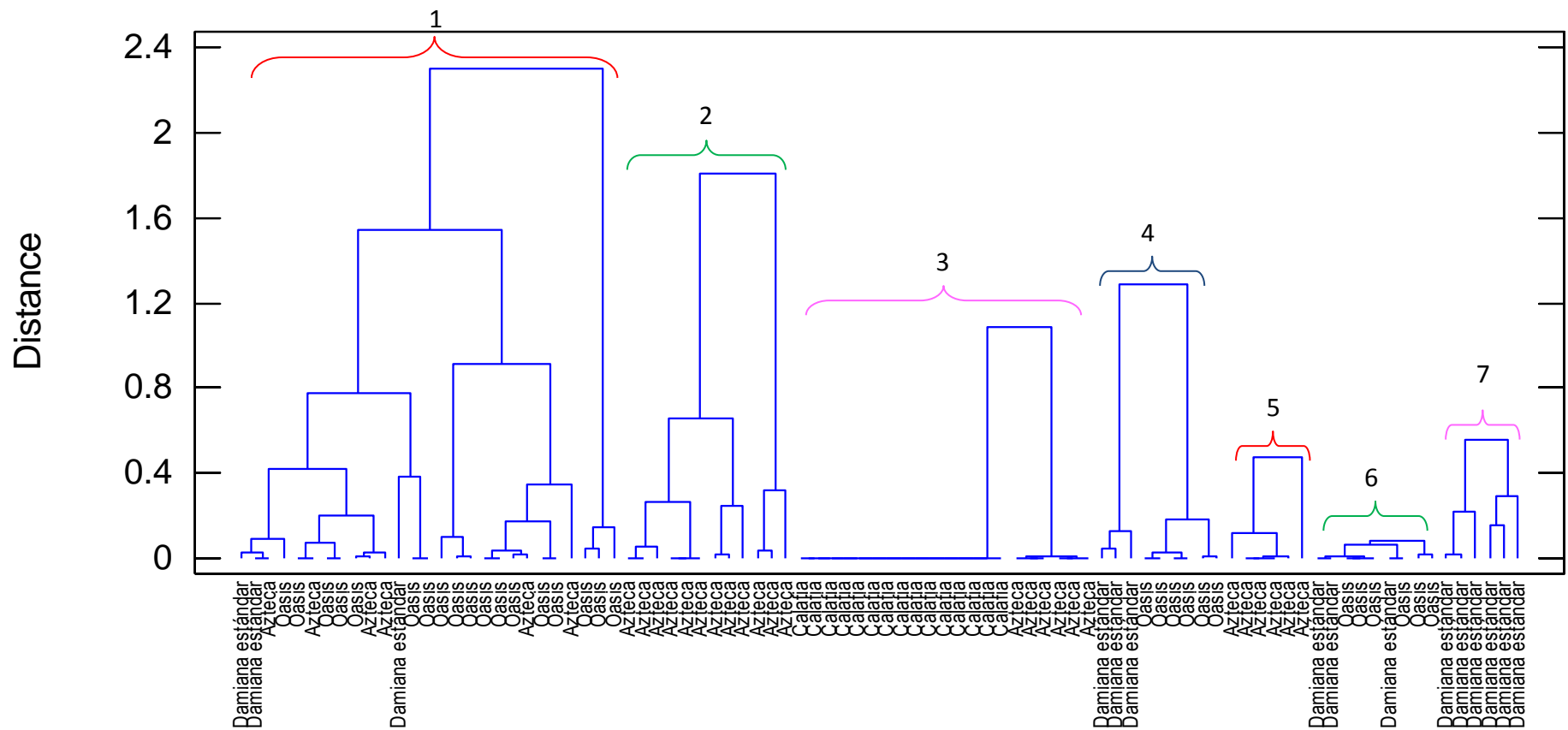


Figura 28. Análisis de Clusters usando como respuesta la concentración de cada polifenol y como factor el tipo de muestra. Condiciones: método de Ward, distancia euclídea.

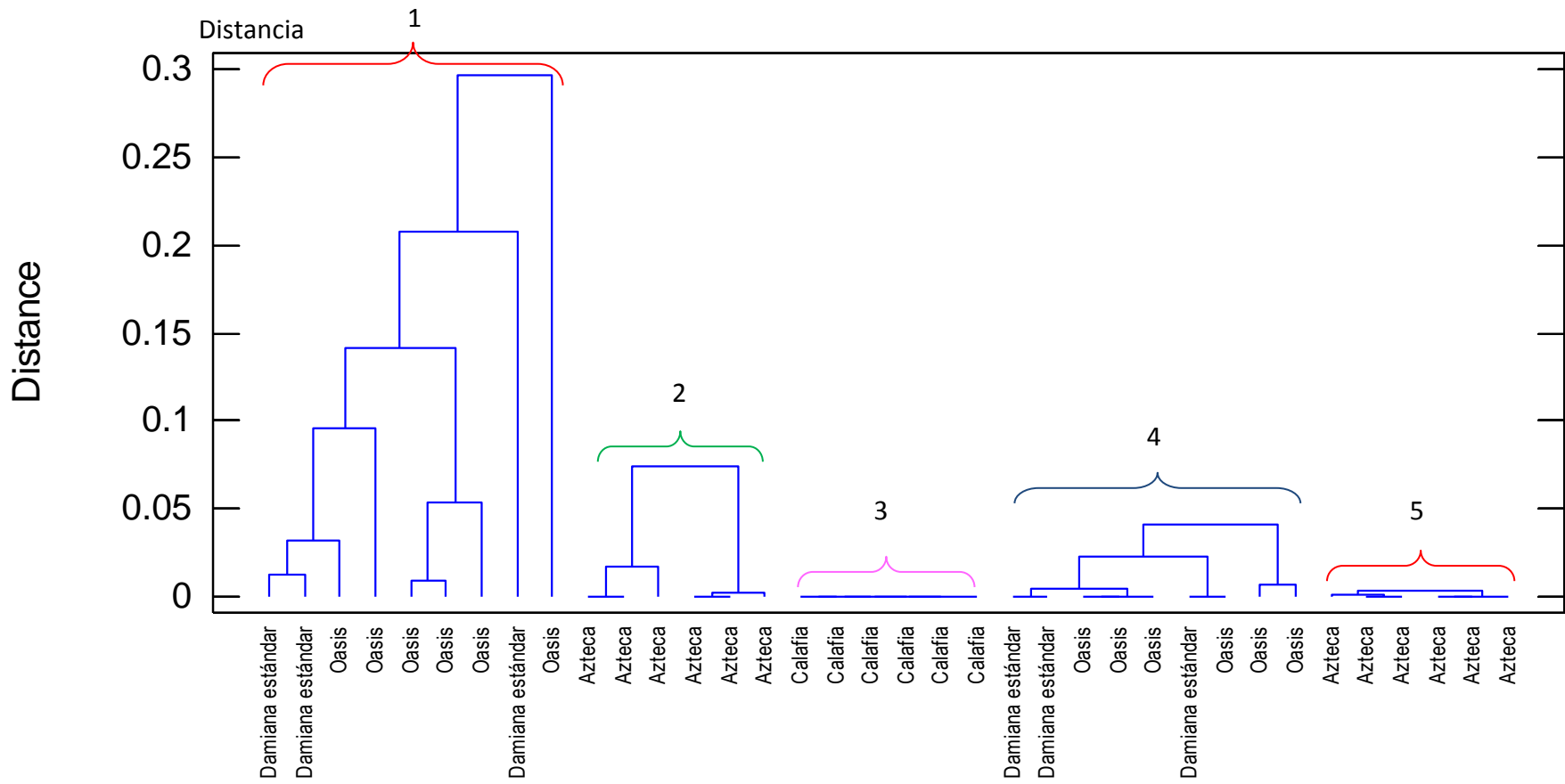


Figura 29. Análisis de Clusters usando como respuesta la concentración de arbutina y apigenina y como factor el tipo de muestra. Condiciones: método de Ward, distancia euclídea.



En el dendograma de la Figura 25 se pueden reconocer la formación de 7 grupos relacionados entre si, presentando un orden de similitud de mayor a menor como sigue:

Grupo 6 > 5 > 7 > 3 > 4 > 2 > 1

Además de que se observa que los grupos 1 y 6 presentan principalmente a las muestras de la Damiana auténtica y las cápsulas oasis. Cabe hacerse notar que en el grupo 1 con menor similitud (mayor altura de las ramas) aparecen muestras de té azteca. Esto puede deberse a la influencia de la concentración del ácido ascórbico encontrada como igual entre la Damiana auténtica y el té azteca, aunque hay que recordar que éste no es un polifenol, por lo que puede aportar información confusa al sistema, ya que en general solo los polifenoles por ser marcadores del metabolismo de la planta, son los que aportan información atribuible a diferencias en el metabolismo de la planta por efecto de la localidad, tipo de tierra y su composición al participar en dos rutas de síntesis en plantas, la vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores, y la vía del ácido siquímico (Bravo, 1998).

Por tal motivo se decidió utilizar la información de solo las concentraciones de arbutina y apigenina para realizar un análisis cluster alternativo y éste se presenta en la Figura. 26. El dendograma muestra como como los polifenoles arbutina y apigenina son mejores marcadores del metabolismo de Turnera diffusa, ya que presentan la formación de 5 grupos claramente diferenciados, presentando un orden de similitud de mayor a menor como sigue:

Grupo 3 > 5 > 4 > 2 > 1

El grupos 3 representa la gran similitud del grupo de las muestras de té de calafia, ya que no presentaron presencia en su composición de los polifenoles identificados en la Damiana auténtica. Los grupos 5 y 2 presentan solo muestras con té azteca, teniendo más similitud entre ellas las del grupo 5 que las del 2. Mientras que los grupos 4 y 1 en general agrupa juntas a las muestras de Damiana auténtica con las de las cápsulas oasis, lo cual nos confirma una vez más que estos materiales vegetales tienden a presentar comportamientos iguales en contenido y tipo de polifenoles. Resumiendo las pruebas hechas a las muestras comerciales en la Tabla 20:

**Tabla 20. Resumen del resultados de las pruebas química y estadísticas para la evaluación de la autenticidad de Damiana de Baja California en productos comerciales**

Prueba de identidad	Capsulas Oasis	Té azteca	Té calafia
Perfil de polifenoles	cumple	cumple	no cumple
ANOVA*	cumple	no cumple	no cumple
Ubicación en el dendograma*	cumple	no cumple	no cumple
Identidad	Damiana de Baja California	Damiana de Baja California cultivada en condiciones poco favorables ó adulterada con Damiana de otra localidad	Material vegetal es diferente

Concluyendo podemos afirmar con análisis químicos y estadísticos que:

Las capsulas oasis son autentica Damiana de Baja California, mientras que el té azteca es un producto adulterado, pero que si contiene Damiana de Baja California aunque en una menor concentración. Esto podría deberse también a que fue cultivada en condiciones desfavorables o que es Damiana pero de otro estado (San Luis Potosí o Guerrero). Mientras que el té calafia es un producto falsificado.

# **Capítulo 6**

## **Conclusiones**

## 6.1. Conclusiones

Se demostró la actividad antifúngica de Damiana de Baja California sobre el microorganismo fitopatógeno *Colletotrychum gloesporioides*, en donde mediante las pruebas *in-vitro* se pudo constatar este hecho y constatar que actúa el extracto como fungistático.

Se optimizó el método óptimo de extracción de los polifenoles de *Turnera diffusa* siendo éste la extracción asistida por sonicación como mejor método de extracción.

Se encontró que la mezcla de disolvente óptima para obtener las señales más altas (con un menor ruido) fue de 70:30 etanol-agua respectivamente para la extracción de los polifenoles.

Se obtuvo el perfil electroforético característico de la Damiana Baja California, y con esto se compararon los perfiles de algunos productos comerciales herbolarios. Este perfil resultó útil para ser aplicado como control de calidad en la autenticidad de Damiana de Baja California.

Se identificaron 4 compuestos polifenólicos libres (Arbutina, Rutina, Vainilina y apigenina) y un Ácido ascórbico, por la Técnica de (CE) por adición de estándar y por comparación de sus espectros de absorción.

Se seleccionó el estándar interno el cual fue el ácido benzoico siendo éste el compuesto que cumplió con las características para el perfil de la Damiana de Baja California por CE mediante la medición de las correspondientes curvas de calibración.

Los polifenoles arbutina y apigenina resultaron buenos marcadores para ser utilizados junto con el perfil electroforético y el ANOVA como pruebas de autenticidad para ser aplicados a productos comerciales que dicen ser Damiana de Baja California, concluyentes que el único producto auténtico son las cápsulas oasis mientras que aunque el té azteca posea el mismo perfil electroforético que la Damiana auténtica aunque los polifenoles se encuentran en una menor concentración por lo que sospecha de una posible adulteración con producto de otra localidad.

Finalmente el producto té calafia resultó un producto fraudulento ya que posee el perfil electroforético característico ni contiene los polifenoles encontrados en la Damiana Auténtica.

Se contribuyó al proyecto DGAPA, UNAM, PAPIIT IT201513: Desarrollo de envases activos para la conservación de frutos frescos y mínimamente procesados.

Perspectivas.

- Realizar el Análisis *in-vitro* del compuesto característico “arbutina” sobre el microorganismo fitopatógeno (*Colletotrichum gloeosporioides*), por el método de envenenamiento y midiendo la inhibición observada con respecto a los días de crecimiento. Todo lo anterior para aplicar esta capacidad inhibitoria encontrada en la aplicación de recubrimientos y así alargar la vida postcosecha de frutos y hortalizas.
- Evaluar la influencia de los factores climáticos para el monitoreo del perfil electroforético y así contralar los de mayor influencia con el fin de obtener resultados que puedan considerarse iguales.
- Proponer esta metodología como una opción viable para lograr en Control de Calidad de productos herbolarios de Damiana de Baja California y concluir sobre su autenticidad.

# **Capítulo 7**

## **Bibliografías**

## 7.1. Bibliografías

- Alcaraz, L. (1999). *Estudio de las Condiciones para la Micropropagación de Damiana Turnera diffusa*. México, D.F.: Tesis de Doctorado (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alcaraz-Melendez, L. &. (2004). Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Elsevier, Fitoterapia*, 696-701.
- Allende, R. G. (2 de Marzo de 2015). CONACYT, *Centro de Investigación y Desarrollo A.C.* Obtenido de <http://culiacan.ciad.edu.mx/cms/index.php/noticias-y-eventos/noticias-antiores/235-control-biologico-de-antracnosis-en-mango-patente-otorgada-a-investigadores-de-ciad-culiacan.html>
- Alonso, J. N. (2001). Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aillamiento de *Colletotrichum gloeosporioides* penz. obtenidos de frutos de mango (*mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 90-93.
- Antolovich, M. P. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989/1009.
- Arranz, S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española metodología para su determinación e identificación*. Madrid.
- Aulacio, M. P. (2 de mayo de 2013). *limpieza, desinfección, esterilización y antisepsia*. Obtenido de [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/08\\_Tema\\_14\\_Limpieza\\_\\_desinfecci%C3%B3n.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_14_Limpieza__desinfecci%C3%B3n.pdf)
- Avelino, F. C. (2011). Actividad antiproliferativa de *Turnera diffusa* Willd. *XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 1.
- Bennett, R. M. (2004). Profiling glucosinolates, flavonoids, alkaloids and other secondary metabolites in tissues of *Azima tetraantha* L. (Salvadoraceae). *Jurnal. Agric. Food Chemistry*, 52, 5856-5862.
- C., R. N. (1989). *Baja California, plant field guide*. E.U.A.: La Joya.
- Cacace, J. E. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 939-946.
- Carril, A. Á.-U. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 119-145.
- Castagnino, J. M. (2000). Electroforesis capilar. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 25(1), 13-32.
- Castanon, M., Steyertha, N., & J., C. (2006). Aplicación de un método de electroforesis capilar al estudio de la glicosilación de albúmina in vitro. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40(4), 473-482.

- Castillo, A. R. (2005). *Fundamentos de Electroforesis Capilar*. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castillo, R. A., Revilla, V. A., & López A., R. &. (2005). *Fudamentos de electroforesis capilar*. México: UNAM.
- Cela, R. L. (2002). *Técnicas de separación en Química Analítica*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación en discapacidad*, 1(2), 86-89.
- Considine D.M., & Considine G.D. (1983). *Foods and food production encyclopedia*. New York: Van Nostrand Reynold company.
- David, H. N. (1997). High performance Capillary electrophoresis. Francia: Hewlett Packard Company.
- Debón, R. B. (2011). Caracterización de los efectos biológicos de los polifenoles en la inflamación y el metabolismo: nuevas perspectivas nutricionales. *Universitat Rovira*.
- Deshpande, S. C. (1985). *Journal of Food Science* 50, 905.
- Doroteo, M. C. (12 de Septiembre de 2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Tecnología en salud*, 2, 86-89. Obtenido de Tecnología y salud: <http://www.medigraphic.com/rid>
- Ferrara, B. M. (15 de mayo de 2013). *Almohada herbal*. Obtenido de [http://www.almohadaherbal.com/boletin\\_1\\_damiana.htm](http://www.almohadaherbal.com/boletin_1_damiana.htm)
- Georgé, S. B. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.
- González, J. F. (2010). *Caracterizacion de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (Salvia hispánica L.) mediante electroforesis capilar*. México: IPN.
- Handique, J., & Baruah, J. (2002). Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Funtional Polymers*, 163-188.
- Harborne, G. R. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37(1): 19-42.
- Heiger, D. (2000). High performance capillary electrophoresis: An introduction. Alemania: Agile Technologies.
- Hellström, J. K. (2008). HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7617-7624.
- Henrique, D. C. (2009). Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant Staphylococcus aureus by Turnera ulmifolia L. *BioMed central*, 1-4.
- Hernández. (2014). *Tesis de Licenciatura: Caracterización y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en semillas y aceite de chía (Salvia hispánica)*. Mexico: UNAM, FES-Cuautitlán.



- Hernández, C. (5 de Enero de 2015). Evaluación del potencial antifúngico de extractos vegetales crudos en la germinación de esporas de *Colletotrichum gloeoporioides* (Penz). Youtepec , Morelos.
- Howard, L. R. (2003). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18), 5207-5213.
- Hu, M. (2010). Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *molecular pharmaceutics*, 803-806.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits an vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Ikawa, M., Schafer, T., & Dollard, C. y. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1811-1815.
- INEGI . (10 de Junio de 2014). *Cuéntame*. Obtenido de [cuentame.inegi.org.mx](http://cuentame.inegi.org.mx)
- J.G. Handique, J. B. (2002). Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Funtional Polymers*, 163-188.
- Jianping Zhaoa, A. K. (2008). Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *Journal of Ethnopharmacology*, 387-393.
- Jiménez, P. G. (2012). Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin-Ciocalteu. En *Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Jorgenson, K. L. (1981). Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries: Preliminary Data on Performance. *Journal of High Resolution Chromatography*, 4,230-231.
- Ju, Z. Y. (2003a). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207-5213.
- Ju, Z., & Howard, L. (2003 a). Effects os solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin.
- Khanna, S. K. (1968). Extraction of .
- Khanna, S., Viswanathan, P., Krishnan, P., & Sanwal, G. G. (1980). Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry total phenolics in the presence of reducing agents*, 7(9), 1513-1517.
- Krygier, K. S. (1982a). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330-334.
- Ma. Araceli Gacía, E. S. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. Distrito Federal: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.
- Maria A. Gacía, E. S. (2002). *Guía de Validación Métodos Analíticos*. Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biologos. A.C.

- Mattarei, A. B. (2008). A Mitochondriotropic Derivative of Quercetin: A Strategy to Increase the Effectiveness of Polyphenols. *Full papers*, 2633-2642.
- Melendez, L. A. (2006). Comercialización de una planta de desierto: Damiana (*Turnera diffusa*). *Revista Mexicana de Agronegocios*, 1-13.
- Meléndez, L. V. (2006). Comercialización de una planta del desierto: Damiana (*Turnera diffusa*). *Revista Mexicana de Agronegocios*, 1-13.
- Nacz, M. S. (1992). Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. *Food Chemistry*, 45(1), 51-54.
- Okuda, T. Y. (1990). Oligomeric hydrolyzable tannins, a new class of plant polyphenols. *Heterocycles*, 30(2), 1195-1218.
- Oliveira, R. M. (18 de Enero de 2014). Obtenido de [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_plagas%2FBSVP-31-04-531-548.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_plagas%2FBSVP-31-04-531-548.pdf)
- OMS. (2003). Medicina Tradicional. En 5. a. Salud, *Informe de la Secretaria* (págs. 1-3).
- Pérez, L. S. (2003). Caracterización Morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24-35.
- Piacente, S. C. (2002). Flavonoids and arbutin from *Turnera diffusa*. *Z Naturforsch*, 11-12, 983-985.
- Piacente, S., Camargo, E., & Zampelli, A. (2002). Flavonoids and Arbutin from *Turnera diffusa*. *Naturforsch*, 983-985.
- PREGO M, D. J. (1999). Actividad antifúngica de la capsicina frente a varios hongos fitopatógenos. *Memorias XIII Reunión Nacional de Sociedad Española de Fisiología Vegetal*, 155-159.
- R. A. Ames, J. M. (2000). CE applications for food analysis in: Capillary electrophoresis for food analysis: Method development. *The Royal Society of Chemistry*, 67.
- Raj, K. S. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 2-16.
- Raj, N. M., R., S., Chaluvadi, M., & Krishina. (2001). Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical, Effects and Therapeutic Potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33(2), 2-16.
- Rivière, C. V. (2009). Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfeanus*. *Phytochemistry*, 70, 86-94.
- Rizner Hras, A. H. (200). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 229-333 (71).
- Roa, C. K. (2005). "Determinación de especies de glutatión por Electroforesis Capilar en plantas bajo estrés de cobre". Chile : Universidad de Chile .

- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: and overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 97-105.
- Rodríguez, R. (2010). *Estudio de compuestos ulceroso sus metabolitos y productos de degradación por lectroforesis capilar*. Real.
- Salazar, R. P. (2008). Determination of the Antioxidant Activity of Plants from Northeast Mexico. *informa healthcare*, 166-170.
- Salud, S. d. (2012). NORMA Oficial Mexicana NOM-248-SSA1-2011, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de remedios herbolarios. *DIARIO OFICIAL*, 1-22.
- Sandoval, G. (1982). *La Damiana (Turnera diffusa Willd.). Una Revisión Bibliográfica y Experiencias en su Aprovechamiento e Inducción al Cultivo*. México: Tesis Profesional (Ing. Agrónomo Especialista en Fitotecnia) Universidad Nacional autónoma de Chapingo.
- Shahidi, F. N. (1991). Chemical composition and . *Food Chemistry*, 42(2), 145-151.
- Sharron G. Penn, H. H. (1997). Direct Analysis of sugar Alcohol Borate Complexes in Plant Extracts by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transfor Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 69, 2471-2477.
- Singleton, V. O.-R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Follin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*, 299, 152-178.
- Skoog, D. A. (2010). *Fundamentos de química analítica*. México Distrito Federal: Cengage Learning.
- UNAM. (1 de Junio de 2015). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Obtenido de Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=damiana&id=7387>
- Vallejo, C., & Vargas, M. M. (2007). Capillary electrophoresis applications for food analysis. Cap. 30 pp 1-53.
- Villasana, D. ., (10 de Marzo de 2013). *Cienciacierta*. Obtenido de posgradoeinvestigacion.uadec.mx
- Woljgast, J. E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food research international*, 33(200), 423-447.
- YH Wang, B. A. (2009). Quantitative Determination of  $\beta$ -Arbutin and Seven Flavonoids from *Turnera diffusa* (Damiana) Extracts and Dietary Supplements Claiming to Contain Damiana by Using HPLC-UV Method. *Plnata Med*, 75-76.
- Zhao, J. P. (2007). Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. *Research Institute of Pharmaceutical Sciences*, 289-292.

# Capítulo 8

## Anexos

# 8.1. Anexo A

## 8.1.1. Índice de tablas

TABLA 1. TAXONOMÍA.....	14
TABLA 2. TAXONOMÍA DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> . ....	19
TABLA 3. ESTRUCTURA DE ALGUNOS POLIFENOLES EXTRAÍBLES. ....	23
TABLA 4 . SISTEMAS DE PRUEBAS IN-VITRO SOBRE EL MICROORGANISMO DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> .....	45
TABLA 5. LAVADO RUTINARIO DE COLUMNA CAPILAR EN EC AL INICIO DEL DÍA .....	45
TABLA 6. CONDICIONES UTILIZADAS PARA LA SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA POR LA TÉCNICA DE EC. ....	46
TABLA 7. RESULTADOS <i>IN-VITRO</i> DE LA INHIBICIÓN EN EL CRECIMIENTO DEL M.O. FITOPATÓGENO AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS EN FRUTOS EN MEDIO PDF ENVENENADO CON EXTRACTO DEL DAMIANA. ....	53
TABLA 8. PORCENTAJE DE DISOLVENTE PARA LA EXTRACCIÓN DE FENOLES EN DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA .....	54
TABLA 9. DIFERENTES MÉTODOS ESTUDIADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES DE <i>TURNERA DIFFUSA</i> .....	55
TABLA 10. CONDICIONES ÓPTIMAS ELECTROFORÉTICAS EN EL ANÁLISIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) .....	58
TABLA 11. ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS.....	56
TABLA 12. PLANEACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS POLIFENOLES .....	61
TABLA 13. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN, EXPRESADA COMO LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (DER%) DE LOS TIEMPOS DE MIGRACIÓN Y ÁREAS BAJO LA CURVA DE LAS SEÑALES DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE FENOLES Y ÁCIDO BENZOICO.....	62
TABLA 14. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN, EXPRESADA COMO LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (DER%) DE LOS TIEMPOS DE MIGRACIÓN Y ÁREAS BAJO LA CURVA DE LAS SEÑALES DE UNA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE FENOLES Y ÁCIDO BENZOICO.....	63
TABLA 15. INTERVALOS DE CONFIANZA (IC) EN PENDIENTES (M) DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LOS POLIFENOLES Y EL ÁCIDO ASCÓRBICO. ....	64
TABLA 16. CUANTIFICACIÓN SOBRE 100G DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA.....	65
TABLA 17. TABLA GLOBAL DE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS EN LA PREVALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) .....	66
TABLA 18. ANÁLISIS FÍSICO DE COMPARACIÓN DE MUESTRAS COMERCIALES DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA SOBRE AUTENTICA DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA .....	68
TABLA 19. CUANTIFICACIÓN DE LA APLICACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA Y SU CRITERIO DE CALIDAD. <i>ND= NO DETECTABLE DENTRO DE LOS INTERVALOS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN</i> .....	70
TABLA 20. RESUMEN DEL RESULTADOS DE LAS PRUEBAS QUÍMICA Y ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA AUTENTICIDAD DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA EN PRODUCTOS COMERCIALES.....	75
TABLA 21. ESTÁNDARES UTILIZADOS PARA LA EXPERIMENTACIÓN DEL ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) .....	94
TABLA 22. ABSORBANCIA DE LAS MUESTRA DE DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) .....	96
TABLA 23. PRECISIÓN DE SISTEMA DEL COMPUESTO DE ARBUTINA .....	101
TABLA 24. PRECISIÓN DE SISTEMA DEL COMPUESTO RUTINA .....	102
TABLA 25. PRECISIÓN DE SISTEMA DEL COMPUESTO DE VAINILLINA .....	102
TABLA 26. PRECISIÓN DE SISTEMA DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO .....	103
TABLA 27. PRECISIÓN DE SISTEMA DEL COMPUESTO DE APIGENINA .....	103
TABLA 28. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR ARBUTINA .....	104
TABLA 29. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR RUTINA .....	105

TABLA 30. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR VAINILLINA .....	106
TABLA 31. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR ÁCIDO ASCÓRBICO .....	107
TABLA 32. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR ÁCIDO ASCÓRBICO .....	108
TABLA 33. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE ARBUTINA EN EL PRODUCTO DE "OASIS" .....	109
TABLA 34. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE RUTINA EN EL PRODUCTO DE "OASIS" .....	110
TABLA 35. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE VAINILLINA EN EL PRODUCTO DE "OASIS" .....	111
TABLA 36. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL PRODUCTO DE "OASIS" .....	112
TABLA 37. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL PRODUCTO DE "OASIS" .....	113
TABLA 38. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE ARBUTINA EN EL PRODUCTO DE "AZTECA" .....	114
TABLA 39. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE RUTINA EN EL PRODUCTO DE "AZTECA" .....	115
TABLA 40. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE VAINILLINA EN EL PRODUCTO DE "AZTECA" .....	116
TABLA 41. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL PRODUCTO DE "AZTECA" .....	117
TABLA 42. RÉPLICAS DEL COMPUESTO DE APIGENINA EN EL PRODUCTO DE "AZTECA" .....	118

## 8.1.2. Índice de figuras

FIGURA 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ).....	16
FIGURA 2. DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ).....	16
FIGURA 3. FRUTOS CON ANTRACNOSIS ( <i>COLLETOTRICHUM GLOESOSPORIOIDES</i> ).....	19
FIGURA 4. CLASIFICACIÓN DE POLIFENOLES.....	21
FIGURA 5. ESQUEMA DE ANTIOXIDANTE Y RADICAL LIBRE .....	28
FIGURA 6. REACCIÓN QUÍMICA DEL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU.....	30
FIGURA 7. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA .....	34
FIGURA 8. EQUIPO Y SISTEMA GENERAL DE ELECTROFORESIS CAPILAR.....	34
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN DE LOS ELEMENTOS DEL SISTEMA CE.....	35
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN DEL FLUJO ELECTROSMÓTICO EN UN CAPILAR DE SÍLICE .....	35
FIGURA 11. DESARROLLO DEL FEO EN UN CAPILAR DE SÍLICE, A) SEPARACIÓN RELACIÓN CARGA-MASA, B) MOVILIDAD DE LOS ANALITOS, C) REPRESENTACIÓN DE LA DOBLE CAPA ELÉCTRICA.....	37
FIGURA 12. CORTE TRANSVERSAL DE CAPILAR DE SÍLICE FUNDIDA.....	38
FIGURA 13. DETECTOR UV-VIS CON ARREGLO DE DIODOS (DAD) .....	39
FIGURA 14. MUESTRA SECA Y MOLIDA DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) .....	41
FIGURA 15. ESTÁNDARES PRIMARIOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS .....	43
FIGURA 16. INOCULACIÓN DEL MEDIO ENVENENADO DE EXTRACTO DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ).....	52
FIGURA 17. ELECTROFEROGRAMA DEL EXTRACTO DE DAMIANA REALIZADO CON DIFERENTES PROPORCIONES DE UNA MEZCLA ETANOL:AGUA. A. ETANOL:AGUA(0:100), B(20:80), C(40:60) Y D(70:30).....	55
FIGURA 18. ELECTROFEROGRAMAS DE EXTRACTOS DE DAMIANA OBTENIDOS USANDO LA MEZCLA DE DISOLVENTES SELECCIONADA (ETANOL-AGUA 70:30) Y LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN: A. CALENTAMIENTO A 60 °C CON AGITACIÓN POR 1H, B. MACERACIÓN CON AGITACIÓN 8 HORAS, C. SONICACIÓN POR 90 MIN.....	56
FIGURA 19. HUELLA DIGITAL CARACTERÍSTICA DEL EXTRACTO DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA OBTENIDA BAJO LAS CONDICIONES ÓPTIMAS SELECCIONADAS: DISOLVENTE ETANOL: AGUA (70:30) Y UTILIZANDO ULTRASONIDO (90 MIN) COMO MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....	57
FIGURA 20. ELECTROFEROGRAMA DE LA COMPARACIÓN DE: A. LA MEZCLA DE ESTÁNDARES DE POLIFENOLES EN UNA MEZCLA DE ETANOL:AGUA (70:30) Y B. EL PERFIL DEL EXTRACTO DE <i>TURNERA DIFFUSA</i> . .....	59
FIGURA 21. ELECTROFEROGRAMA DE LA IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES POLIFENOLES EN LOS EXTRACTOS DE <i>TURNERA DIFFUSA</i> POR EC .....	55
FIGURA 22. ESTRUCTURA DEL ÁCIDO BENZOICO .....	57
FIGURA 23. ELECTROFEROGRAMA DEL PARÁMETRO DE ESPECIFICIDAD A) MEZCLA DE ESTÁNDARES, B) DILUENTE (ETANOL: AGUA 70:30).....	59
FIGURA 24. MUESTRAS COMERCIALES HERBOLARIAS DE DAMIANA DE BAJA CALIFORNIA EN DONDE: A) MUESTRA AUTÉNTICA DE DAMIANA B) CÁPSULAS OASIS C) TÉ CALAFIA D) TÉ AZTECA .....	67
FIGURA 25. PRODUCTOS COMERCIALES HERBOLARIOS DE DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) ESTUDIADOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD.....	68
FIGURA 26. ELECTROFEROGRAMA DE APLICACIÓN DEL MÉTODO DE DAMIANA CON REMEDIOS COMERCIALES. LOS POLIFENOLES ENCONTRADOS SE PUEDEN IDENTIFICAR POR SUS TIEMPOS DE MIGRACIÓN Y POR QUÉ ESTÁN IDENTIFICADOS EN ÓVALOS DE DIFERENTES COLORES ARBUTINA, RUTINA, VAINILLINA, ÁCIDO ASCÓRBICO, APIGENINA .....	69
FIGURA 27. DIAGRAMAS DE CAJA CON BIGOTE QUE RESUMEN EL ANÁLISIS DE VARIANZA REALIZADO A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE POLIFENOLES REALIZADO (N=6) A LAS MUESTRAS COMERCIALES TÉ AZTECA Y CÁPSULAS OASIS Y SU COMPARACIÓN CON LA DAMIANA AUTÉNTICA (N=3). NO SE PRESENTAN RESULTADOS PARA EL TÉ CALAFIA, YA QUE NO CONTIENE NINGÚN POLIFENOL DE LOS IDENTIFICADOS EN LA DAMIANA AUTÉNTICA.....	71

FIGURA 28. ANÁLISIS DE CLUSTERS USANDO COMO RESPUESTA LA CONCENTRACIÓN DE CADA POLIFENOL Y COMO FACTOR EL TIPO DE MUESTRA. CONDICIONES: MÉTODO DE WARD, DISTANCIA EUCLIDEA. ....	73
FIGURA 29. ANÁLISIS DE CLUSTERS USANDO COMO RESPUESTA LA CONCENTRACIÓN DE ARBUTINA Y APIGENINA Y COMO FACTOR EL TIPO DE MUESTRA. CONDICIONES: MÉTODO DE WARD, DISTANCIA EUCLIDEA. ....	74
FIGURA 30. COMPARACIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE SEÑAL ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO DE DAMIANA CON ADICIÓN DE ESTÁNDAR DE APIGENINA. ....	97
FIGURA 31. COMPARACIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE SEÑAL ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO DE DAMIANA CON ADICIÓN DE ESTÁNDAR DEL ÁCIDO ASCÓRBICO. ....	98
FIGURA 32. COMPARACIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE SEÑAL ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO DE DAMIANA CON ADICIÓN DE ESTÁNDAR DEL ÁCIDO VAINILLINA. ....	99
FIGURA 33. COMPARACIÓN DE IDENTIFICACIÓN DE SEÑAL ELECTROFORÉTICA DEL EXTRACTO DE DAMIANA CON ADICIÓN DE ESTÁNDAR DE RUTINA .....	100



### 8.1.3. Índice de gráficos

GRÁFICO 1. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES DE DAMIANA ( <i>TURNERA DIFFUSA</i> ) DE DIFERENTES ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA .....	50
GRÁFICO 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE FENOLES TOTALES .....	96
GRÁFICO 3. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ARBUTINA .....	104
GRÁFICO 4. GRÁFICO DE RESIDUALES DE LA LINEALIDAD DE SISTEMA PARA LA RELACIÓN DE ÁREAS ARBUTINA/SI .....	104
GRÁFICO 5. CURVA DE CALIBRACIÓN DE RUTINA .....	105
GRÁFICO 6. GRÁFICO DE RESIDUALES DE LA LINEALIDAD DE SISTEMA PARA LA RELACIÓN DE ÁREAS RUTINA/SI.....	105
GRÁFICO 7. CURVA DE CALIBRACIÓN DE VAINILLINA.....	106
GRÁFICO 8. GRÁFICO DE RESIDUALES DE LA LINEALIDAD DE SISTEMA PARA LA RELACIÓN DE ÁREAS VAINILLINA/SI .....	106
GRÁFICO 9. CURVA DE CALIBRACIÓN ÁCIDO ASCÓRBICO .....	107
GRÁFICO 10. GRÁFICO DE RESIDUALES DE LA LINEALIDAD DE SISTEMA PARA LA RELACIÓN DE ÁREAS VAINILLINA/SI .....	107
GRÁFICO 11. CURVA DE CALIBRACIÓN APIGENINA .....	108
GRÁFICO 12. GRÁFICO DE RESIDUALES DE LA LINEALIDAD DE SISTEMA PARA LA RELACIÓN DE ÁREAS VAINILLINA/SI .....	108
GRÁFICO 13. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE ARBUTINA DEL PRODUCTO “EL OASIS” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN .	109
GRÁFICO 14. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE ARBUTINA DEL PRODUCTO “EL OASIS” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN .	110
GRÁFICO 15. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE VAINILLINA DEL PRODUCTO “EL OASIS” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	111
GRÁFICO 16. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL PRODUCTO “EL OASIS” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	112
GRÁFICO 17. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE APIGENINA DEL PRODUCTO “EL OASIS” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN	113
GRÁFICO 18. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE ARBUTINA DEL PRODUCTO “AZTECA” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN...	114
GRÁFICO 19. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE RUTINA DEL PRODUCTO “AZTECA” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	115
GRÁFICO 20. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE VAINILLINA DEL PRODUCTO “AZTECA” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN..	116
GRÁFICO 21. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE ÁCIDO ASCÓRBICO DEL PRODUCTO “AZTECA” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN .....	117
GRÁFICO 22. INTERPOLACIÓN DEL COMPUESTO DE APIGENINA DEL PRODUCTO “AZTECA” SOBRE LA CURVA DE CALIBRACIÓN..	118

### 8.1.4. Índice de ecuaciones

ECUACIÓN 1. VELOCIDAD DEL ANALITO .....	32
ECUACIÓN 2. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA. ....	32
ECUACIÓN 3. MOVILIDAD ELECTROOSMÓTICO .....	33
ECUACIÓN 4. LÍMITE DE DETECCIÓN.....	47
ECUACIÓN 5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	47
ECUACIÓN 6. CÁLCULO DE % DER.....	60

## 8.2. Anexo B

### 8.2.1 Hojas de registro del espécimen Damiana (Turnera diffusa)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA CARRERA DE BIOLOGÍA			
<b>FESI/IZTA/048/2012</b>			
<b>DRA. MARÍA GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ, LABORATORIO DE DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN-UNAM, P R E S E N T E .</b>			
<p>Por este conducto me permito agradecer a usted la donación de material botánico (muestras de mercado), respaldo del Proyecto CONACYT: <i>"Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y Microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas"</i>, realizado en el Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la cual es usted responsable. Así mismo, le informo que los ejemplares han sido integrados en la <b>Colección Etnobotánica</b> del Herbario Iztacala con los siguientes Números de Registro (se anexa listado).</p>			
<p>Sin otro particular, le envío un cordial saludo.</p>			
<b>ATENTAMENTE</b> <b>"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"</b> Los Reyes Iztacala, Edo. de México., 5 de octubre de 2012			
 <b>M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILAFRANCO</b> RESPONSABLE DEL HERBARIO			
	<p>Edificio de gobierno, primer piso Tel: 5623-1147 • 5623-1149 Fax: 5623-1149 Av. de los Barrios N.º 1, Los Reyes Iztacala, Tlalapualta, CP 54090, Estado de México, México.</p>	<p>Herbario IZTA Edificio 14, Planta baja Av. de los Barrios No. 1 Los Reyes Iztacala, Tlalapualta Estado de México, CP 54090 MÉXICO Tel/Fax: 5623-1378 herbario_izta@campus.iztacala.unam.mx</p>	



FESI/IZTA/048/2012

**NÚMEROS DE REGISTRO DEL PROYECTO CONACYT "Desarrollo de recubrimientos biorgánicos a partir de fitomoléculas de especies del Semidesierto Mexicano y Microorganismos antagonistas para alargar la vida de anaquel en frutas y hortalizas"**

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	NO. REGISTRO
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	VERBENACEAE	Orégano(1)	2115 IZTA
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	VERBENACEAE	Orégano(2)	2116 IZTA
<i>Cassia angustifolia</i> Vahl.	FABACEAE	Hoja Sen	2117 IZTA
<i>Larrea tridentata</i> (Moc. & Sessé ex DC.) Cov.	ZYGOPHYLLACEAE	Gobernadora	2118 IZTA
<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult	TURNERACEAE	Damiana (Baja California)	2119 IZTA
<i>Turnera</i> sp	TURNERACEAE	Damiana (San Luis)	2120 IZTA
<i>Turnera</i> sp	TURNERACEAE	Damiana (Guerrero)	2121 IZTA
<i>Jatropha</i> sp	EUPHORBIACEAE	Sangre de Drago	2122 IZTA



Edificio de gobierno, primer piso  
 Tel: 5623-1147 • 5623-1149  
 Fax: 5623-1149  
 Av. de los Barrios N.º 1, Los Reyes Iztacala,  
 Tlalnepantla, CP 54090,  
 Estado de México, México.

Herbario IZTA  
 Edificio L4, Planta baja  
 Av. de los Barrios No.1  
 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla  
 Estado de México, CP 54090 MÉXICO  
 Tel/Fax: 5623-1378  
 herbario\_izta@campus.iztacala.unam.mx



## 8.3. Anexo C

### 8.3.1 Metodología de soluciones

#### Solución Buffer de Boratos 50 mM

1. Pesar 1.8 g de reactivo de tetraborato de sodio
2. Disolver la cantidad pesada en 50 mL de H<sub>2</sub>O desionizada la en un vaso de precipitado de 100 mL.
3. Llevar a agitación magnética durante 10 minutos
4. Ajustar pH a 9.4 con NaOH 1M.
5. Transfiera a un matraz volumétrico de 100 mL y finalmente afore con H<sub>2</sub>O desionizada.

#### Análisis de polifenoles

Tabla 21. Estándares utilizados para la experimentación del Análisis de identificación de compuestos Damiana (*Turnera Diffusa*)

ESTÁNDAR	MARCA	ESTÁNDAR	MARCA
(-)-Epicatequina	Sigma Aldrich	apigenina	Sigma Aldrich
(+)-catequina	Sigma Aldrich	kaempferol	Sigma Aldrich
2-(4-hidroxifenil)etanol	Sigma Aldrich	miricetina	Sigma Aldrich
Ácido 2,5dihidroxibenzoico	Sigma Aldrich	naringina	Sigma Aldrich
Ácido 3,4dihidroxibenzoico	Sigma Aldrich	quercetina	Sigma Aldrich
Ácido ascórbico	Sigma Aldrich	resorcinol	Sigma Aldrich
ácido benzoico	J.T. Baker	resveratrol	Sigma Aldrich
ácido cafeíco	Sigma Aldrich	rutina	Sigma Aldrich
ácido gálico	Fluka	vainilina	Sigma Aldrich
ácido p-cumárico	Sigma Aldrich	p-coumarico acido	Fluka
ácido p-hidroxibenzoico	Sigma Aldrich	Ácido transinamico	Fluka
ácido siríngico	Sigma Aldrich		
ácido tánico	Sigma Aldrich		
ácido trans-cinámico	Sigma Aldrich		
ácido vanílico	Fluka		
Arbutina	Sigma Aldrich		

### **Solución de mezcla de estándares utilizados en el análisis de precisión:**

preparar 10 ml de la mezcla de polifenoles y ácido ascórbico adicionando 2.0 mL de Metanol y en seguida disolviendo con agua llevando al pesando la cantidad necesaria de cada estándar. Solución A

Los estándares pesados fueron los siguientes:

- Arbutina
- Rutina
- Ácido ascórbico
- Vainillina
- Acido benzoico (Estándar interno)
- Apigenina

### **Solución de estándar interno (IS) para la adición de la muestra**

Se preparó una solución de ácido benzoico a 2000 ppm pesando los miligramos necesarios para dicha concentración de estándar Interno, solubilizando en H<sub>2</sub>O desionizada. Solución B

### **Adición de estándar interno (IS) en la muestra**

Se adicionó al extracto etanólico de Damiana de Baja California 240µL de la solución B de IS.

### **Adición de estándar interno (IS) en mezcla de estándar utilizado en el análisis de precisión.**

Se adiciono a la solución A 1200 µL de la solución B

## 8.4. Anexo D

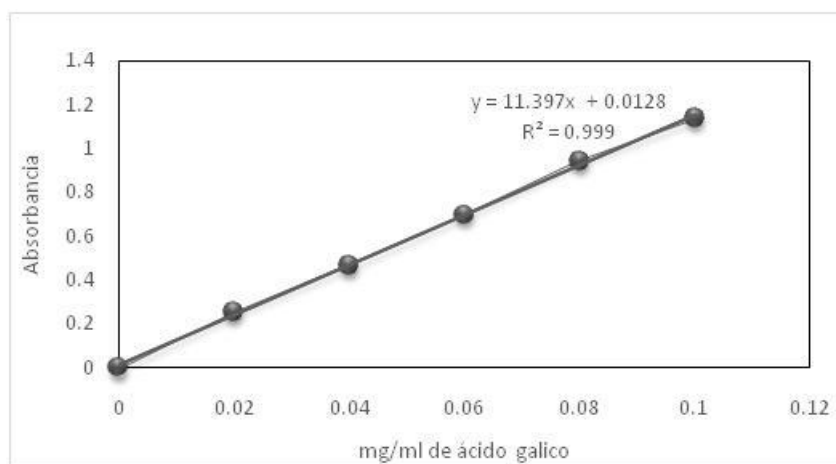


Gráfico 2. Curva de Calibración de Fenoles Totales

Tabla 22. Absorbancia de las muestra de Damiana (*Turnera diffusa*)

Muestras de Damiana <i>Turnera diffusa</i>											
	Replicas	Absorbancia	Conc. mg/g		Replicas	Absorbancia	Conc. mg/g		Replicas	Absorbancia	Conc. mg/g
Damiana de Baja California	1	0.381	3.231	Damiana de Guerrero	1	0.140	1.116	Damiana de San Luis Potosi	1	0.126	0.993
	2	0.452	3.854		2	0.132	1.046		2	0.146	1.169
	3	0.385	3.266		3	0.154	1.239		3	0.129	1.020
	PROM	0.406	3.450		PROM	0.142	1.134		PROM	0.134	1.061
	DE	0.040	0.350		DE	0.011	0.098		DE	0.011	0.095
	DER %	9.824	10.144		DER %	7.842	8.619		DER %	8.069	8.924

### 8.4.1. Identificaciones de compuestos de Damiana (*Turnera diffusa*) por fortificación de estándar.

#### Apigenina

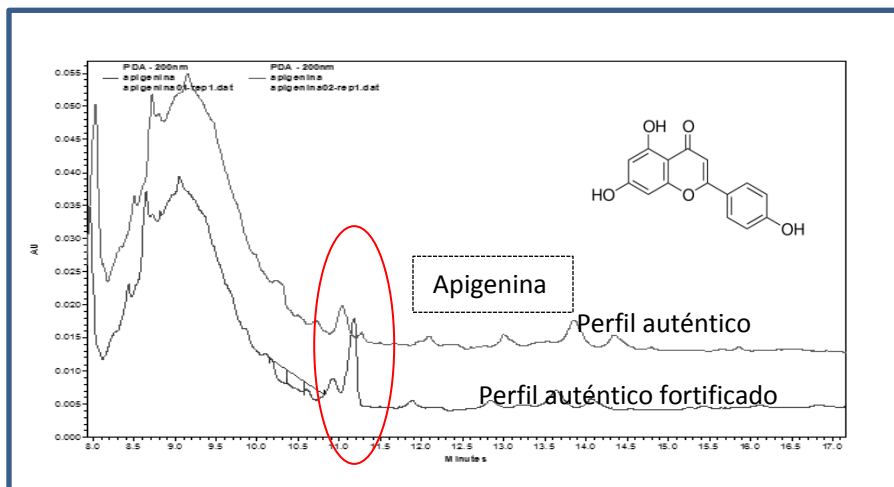
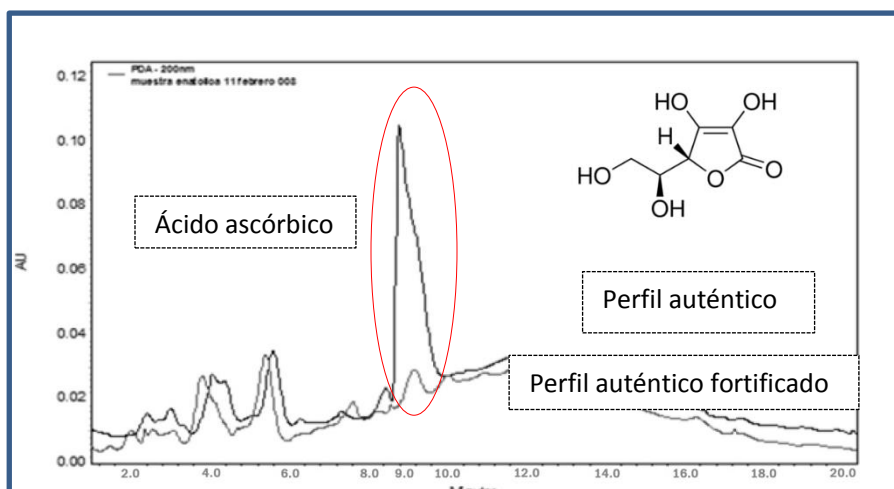


Figura 30. Comparación de identificación de señal electroforética del extracto de Damiana con adición de estándar de apigenina.

La identificación de apigenina en el perfil auténtico de Damiana de Baja California observado en la (figura 2) por la adición de un estándar primario (apigenina) muestra el crecimiento de la señal al minuto 11.2 tiempos de migración. Parte del trabajo de la identificación fue la adición de un estándar en el perfil auténtico observando el crecimiento de la señal en el perfil, realizar lecturas por triplicado para confirmar la identificación de señal aumentada y finalmente la comparación de espectros de absorción. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de apigenina en los extractos de etanol-agua (70:30) en el perfil auténtico de Damiana de Baja California.

## Ácido ascórbico



**Figura 31.** Comparación de identificación de señal electroforética del extracto de Damiana con adición de estándar del ácido ascórbico.

La identificación de apigenina en el perfil auténtico de Damiana de Baja California observado en la (figura 3) por la adición de un estándar primario (ácido ascórbico) muestra el crecimiento de la señal al minuto 9 tiempos de migración. Parte del trabajo de la identificación fue la adición de un estándar en el perfil auténtico observando el crecimiento de la señal en el I perfil, realizar lecturas por triplicado para confirmar la identificación de señal aumentada y finalmente la comparación de espectros de absorción. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia del ácido ascórbico en los extractos de etanol-agua (70:30) en el perfil auténtico de Damiana de Baja California.



## Vainillina

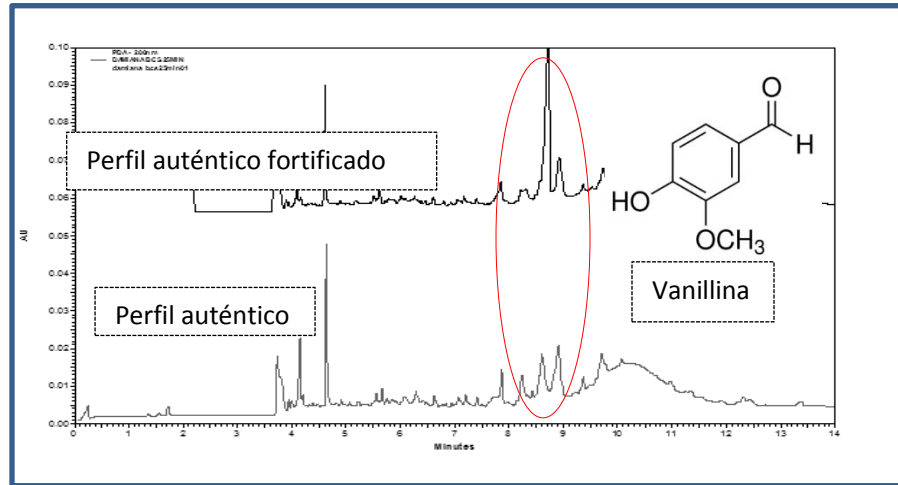


Figura 32. Comparación de identificación de señal electroforética del extracto de Damiana con adición de estándar del ácido Vainillina.

La identificación de apigenina en el perfil auténtico de Damiana de Baja California observado en la (figura 4) por la adición de un estándar primario (Vainillina) muestra el crecimiento de la señal al minuto 8.2 tiempo de migración. Parte del trabajo de la identificación fue la adición de un estándar en el perfil auténtico observando el crecimiento de la señal en el perfil, realizar lecturas por triplicado para confirmar la identificación de señal aumentada y finalmente la comparación de espectros de absorción. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de vainillina en los extractos de etanol-agua (70:30) en el perfil auténtico de Damiana de Baja California.

## Rutina

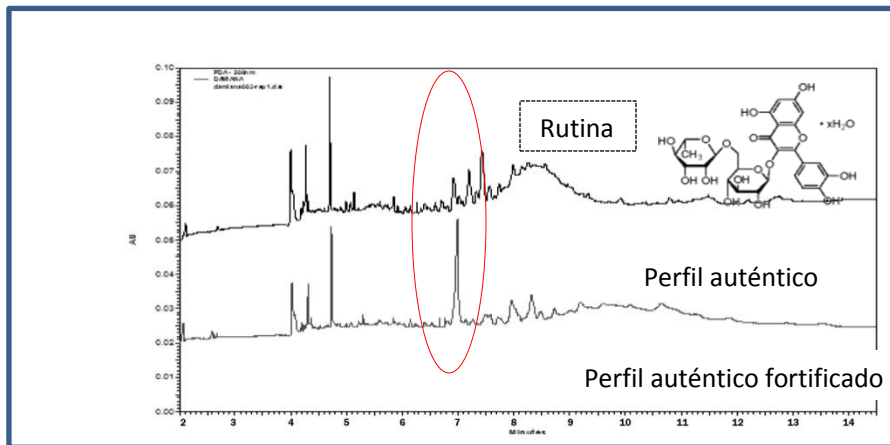


Figura 33. Comparación de identificación de señal electroforética del extracto de Damiana con adición de estándar de Rutina

La identificación de apigenina en el perfil auténtico de Damiana de Baja California observado en la (figura 5) por la adición de un estándar primario (Rutina) muestra el crecimiento de la señal al minuto 7.1 tiempo de migración. Parte del trabajo de la identificación fue la adición de un estándar en el perfil auténtico observando el crecimiento de la señal en el perfil, realizar lecturas por triplicado para confirmar la identificación de señal aumentada y finalmente la comparación de espectros de absorción. Por lo tanto de esta forma se confirma la presencia de vainillina en los extractos de etanol-agua (70:30) en el perfil auténtico de Damiana de Baja California.

## 8.4.2. Precisión de Sistema

Una vez establecidas las condiciones e identificados los compuestos en el extracto de Damiana de Baja California y escoger el Estándar Interno ideal se procedió a correr la mezcla de los estándares identificados para obtener sus tiempos de migración y evaluar la precisión en términos de la repetibilidad del método para lo cual se calculó el % de desviación estándar relativa (%DER) ó también conocido como coeficiente de variación según la siguiente fórmula:

$$\%DER = \frac{s}{X_{prom}} \cdot 100$$

En las siguientes tablas 23-27, se observan los tiempos de migración de cada uno de los 5 estándares (picos). Se obtiene la desviación estándar durante los 6 ensayos que se realizaron. El % DER coeficiente de variación no debía ser mayor al 3% que es lo deseable en cualquier método analítico para que este se estime, diciendo así que el método desarrollado en Electroforesis Capilar cuenta con repetibilidad.

### Arbutina

Tabla 23. Precisión de sistema del compuesto de Arbutina

x	TM	A S	A A/A EI
1	4.338	139872	0.2230
2	4.317	139541	0.2231
3	4.313	138970	0.2230
4	4.303	142821	0.2255
5	4.313	140028	0.2229
6	4.308	138711	0.2230
<b>PROM.</b>	4.3153	139990.5000	0.2234
<b>DE</b>	0.0121	1477.0084	0.0010
<b>%DER</b>	0.2806	1.0551	0.4627

\*Se inyectó la muestra por sextuplicado y se analizó %DER el cual debería ser <3%

## Rutina

Tabla 24. Precisión de sistema del compuesto Rutina

x	TM	A S	A A/A EI
1	7.154	134521	0.2145
2	7.138	134005	0.2143
3	7.133	133698	0.2146
4	7.129	138332	0.2184
5	7.138	134890	0.2147
6	7.129	133241	0.2142
<b>PROM.</b>	<i>7.13683333</i>	<i>134781.1667</i>	<i>0.2151</i>
<b>DE</b>	<i>0.00932559</i>	<i>1834.9794</i>	<i>0.0016</i>
<b>%DER</b>	<i>0.13066849</i>	<i>1.3615</i>	<i>0.7653</i>

\*Se inyectó la muestra por sextuplicado y se analizó %DER el cual debería ser <3%

## Vainillina

Tabla 25. Precisión de sistema del compuesto de Vainillina

x	TM	A S	A A/A EI
1	8.246	337422	0.5381
2	8.221	334901	0.5355
3	8.217	330458	0.5304
4	8.217	344590	0.5442
5	8.221	340012	0.5412
6	8.217	329725	0.5300
<b>PROM.</b>	<i>8.313</i>	<i>336184.6667</i>	<i>0.53655032</i>
<b>DE</b>	<i>0.01135635</i>	<i>5709.6218</i>	<i>0.00574037</i>
<b>%DER</b>	<i>0.13660952</i>	<i>1.6984</i>	<i>1.0698667</i>

\*Se inyectó la muestra por sextuplicado y se analizó %DER el cual debería ser <3%

## Ácido ascórbico

Tabla 26. Precisión de sistema del compuesto de Ácido ascórbico

x	TM	A S	A A/A EI
1	9.036	62970	0.1004
2	9.048	62875	0.1005
3	9.025	62543	0.1004
4	9	64807	0.1023
5	9.042	63114	0.1005
6	9.025	61995	0.0996
<b>PROM.</b>	<i>9.092</i>	<i>63050.6667</i>	<i>0.10062998</i>
<b>DE</b>	<i>0.01869492</i>	<i>948.4979</i>	<i>0.000898722</i>
<b>%DER</b>	<i>0.20561944</i>	<i>1.5043</i>	<i>0.893096149</i>

\*Se inyectó la muestra por sextuplicado y se analizó %DER el cual debería ser <3%

## Apigenina

Tabla 27. Precisión de sistema del compuesto de Apigenina

x	TM	A S	A A/A EI
1	12.08	58790	0.0937
2	11.95	57725	0.0923
3	11.904	57201	0.0918
4	11.854	59635	0.0942
5	11.958	58792	0.0936
6	11.921	57024	0.0917
<b>PROM.</b>	<i>12.093</i>	<i>58194.50</i>	<i>0.09287813</i>
<b>DE</b>	<i>0.07609928</i>	<i>1035.7808</i>	<i>0.00108812</i>
<b>% DER</b>	<i>0.6292837</i>	<i>1.7799</i>	<i>1.17155673</i>

\*Se inyectó la muestra por sextuplicado y se analizó %DER el cual debería ser <3%

### 8.4.3. Curvas de Calibración de los compuestos identificados

#### ARBUTINA

Tabla 28. Curva de Calibración del estándar Arbutina

ARBUTINA	X (mg/L)	AS	AS/SI
	400	50733	0.07895682
	400	49608	0.07874067
	400	46695	0.07473651
	800	89136	0.14295795
	800	91352	0.14383401
	800	93185	0.14503208
	1200	183515	0.29827906
	1200	180653	0.28558939
	1200	188730	0.29715082
	1600	234903	0.37673510
	1600	237363	0.38885448
	1600	240363	0.37253394
	2000	330709	0.53039717
	2000	325682	0.50688779
2000	322565	0.50916951	

Gráfico 3. Curva de Calibración de Arbutina

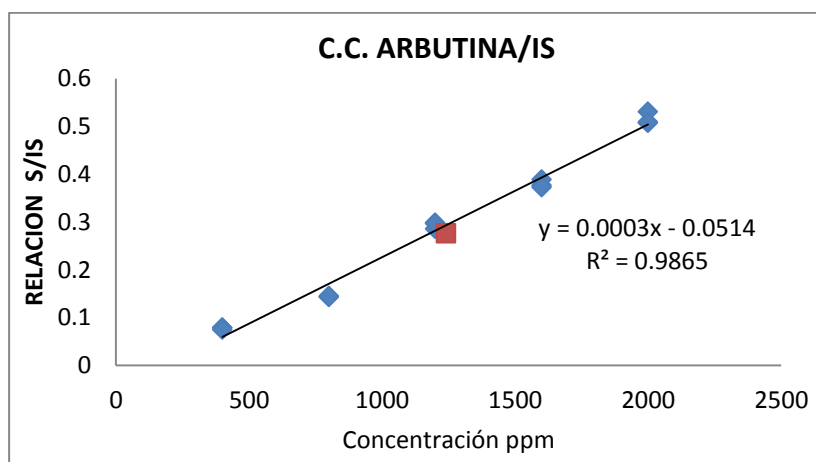
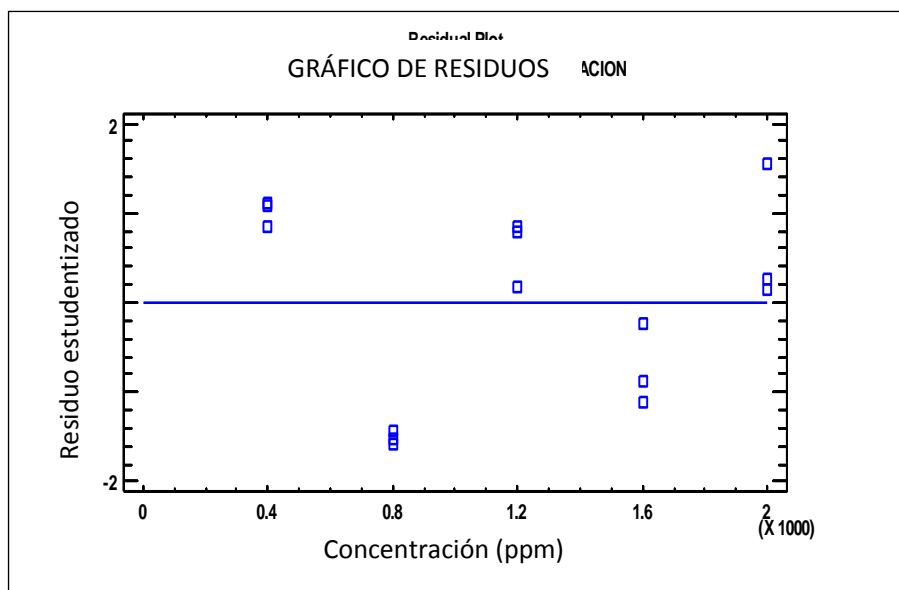


Gráfico 4. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas Arbutina/SI



## RUTINA

Tabla 29. Curva de Calibración del estándar Rutina

RUTINA	X (mg/L)	AS	AS/SI
	188	27256	0.04241908
	188	25052	0.03976394
	188	24652	0.03945614
	376	44313	0.07107000
	376	45962	0.07236731
	376	46231	0.07195341
	564	75970	0.12347906
	564	76126	0.12034552
	564	77585	0.12215571
	752	96626	0.15496782
	752	94252	0.15440618
	752	97233	0.15069954
	940	116556	0.18693465
	940	119592	0.18613164
940	117525	0.18551346	

Gráfico 5. Curva de Calibración de Rutina

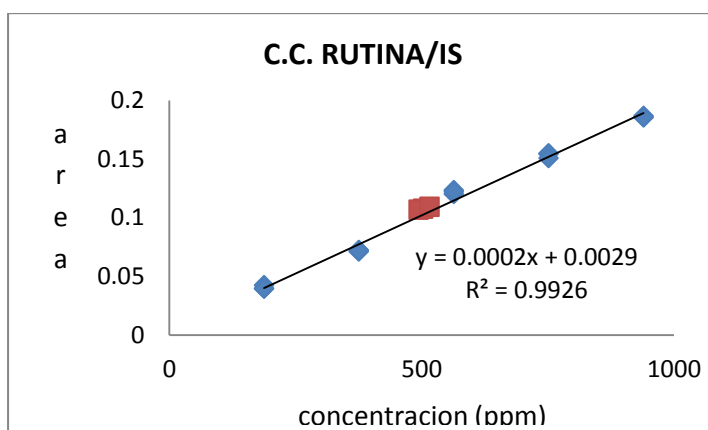
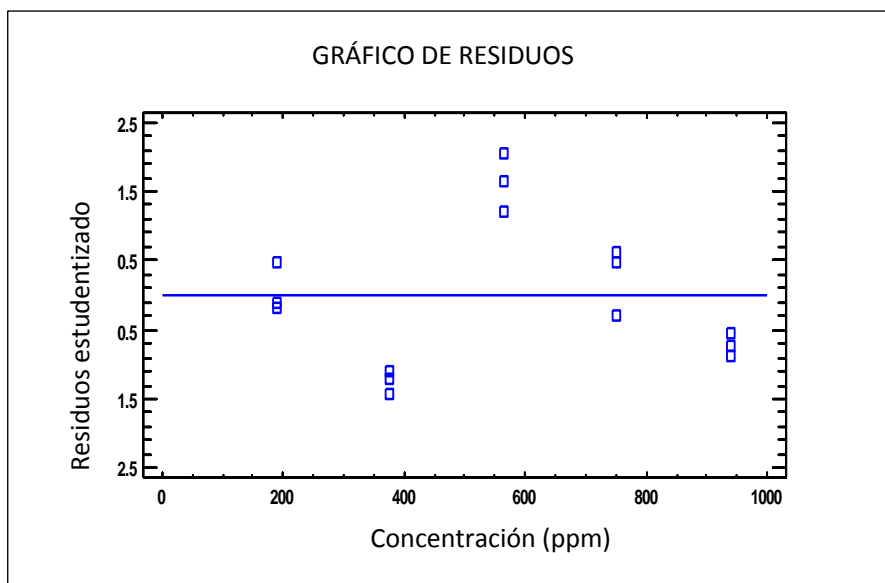


Gráfico 6. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas Rutina/SI



# VAINILLINA

Tabla 30. Curva de Calibración del estándar Vainillina

VAINILLINA	X (mg/L)	AS	AS/SI
	321.28	136041	0.2117234
	321.28	124550	0.1976927
	321.28	114989	0.1840427
	642.56	175416	0.2813354
	642.56	186433	0.2935393
	642.56	192817	0.3000982
	963.84	313944	0.5102739
	936.84	336443	0.5318735
	936.84	338199	0.5324861
	1285.12	439421	0.7047390
	1285.12	415216	0.6802180
	1285.12	451345	0.6995308
	1606.4	544271	0.8457822
	1606.4	540163	0.8407036
1606.4	522153	0.8242195	

Gráfico 7. Curva de Calibración de Vainillina

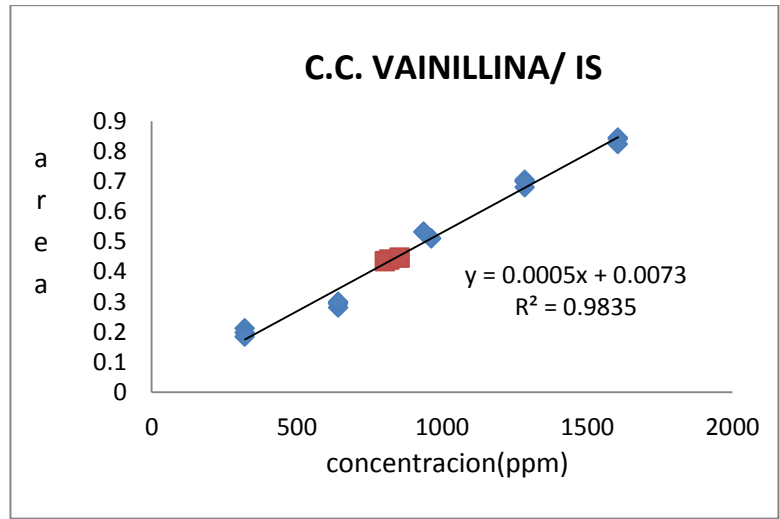
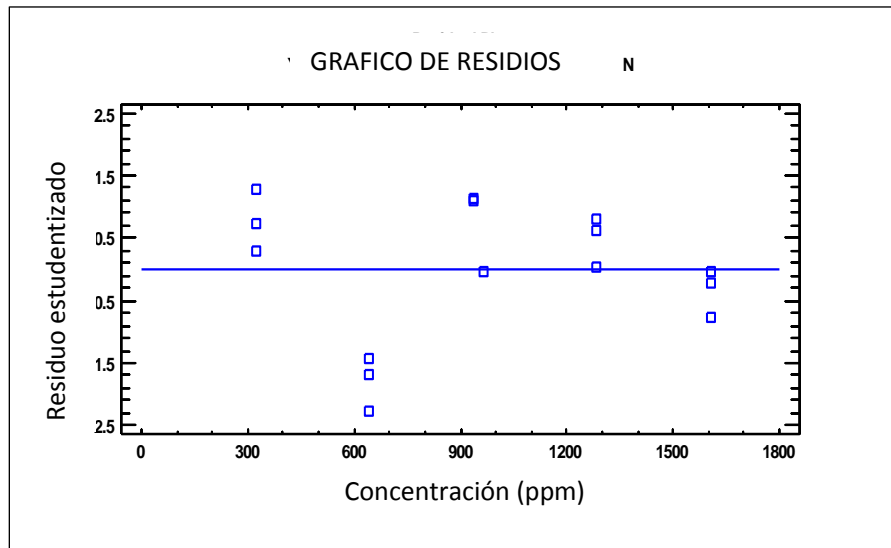


Gráfico 8. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas Vainillina/SI





## ÁCIDO ASCORBICO

Tabla 31. Curva de Calibración del estándar Ácido ascórbico

ACIDO ASCORBICO	X (mg/L)	AS	AS/SI
	332	13834	0.0215301
	332	12092	0.0191931
	332	11190	0.0179098
	664	26930	0.0431908
	664	28468	0.0448229
	664	29936	0.0465920
	996	54626	0.0887872
	996	55697	0.0880498
	996	55332	0.0871188
	1328	78256	0.1255061
	1328	72817	0.1192907
	1328	78838	0.1221894
	1660	105993	0.1699935
	1660	111571	0.1736478
1660	109692	0.1731490	

Gráfico 9. Curva de Calibración Ácido ascórbico

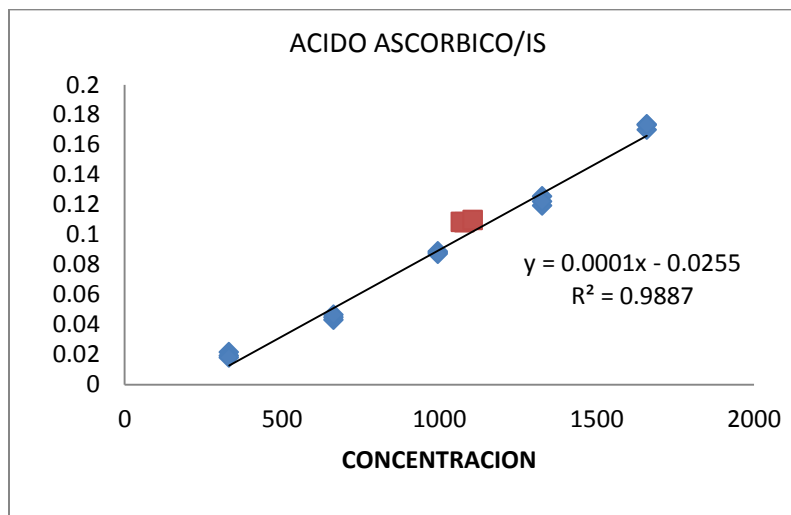
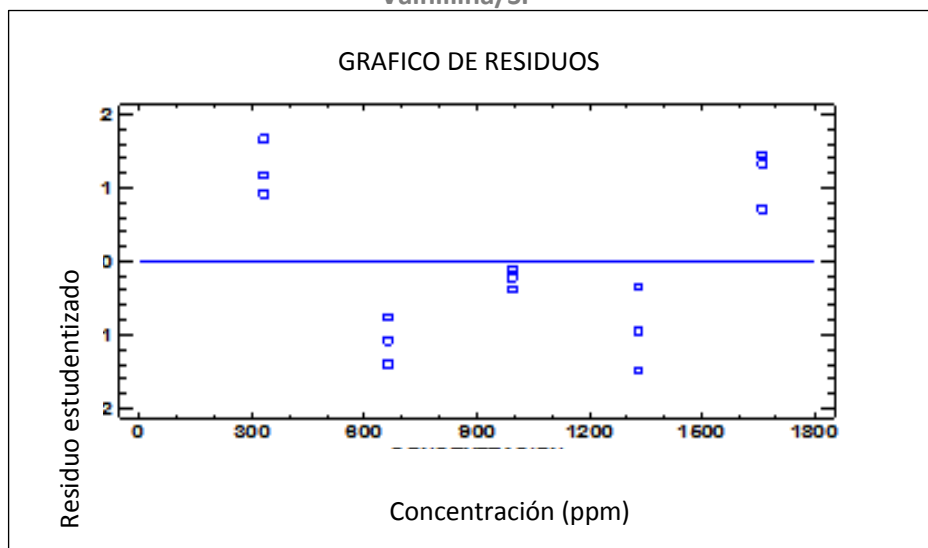


Gráfico 10. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas Vainillina/SI



## APIGENINA

Tabla 32. Curva de Calibración del estándar Ácido ascórbico

APIGENINA	X (ppm)	AS	AS/SI
	15.44	9383	0.0146029
	15.44	9265	0.0147059
	15.44	8552	0.0136876
	30.88	14066	0.0225593
	30.88	16602	0.0261399
	30.88	17766	0.0276508
	46.32	24252	0.0394183
	46.32	28026	0.0443055
	46.32	28341	0.0446222
	61.76	35932	0.0576273
	61.76	32621	0.0534406
	61.76	37532	0.0581701
	77.2	41621	0.0667525
77.2	46916	0.0730195	
77.2	45261	0.0714445	

Gráfico 11. Curva de Calibración Apigenina

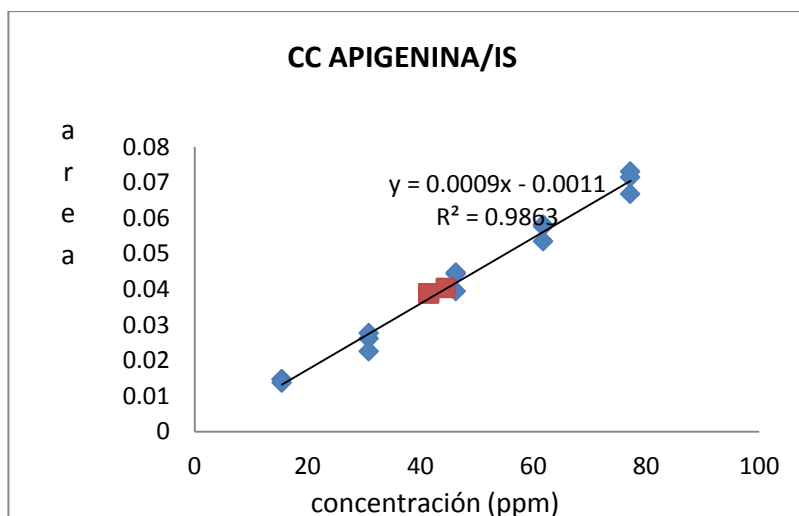
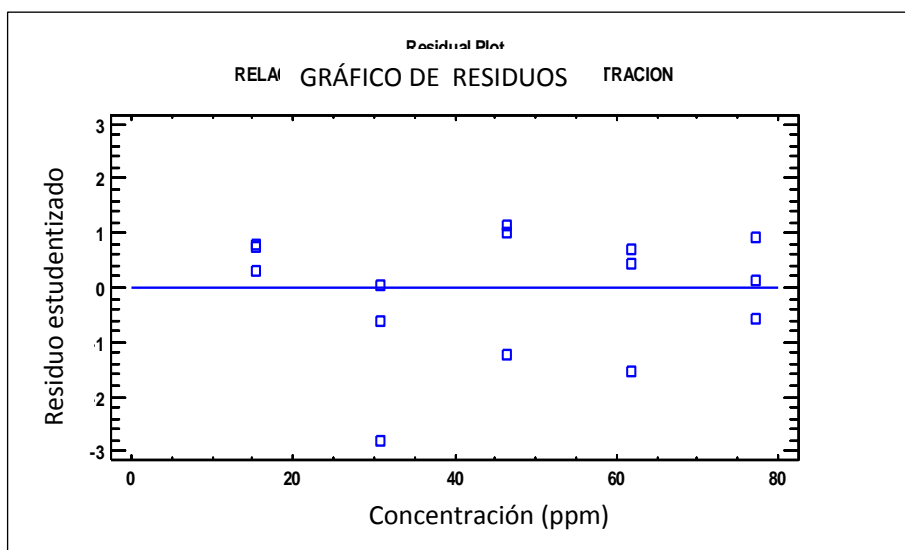


Gráfico 12. Gráfico de residuales de la linealidad de sistema para la relación de áreas Vainillina/SI



## 8.5. Anexo E

### 8.5.1. Interpolación de los compuestos identificados en los productos comerciales

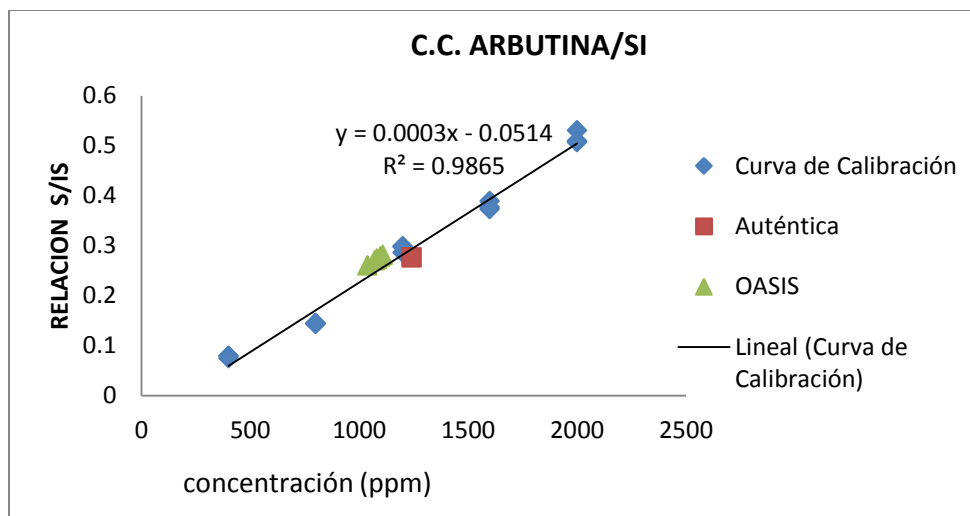
#### PRODUCTO COMERCIAL “EL OASIS”

##### Arbutina

Tabla 33. Réplicas del compuesto de Arbutina en el producto de “oasis”

	ARBUTINA	SI	AS/SI
	165298	635212	0.26022493
	176459	645213	0.27348953
	168522	623154	0.27043395
	176852	648421	0.27274255
	178965	643541	0.27809417
	185642	659875	0.28132904
<b>PROM.</b>	175289.667	642569.333	0.272
<b>DE</b>	7350.126	12431.787	0.007
<b>% DER</b>	4.193	1.934	2.669

Gráfico 13. Interpolación del Compuesto de Arbutina del producto “El Oasis” sobre la Curva de Calibración



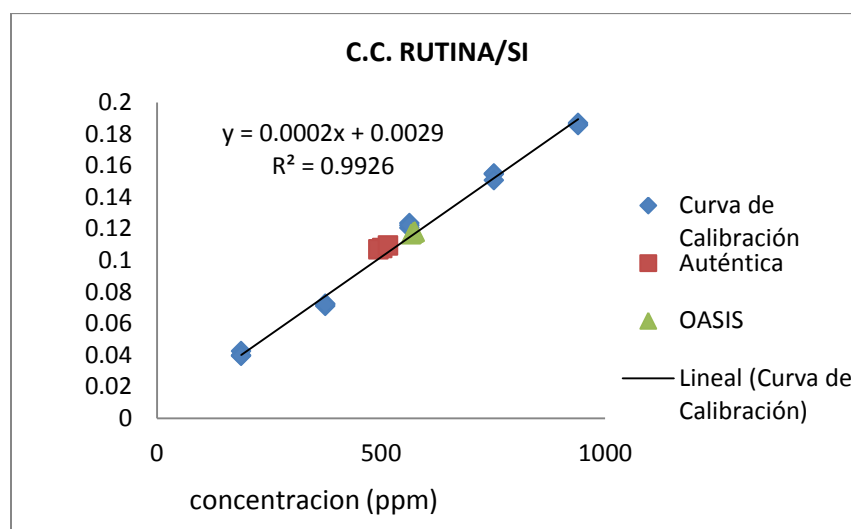
## PRODUCTO COMERCIAL “EL OASIS”

### Rutina

Tabla 34. Réplicas del compuesto de Rutina en el producto de “oasis”

	RUTINA	SI	AS/SI
	74568	635212	0.11739073
	75847	645213	0.11755343
	72659	623154	0.11659879
	75485	648421	0.11641356
	75826	643541	0.11782621
	77869	659875	0.11800568
<b>PROM.</b>	75375.6667	642569.333	0.11729807
<b>DE</b>	1713.83916	12431.7878	0.00065189
<b>% DER</b>	2.27373002	1.93469982	0.55575393

Gráfico 14. Interpolación del Compuesto de Arbutina del producto “El Oasis” sobre la Curva de Calibración



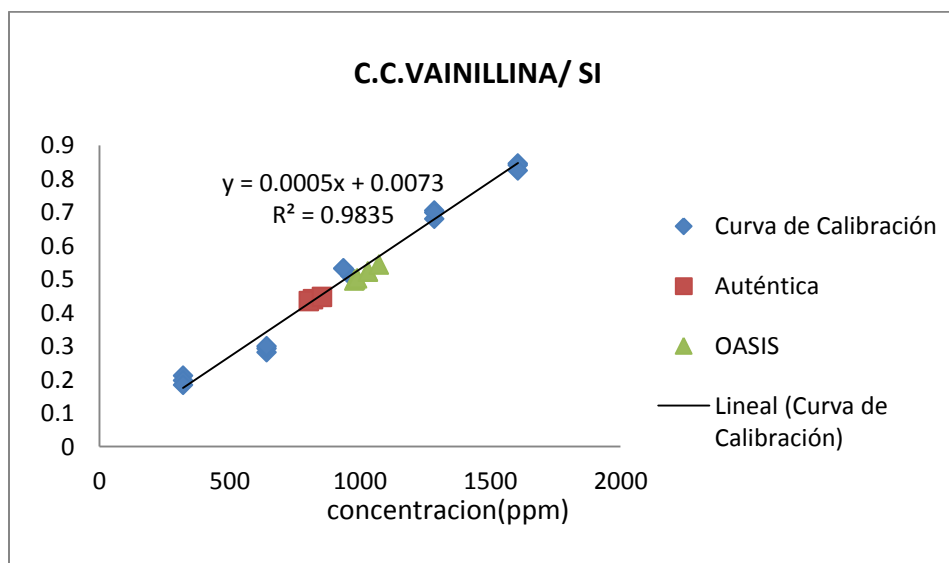
## PRODUCTO COMERCIAL “EL OASIS”

### Vainillina

Tabla 35. Réplicas del compuesto de Vainillina en el producto de “oasis”

	VAINILLINA	SI	AS/SI
	315264	635212	0.496313042
	321478	645213	0.498250965
	325468	623154	0.52229144
	325642	648421	0.502207671
	336596	643541	0.523037382
	358689	659875	0.543571131
<b>PROM.</b>	330522.833	642569.333	0.514278605
<b>DE</b>	15454.6509	12431.7878	0.018570557
<b>% DER</b>	4.67581945	1.93469982	3.610991545

Gráfico 15. Interpolación del Compuesto de Vainillina del producto “El Oasis” sobre la Curva de Calibración

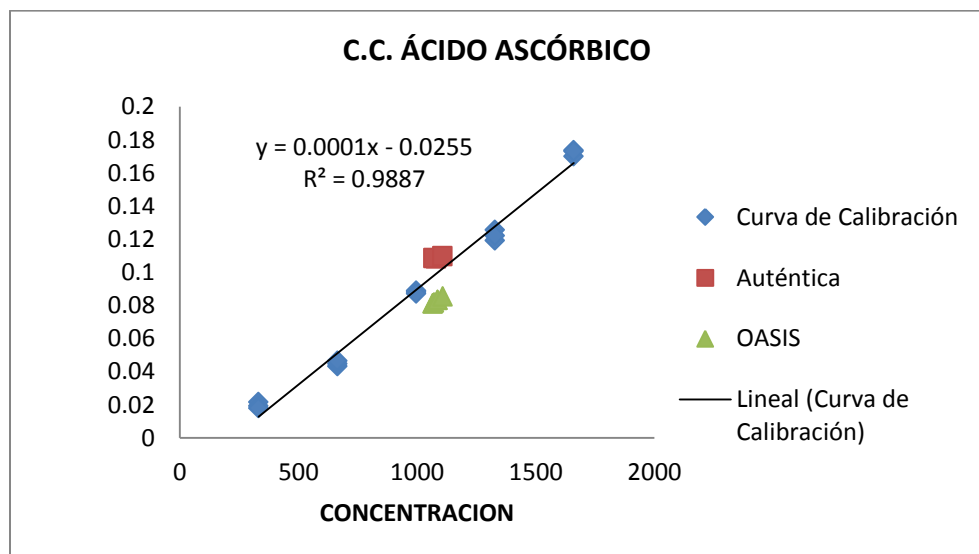


## Ácido ascórbico

Tabla 36. Réplicas del compuesto de Ácido ascórbico en el producto de "oasis"

	ÁCIDO ASCORBICO	SI	AS/SI
	51536	635212	0.08113197
	52321	645213	0.08109105
	50855	623154	0.08160904
	53924	648421	0.08316202
	53534	643541	0.08318662
	56321	659875	0.08535101
<b>PROM.</b>	53081.833	642569.333	0.082
<b>DE</b>	1966.375	12431.787	0.001
<b>%DER</b>	3.704	1.934	1.999

Gráfico 16. Interpolación del Compuesto de Ácido ascórbico del producto "El Oasis" sobre la Curva de Calibración

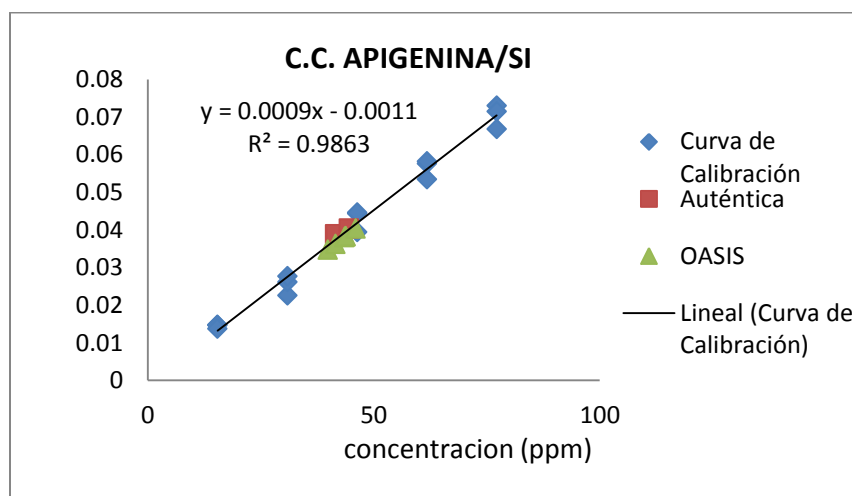


## Apigenina

Tabla 37. Réplicas del compuesto de Ácido ascórbico en el producto de “oasis”

	<b>APIGENINA</b>	<b>SI</b>	<b>AS/SI</b>
	22066	635212	0.03473801
	24685	645213	0.03825868
	22589	623154	0.03624947
	24685	648421	0.0380694
	24658	643541	0.03831613
	26598	659875	0.04030763
<b>PROM.</b>	24213.5	642569.333	0.03765655
<b>DE</b>	1647.9564	12431.7878	0.00192323
<b>% DER</b>	6.80594049	1.93469982	5.10729184

Gráfico 17. Interpolación del Compuesto de Apigenina del producto “El Oasis” sobre la Curva de Calibración

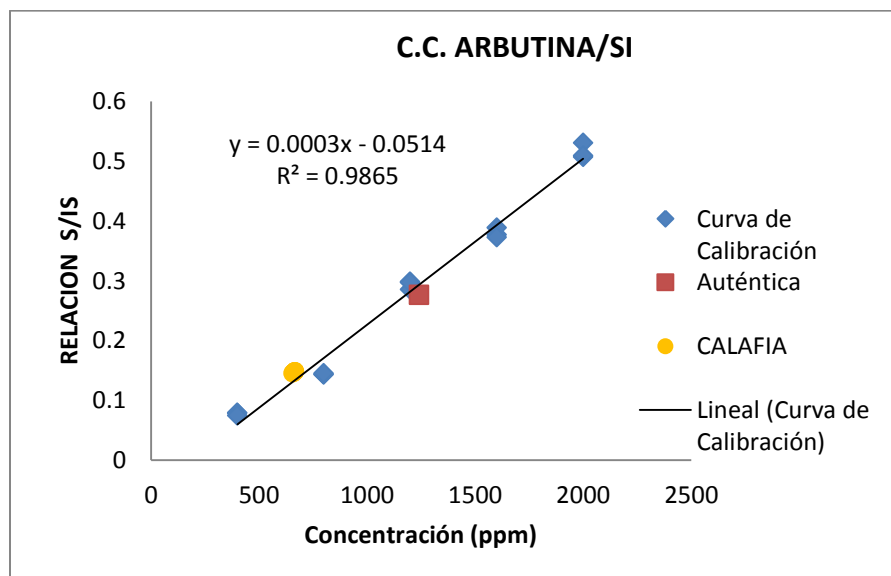


## Producto Comercial "AZTECA"

Tabla 38. Réplicas del compuesto de Arbutina en el producto de "Azteca"

	ARBUTINA	SI	AS/SI
	93185	635985	0.14652075
	92564	623598	0.14843537
	94526	645232	0.14649924
	89524	615124	0.14553814
	98646	665322	0.14826806
	92561	623564	0.14843865
<b>PROM.</b>	93501	634804.167	0.14728337
<b>DE</b>	3006.646	18334.125	0.001
<b>%DER</b>	3.21562	2.888	0.852

Gráfico 18. Interpolación del Compuesto de Arbutina del producto "Azteca" sobre la Curva de Calibración



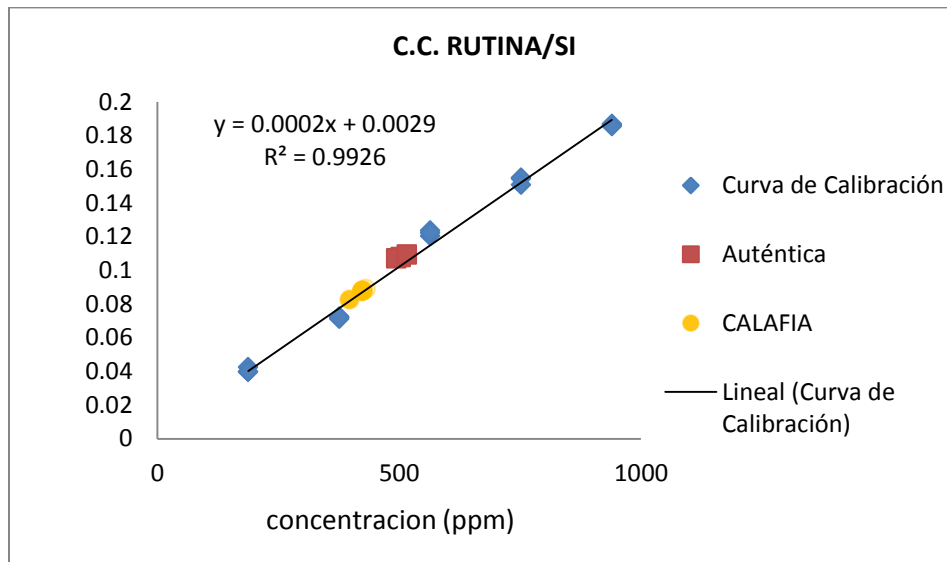


## Rutina

Tabla 39. Réplicas del compuesto de Rutina en el producto de "Azteca"

	RUTINA	SI	AS/SI
	56621	635985	0.08902883
	54652	623598	0.08763979
	56641	645232	0.08778393
	50694	615124	0.08241265
	58262	665322	0.08756963
	54642	623564	0.08762854
<b>PROM.</b>	55252	634804.167	0.08701056
<b>DE</b>	2621.87132	18334.125	0.0023196
<b>%DER</b>	4.74529667	2.88815449	2.66588007

Gráfico 19. Interpolación del Compuesto de Rutina del producto "Azteca" sobre la Curva de Calibración

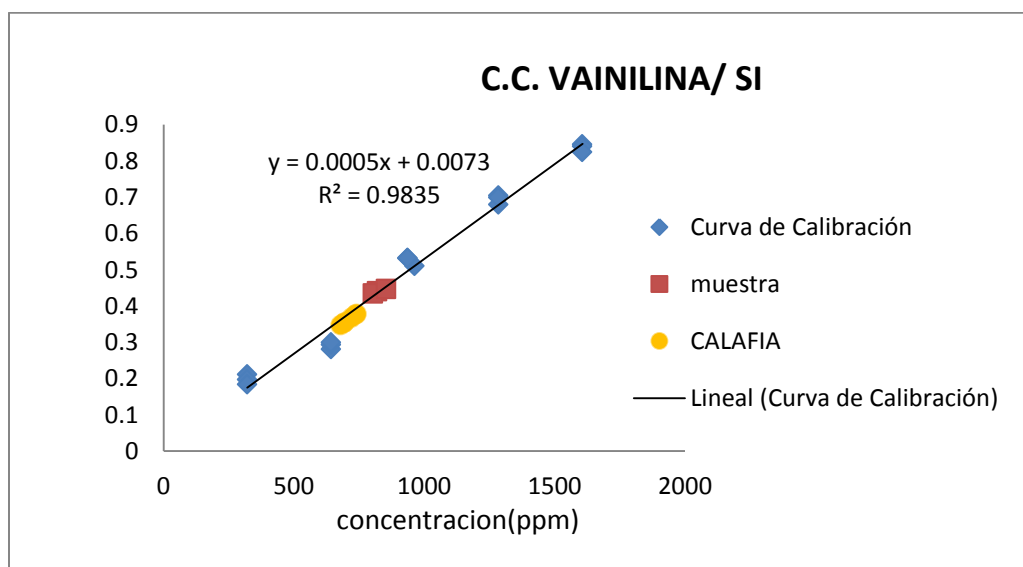


## Vainillina

Tabla 40. Réplicas del compuesto de Vainillina en el producto de "Azteca"

	VAINILLINA	SI	AS/SI
	225623	635985	0.354761512
	235685	623598	0.377943804
	242642	645232	0.376053884
	226268	615124	0.367841281
	235336	665322	0.353717448
	216526	623564	0.347239417
<b>PROM.</b>	230346.667	634804.167	0.362926224
<b>DE</b>	9322.29422	18334.125	0.012802819
<b>%DER</b>	4.04707146	2.88815449	3.527664476

Gráfico 20. Interpolación del Compuesto de Vainillina del producto "Azteca" sobre la Curva de Calibración

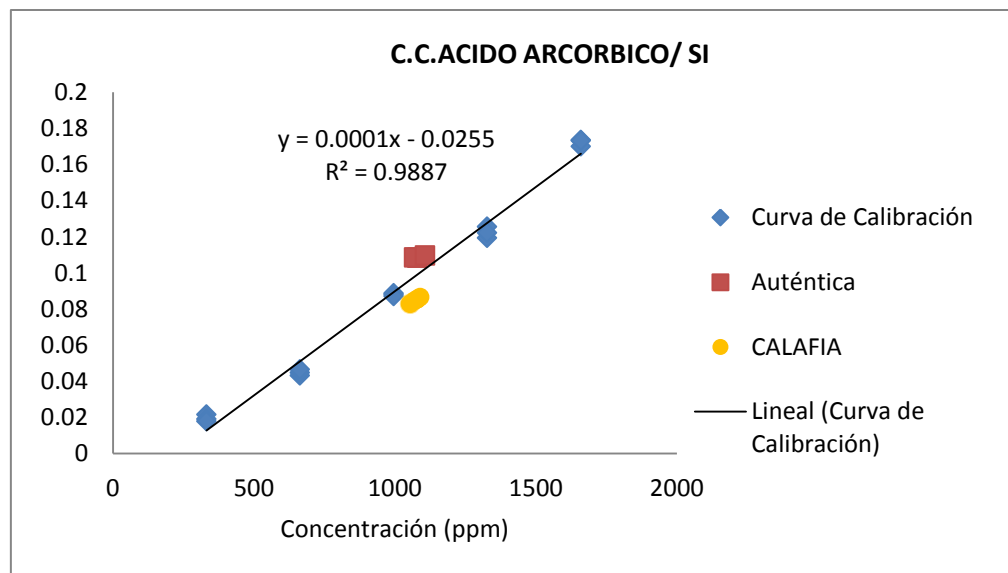


## Ácido ascórbico

Tabla 41. Réplicas del compuesto de Ácido ascórbico en el producto de "Azteca"

	ACIDO ASCORBICO	SI	AS/SI
	54216	635985	0.08524729
	53265	623598	0.0854156
	54487	645232	0.08444559
	52782	615124	0.08580709
	55167	665322	0.08291775
	53971	623564	0.08655246
<b>PROM.</b>	53981.333	634804.167	0.085
<b>DE</b>	856.529	18334.125	0.001
<b>%DER</b>	1.586	2.88815449	1.478

Gráfico 21. Interpolación del Compuesto de Ácido ascórbico del producto "Azteca" sobre la Curva de Calibración



## Apigenina

Tabla 42. Réplicas del compuesto de Apigenina en el producto de “Azteca”

	APIGENINA	SI	AS/SI
	9023	635985	0.01418744
	9264	623598	0.01485572
	9423	645232	0.01460405
	9156	615124	0.0148848
	9653	665322	0.01450876
	9365	623564	0.01501851
<b>PROM.</b>	9314	634804.167	0.01467655
<b>DE</b>	219.794449	18334.125	0.00030497
<b>%DER</b>	2.35982875	2.88815449	2.07796176

Gráfico 22. Interpolación del Compuesto de Apigenina del producto “Azteca” sobre la Curva de Calibración

