



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Obtención de las huellas digitales del extracto metanólico y aceite esencial de la planta *Agastache mexicana* Kunth Lint & Epling ssp. *xolocotziana* (Toronjil blanco), utilizando la técnica cromatográfica de capa fina de alta resolución

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A:

JARAMILLO UGARTE IMELDA

ASESOR: QFB. Brígida del Carmen Camacho Enríquez

COASESOR: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



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
AVANZADA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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

Obtención de las huellas digitales del extracto metanólico y aceite esencial de la planta *Agastache mexicana Kunth Lint & Epling ssp. xofocotziana* (Toronjil blanco), utilizando la técnica cromatográfica de capa fina de alta resolución (HPTLC).

Que presenta la pasante: Imelda Jaramillo Ugarte
Con número de cuenta: 306094459 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

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 23 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q. Mario Arturo Morales Delgado</u>	<u>Mario A. Morales D.</u>
VOCAL	<u>Q.F.B. Brigida del C Camacho Enriquez</u>	<u>Brigida del C Camacho Enriquez</u>
SECRETARIO	<u>M.C. Ma. del Rocío Ramírez Salgado</u>	<u>Ma. del Rocío Ramírez Salgado</u>
1er. SUPLENTE	<u>M.F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	<u>Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>
2do. SUPLENTE	<u>M. I. Claudia Mariano Hernández</u>	<u>Claudia Mariano Hernández</u>

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

LMCF/cpa*

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme la vida y poner en mi camino a tantas personas valiosas, empezando por mis padres y hermanos, y posteriormente poner en mi camino a mi esposo y con ello mandarme unos angelitos preciosos que son mis hijos Alexander y Santiago quienes se convirtieron en mi principal inspiración para lograr mis metas, además de muchas personas maravillosas que me permitiste conocer a lo largo de mi vida de las cuales eh aprendido mucho y me han brindado su cariño.

Gracias por que en mi vida no me ha hecho falta nada pues eh tenido amor, cariño y comprensión logrando con ello que siempre sea sencillamente FELIZ.

A MIS PADRES

Francisco Jaramillo Rogel e Ignacia Ugarte Medero. Por estar a mi lado en todo momento brindándome las herramientas necesarias a base de muchos sacrificios para poder ver mis sueños hechos realidad y nunca dejarme caer, por su apoyo, comprensión y cariño. Dándome siempre palabras de aliento que nunca olvidare como la frase “querer es poder” y que no hay imposibles en ésta vida por todo esto, solo me queda decirles que gracias y que sin ustedes yo no sería lo que soy hoy en día.

Y ésta meta lograda también es de ustedes.

LOS AMO

A MI ESPOSO

Alejandro De la Cruz Guzmán. Por tu apoyo, tolerancia y amor; por siempre estar a mi lado empujándome y motivándome cada día, alentándome con tus palabras y acciones para poder ver éste sueño hecho realidad.

Te amo

A MIS HIJOS

Alexander y Santiago De la Cruz Jaramillo. Porque a pesar de ser tan pequeños me enseñaron el amor más grande que jamás imagine sentir, que es el de una madre y por convertirse en mi mayor motivación para salir adelante cada día.

Los amo

A MIS HERMANOS

Mireya, Francisco, Fernando y Alfredo por apoyarme siempre y mostrar interés en mí y motivarme a terminar mi licenciatura por siempre decirme que lo podía lograr.

A MIS AMIGOS SURTIDO RICO

Arisbeth, Cristian, Karen, Gisela, Marylu, Trinidad, Rosa y Miguel, por brindarme su compañerismo y sobre todo su amistad por apoyarme durante el momento el que los conocí durante ésta Licenciatura y por qué sé que, aunque los años de estudio dentro de la FES-C1 terminaron nuestra amistad seguirá por siempre

A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FITOQUIMICA

Alejandra, Ana Luisa, Daniel, Isboset, Lidia, Liz, Jannine, Mari Carmen, Mario. Por brindarme su amistad y apoyo durante el tiempo en que convivimos en el laboratorio, así como sus experiencias dentro del mismo haciendo que los dejara de ver como compañeros y les tomara cariño hasta llegarlos a considerar mis amigos.

A MI ASESORA DE TESIS

Muchas gracias Profesora Brígida porque aparte de ser mi profesora, usted se convirtió en una persona a la cual le tengo un profundo cariño debido a su calidez como persona; que aparte de sus conocimientos impartidos durante clases, sus enseñanzas salieron de ese salón para enseñarme por medio del ejemplo como hay que ser como persona y profesional.

ALINEE

Por apoyarme a realizar ésta tesis compartiendo tus conmigo y permitiendo conocerte aparte de lo laboral

UNAM

Por ser una institución que me brindo las herramientas necesarias para poder enfrentarse al mundo laboral con la seguridad de que mi formación es la adecuada para desenvolverse en el mismo, siendo así la FES-C la facultad que me vio crecer y desarrollarme convirtiéndome en una Licenciada en Farmacia.

PROYECTO PAPIME (PE204118): Actualización y fortalecimiento de la enseñanza experimental de las asignaturas: FITOQUÌMICA Y FARMACOGNOSIA Y FITOFÁRMACOS de la licenciatura en Química Industrial

Por dotar de fondos al laboratorio para la ejecución de estos y otros ensayos que proveerán de herramientas practicas a la asignatura.

En el verdadero éxito, la suerte no tiene nada que ver; la suerte es para los improvisados y aprovechados; y el éxito es el resultado obligado de la constancia, de la responsabilidad, del esfuerzo, de la organización y del equilibrio entre la razón y el corazón.

Contenido	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	6
2 MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Plantas medicinales en el mundo.....	8
2.2 Plantas medicinales en México.....	9
2.2.1 Toronjil blanco.....	9
2.2.2 Sinonimia popular.....	9
2.2.3 Descripción botánica.....	9
2.2.4 Composición química del aceite esencial.....	10
2.2.5 Usos en la medicina tradicional mexicana.....	10
2.3 Control de calidad de las plantas.....	11
2.3.1 Infrarrojo.....	13
2.4 Aceites esenciales.....	14
2.4.1 Definición.....	14
2.4.2 Composición.....	14
2.4.3 Métodos de obtención.....	14
2.4.4 Control de calidad.....	16
2.4.5 Usos.....	17
2.5 Extractos vegetales.....	17
2.6 Métodos de separación.....	18
2.6.1 Cromatografía.....	18
2.7 Formas de detección.....	24
2.7.1 Espectrofotometría UV-Vis.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.1.1 Objetivos particulares.....	26
4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Adquisición del material vegetal.....	27

4.2 Identidad botánica	28
4.2.1 Análisis macroscópico de la planta <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	28
4.2.2 Análisis microscópico de la planta <i>A. mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	28
4.3 Material extraño	28
4.4 Secado	28
4.5 Preparación de materia prima	28
4.6 Extracción del Aceite esencial.....	29
4.6.1 Separación de la mezcla aceite-agua.....	29
4.6.2 Almacenamiento.....	29
4.7 Control de calidad del aceite	29
4.7.1 Propiedades sensoriales	29
4.7.2 Densidad	30
4.7.3 Índice de refracción	30
4.7.4 Infrarrojo	30
4.8 Obtención del perfil cromatográfico	30
4.8.1 Monitoreo manual	30
4.8.2 Monitoreo automatizado.....	32
4.8.3 Identificación de los componentes del perfil cromatográfico del AE.....	33
4.8.4 Prueba de especificidad	33
4.8.5 Realización de la curva de calibración	34
4.9 Obtención de los extractos	34
4.9.1 Tamizaje fitoquímico.....	36
4.9.2 Elección del extracto y técnica de maceración.....	36
4.9.3 Obtención del perfil cromatográfico	36
4.9.4 Identificación de compuestos	40
4.9.5 Prueba de especificidad	40
4.9.6 Realización de las curvas de calibración	40
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	42
5.1 Adquisición de la materia prima vegetal	42
5.1.1 Identidad botánica	42
5.1.2 Análisis macroscópico	43
5.1.3 Análisis microscópico	44

5.1.4 Material extraño	44
5.1.5 Secado	44
5.1.6 Preparación de la materia prima	45
5.2 ACEITE ESENCIAL (AE)	45
5.2.1 Obtención del AE	45
5.2.2 Control de calidad del AE.....	46
5.2.3 Obtención del perfil cromatográfico	48
5.3 Resultados del extracto	61
5.3.1 Resultados del tamizaje fitoquímico.....	61
5.3.2 Elección del extracto y técnica de maceración.....	65
5.3.3 Obtención del perfil cromatográfico	65
6 CONCLUSIONES	71
7 PROSPECTIVAS	72
ANEXO 1 Preparación de reactivos.....	73
ANEXO 2 Realización e interpretación de las pruebas	74
ANEXO 3 IR de los estándares.....	76
ANEXO 4 Identificación de Rf de los estándares.....	78
ANEXO 5 Determinación del número de extracciones	80
ANEXO 6 Equipos utilizados en la experimentación.....	82
ANEXO 7 MONOGRAFÍA.....	83
8 BIBLIOGRAFÍA.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Forma de la hoja de la planta <i>Agastache mexicana</i> ssp. <i>xolocotziana</i>	10
Figura 2 Frecuencias de vibración de los grupos funcionales en la región infrarroja	13
Figura 3 Obtención de aceite por destilación por arrastre de vapor.	15
Figura 4 Dispositivo de hidrodestilación.....	16
Figura 5 Espectro electromagnético	24
Figura 6 Transiciones electrónicas permitidas.....	25
Figura 7 Esquema general para una transición electrónica HOMO-LUMO	25
Figura 8 Metodología general del trabajo experimental.....	27
Figura 9 Metodología de la obtención del perfil cromatográfico del aceite esencial	31
Figura 10 Orden de aplicación de las muestras en la placa.....	33
Figura 11 Metodología de la obtención del perfil cromatográfico del extracto	35

Figura 12 Diagrama de extracción por gradiente de polaridad	37
Figura 13 Tamizaje fitoquímico	38
Figura 14 Oficio de la identificación de la planta expedida por la FES-Iztacala.....	42
Figura 15 Fotografías de la planta <i>Agastache mexicana ssp. xolocotziana</i>	43
Figura 16 Fotografías de los tallos de la planta <i>Agastache mexicana ssp. xolocotziana</i>	43
Figura 17 Hoja de <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i>	44
Figura 18 Flor de la planta de <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i>	44
Figura 19 Fotografía de la planta <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i> seca.....	45
Figura 20 Aparato de hidrodestilación	45
Figura 21 AE de toronjil blanco obtenido por.....	45
Figura 22 AE de la planta <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i>	46
Figura 23 Medición del índice de refracción.....	46
Figura 24 Espectro infrarrojo del aceite esencial de la planta <i>Agastache mexicana ssp. xolocotziana</i> ...	47
Figura 25 Perfil cromatográfico de la planta <i>A. mexicana ssp. xolocotziana</i> con aplicación manual y revelada con ác. fosfomolibdico	49
Figura 26 Perfil cromatográfico del AE utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelador.	50
Figura 27 Perfil cromatográfico del AE con lámpara UV a 254nm.	50
Figura 28 Perfiles cromatográficos del AE obtenidos en diferentes días	51
Figura 29 Especificidad del mentol	52
Figura 30 Especificidad de pulegona.....	53
Figura 31 Especificidad del linalool.....	54
Figura 32 Perfil cromatográfico del extracto metanol-agua (80:20) de la especie <i>A. mexicana ssp.</i> <i>xolocotziana</i> utilizando NP/PEG como revelador y luz UV a 365 nm	66
Figura 33 Perfil cromatográfico del extracto metanol-agua (80:20) de la especie <i>A. mexicana ssp.</i> <i>xolocotziana</i> con lámpara UV a 254.	66
Figura 34 Cromatograma de los extractos obtenidos en cada repetición.	67
Figura 35 Especificidad del ácido rosmarínico.	68
Figura 36 Cámara de elución para las placas con muestra del extracto Metanólico.....	82
Figura 37 Detector de HPTLC, TLC Scanner 3.....	82
Figura 38 Aplicador de HPTLC ATS 4	82
Figura 39 Cámara de elución utilizada para las placas con muestra de AE	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía del toronjil blanco.....	9
Tabla 2 Compuestos químicos con su actividad biológica del aceite esencial de la planta <i>Agastache</i> <i>mexicana ssp. xolocotziana</i>	10
Tabla 3 Principales características de las diferentes clases de cromatografía	19
Tabla 4 Guía para la selección de fase estacionaria para el desarrollo del método HPTLC	22
Tabla 5 Lista de reactivos de derivatización más utilizados	23
Tabla 6 Fases móviles ensayadas durante el desarrollo del método	32
Tabla 7. Parámetros estadísticos y criterio de aceptación de cada uno.	34
Tabla 8 Fases móviles ensayadas durante el desarrollo del método	39

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas del AE	46
Tabla 10 Estructuras de los compuestos identificados en la experimentación	48
Tabla 11 Resultados de los Rf y Longitudes de onda máxima de los estándares identificados en el AE .	51
Tabla 12 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad del mentol	52
Tabla 13 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad de pulegona	53
Tabla 14 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad de linalool	54
Tabla 15 Preparación de las solución y volúmenes de alícuotas aplicada para las curvas de calibración de los estándares.	55
Tabla 16 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema del mentol.....	56
Tabla 17 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema de pulegona	57
Tabla 18 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema de linalool	58
Tabla 19 Cuantificación de los compuestos en el AE.....	59
Tabla 20 Resultados de la prueba de exactitud para mentol	59
Tabla 21 Resultados de la prueba de exactitud para pulegona.....	60
Tabla 22 Resultados de la prueba de exactitud para linalool.....	60
Tabla 23 Resultados del tamizaje fitoquímico	61
Tabla 24 Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto metanol-agua (80:20)	63
Tabla 25 Resultados de los Rf, longitudes de onda máxima, así como la estructura del estándar identificado en el extracto	68
Tabla 26 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad del ácido rosmarínico	69
Tabla 27 Parámetros de la linealidad del sistema ác. rosmarínico.....	70
Tabla 28 Cuantificación del compuesto en el extracto.....	70
Tabla 29 Resultados de la prueba de exactitud para ác. rosmarínico	70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de calibración del mentol.....	56
Gráfico 2 Curva de calibración de la pulegona	57
Gráfico 3 Curva de calibración del linalool	58
Gráfico 4 Curva de calibración del ác. rosmarínico	69

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido un recurso utilizado desde la antigüedad por el ser humano para su alimentación, vivienda y curación de enfermedades (Lock de Ugaz, 2010). El conocimiento empírico de las plantas y sus efectos curativos se remonta a miles de años y forma parte de los sistemas y tradiciones curativas de diferentes culturas en el mundo.

En México, desde tiempos prehispánicos ha contado con una gran tradición de prácticas curativas, en las que la información se ha transmitido de manera oral, de generación en generación. Nuestro país cuenta con una gran variedad de plantas que forman parte de la Medicina Tradicional Mexicana. Obras como el Códice de la Cruz Badiano, escrito en 1552 por Juan Badiano, quién se encarga de escribir en náhuatl y traducir al latín los conocimientos dictados por Martín de la Cruz (Adame & Adame, 2000) y la Historia General de las Cosas de la Nueva España, escrita por fray Bernardino de Sahagún entre otras, muestran las plantas utilizadas en la época.

Muchas de las plantas que se utilizaban en aquellos tiempos, en la actualidad continua su uso, por ejemplo; para el tratamiento de enfermedades de síndrome cultural, como el susto y los nervios; se utilizan plantas como la *Passiflora incarnata* (pasiflora), *Valeriana mexicana* (valeriana), *Matricaria recutita* (manzanilla), *Agastache mexicana* (toronjil), entre otras. La palabra síndrome engloba una serie de síntomas que se deben controlar, en el caso de los “nervios” la ansiedad, es uno de los principales, y para su manejo se ha recomendado, desde la antigüedad, el uso de los “toronjiles”.

El complejo de plantas medicinales llamado “toronjiles” está formado por el toronjil blanco (*Agastache mexicana* Lint. et. Epling ssp. *xolocotziana*), el toronjil morado (*Agastache mexicana* Lint. et Epling ssp. *mexicana*); provenientes de México y el toronjil azul (*Dracocephalum moldavica* L.) de origen europeo. Los toronjiles no solo se utilizan para ansiedad sino para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales que también forman parte del síndrome “nervios”. Estrada-Reyes (2014) y cols., comprueban la actividad ansiolítica del toronjil blanco y morado, en ratones.

El uso de fuentes naturales para la elaboración de productos con fines comerciales es un fenómeno que se ha dado en las últimas décadas produciendo ventas millonarias. Este tipo de productos deben cumplir con ciertos parámetros de calidad que aseguren su seguridad y eficacia.

El control de calidad de las plantas medicinales se realiza con el propósito de garantizar la presencia y concentración de los principios activos y que la materia prima vegetal se encuentre libre de contaminantes que puedan afectar la salud del consumidor (Sharapin, 2000). La inocuidad y la calidad de las materias primas vegetales medicinales y de los productos acabados depende de factores que se

pueden clasificar en intrínsecos (genéticos) o extrínsecos (medio ambiente, métodos de recolección, cultivo, cosecha, proceso postcosecha, transporte y prácticas de almacenamiento). La contaminación inadvertida por agentes microbianos o químicos durante cualquiera de las etapas de la producción puede también comprometer la inocuidad y la calidad. Las plantas medicinales obtenidas de poblaciones silvestres presentan una problemática particular que va desde la confusión con otra especie por falta de conocimiento del recolector, hasta la adulteración intencional; afectando la seguridad y eficacia de la planta medicinal y los productos elaborados con ésta (Lucinda Da Silva, G. Couto, & B. Bresolin, 2012).

Una medida que contribuye a la calidad es la determinación de huellas digitales a través de un perfil cromatográfico de un espécimen con un aval botánico. La muestra se extrae y después se obtiene su cromatograma. El resultado es una secuencia específica de bandas o zonas debido a los componentes conocidos o desconocidos del extracto. La huella digital de la materia prima botánicamente autenticada sirve como una referencia primaria contra la cual, el material desconocido puede ser caracterizado (Reich & Schibli, 2007).

La optimización de los procesos de obtención de huellas digitales cromatográficas no sólo es una herramienta analítica alterna para la identificación, sino también un enfoque para expresar los diferentes patrones de distribución de componentes químicos de los medicamentos a base de hierbas, para preservar su integridad (base de datos).

El desarrollo de técnicas analíticas y la capacidad informática contribuyen a un análisis de huella dactilar mejorado y afinado correlacionándolo con los resultados de las áreas de farmacología, bioquímica e investigación clínica.

Es por ello el interés del grupo de trabajo de Farmacognosia de las FESC Campo 1 (L-324) por desarrollar una metodología para la obtención de un perfil de huellas digitales, identificación de los componentes y cuantificación de estos por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de la especie *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* (Toronjil blanco), cabe señalar que este trabajo pretende hacer una contribución a la monografía que presenta la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) con un perfil químico del aceite esencial y del extracto metanólico.

2.1 Plantas medicinales en el mundo

El hombre cuando apareció en el planeta utilizó a las plantas como un recurso primordial para la satisfacción de sus necesidades básicas como alimentación y curación. Aprende por ensayo y error a diferenciar las plantas que lo alimentaban, aquellas que le curaban sus enfermedades y las que le causaban efectos tóxicos. En este largo aprendizaje, el hombre reconoce en el reino vegetal su principal recurso terapéutico. Con los avances tecnológicos de cada época va descubriendo que en las plantas existe un arsenal químico útil para el tratamiento de las enfermedades, reconociendo así al principio activo.

Con el desarrollo de la química, el hombre descubre que es capaz de realizar una síntesis química de los compuestos responsables de la actividad biológica; iniciándose así, un aparente descenso en el interés por las plantas medicinales. Dando como resultado un enorme auge por la elaboración de medicamentos a base de principios activos derivados de una síntesis orgánica, sin embargo, también se observa que en ellos se presentan una serie de reacciones adversas que con el uso de las plantas medicinales no se manifestaban, es entonces cuando se consideró que había que regresar a lo natural (Alonso, 2014).

En ese sentido, al final del siglo XX el paradigma empieza a cambiar y la industria farmacéutica se interesa por introducir productos manufacturados a base de plantas como *Gingko biloba*, *Panax ginseng*, *Psidium guajava*, entre otros. El mercado actual de productos fitoterapéuticos constituye, por ejemplo, en Estados Unidos o Europa entre el 30-40% (respectivamente) de los productos que comprenden el circuito comercial farmacéutico.

Existen en el mundo unas 250 mil especies vegetales de las cuales sólo se conocen científicamente el 10% de ellas, considerándose como medicinales alrededor de 12 mil especies en total, esto no significa que el resto no sea medicinal, sino que aún carecen de evidencia científica que las avale como tales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado que el 80% de las personas que viven en los países en desarrollo utiliza la medicina tradicional herbolaria para resolver sus problemas de salud. Tomando en cuenta que el 80% de la población mundial reside en países en desarrollo, se puede calcular que el 64% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales en forma no industrializada.

En las dos últimas décadas, ha aumentado considerablemente, tanto en países desarrollados como en desarrollo, el interés por la medicina tradicional y en particular, por los medicamentos herbolarios, lo que ha producido un rápido crecimiento de los mercados nacionales e internacionales de las hierbas medicinales y se están obteniendo rendimientos económicos significativos. Según la Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, se estima que las ventas mundiales de productos herbarios ascendieron en el año 2000 a 60 000 millones de dólares. En consecuencia, tanto las autoridades

sanitarias como la opinión pública se han interesado cada vez más por la inocuidad y la calidad de los medicamentos herbarios (World Health Organization , 2003).

2.2 Plantas medicinales en México

México posee una gran diversidad de plantas medicinales, por ello la medicina tradicional mexicana ocupa el primer lugar en Latinoamérica y fluctúa entre el segundo o tercero a nivel mundial, el toronjil forma parte de esa diversidad. El toronjil es una planta reportada por Martín de la Cruz en el siglo XVI y por Gregorio López en el XIX para el tratamiento de resfrío, dolor de cabeza, “quita tristezas”, fortalece el corazón, etc., siendo ésta una planta que actualmente tiene un amplio número de consumidores. (Zolla, 2012) (UNAM, 2009).

2.2.1 Toronjil blanco

Tabla 1. Taxonomía del toronjil blanco

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Agastache</i>
Especie	<i>Agastache mexicana</i>
Subespecie	<i>Agastache mexicana xolocotziana</i>

2.2.2 Sinonimia popular

El toronjil se le conoce con diferentes nombres de acuerdo con la lengua y localidad: toronjil de casa, toronjil de monte. Puebla: pinkil (tepehua), tama, toroji, toronji (otomí) (UNAM, 2009).

2.2.3 Descripción botánica

El toronjil es una hierba de unos 40 a 60 cm, con tallos cuadrados y hojas opuestas que tienen forma de lanza, de 4 a 6 cm., con orillas aserradas (bordes dentados) (Figura 1); tiene flores en racimos terminales de color blanco, en número de 5 hasta 20, con forma tubular, además de ser una planta aromática cuyo olor es anisado.

El toronjil es originario de México; está presente en climas cálido, semicálido y templado entre el nivel del mar y los 780 m y desde los 1600 a los 3900 m; por lo que está asociado a bosques tropicales

caducifolio, subcaducifolio y perennifolio y a bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino (UNAM, 2009).

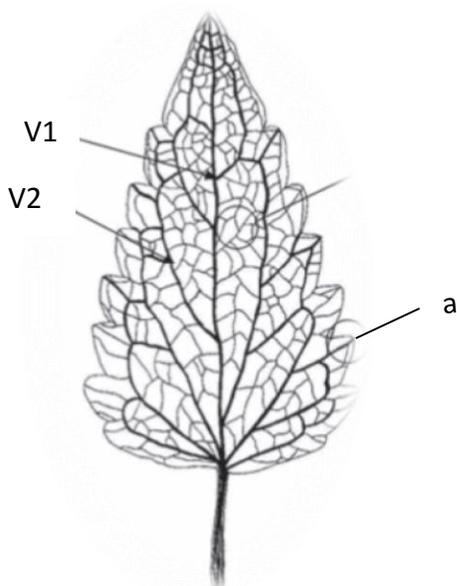


Figura 1 Forma de la hoja de la planta *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* a, bordes dentados. Abreviaturas: V1: venas primarias y V2: venas secundarias
 Nota: Imagen obtenida de Santillán Ramírez & et. al., 2008

2.2.4 Composición química del aceite esencial

La familia de las labiadas se caracteriza por tener un gran número de especies que producen aceite esencial, entre éstas se encuentra el toronjil. El aceite esencial de las flores de la planta está compuesto principalmente por monoterpenos. En la tabla 2 se muestran algunos de ellos.

Tabla 2 Compuestos químicos con su actividad biológica del aceite esencial de la planta *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*.

Compuesto químico	Actividad Biológica
Limoneno	Antiséptico urinario, antiespasmódico
Mentona	Antiespasmódico
Pulegona	Antiséptico urinario
Linalool	Anticonvulsivo

Nota: Adaptado de (Estrada Reyes, Aguirre Hernández, García, & Soto Hernández, 2004)

2.2.5 Usos en la medicina tradicional mexicana

El toronjil blanco, forma parte del complejo denominado “los tres toronjiles” junto con el toronjil morado y azul, se utiliza comúnmente para aliviar problemas gastrointestinales, nervios y cardiovasculares, así como, de síndrome cultural como el “espanto” y el “susto” (Estrada, García , Aguirre, & Soto, 2004).

Otras virtudes medicinales que presenta son:

- La raíz se utiliza para curar heridas, úlceras y disminuir el dolor y la fiebre.
- Ayuda en el tratamiento de gripa e irritabilidad.
- Sus hojas son eficaces contra la picadura de alacrán.
- Alivia el catarro, tos, seca ampollas, para lombrices intestinales, entre otras (Reyes Mireles, 2010).

2.3 Control de calidad de las plantas

La preocupación por la calidad de los medicamentos y por el establecimiento de normas o patrones para la fabricación no es cuestión de los últimos tiempos: aparece en los escritos del emperador chino Sheang Nong aproximadamente en el año 2500 A.C. y en el código de Hamurabi, año 2000 A.C.

La calidad de una planta medicinal es definida como el estado óptimo de una droga que es determinado por la identidad, modo de conservación, contenido de principios activos y otras propiedades químicas, físicas y biológicas. El control de calidad es un término que se refiere a los procesos involucrados en el mantenimiento de la calidad y validez de un producto (Kuklinski, 2000).

En la actualidad existen farmacopeas que tienen como objetivo establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de la calidad de este tipo de productos y su uso adecuado.

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

- * Identidad: La correcta certificación de una droga cruda.
- * Pureza: Está estrechamente ligada con el uso seguro de la droga, se debe legitimar que no ha sufrido alteraciones, adulteraciones, ni excede los límites de materia extraña orgánica, sustancias nocivas u otros contaminantes.
- * Cantidad de principios activos: Consiste en certificar que la droga contenga la dosis necesaria para asegurar su actividad farmacológica sin llegar a valores tóxicos.

En México, entre los documentos expedidos por la Secretaria de Salud que consignan los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos y productos biológicos se encuentra la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. En ésta, en la sección de métodos de análisis incluye a la cromatografía en capa fina como una importante herramienta analítica para el control de calidad de plantas medicinales para determinar

de forma cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa los compuestos presentes en las muestras de origen vegetal (Secretaria de Salud, 2013) (Hernández, 2015).

La importancia del control de calidad en una droga radica en evitar alguna de las siguientes situaciones:

- La droga utilizada no esté descrita en la farmacopea y puede presentarse una sustitución, una falsificación o una sofisticación: Se trata de adulteraciones de la materia prima vegetal, que en general ocurren en la recolección de las plantas nativas, en donde los recolectores, mezclan la especie medicinal con otras de características morfológicas semejantes.
La sofisticación se presenta principalmente en extractos y tinturas. Estas prácticas consisten en adicionar a la droga extraída, o a los extractos y tinturas de bajo contenido de principios activos, sustancias naturales aisladas o sustancias sintéticas de estructura semejante a los principios activos que están contenidos originalmente en la planta.
- La parte de la planta no corresponde a la prescrita: Los principios activos no se distribuyen uniformemente por toda la planta, sino que se localizan preferencialmente en algunas partes y órganos.
- La cantidad de sustancias extrañas, pesticidas, metales pesados y contenido de cenizas es mayor que lo permitido.
- El contenido de componentes activos no corresponde al prescrito.
- Contaminación microbiológica.

Para solucionar los problemas anteriormente mencionados y asegurar la calidad de las materias primas vegetales, la OMS recomienda incluir en las especificaciones farmacopéicas para el material vegetal: El nombre botánico con referencia de los autores, especificación de la parte usada, descripción morfológica macro y microscópica, determinación de cenizas totales o cenizas sulfatadas (residuo de la incineración) y de cenizas insolubles en ácido, de las sustancias que van a ser extraídas de la planta, humedad, residuos de pesticidas y pérdida por secado, aceites esenciales, identificación por cromatografía en capa fina, en donde: la TLC se utiliza como un método de “huella digital” para la caracterización de un extracto de la planta. Las muestras y las referencias se aplican en la misma placa; después de la elución con una mezcla de disolventes adecuada, la placa se examina con luz UV (254 o 366 nm) o visible con o sin derivatización. La identificación consiste en comparar los valores de R_f de la muestra y de la sustancia de referencia. También se incluyen las pruebas de determinación cuantitativa de los principios activos que debe ser considerada en su totalidad, para poder garantizar una adecuada calidad del producto; cuando las impurezas no sean determinadas con facilidad, los métodos más indicados son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía de gases.

Muestreo, para que los métodos de análisis de drogas vegetales expresen en sus resultados valores representativos de la cantidad de droga disponible, la muestra debe ser recolectada utilizándose una técnica definida y uniforme (Sharapin, 2000).

2.3.1 Infrarrojo

Aunque ésta técnica no se encuentra como una prueba en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, es una prueba eficiente para el control de calidad de las plantas, debido a que esta técnica se basa en vibraciones de enlaces moleculares inducidos por la radiación infrarroja. Es eficiente en tiempo y requiere sólo pequeñas cantidades de material de la muestra.

Una molécula vibra constantemente: sus enlaces se estiran y contraen. La absorción de la luz infrarroja produce cambios en las vibraciones de una molécula: la región de luz que se encuentra más allá del rojo del espectro visible presenta una frecuencia de menor longitud de onda mayor y una energía menor.

Las partes específicas del espectro infrarrojo se denotan por su frecuencia que se expresa en número de onda, cm^{-1} ; el número de onda es simplemente el número de ondas por centímetro, y es igual al recíproco de la longitud de onda en centímetros.

El infrarrojo es una región del espectro electromagnético que se utiliza para la caracterización de compuestos orgánicos, que brinda información de los grupos funcionales que se encuentran en una molécula o una mezcla. Un grupo de átomos determinado da origen a bandas de absorción características, es decir, un grupo funcional en específico absorbe luz de frecuencias determinadas, que son prácticamente las mismas de un compuesto a otro. Así, por ejemplo, el hidroxilo ($-\text{OH}$) absorbe fuertemente a $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ (Thronton & Neilson, 1998).

En la figura 2 se muestran las frecuencias de absorción de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas en el espectro infrarrojo.

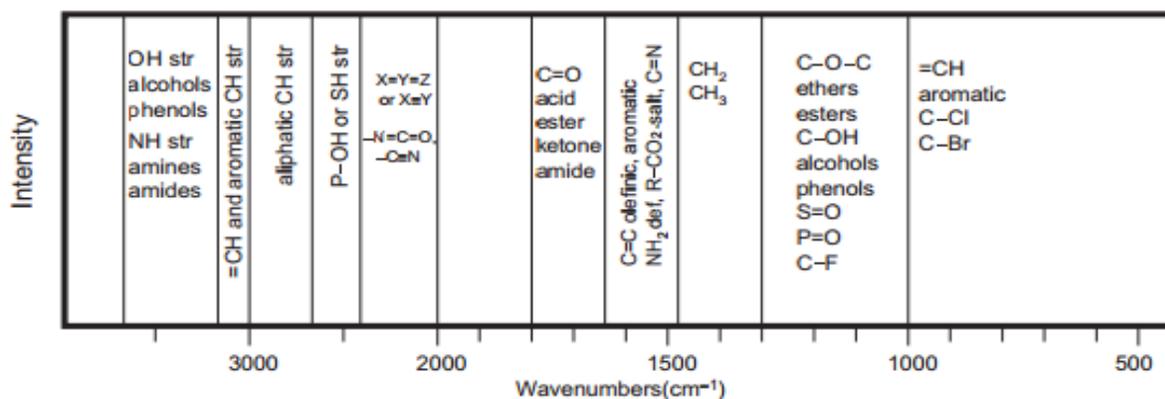


Figura 2 Frecuencias de vibración de los grupos funcionales en la región infrarroja

Nota: Imagen obtenida de Larkin, 2011

2.4 Aceites esenciales

2.4.1 Definición

Los aceites esenciales (AE) son las fracciones líquidas volátiles, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica.

Los AE son líquidos volátiles, insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos, la mayoría son menos densos que el agua, presentan índices de refracción altos, poder rotatorio, se descomponen con la luz y con temperaturas elevadas por lo que se deben almacenar adecuadamente. Su función en las plantas es como sistema de defensa y en la polinización.

Los aceites esenciales se encuentran en diferentes cavidades o canales en el parénquima, son generados por la planta en células secretoras aisladas, en pelos secretores o en bolsas o canales secretores (Plazas González, 2011).

2.4.2 Composición

Los AE generalmente son mezclas complejas de más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres), monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos, entre otros.

2.4.3 Métodos de obtención

Las siguientes técnicas se utilizan principalmente para la captura de pequeñas cantidades de AE en las plantas aromáticas y en parte para la determinación del contenido de aceite esencial en el material vegetal (Martínez, 2003).

◆ Destilación por arrastre de vapor.

La destilación por arrastre de vapor es una técnica que se utiliza para separar sustancias orgánicas volátiles, insolubles en agua de las que no lo son. Esta técnica permite separar componentes volátiles de puntos de ebullición elevados a temperaturas por debajo del punto de ebullición del agua. En la figura 3 se muestra el equipo utilizado para esta técnica.

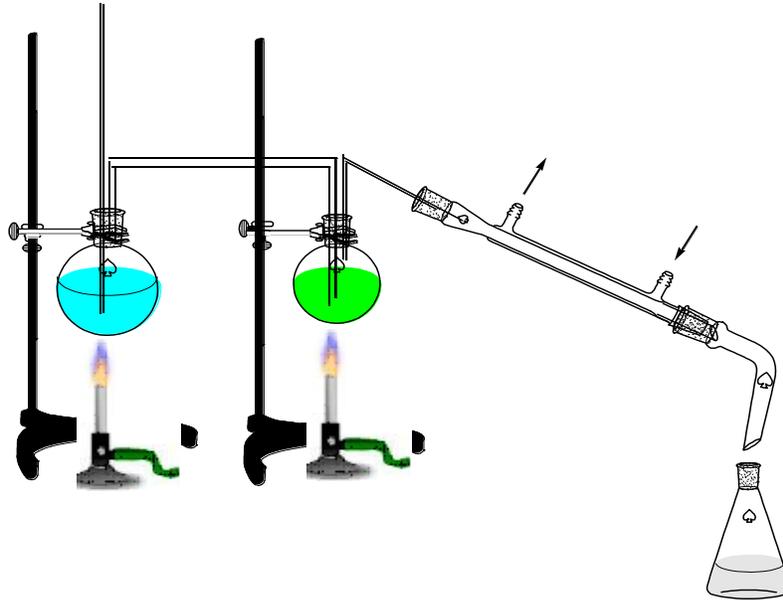


Figura 3 Obtención de aceite por destilación por arrastre de vapor.

Nota: Imagen obtenida de Camacho, Morales, Sánchez, Velázquez, & Ángeles, en revisión

◆ **Expresión o prensado en frío:**

La expresión es un método de extracción de aceites esenciales que consiste en ejercer una fuerza mecánica sobre el material vegetal, con el fin de romper las células y así el aceite sea liberado. Este método es muy artesanal, se utiliza para las especies de la familia de las rutáceas (naranjas, limones, toronjas, etc.)

◆ **Enflorado o enfleurage:**

El material vegetal (generalmente flores) se pone en contacto con una grasa. La esencia se disuelve en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (el concreto) de aceite esencial y grasa la cual es separada posteriormente por otros medios fisicoquímicos. En general se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Martínez , 2003).

◆ **Hidrodestilación**

El dispositivo más utilizado es el aparato de destilación circulatorio, basándose en la publicación de Clevenger (1928) y que más tarde se han encontrado diversas modificaciones. Una de esas modificaciones es el aparato descrito por Cocking y Middleton (1935). Este dispositivo consta de un matraz bola en donde se coloca el material vegetal picado en contacto con el agua y se somete a calor, es conectado a un condensador vertical y a un tubo graduado, para la determinación volumétrica del aceite. En la parte inferior del tubo hay tres vías una de ella permite dirigir el agua de nuevo al frasco, ya

que es un dispositivo de destilación de circuito cerrado continuo, y al final del proceso de destilación se separa el aceite esencial de la fase acuosa (Hüsnü Can Baser & Gerhard, 2010).

Esta técnica se basa en que el agua al llegar al punto de ebullición genera vapor. La generación del vapor debe ser interna (base del recipiente), produciendo la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del material vegetal. Conforme el vapor entra en contacto con la planta, éste extrae los componentes volátiles. La mezcla de vapor saturado y el aceite esencial fluyen hacia el condensador, en donde se condensa y enfría hasta la temperatura ambiente. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, la cual es separada en la trampa de Clevenger en la que se va acumulando el aceite esencial debido a que es inmisible con el agua (Plazas González, 2011), esta técnica es utilizada principalmente para aceites cuya densidad es menor a 1.

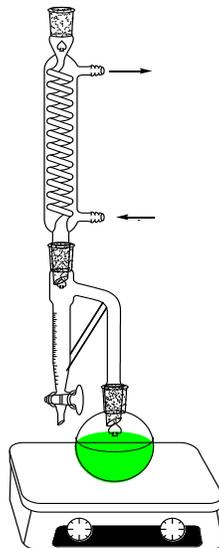


Figura 4 Dispositivo de hidrodestilación

Nota: Imagen obtenida de Camacho, Morales, Sánchez, Velázquez, & Ángeles, en revisión

2.4.4 Control de calidad

2.4.4.1 Propiedades sensoriales

- * Olor: Se clasifica de acuerdo con los 10 olores primarios:
 - ✓ Fragante o floral: Olor a flores (rosa, jazmín, lirio) o perfume
 - ✓ Leñoso o resinoso: Olor a pino o hierba recién cortada
 - ✓ Frutal: Frutas no cítricas
 - ✓ Químico: Alcohol, azufrado, acético, amoniaco
 - ✓ Mentolado o refrescante: relativo al mentol y con una sensación de descongestión

- ✓ Dulce: Caramelo, vainilla, incienso, cuero
 - ✓ Quemado o ahumado: Humo, incienso, cuero
 - ✓ Cítrico: Naranja, limón
 - ✓ Podrido: Carne podrida o leche agria
 - ✓ Acre o rancio: Áspero y picante (PrestaShop, 2016).
- * Color: Un modelo utilizado para la determinación del color es el modelo RGB el cual se basa en la teoría aditiva del color, mediante la mezcla o suma de los tres colores primarios rojo, verde y azul asignándole valores de 0 a 255 a cada uno de ellos.

Para conseguir un color determinado se asignan valores para cada uno de los colores primarios por lo que la ausencia de color, que sería en negro, se obtiene cuando los tres valores se llevan a (0,0,0), por el contrario, el color blanco se forma llevando a su máximo nivel los tres valores (255, 255, 255) (Borrego Jiménez, 2014).

2.4.4.2 Propiedades fisicoquímicas

Índice de refracción: El índice de refracción de una sustancia transparente es el radio de la velocidad de la luz en el aire y su velocidad en el material de prueba. Es indicativo de la pureza de la materia prima analizada, debido a que depende de la composición a través de la cual se transmite la radiación (Boatella Riera & Codony Salcedo, 2004). Esta constante física se utiliza para identificación de, y detección de impurezas en aceites volátiles (Troy & Beringer, 2006).

2.4.5 Usos

Terapéuticamente, los aceites esenciales despliegan un amplio espectro de actividades como antiséptico, estimulante, carminativo, diurético, antihelmíntico, analgésico, antirreumático, aromático y muchas otras actividades.

Aparte de los alimentos y usos farmacéuticos, se utilizan también como repelentes de insectos, insecticidas, pesticidas y desodorantes (Shaha & Salunkhe, 2014).

2.5 Extractos vegetales

Para aprovechar las sustancias activas de una planta, se recurre frecuentemente a los extractos. El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un disolvente, que generalmente suele ser agua o alcohol y el producto resultante puede ser una solución concentrada.

Los métodos de extracción se pueden agrupar en las siguientes clasificaciones:

- a) Tipo de disolvente:
 - Extracción con agua: infusión y decocción.
 - Extracción con disolventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico (Gonzalez Villa , 2004).

- b) Técnica utilizada:
 - Percolación en frío o en caliente.
 - Extracción continua (Soxhlet): Método caliente.
 - Extracción con fluidos en condiciones supercríticas.
 - Extracción en fase sólida.

La elección del método dependerá de los objetivos del estudio y facilidades que se tengan, es decir los recursos con los que se cuente (Deanna & Masahisa, 2002).

2.6 Métodos de separación

La separación e identificación de los componentes químicos de un extracto vegetal, se realiza principalmente utilizando técnicas cromatográficas.

2.6.1 Cromatografía

La cromatografía es un método físico para la separación de una mezcla de solutos provocada por la partición o distribución dinámica del material entre dos fases inmiscibles, una de las cuales se está moviendo en la otra y se nombran fase estacionaria y fase móvil. Ésta última se mueve en una dirección específica sobre la fase estacionaria. Cada tipo de cromatografía contiene una fase móvil y una fase estacionaria; la fase móvil puede ser líquido o gas.

La Cromatografía, en sus diversas formas, es una técnica extremadamente valiosa para la separación, aislamiento, purificación e identificación de los componentes de la mezcla.

La cromatografía se puede clasificar de acuerdo con diferentes parámetros: estado físico de sus fases, mecanismo de separación, naturaleza de la fase móvil o de la fase estacionaria, o bien según la disposición de la fase estacionaria (forma en que las dos fases entran en contacto), esta última se clasifica en cromatografía en columna y planar.

Existiendo así las siguientes clases de cromatografía dependiendo de sus propiedades de separación: la de adsorción, la de reparto, de intercambio iónico y filtración molecular. Las principales características se resumen en la tabla 3.

Tabla 3 Principales características de las diferentes clases de cromatografía

Tipo	Adsorción	Partición	Intercambio iónico	Permeación en gel
Fase estacionaria	sólida	líquida	sólida	sólida
Fase móvil	Líquida o gaseosa	Líquida o gaseosa	Líquida o gaseosa	Líquida
Fundamento del proceso de separación	Interacción molecular entre el soluto y el solvente	Solubilidad diferencial del soluto entre las fases	Intercambio de iones entre la solución y la fase estacionaria	Grado de inclusión en los poros de la fase estacionaria
Propiedad diferenciadora	Polaridad	Solubilidad	Ionización	Tamaño molecular
Unidades	Coeficiente de adsorción	Coeficiente de distribución	Carga, cte. de disociación, radio iónico.	Tamaño molecular efectivo
Naturaleza del proceso	Adsorción sobre sólido	Distribución entre líquidos	Interacciones electrostáticas y difusión	Difusión.

Nota: Recuperado de Mercano & Hasewaga, 2012

◆ **Cromatografía en Capa Fina (TLC: Thin Layer Chromatography)**

En la cromatografía planar, la fase estacionaria puede ser una hoja de papel (cromatografía en papel) o se puede distribuir como una capa sobre vidrio, aluminio o plástico, por eso el nombre de cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés). La fase móvil migra por capilaridad a través de la estacionaria, La fase móvil deberá reunir al igual que la estacionaria ciertas características como: ser inerte (no reaccionar con la fase móvil ni con los componentes de la mezcla a separar), los disolventes utilizados deberán ser puros y de preferencia volátiles.

La fase estacionaria no debe formar enlaces covalentes con las sustancias separadas, debe ser insoluble en la fase móvil, no deben migrar con la fase móvil a lo largo de la placa, no debe contener componentes que interfieran con la separación o la detección, debe ser incolora, no debe hincharse o contraerse bajo la acción de la fase móvil, y no debe absorber la luz. En el caso del gel de sílice es un adsorbente polar con propiedades hidrofílicas.

Es muy importante en esta técnica la cámara de elución que previamente se deberá saturar con todos los componentes de la fase móvil, para mantenerla en equilibrio y que garantice que toda la placa se

está desarrollando en las mismas condiciones. Mantener la saturación es importante, por lo que se deberá destapar con cuidado para no alterarla (Krasikov, 2003).

La separación se produce por la distribución de sustancias de la muestra, entre la fase estacionaria y la fase móvil. Esta afinidad relativa en capa fina se expresa por el valor del factor de retención o (Rf), que expresa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la recorrida por la fase móvil. Es decir:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

El valor de Rf está condicionado por numerosos factores, tales como las variaciones en la composición de la fase móvil, la temperatura (que modifica el coeficiente de partición), la viscosidad, las características del adsorbente como: grosor y tamaño de poro (que modifican la velocidad del flujo del líquido), etc. Por ello, para dar el valor de Rf como una característica propia de cada sustancia, hay que especificar claramente las condiciones en que se ha realizado la medición, ya que es una constante en determinado sistema cromatográfico (Orid, 2000).

La cromatografía en capa fina (TLC) es sin duda uno de los métodos de separación más versátiles y ampliamente utilizados en cromatografía. El concepto de TLC es simple y las muestras requieren por lo general tratamiento previo mínimo. Se ha utilizado con frecuencia en análisis farmacéuticos, clínicos, química industrial, ambiental, toxicológica, química de los alimentos, análisis de plaguicidas, la pureza de tintes, cosméticos y en el análisis de hierbas.

La introducción de la Cromatografía en capa fina de alta resolución mejor conocida por sus siglas en inglés HPTLC, ha aumentado el interés por este tipo de técnica.

◆ **Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC: High performance thin layer chromatography)**

Krasikov (2003) menciona que la TLC y HPTLC son semejantes cada componente de la mezcla tiene una velocidad de migración diferente, dado que cada uno participa en múltiples actos de adsorción y desorción. Las características de las fase móvil y estacionaria son semejantes a la TLC y se señalaron anteriormente.

La cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) es un método adecuado para tareas analíticas cualitativas y cuantitativas. Se utiliza para la identificación y cuantificación de impurezas, sustancias

activas; desarrollo y optimización de procesos; debido a que este método proporciona una excelente separación, análisis cualitativo y cuantitativo de una amplia gama de compuestos, como suplementos dietéticos a base de hierbas y botánicos, nutracéuticos, medicinas occidentales tradicionales, medicinas tradicionales chinas y medicinas ayurvédicas (indias) y determinación de sustancias radiomarcadas en productos químicos, muestras bioquímicas, biológicas, farmacéuticas y medicinales entre otras.

HPTLC es superior a otras técnicas analíticas en términos de tiempo para el análisis. Las características importantes de HPTLC incluyen la capacidad de analizar muchas muestras que contienen componentes múltiples al mismo tiempo, al aplicarlas en una sola placa.

La cromatografía en capa fina de alta resolución es una técnica instrumental sofisticada basada en las capacidades de la cromatografía de capa fina. Las ventajas de la automatización, escaneo, y principalmente la detección selectiva, preparación mínima de muestra, entre otras; la convierte en una herramienta analítica poderosa para resolver incluso mezclas complejas (ManMohan, 2011).

Logrando así una mejor separación, elimina errores manuales y mejora la reproducibilidad de los resultados, útil para el análisis cualitativo y cuantitativo en productos herbarios. Se puede utilizar prácticamente con todas las sustancias, con la excepción de aquellas que son gaseosas.

En la actualidad el método de HPTLC es una herramienta útil en la evaluación de la calidad en productos cuyas formulaciones están hechas en base a hierbas y en donde su variación en el contenido en materia prima puede variar, debido a diferentes factores geo-climáticos y razones comerciales.

Todo proceso analítico para HPTLC puede ser resumido en los siguientes pasos:

1. Para la selección de la fase estacionaria en HPTLC se puede empezar por utilizar gel de sílice que es muy utilizada y se aplica para la mayoría de las drogas. A continuación, se muestra en la tabla 4 los tipos de fase estacionaria que se pueden utilizar considerando el compuesto que se desea separar.
2. Preparación de la muestra: la preparación de muestras para HPTLC no es muy exigente. Sólo se necesita colocar la muestra en un disolvente adecuado que solubilizará completamente al analito. En caso de ser necesario se puede utilizar la sonicación para asegurar la solubilidad completa de la muestra, así como la filtración o centrifugación para eliminar los excipientes no disueltos.
3. Aplicación de la muestra en fase estacionaria: Comúnmente, se conocen dos formas aplicación de muestras en una placa de HPTLC: aplicación de contacto y técnicas en aerosol o pulverización. La selección de una técnica de aplicación de muestra depende de factores tales como la naturaleza de la tarea analítica, el tipo de matriz de muestra, la carga de trabajo y las limitaciones de tiempo, el tipo de capa de separación y los volúmenes de muestra que se aplicarán. Durante la aplicación

puntual mediante la técnica de aplicación de contacto, el disolvente de la muestra realiza la "cromatografía circular". Esto puede causar una distribución irregular de los componentes de la muestra a través del punto, y las manchas pueden ser amplias y no simétricas después del desarrollo del cromatograma.

La técnica en aerosol o pulverización ofrece la ventaja de evitar cualquier asimetría durante la aplicación de la muestra al mejorar la resolución y detección de un sistema. Si las muestras se aplican como bandas estrechas garantiza la distribución homogénea de la muestra en toda la longitud de la banda.

Tabla 4 Guía para la selección de fase estacionaria para el desarrollo del método HPTLC

Fase estacionaria	Tipo de muestra
Gel de sílice	Toda clase de componentes
Óxido de Aluminio	Compuestos básicos (alcaloides, aminos, etc.) esteroides, terpenos, hidrocarburos alifáticos y aromáticos
Amino	Azúcares, fenoles, ácidos carboxílicos, purinas, nucleótidos
Ciano	Toda clase de componentes, PHB esterés
Diol	Toda clase de componentes, esteroides, hormonas
Fase Reversa C-2, C-8, C-18	Sustancias polares, esteroides, tetraciclinas, ftalatos, barbitúricos, bases nucleicas, aminofenoles
Poliamida	Fenoles, flavonoides, compuestos nitro
Gel de sílice impregnado con nitrato de plata	Hidrocarburos aromáticos cíclicos, ácido bórico
Fase Quiral	Enantiómeros

Nota: Información obtenida de Patel, Rashmin y cols (2012)

- Desarrollo de la placa: la elección de la fase móvil para el método HPTLC, se selecciona y optimiza sobre la base de la propia experiencia del analista, la información obtenida de la literatura de estudios similares y, por último, el método tradicional de prueba y error. Durante el desarrollo, una fase gaseosa está presente además de la fase estacionaria y móvil. Esta fase gaseosa puede influir significativamente en el resultado de la separación, ésta dependerá de: tipo, tamaño y condición de saturación de la cámara durante el desarrollo. El uso de cámaras no saturadas debe evitarse debido a la disminución de la reproducibilidad y, frecuentemente a la obtención de frentes de disolvente curvados o torcidos. Las separaciones complejas se pueden realizar con una mejor resolución mediante el desarrollo bidimensional, en el que la mezcla de muestra se aplica en una esquina de la placa de HPTLC. La placa se desarrolla con la primera fase móvil, se seca y se desarrolla con una segunda fase móvil en la dirección perpendicular.
- Detección de compuestos: La observación de los datos obtenidos mediante el desarrollo de la placa se pueden efectuar de varias maneras:

- Visualización directa, es decir, observar a aquellas sustancias que como propiedad intrínseca poseen color.
- Luz UV: empleando una lámpara de luz UV se pueden observar aquellos compuestos con absorción en esa región (compuestos insaturados, aromáticos, entre otros). La mayor parte de las placas contienen un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos en la región UV. El indicador absorbe luz UV y emite luz visible. Si en la placa está presente un compuesto activo en la región UV, éste evita la absorción de luz del indicador en la zona en la que se encuentra el compuesto, resultando en la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia del compuesto.
- Por último, para aquellos compuestos que no se consiguen ver por ninguno de los métodos anteriores se utiliza el revelado utilizando reactivos que ya sea por inmersión o pulverización de la placa se pueden formar derivados observables, en la tabla 5 se muestran algunos reactivos.

Tabla 5 Lista de reactivos de derivatización más utilizados

Agentes	Detección
Ácido sulfúrico	Detección en general
Yodo (vapores de yodo)	Alcaloides, derivados de la purina, lípidos, carotenoides
Anilina-difenilamina-ácido fosfórico	Azúcares, glucósidos
Anisaldehído-ácido sulfúrico	Terpenoides, saponinas, esteroides
2,6-Dibromoquinona -4-clorimida	Arbutina, vitamina B6, fenoles, cumarinas, tioles, tionas, capsaicina, antioxidantes, aminas
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides, compuestos de nitrógeno heterocíclico, polietilenglicol
Vapor de amoníaco	Opiáceos, micotoxinas, flavonoides, senósidos
Natural Products / polietilenglicol	Flavonoides, carbohidratos, antocianinas
Ninhidrina	Aminoácidos, aminas biogénicas, efedrina
Ácido fosfomolibdico	Aceites fijos, fosfolípidos, sustancias reductoras, esteroides, compuestos de aceites esenciales, morfina
Vainillina-ácido inorgánico	Terpenoides, esteroides, salicina, alcaloides del cornezuelo del centeno, la mayoría de los compuestos lipofílicos

Nota: Información obtenida de Patel y cols., 2012

6. Cuantificación (cuando sea necesario): la mayoría de los estudios cuantitativos de HPTLC modernos se realizan *in situ* midiendo las zonas de muestras y de los estándares de referencia, usando un densitómetro o escáner. El cromatograma se puede explorar en modo de reflectancia, transmitancia, absorbancia o por fluorescencia (Devi Datt, 2012) (Patel, Patel, Dubey, Dubey, & Patel, 2012).

2.7 Formas de detección

El desarrollo de la placa da por resultado bandas o manchas (depende de cómo se haya aplicado la muestra) que corresponden a cada compuesto resuelto de la mezcla y como se señaló anteriormente existen diferentes formas de visualización. Como la luz UV fue una de las técnicas utilizadas en el presente trabajo, se ampliará la información acerca de esta técnica (WordPress.com, 2012).

2.7.1 Espectrofotometría UV-Vis

La región ultravioleta se divide, en ultravioleta lejano (de 10 a 200 nm) y ultravioleta cercano (de 200 a 400 nm). La región de ultravioleta lejano suele llamarse también ultravioleta de vacío, puesto que el oxígeno absorbe justo por debajo de 200 nm y es preciso eliminarlo del espectrofotómetro. Mientras que la región visible se encuentra entre 400-700 nm.

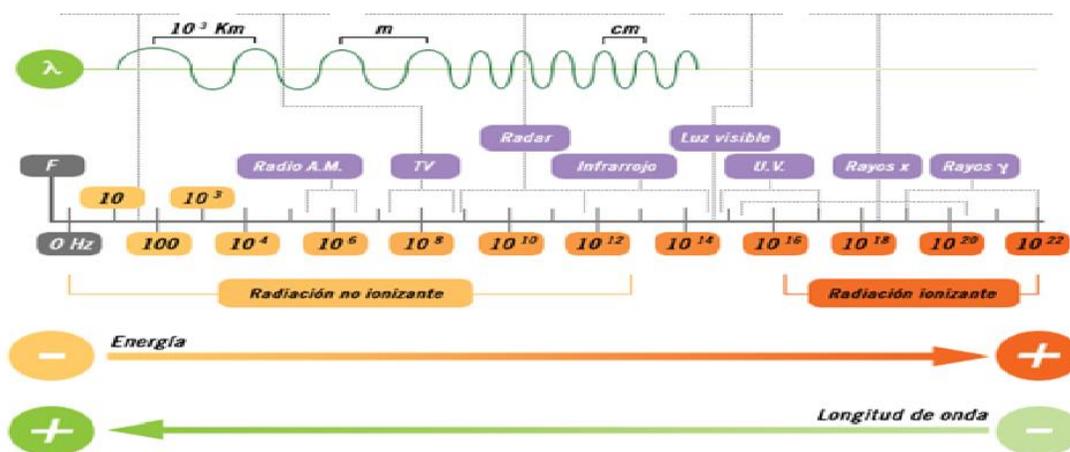


Figura 5 Espectro electromagnético

Nota: Imagen obtenida de WordPress.com, 2012

Las radiaciones ultravioleta y visible tienen en común, que la absorción en ambas regiones provoca la excitación de electrones a niveles de energía superiores. Para excitar a los electrones fuertemente unidos se requiere, en general, fotones energéticos (de longitud de onda corta), mientras que los electrones unidos débilmente (deslocalizados) pueden excitarse con radiación de longitud más larga (Olsen, 1990).

Las especies absorbentes son las que contienen electrones π , σ y n que se encuentran en moléculas orgánicas. Todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación electromagnética porque contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía superiores. La absorción de radiación visible y ultravioleta cercano está restringida a un número limitado de grupos funcionales (llamados cromóforos), que son especies orgánicas con enlaces no saturados. Los orbitales moleculares asociados con enlaces sencillos, en las moléculas orgánicas, se designan como orbitales σ , y los

electrones correspondientes son electrones σ . En cambio, el doble enlace contiene dos tipos de orbitales moleculares, una orbital sigma (σ) correspondiente a un par de electrones enlazantes y una orbital molecular pi (π) asociado con el otro par. Los orbitales moleculares de antienlace σ y π se designan como σ^* y π^* , respectivamente.

Las transiciones electrónicas entre los distintos niveles de energía se pueden producir por absorción de radiación. Como se muestra en la figura 6 son posibles cuatro tipos de transiciones: $\sigma \rightarrow \sigma^*$; $n \rightarrow \sigma^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \pi^*$ (Ramírez, 2008). Las transiciones permitidas en el ultravioleta cercano corresponden a las $\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \pi^*$, para moléculas insaturadas y las que poseen heteroátomos con pares de electrones libres.

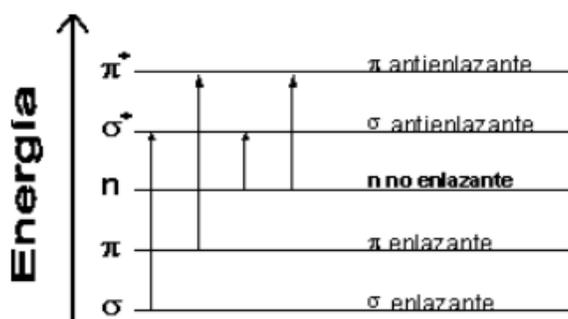


Figura 6 Transiciones electrónicas permitidas
 Nota: Imagen obtenida de Santander García, 2018

Cuando una molécula absorbe radiación ultravioleta o visible, las transiciones electrónicas se producen entre el orbital molecular de más alta energía ocupado, que se denomina HOMO (del inglés: Highest Occupied Molecular Orbital), y el orbital molecular de más baja energía desocupado, el LUMO (del inglés: Lowest Unoccupied Molecular Orbital) (Aldabe Bilmes, Aramendia, Bonazzola, & Lacreu, 2004).

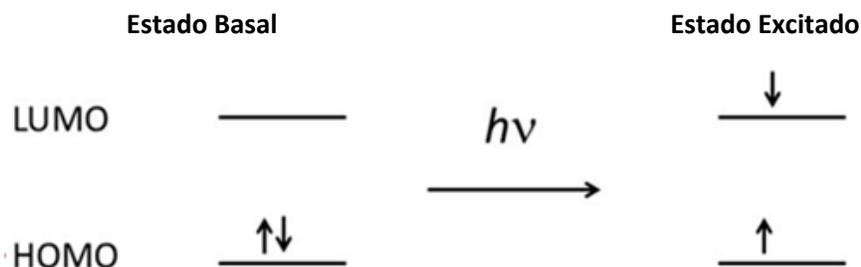


Figura 7 Esquema general para una transición electrónica HOMO-LUMO
 Nota: Imagen obtenida de Vaquera, 2015

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología por la técnica de Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) para obtener el perfil de huellas dactilares del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de la especie *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling ssp. *xolocotziana* (toronjil blanco).

3.1.1 Objetivos particulares

- Determinar la identidad del material adquirido en el mercado “Sonora” de la Ciudad de México por expertos botánicos del Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su correcta caracterización taxonómica.
- Analizar los extractos obtenidos por gradiente de polaridad, por medio de pruebas químicas presuntivas que permitan identificar la fracción donde se encuentran los compuestos polifenólicos.
- Establecer el método cromatográfico a través de la modificación de las condiciones experimentales que permitan separar la mezcla de componentes presentes en el extracto a seleccionar y el aceite esencial de la planta.
- Analizar el extracto seleccionado y aceite esencial mediante la comparación con estándares para deducir los compuestos químicos presentes.
- Evaluar especificidad, linealidad y exactitud por medio de pruebas y criterios estadísticos para la identificación y cuantificación de compuestos químicos en el extracto y aceite esencial.

4 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En la figura 8 se presenta la metodología general planteada en este proyecto y posteriormente se desglosará cada paso, para ver los detalles propios.

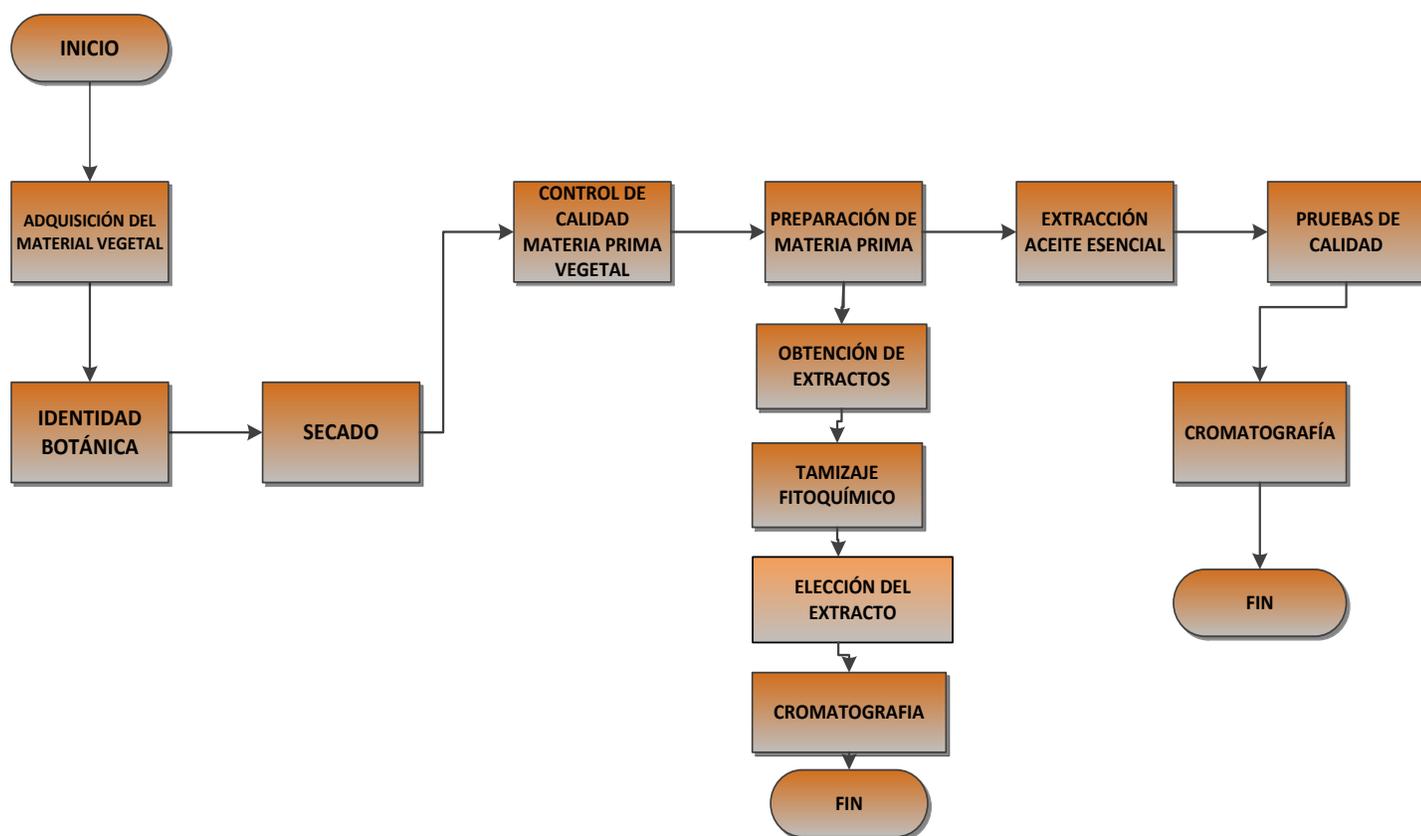


Figura 8 Metodología general del trabajo experimental

4.1 Adquisición del material vegetal

El material vegetal se compró en el Mercado Sonora ubicado en Fray Servando Teresa de Mier # 419, colonia Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza, C.P. 15800 (entre las calles San Nicolás, Canal y La Viga, a espaldas de la estación central de bomberos), Ciudad de México, adquiriéndolo siempre en el mismo puesto.

4.2 Identidad botánica

Una vez obtenida la materia prima se herborizó: Colocando un ejemplar del toronjil, entre dos hojas de papel secante; cuidando que se observen cada una de sus partes y fijando con ayuda de una prensa. El ejemplar seco se llevó al Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, para la identificación de la planta medicinal.

4.2.1 Análisis macroscópico de la planta *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*

Tomar un ejemplar del toronjil blanco y observar que éste cumpla con las características físicas descritas en la monografía de la planta, en cuanto a la forma de tallo, ubicación de las hojas y flores (UNAM, 2009).

4.2.2 Análisis microscópico de la planta *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*

Con un microscopio estereoscópico observar la hoja y flor de la planta para verificar que cumplan con las características de éstas.

4.3 Material extraño

Considerando las características macroscópicas del material vegetal, se efectuó una separación de todo aquello que no cumpla con la descripción botánica (tierra, hojas, material con cambio de coloración o signos de deterioro, otras plantas etc.) (WHO, 1998).

4.4 Secado

Como método de conservación se utilizó secado natural y a la sombra extendiendo el material vegetal adquirido en una mesa, cubriéndolo con hojas de papel secante para protegerlo de la luz y del polvo (Villar del Fresno, 1999).

4.5 Preparación de materia prima

Se seleccionaron las partes a utilizar de la planta (flores y hojas), previamente secas y se trituraron en Picadora clásica 1,2,3 Moulinex, presionando 3 veces durante 30 s por cada vez. El polvo obtenido se tamizó utilizando una malla 30 para conseguir un tamaño de partícula homogéneo.

4.6 Extracción del Aceite esencial

Se utilizaron dos métodos de extracción: hidrodestilación y destilación por arrastre de vapor, que se describen a continuación.

Hidrodestilación: Se pesaron aproximadamente 100 g del material vegetal y se colocaron en un matraz bola de 3 L, adicionándole 1 L de agua destilada. Se montó el equipo de hidrodestilación adaptado con una trampa tipo Clevenger, (figura 4). Se calentó por un lapso de 2 h cuidando de tomar como tiempo inicial el momento en que la destilación empieza. Durante todo el proceso se cuidó la temperatura.

Destilación por arrastre de vapor: Se pesaron aproximadamente 150 g del material vegetal colocándolo en un matraz bola de 1 L. En otro matraz bola de 2 L se colocaron 1.5 L de agua destilada y se armó el equipo de destilación por arrastre de vapor (figura 3). Se calentó durante 3 h colectando el destilado (mezcla aceite-agua).

4.6.1 Separación de la mezcla aceite-agua

Hidrodestilación: Al término del proceso de extracción y con el equipo frío se abrió la llave de la trampa de Clevenger y se colectó el aceite esencial en un tubo de ensayo cuidando de que no pasara agua, en caso de que sucediera, se eliminó el agua utilizando una pipeta Pasteur o se adicionó un agente desecante (sulfato de sodio anhidro).

Arrastre de vapor: La mezcla aceite-agua se colocó en un embudo de separación, dejándola reposar para la separación de las dos fases. Se retiró la fase acuosa quedando el aceite que posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro.

4.6.2 Almacenamiento

Se colocaron los aceites obtenidos en tubos de ensayo con tapa rosca protegidos de la luz a una temperatura de 7°C.

4.7 Control de calidad del aceite

Una vez obtenido el aceite esencial se prosiguió a la realización de las siguientes pruebas.

4.7.1 Propiedades sensoriales:

El olor se describió de acuerdo con la descripción de los 10 olores primarios presentados en el marco teórico.

Color: Se realizó una comparación con el modelo RGB como patrón.

4.7.2 Densidad

Para la determinación de este parámetro se utilizó el método del picnómetro (NMX-F-075-SCFI,2012) reemplazando, a éste por un matraz volumétrico de 1 mL, debido al bajo rendimiento que presentan los aceites esenciales obtenidos.

4.7.3 Índice de refracción

Se determinó utilizando un refractómetro solar marca Zeigen, previamente calibrado realizando la prueba por triplicado; cuidando que la temperatura en las mediciones fuera de 20°C.

4.7.4 Infrarrojo

El espectro de infrarrojo se obtuvo con un espectrofotómetro de infrarrojo, modelo Nicolet iS10FT con punta de diamante. Colocando la muestra directa y sin dilución alguna para su posterior interpretación.

4.8 Obtención del perfil cromatográfico

En la figura 9 se muestra la metodología general para la obtención del perfil cromatográfico del aceite esencial.

4.8.1 Monitoreo manual

Para el monitoreo manual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- * Preparación de la muestra: el aceite esencial se utilizó directamente, solo se transfirió a un frasco vial.
- * Preparación del análisis: para asegurar la limpieza de la placa fue necesario revisarla en luz blanca y luz UV para detectar la presencia de algún contaminante.
- * Aplicación de la muestra: con ayuda de un capilar, aplicar de forma puntual la muestra sobre las placas cromatográficas; cuyas especificaciones se muestran a continuación:
Placas de HPTLC de vidrio marca Uniplate HPTLC-HLF fase normal sílica gel W/Organic Binder, W/UV 254 de 10x10cm 150micras y de aluminio marca MERCK (TLC Sílica Gel 60F₂₅₄), siendo estas últimas las utilizadas en toda la experimentación. Se ensayaron diferentes tamaños de placa.

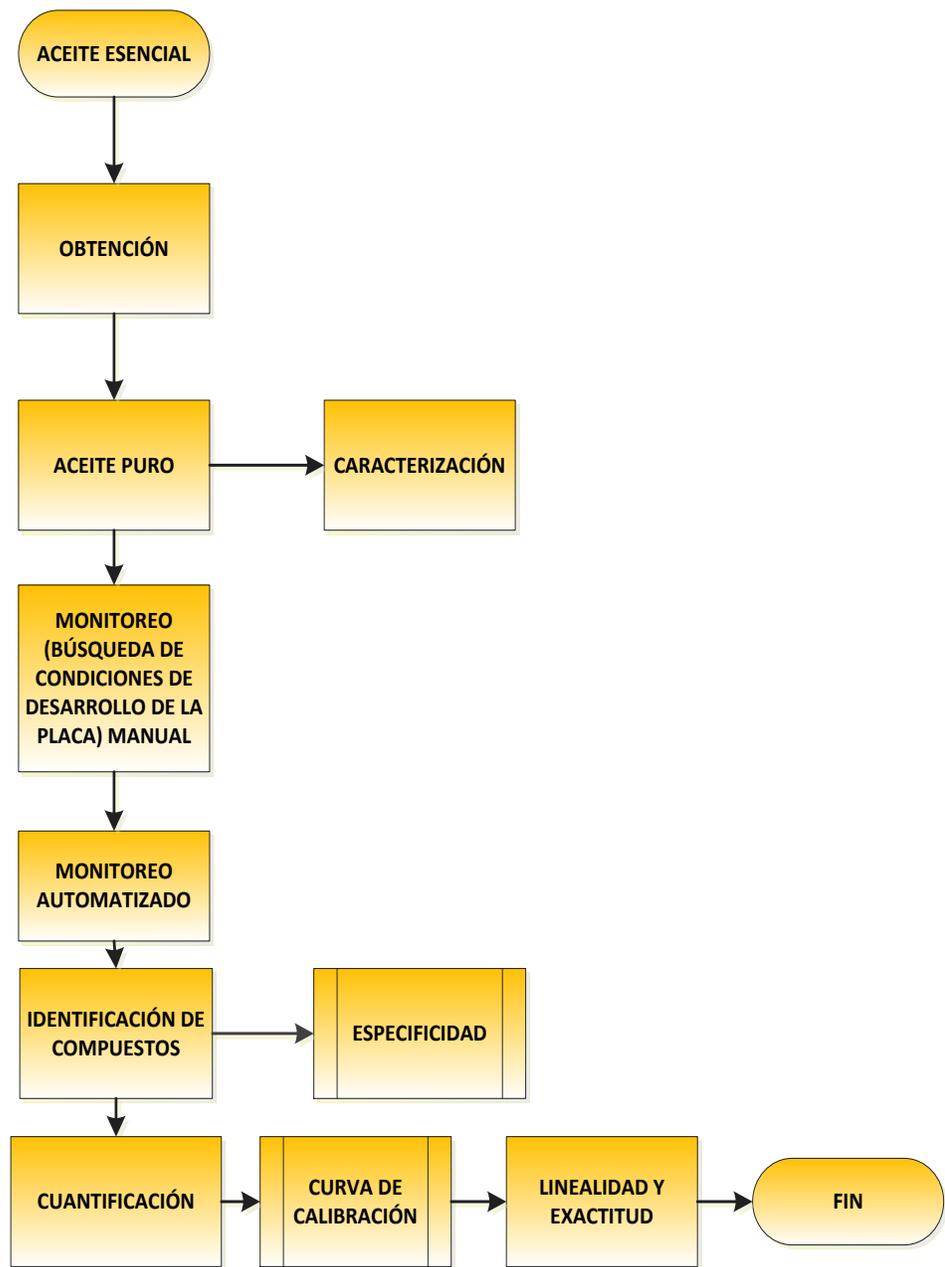


Figura 9 Metodología de la obtención del perfil cromatográfico del aceite esencial

- * Desarrollo de la práctica: se saturó la cámara durante 30 min con diferentes fases móviles que se presentan en la tabla 6.

Tabla 6 Fases móviles ensayadas durante el desarrollo del método

Sistema de elución	Proporción
Tolueno- acetato de etilo	4:0.1
Tolueno- acetato de etilo	4:0.3
Tolueno- acetato de etilo	4:0.5
Tolueno- acetato de etilo	6:0.3
Tolueno- acetato de etilo	6:0.4
Tolueno- acetato de etilo	7:0.3
Tolueno- acetato de etilo	7:0.4

El sistema de elución tolueno-acetato de etilo (7:0.4) fue el que tuvo una mejor resolución cromatográfica del AE.

- * Documentación de la placa desarrollada: se revisó la placa en luz blanca y luz UV con longitud de onda de 254 y 366 nm. En luz blanca y luz UV a 366 nm no se logró apreciar ningún componente, mientras que en 254 nm se observaban los compuestos separados de forma difusa.
- * Derivatización: se sometieron las placas con los siguientes reactivos; ácido fosfomolibdico, cámara de yodo, vainillina y anisaldehído – ácido sulfúrico.
- * Documentación de la placa derivatizada: se observó en cuál de los reactivos se logran identificar los compuestos de la placa.

4.8.2 Monitoreo automatizado.

La preparación de la muestra y preparación del análisis es el mismo que en monitoreo manual.

- * Aplicación de la muestra: se aplicaron las muestras en forma de banda con una longitud de 3 mm con ayuda de CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4).
- * Desarrollo de la placa: se saturó la cámara figura 42 (ANEXO 6) durante 30 minutos con el sistema más eficiente en la separación que resultó de la tabla 6 y recorriendo 90 mm de distancia sobre la fase estacionaria; dejando secar la placa de forma vertical.
- * Documentación de la placa desarrollada: se revisó la placa en luz blanca y luz UV con longitud de onda de 254 y 366 nm. En luz blanca y con la lámpara CAMAG UV Cabinet 4 a 366 nm no se logró apreciar ningún componente, mientras que en 254nm se observaban los compuestos separados bien definidos.
- * Derivatización: se efectuó el revelado de la placa con anisaldehído-ácido sulfúrico, para su aplicación se coloca el reactivo en un cristizador de vidrio y la placa es sumergida en posición

horizontal durante 10 segundos, se saca y nuevamente se deja secar en su totalidad en posición vertical, una vez seca se calentó a 100°C durante 1 min, observándose directamente las bandas.

4.8.3 Identificación de los componentes del perfil cromatográfico del AE

Para la identificación de los componentes del aceite esencial fue necesario compararlo con estándares de referencia existentes en el laboratorio de Farmacognosia.

Para hacer el estudio comparativo se aplicaron de forma intercalada la muestra y los estándares de referencia. Se desarrolló la placa, se secó y escaneó con el equipo CAMAGs TLC Scanner 3 sin derivatizar para la región ultravioleta y derivatizado con anisaldehído-ácido sulfúrico para la región visible. Se determinaron los R_f y longitudes de onda máximas de cada componente presente en el aceite esencial.

4.8.4 Prueba de especificidad

Para evaluar que la señal obtenida en la muestra corresponde al analito de interés, se procedió a realizar la prueba de especificidad, aplicando en la placa las muestras en banda, como se muestra en la Figura 10.

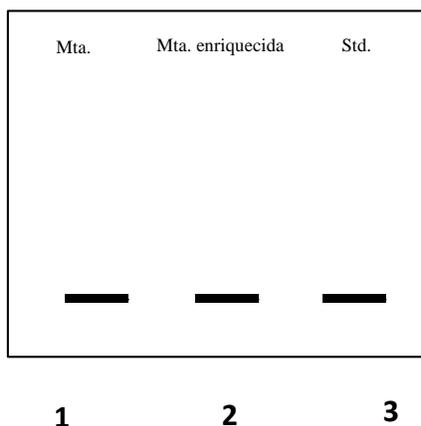


Figura 10 Orden de aplicación de las muestras en la placa

Nota: Se aplicó la misma cantidad de muestra problema en el carril 1 y 2; donde la muestra enriquecida significa muestra con estándar.

Se desarrolló la placa en las mismas condiciones que en el apartado de monitoreo automatizado (elución, secado, revelado y escaneo). Con el valor de la longitud de onda máxima del estándar (carril 3), se procedió a escanear a los otros dos carriles y se seleccionaron las bandas que correspondían al valor de R_f del estándar. Se compararon sus áreas bajo la curva.

4.8.5 Realización de la curva de calibración

De cada compuesto identificado en la muestra se realiza una curva de calibración con 5 puntos y se ensayó por triplicado; la placa se desarrolló en las mismas condiciones que en el monitoreo automático.

4.8.5.1 Evaluación de linealidad y exactitud de la curva de calibración

Para la linealidad de la curva se consideraron los parámetros que se muestran en la tabla 7:

Tabla 7. Parámetros estadísticos y criterio de aceptación de cada uno.

Parámetro estadístico de la regresión	Criterio de Aceptación
R^2	$R^2 \geq 0.98$
IC (β_0)	IC (β_0) Debe incluir a cero
CV	$CV \leq 5\%$

Nota: IC (β_0): Intervalo de confianza para la ordenada al origen; CV: coeficiente de variación y R^2 : coeficiente de determinación

Mientras que, para la exactitud se evaluó la cantidad agregada vs. porcentaje de recuperación.

4.9 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos se siguió la metodología mostrada en la figura 11, se utilizaron las flores de la planta previamente secadas y trituradas; el método que se empleó fue extracción con disolventes discontinua, utilizando un gradiente de polaridad.

Los extractos se obtuvieron por dos técnicas de maceración que se describen a continuación:

- Maceración estática: Se colocaron 50 g de la materia prima vegetal en un matraz bola de fondo plano, adicionando 100 mL de disolvente y se dejaron en reposo durante 24 h, protegidos de la luz a temperatura ambiente.
- Maceración dinámica: Se colocaron 5 g de materia prima en un homogeneizador Potter, agregando 12 mL de disolvente y extrayendo durante 35 min.

Una vez obtenido el primer extracto, se separó éste del marco y se procedió a centrifugarlo a 2500 rpm por 10 min para asegurar que el extracto estuviera libre de partículas sólidas.

Con el marco restante se vuelve a realizar otra extracción, pero ahora con el siguiente disolvente; los disolventes utilizados en orden de polaridad fueron hexano, acetato de etilo y por último una mezcla de etanol-agua (70:30) (Figura 12).

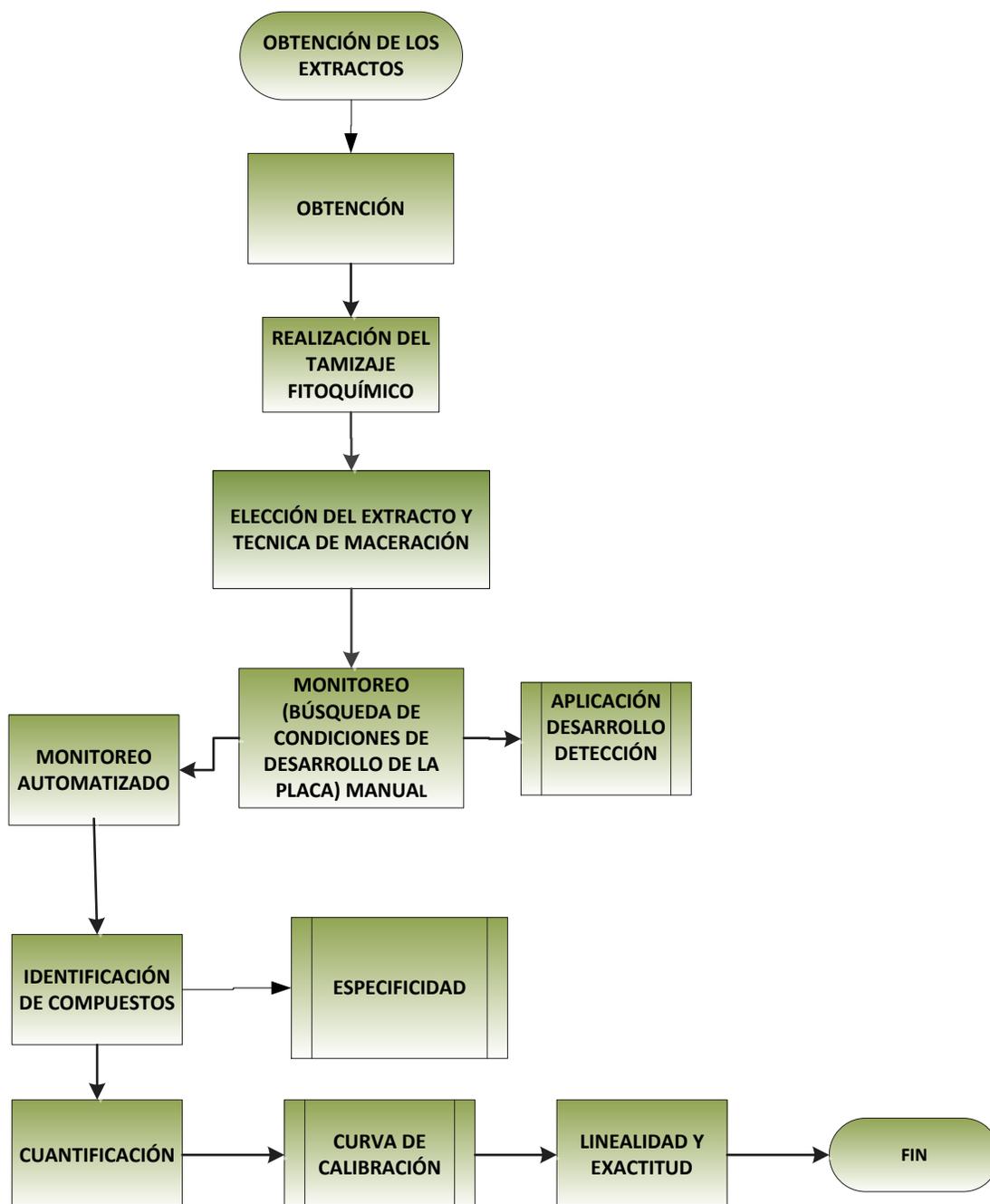


Figura 11 Metodología de la obtención del perfil cromatográfico del extracto

4.9.1 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje consistió en evaluar los extractos obtenidos (hexánico, acetato de etilo y etanol-agua) con reacciones cromogénicas o precipitación, que tienen como característica ser sensibles, reproducibles y de bajo costo para así tener una evaluación rápida de los grupos químicos presentes en cada extracto (Sharapin, 2000).

Las pruebas que se realizaron para los extractos se encuentran en la figura 13. Los procedimientos de preparación y la forma de realización se encuentran en los Anexos 1 y 2.

4.9.2 Elección del extracto y técnica de maceración

De acuerdo con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, se seleccionó la técnica de extracción entre maceración estática o dinámica, así como el tipo de extracto que resultó positivo en las pruebas para polifenoles.

4.9.3 Obtención del perfil cromatográfico

4.9.3.1 Monitoreo manual

Para el monitoreo manual se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- * Preparación de la muestra: se pesaron 100 mg de muestra y se adicionaron 2 mL de metanol y 0.5 mL de agua. Se maceró durante 20 min (se repitió este paso 3 veces); el extracto se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, colocando el sobrenadante en un vial con la finalidad de que éste no presentara ninguna partícula sólida.
- * Preparación del análisis: se aseguró la limpieza de la placa revisándola en luz blanca y luz UV, para detectar la presencia de algún contaminante.
- * Aplicación de la muestra: con ayuda de un capilar, aplicar de forma puntual la muestra sobre las placas cromatográficas; cuyas especificaciones se muestran a continuación:
Placas de HPTLC de vidrio marca Uniplate HPTLC-HLF fase normal sílica gel W/Organic Binder, W/UV 254 de 10x10cm 150micras y de aluminio marca MERCK (TLC Sílica Gel 60F₂₅₄), siendo estas últimas las utilizadas en toda la experimentación. Se ensayaron diferentes tamaños de placa.
- * Desarrollo de la práctica: se saturó la cámara durante 30 minutos (figura 35, anexo 6) con diferentes fases móviles que se presentan en la tabla 8.

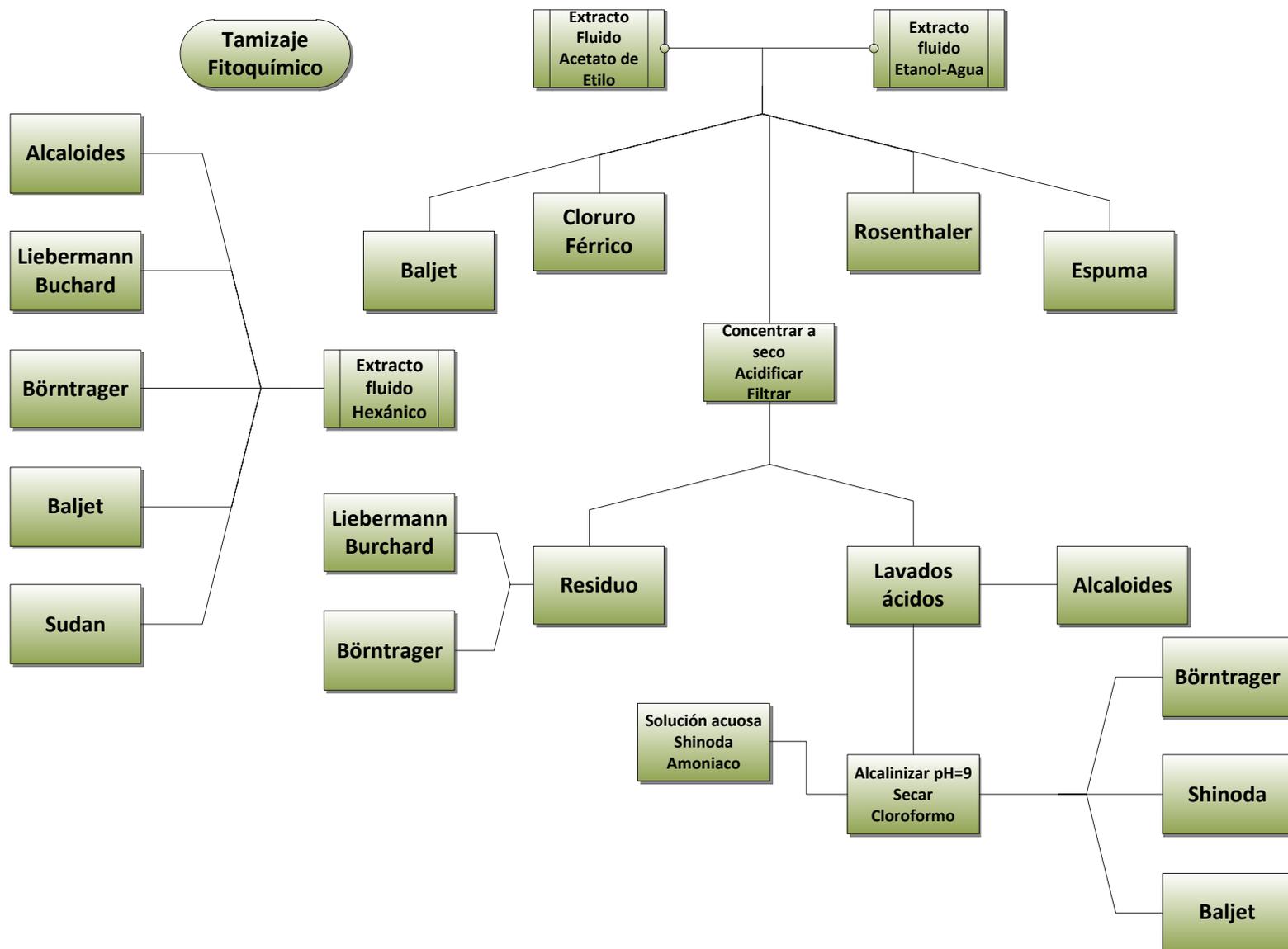


Figura 13 Tamizaje fitoquímico

Tabla 8 Fases móviles ensayadas durante el desarrollo del método

Sistema de elución	Proporción
Cloroformo –acetato de etilo	2:1
Acetato de etilo, ác. fórmico, ác acético glacial y agua	2:1:1:2
Acetato de etilo, ác. fórmico, agua y metanol	3:1:1:0.5
n-butanol, ác. acético	2:1
n-butanol, ác. acético	2:2
n-butanol, ác. acético y agua	2:1:1
n-butanol, ác. acético y agua	4:1:5
n-butanol, ác. acético y agua	6:1:2
n-butanol, ác. acético y agua	6:2:1
n-butanol, ác. acético y agua	2:1:1
n-butanol, ác. acético y agua	3:1:1
n-butanol, ác. acético y agua	2:2.8:1
n-butanol, ác. acético y agua	3:2.5:0.5
n-butanol, ác. acético y agua	3:2:0.5
n-butanol, ác. acético y agua	2.5-3-0.5
n-butanol, ác. acético y agua	2:3.5:0.5

- * Documentación de la placa desarrollada: se revisó la placa en luz blanca y luz UV con longitud de onda de 254 y 366 nm. En luz blanca y luz UV a 366 nm no se logró apreciar ningún componente, mientras que, en 254 nm se observaron los compuestos separados de forma difusa.
- * Derivatización: se sometieron las placas con los siguientes reactivos; vapores de amoniaco, cloruro férrico-ferrocianuro, vainillina, reactivo de Folin-Ciocalteu, reactivo Natural Products-polietilenglicol (NP/PEG) y ácido fosfomolíbico.
- * Documentación de la placa derivatizada: el reactivo que produjo el mejor resultado fue el NP/PEG, ya que permitió visualizar la mayoría de los compuestos químicos presentes en el extracto.

4.9.3.2 Monitoreo automatizado

La preparación de la muestra y preparación del análisis es el mismo que en el monitoreo manual.

- * Aplicación de la muestra: se programó al equipo CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4) para aplicar las muestras en forma de banda con una longitud de 3 mm.
- * Desarrollo de la placa: se probaron los sistemas mostrados en la tabla 5 siendo el más eficiente el: n-butanol, ác. acético y agua (2:3.5:0.5). La placa desarrollada se secó en posición vertical.

- * Documentación de la placa desarrollada: se revisó la placa en luz blanca y luz UV a una longitud de onda de 254 y 366 nm. En luz blanca y luz UV a 366 nm (lámpara CAMAG UV Cabinet 4), no se logró apreciar ningún componente, mientras que en 254 nm se observaban los compuestos separados y bien definidos.
- * Derivatización: se derivatizó con el reactivo de Natural Productos (NP/PEG), la placa se sumergió primeramente en solución A durante 10 segundos, se secó en posición vertical y posteriormente en la solución B (10 segundos) se secó y se observó con la lámpara UV a una longitud de onda de 365 nm.

Se utilizó el mismo procedimiento del monitoreo automatizado-aceite esencial a excepción de la cámara cromatográfica (figura 35, anexo 6).

4.9.4 Identificación de compuestos

Para la identificación de los componentes del extracto fue necesario compararlo con estándares de referencia existentes en el laboratorio de Farmacognosia.

Para hacer el estudio comparativo se aplicaron de forma intercalada la muestra y los estándares de referencia. Se desarrolló la placa, se secó y escaneó con el equipo CAMAGs TLC Scanner 3, sin derivatizar para la región ultravioleta y derivatizado para la región visible con la finalidad de obtener los Rf y longitudes de onda máximas de cada componente presente en el extracto.

4.9.5 Prueba de especificidad

Para evaluar que en la muestra la señal obtenida es del analito de interés, se procedió a realizar la prueba de especificidad, aplicando en la placa las muestras en banda, como se muestra en la figura 10 del apartado 4.8.4.

Se desarrolló la placa en las mismas condiciones que en el punto anterior (elución, secado, revelado y escaneo). Con el valor de la longitud de onda máxima del estándar (carril 3), se procedió a escanear los otros dos carriles y se seleccionaron las bandas que correspondían al valor de Rf del estándar. Se compararon sus áreas bajo la curva.

4.9.6 Realización de las curvas de calibración

De cada compuesto identificado en la muestra se realizó una curva de calibración con 5 puntos, realizándose el ensayo por triplicado, la placa se desarrolló en las mismas condiciones que en el monitoreo automático.

4.9.6.1 Evaluación de linealidad y exactitud de la curva de calibración

Para la determinación de linealidad y exactitud se siguió el procedimiento indicado en el inciso 4.8.5.1.

5 RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Adquisición de la materia prima vegetal

Como se mencionó en la metodología la materia prima vegetal es una muestra que se adquirió en el mercado Sonora de la Ciudad de México en el periodo comprendido entre los meses de octubre-noviembre.

5.1.1 Identidad botánica.

Los resultados proporcionados por el Herbario Etnobotánico IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala son los siguientes:

Planta conocida popularmente como toronjil blanco; de nombre científico *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling. ssp. *xolocotziana* perteneciente a la familia Lamiaceae y con número de registro: 2688 IZTA.

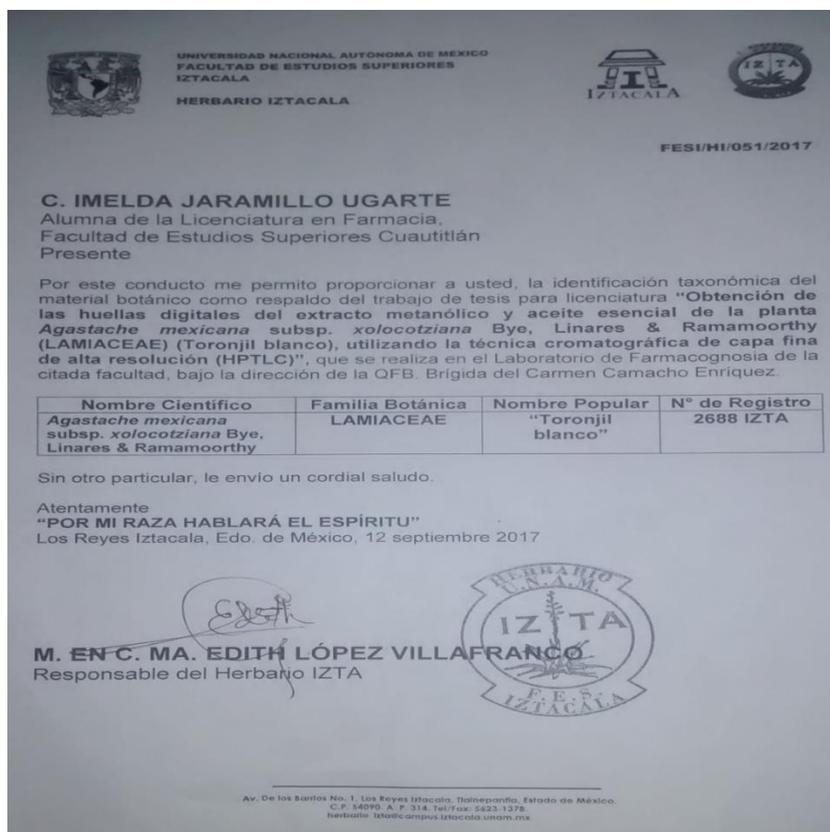


Figura 14 Oficio de la identificación de la planta expedida por la FES-Iztacala

5.1.2 Análisis macroscópico

Como se puede observar en la figura 15 las flores son blancas y se encuentran agrupadas en forma de racimo terminal; mientras en la figura 16 se aprecian los tallos cuadrados típicos de la familia de las lamiáceas. Hojas opuestas en forma de lanza con los bordes dentados.



Figura 15 Fotografías de la planta *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*



Figura 16 Fotografías de los tallos de la planta *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*.

[Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Farmacognosia. 2014). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.1.3 Análisis microscópico

En el análisis microscópico se utilizó un microscopio estereoscópico, y se observaron las hojas y flores. En la figura 17, se aprecia con mayor detalle la forma lanceolada de las hojas, los bordes dentados y su vena primaria (V1) y venas secundarias (V2); mientras que en la figura 18 en la flor blanca se logra ver sus estambres (A) y pistilo (B) (Santillán Ramírez M. , 2008).

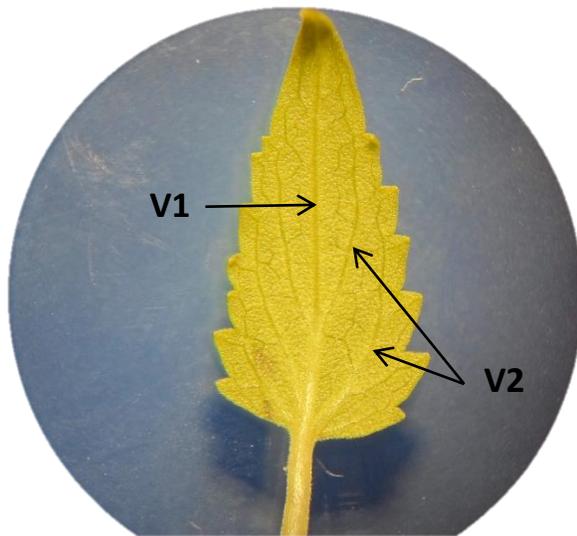


Figura 17 Hoja de *A. mexicana ssp. xolocotziana*

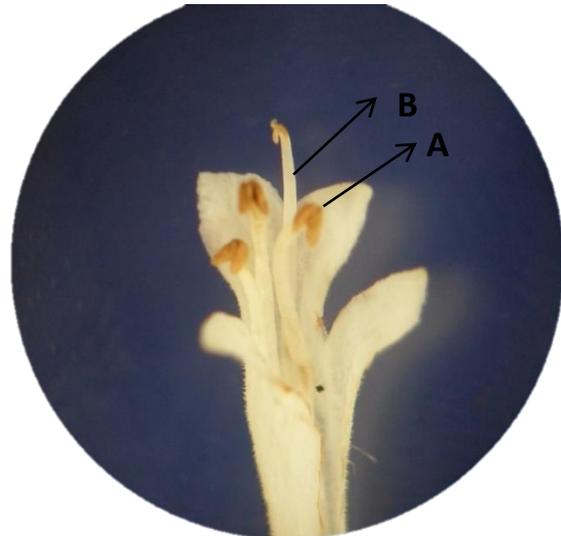


Figura 18 Flor de la planta de *A. mexicana ssp. xolocotziana*

[Fotografías de Alejandra Sánchez]. (Laboratorio de Farmacognosia. 2014). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.1.4 Material extraño

La materia prima vegetal cumplió con la descripción física de la planta; sólo se observaron restos de material en descomposición y polvo que no llegó a más del 1%.

Por lo que se considera que la calidad del producto es buena al tener menos del 2% considerado como límite en la FHEUM (Secretaría de Salud, 2013).

5.1.5 Secado

Durante el tiempo de secado no hubo una alteración de las características físicas, ni presentó contaminación por microorganismos. Se determinó su porcentaje de humedad que fue de 7.21%.



Figura 19 Fotografía de la planta *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* seca
[Fotografías de Alejandra Sánchez]. (Laboratorio de Farmacognosia. 2014). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.1.6 Preparación de la materia prima

Se trituyó la materia prima y posteriormente se pasó por la malla No. 30, obteniendo un polvo moderadamente grueso de acuerdo con la clasificación de FHEUM (2013).

5.2 ACEITE ESENCIAL (AE)

5.2.1 Obtención del AE

Se hizo la obtención del aceite por dos métodos: destilación por arrastre de vapor e hidrodestilación (figuras 20 y 21). Con el método de arrastre de vapor no fue posible separar el aceite debido a que se obtuvieron 500 mL de una mezcla aceite-agua en la que predominaba el agua por lo que este método se descartó.

Los datos que se presentan en los siguientes apartados corresponden a hidrodestilación.



Figura 20 Aparato de hidrodestilación

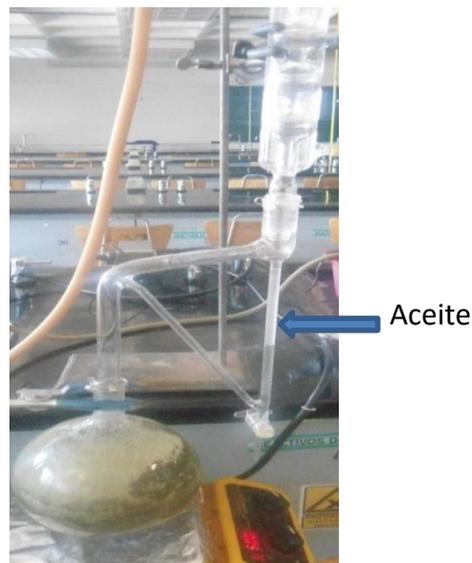


Figura 21 AE de toronjil blanco obtenido por hidrodestilación.

[Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Fitoquímica y Farmacognosia. 2014). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.2.2 Control de calidad del AE

5.2.2.1 Propiedades sensoriales

Se obtuvo un líquido translúcido ligeramente amarillento que de acuerdo con el código RGB tiene la siguiente proporción: Rojo 255, Verde 255 y Azul 235. Con un olor fragante o floral.

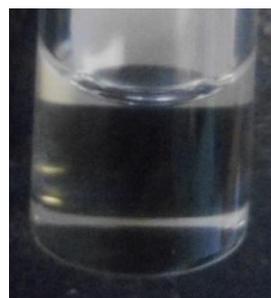


Figura 22 AE de la planta *A. mexicana ssp. xolocotziana*.

[Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Farmacognosia. 2014) Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.2.2.2 Propiedades fisicoquímicas del AE

Tabla 9 Propiedades fisicoquímicas del AE

Nombre de la propiedad	Experimental	Referencia
Densidad (20°C)	0.891±0.02	0.8886 ^a
Índice de Refracción (20°C y 25°C) respectivamente	1.465 y 1.473	1.4658 ^b a 20°C
Rendimiento (%)	1.14	0.9-1.2 ^b

Notas: a: (Pérez Santiago & Silva Castañeda, 2015) y b: (Estrada, García, Aguirre, & Soto, 2004)

Con el valor obtenido de la densidad del AE menor a 1, nos confirma que es más ligero que el agua. Por lo que, el método de hidrodestilación con la trampa tipo Clevenger son las herramientas adecuados para su obtención.

Se determinó el índice de refracción con un valor de 1.465 (figura 23).



Figura 23 Medición del índice de refracción

[Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Farmacognosia. 2014). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México.

Rendimiento: De acuerdo con la especificación de la FHEUM (2013), el rendimiento del AE “contiene no menos del 0.35%”, siendo el valor experimental 1.14% considerándose un excelente rendimiento.

Al hacer una comparación entre los datos obtenidos experimentalmente y los de referencia se observa que entra en especificaciones por lo tanto el AE cumple con los parámetros de calidad determinados.

5.2.2.3 Espectroscopia infrarroja del Aceite esencial de la planta *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*.

En la figura 24 se muestra el espectro infrarrojo del AE obtenido; en él se pueden apreciar las bandas correspondientes a los grupos funcionales mostrados en la misma imagen.

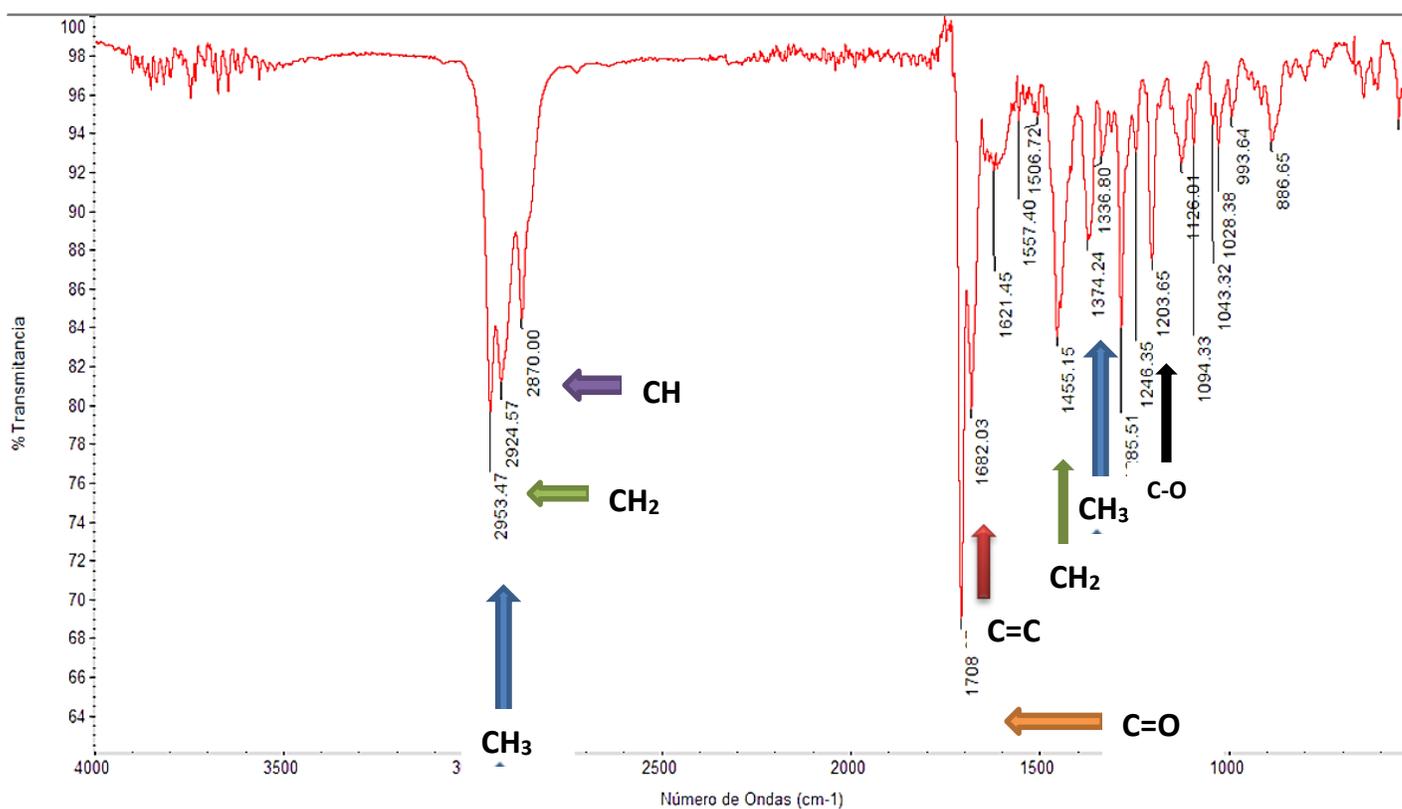
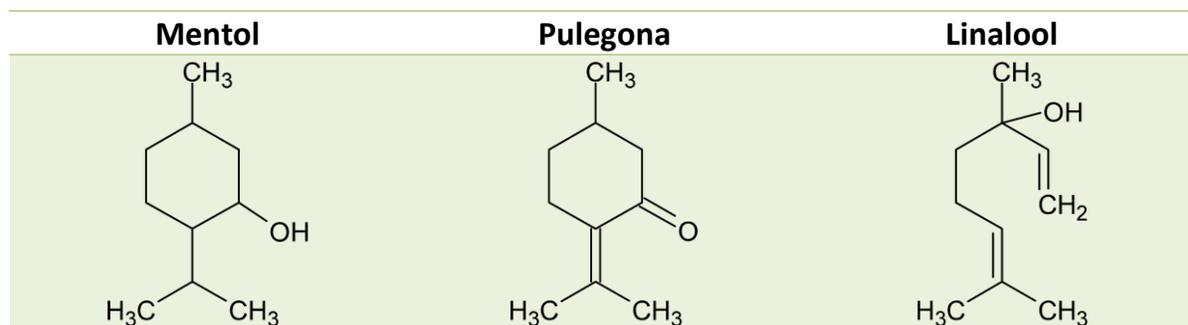


Figura 24 Espectro infrarrojo del aceite esencial de la planta *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*.

Los grupos funcionales encontrados en el espectro infrarrojo del aceite esencial, mostrado en la figura 24, se pueden relacionar con la presencia de pulegona, mentol y linalool (identificados en este trabajo) y cuyas estructuras se muestran en la tabla 10. Sin embargo, cabe mencionar que se observan una serie de bandas de menor intensidad en la región entre 3600 y 3700 cm^{-1} que se podría asignar al grupo funcional OH libre (3650-3590 cm^{-1}).

Dado que los niveles de energía de vibración son únicos para cada molécula, el espectro IR provee una "huella digital" de la misma (Larkin, 2011). El análisis por espectroscopía infrarroja junto con métodos estadísticos está estableciéndose como una herramienta valiosa para el control de calidad de las drogas vegetales (Devi Datt, 2012).

Tabla 10 Estructuras de los compuestos identificados en la experimentación



5.2.3 Obtención del perfil cromatográfico

Para la obtención del perfil cromatográfico se tuvo en consideración el uso de disolventes previamente destilados, con el fin de garantizar su pureza. La cámara de elución se saturó durante 30 min., tiempo en el que los resultados fueron reproducibles.

5.2.3.1 Monitoreo manual

En el monitoreo manual se establecieron las condiciones de trabajo. La muestra se aplicó con un capilar de forma puntual y concentrándolo.

La placa se desarrolló en una cámara previamente saturada. Se utilizaron diversas mezclas de disolventes (para mayor detalle ver la metodología) hasta encontrar la mezcla que permita la resolución de la mezcla. El mejor sistema de elución fue: tolueno-acetato de etilo 7:0.4. El agente cromogénico que permitió distinguir los componentes de la mezcla resuelta fue anisaldehído-ácido sulfúrico. En el caso del ácido fosfomolíbico, todos los componentes se alcanzaban a ver, pero no existía diferencia alguna entre ellos. Se puede observar por la coloración azul (Figura 25), que todos los componentes de la mezcla tienen capacidad reductora por el cambio de Mo^{VI} a Mo^{V} .

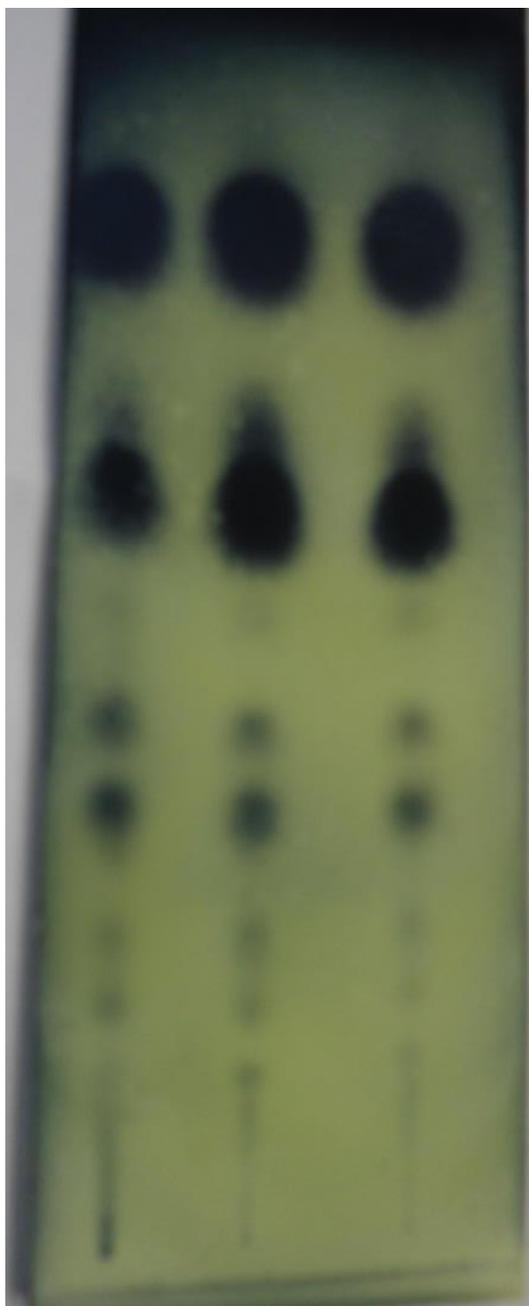


Figura 25 Perfil cromatográfico de la planta *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* con aplicación manual y revelada con ácido fosfomolibdico

5.2.3.2 Monitoreo automatizado

En la figura 26 y 27 se aprecian los perfiles cromatográficos obtenidos de forma automatizada.



Figura 26 Perfil cromatográfico del AE utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelador.



Figura 27 Perfil cromatográfico del AE con lámpara UV a 254nm.

[Fotografías de Alejandra Sánchez] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México.

En las figuras 26 y 27 se muestra el perfil de cromatográfico del aceite esencial de la especie *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*. Este patrón cromatográfico de huellas digitales permite tomarlo como referencia (recordar que se tiene la identidad botánica) al comparar éste con otras muestras provenientes de la misma planta, con el propósito de autenticación de especies a través de la determinación de sustancias características de la planta en cuestión (Sharapin, 2000). Sin embargo, debido a que las plantas responden a factores abióticos y bióticos, existe una alta probabilidad que exista una pequeña variación en las concentraciones de los componentes del aceite, pero la composición deberá mantenerse.

Para evitar en lo posible la variabilidad geográfica, se tuvo el cuidado de adquirir el material vegetal en el mismo sitio. En la figura 28 se muestra el perfil cromatográfico del AE obtenido en diferentes días (misma muestra), en el que se observan, igual número de componentes; por lo que tentativamente el método es reproducible.

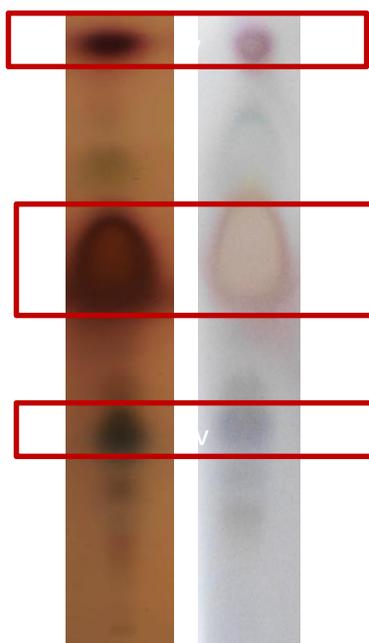


Figura 28 Perfiles cromatográficos del AE obtenidos en diferentes días

[Fotografías de Alejandra Sánchez] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

5.2.3.3 Identificación de compuestos en el AE

Se comparó el aceite con los estándares linalool, β -pineno, estragol (metilchavicol), limoneno, mentol, isoeugenol y pulegona, de los que se identificaron en el AE: mentol, pulegona y linalool, cuyos valores de longitud de onda y Rf obtenidos experimentalmente se muestran en la tabla 11.

Tabla 11 Resultados de los Rf y Longitudes de onda máxima de los estándares identificados en el AE

Nombre	Rf Experimental	Rf Referencia	λ máx. experimental
Pulegona	0.47	0.48 ^a	267
Mentol	0.28	0.28 ^a	587
Linalool	0.34±0.02	0.33 ^a	430

Notas: a: (Wagner & Bladt, 1996)

5.2.3.4 Especificidad

La prueba de especificidad está destinada a garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se consigue mediante la comparación de alguna de las propiedades intrínsecas del compuesto químico en cuestión; por ejemplo: el espectro UV-Vis, comportamiento cromatográfico, reactividad química, entre otros, con una muestra patrón o de referencia.

En este caso la evaluación para la especificidad se realizó comparando el valor de Rf, ABC (área bajo la curva) y el color, producto del método de revelado.

A continuación, se muestran las pruebas de especificidad del mentol, pulegona y linalool que como se mencionó anteriormente fueron los compuestos identificados en el AE, la prueba se realizó como se indica en la metodología.

◆ Especificidad del mentol

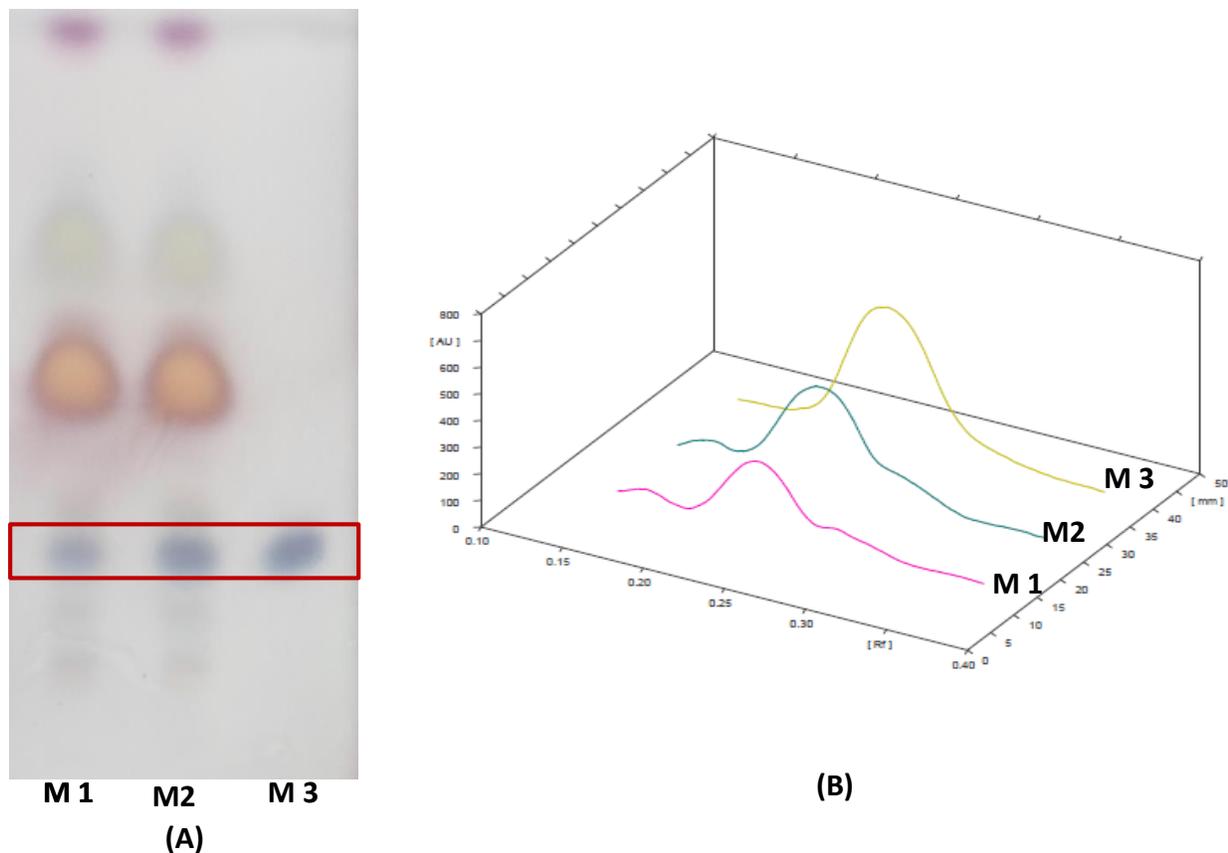


Figura 29 Especificidad del mentol

Nota: (A) AE y (B) cromatograma en donde M1 es la muestra pura (AE), M2 la muestra enriquecida con mentol y M3 el std de mentol

[Fotografías de Alejandra Sánchez] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

Tabla 12 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad del mentol

Muestra	ABC
Aceite esencial	9701.6
AE + mentol	19422.1
Mentol	26745.1

◆ Especificidad de pulegona

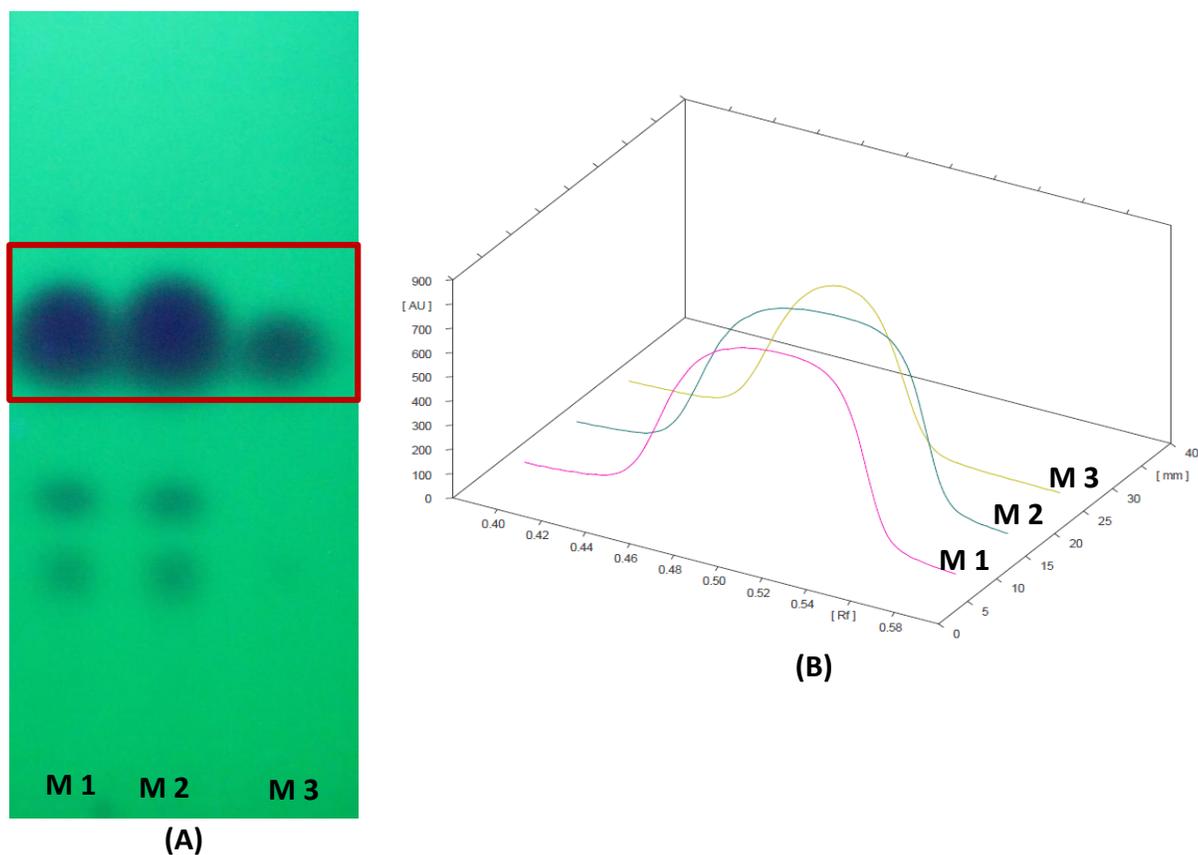


Figura 30 Especificidad de pulegona

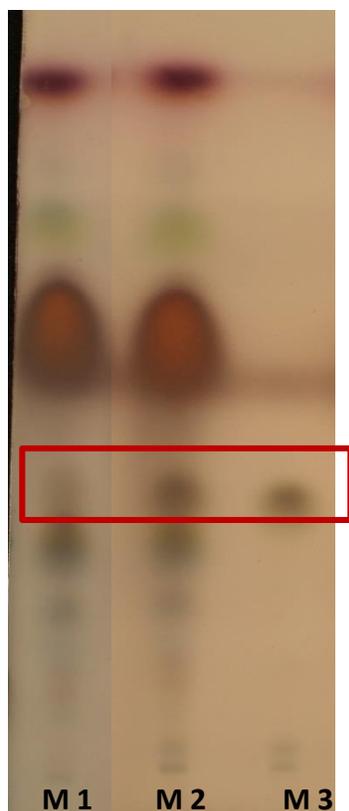
Nota: (A) AE y (B) cromatograma en donde M1 es la muestra (AE), M2 la muestra enriquecida con pulegona y M3 el std de pulegona

[Fotografías de Alejandra Sánchez] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

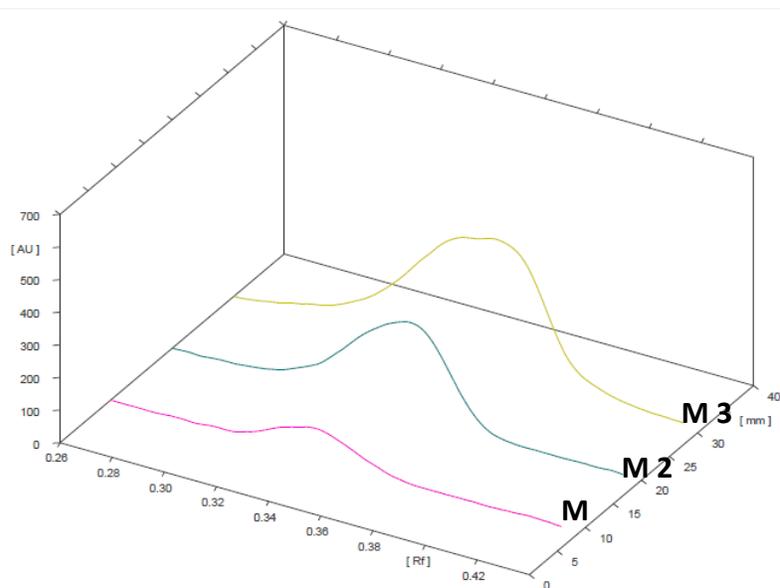
Tabla 13 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad de pulegona

Muestra	ABC
Aceite esencial	880
AE + Pulegona	895
Pulegona	739

◆ Especificidad del linalool



(A)



(B)

Figura 31 Especificidad del linalool

Nota: (A) AE y (B) cromatograma en donde M1 es la muestra (AE), M2 la muestra enriquecida con linalool y M3 el std de linalool

Tabla 14 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad de linalool

Muestra	ABC
Aceite esencial	2295.2
AE + Linalool	8085.2
Linalool	17548.4

Para la identificación de cada compuesto químico en la placa desarrollada se debe considerar que las manchas y los Rf's producidos por la muestra y el estándar sean iguales; consiguiendo una correcta

visualización de cada componente por medio de lámpara UV y como revelador anisaldehído-ácido sulfúrico, detectando así la presencia de terpenos y fenilpropanoides (Wagner & Bladt, 1996).

En la figura 26 y 27 se presenta el perfil cromatográfico del AE, con anisaldehído-ácido sulfúrico y luz UV 254 nm respectivamente. Una vez determinadas las bandas coloridas se obtuvieron los Rf's (tabla 9), y se compararon con el estándar correspondiente, identificándose los siguientes compuestos químicos: mentol, pulegona y linalool, como se muestran en las figuras 29, 30 y 31 respectivamente.

Sharapin (2000), especifica que la identificación de compuestos no se da únicamente por la presencia de manchas o bandas coloreadas con el mismo Rf confrontando con las sustancias de referencia, sino que también se deben comparar las longitudes de onda; para asegurar que las bandas obtenidas se deben solamente al analito de interés. Considerando lo anterior, se procedió a realizar la prueba de especificidad, evaluando de manera inequívoca al analito, aun en presencia de componentes que puedan interferir en la medición (ICH, 2005). Se obtuvieron los valores de ABC, de la muestra, la muestra enriquecida y el estándar, esperando un aumento en M2 (muestra enriquecida) comparada con M1 (muestra sola), dado M2 tiene una mayor concentración del estándar esto se tiene que ver reflejado en el ABC aumentado la misma, que es lo que se obtuvo de forma experimental en los 3 ensayos realizados (1 por cada estándar). En el cromatograma, el estándar únicamente sirvió como referencia de los valores de Rf y longitud de onda.

El densitómetro es el equipo que permite calcular los Rf's, longitud de onda, área y altura de los picos del cromatograma. En el caso del análisis cualitativo, la altura de los picos es útil para el procesamiento de datos, pero en el cuantitativo es mejor utilizar el área del pico porque minimiza los errores de cálculo de la línea base o la resolución incompleta de los picos (Krasikov, 2003).

5.2.3.4 Cuantificación

◆ Curva de calibración

Tabla 15 Preparación de las solución y volúmenes de alícuotas aplicada para las curvas de calibración de los estándares.

Nombre del estándar	Preparación de la solución	Volumen de las alícuotas aplicadas (por triplicado)
Mentol	Pesar 0.0153 gramos y disolver en 10 mL y posteriormente hacer una dilución 1:5 con metanol	100, 200, 300, 400 y 500 nL
Pulegona	Medir 4 µL (3.6 mg) y diluir en 10 mL con metanol	300, 400, 500, 600 y 700 nL
Linalool	Medir 6µL (4.9 mg) y diluir en 25mL con metanol	500, 600, 700, 800 y 900 nL

◆ **Curva de calibración del mentol**

µg de banda	Área bajo la curva
0.0300	549.8
	547.3
	546.9
0.0600	985
	1028
	1008.1
0.0900	1499.9
	1508.7
	1515
0.1200	1901
	1928.4
	1941.5
0.1499	2490.6
	2508.3
	2519.1

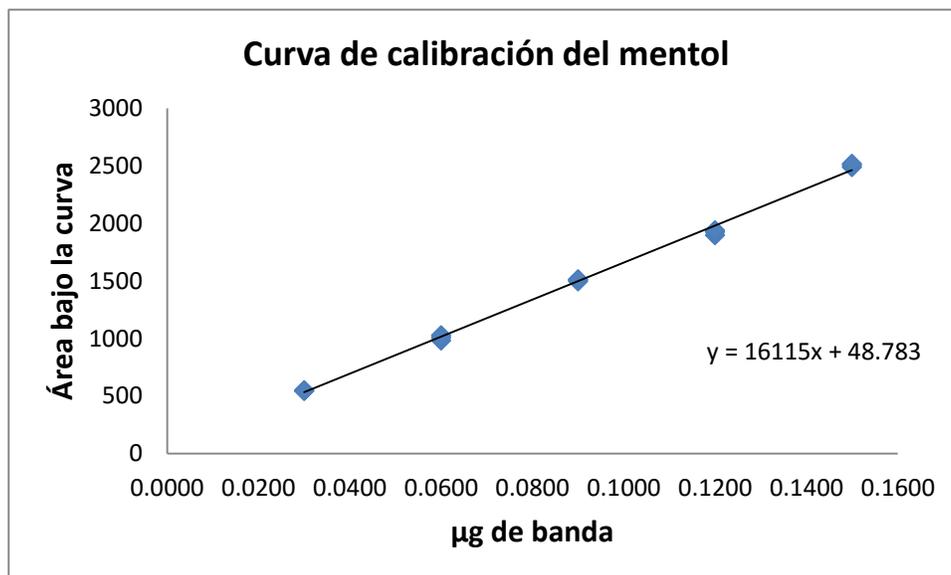


Gráfico 1 Curva de calibración del mentol

Tabla 16 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema del mentol

Parámetro estadístico de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R ²	0.99	R ² ≥ 0.98	Sí cumple
IC(B0)	(-0.845) -(98.412)	IC (B0) Debe incluir a cero	Sí cumple
CV	4.59%	CV ≤ 5%	Sí cumple

◆ Curva de calibración de la pulegona

µg de banda	Área bajo la curva
0.1087	961
	963.9
	985.9
0.1812	1431.9
	1487.8
	1509.1
0.2538	2083.5
	2107.9
	2117.6
0.3263	2689.6
	2699.8
	2833.3
0.4351	3769.5
	3737.3
	3893.6

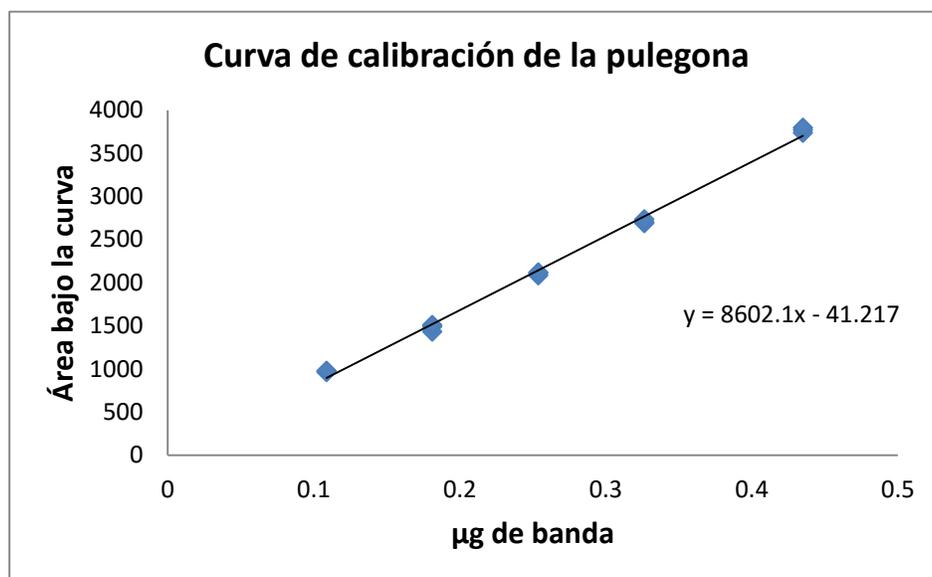


Gráfico 2 Curva de calibración de la pulegona

Tabla 17 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema de pulegona

Parámetro estadístico de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R ²	0.99	R ² ≥ 0.98	Sí cumple
IC(B0)	(-132.450) - (50.019)	IC (B0) Debe incluir a cero	Sí cumple
CV	3.58%	CV ≤ 5%	Sí cumple

◆ Curva de calibración del linalool

µg de banda	Área bajo la curva
0.1014	678.3
	663.3
	693
0.1216	798.2
	780.5
	796.1
0.1419	920.3
	900.9
	913.9
0.1622	1092.1
	1080.5
	1052.7
0.1825	1139.1
	1167.7
	1165.1

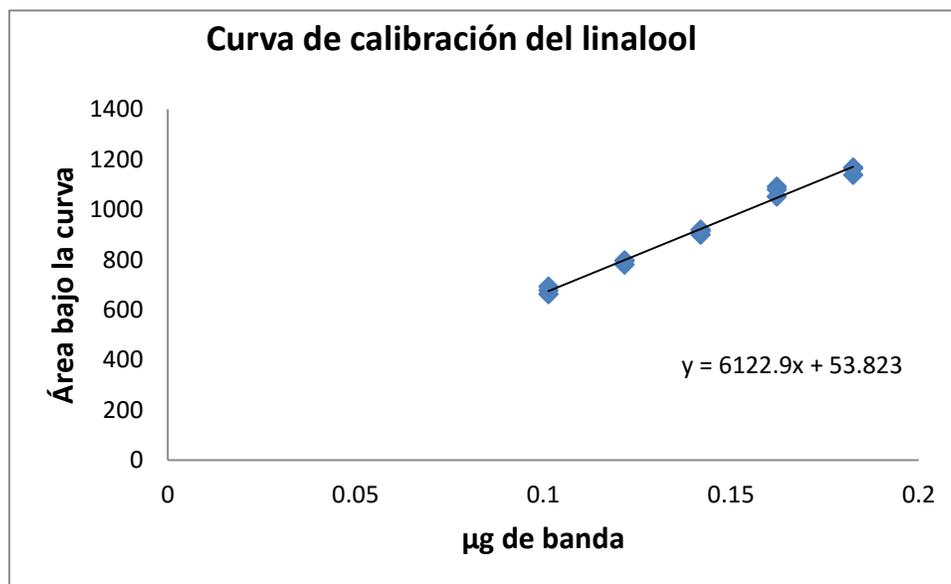


Gráfico 3 Curva de calibración del linalool

Tabla 18 Parámetros obtenidos del análisis de regresión de la linealidad del sistema de linalool

Parámetro estadístico de la regresión	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R ²	0.98	R ² ≥ 0.98	Sí cumple
IC(B0)	(-4.825) -(112.471)	IC (B0) Debe incluir a cero	Sí cumple
CV	2.44%	CV ≤ 5%	Sí cumple

5.2.3.5 Evaluación de linealidad y exactitud

➤ Linealidad

Linealidad es la capacidad que posee el método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.

Para evaluar la linealidad del método, se gráfica una curva de calibración con los datos obtenidos experimentalmente (gráficas 1-3) y los parámetros estadísticos correspondientes a mentol, pulegona y linalool, respectivamente (tablas 16-18). De acuerdo con los valores obtenidos, estos se encuentran dentro del intervalo de los criterios de aceptación, por lo que se puede afirmar que sí existe linealidad en el sistema.

Se procedió a cuantificar cada uno los compuestos antes mencionados en el AE y los resultados se muestran en la tabla 19, en el que el componente mayoritario es la pulegona seguido de linalool y por último el mentol, resultados que concuerdan con el tamaño e intensidad de las bandas obtenidas en el perfil cromatográfico.

Tabla 19 Cuantificación de los compuestos en el AE

Componentes	ABC en el AE	Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del aceite esencial
Mentol	1672.1	0.1008
Pulegona	1720.7	0.2039
Linalool	857.8	0.1313

➤ Exactitud

Tabla 20 Resultados de la prueba de exactitud para mentol

Mentol			
Concentración adicionada μg	Área bajo la curva	Respuesta analítica μg	% de Recobro
0.1008	1675.5	0.1010	100.2
	1691.6	0.1020	101.2
	1665.0	0.1004	99.6
	1671.5	0.1008	100
	1749.5	0.1056	104.8
	1684.4	0.1016	100.8
	%CV	1.87	

Tabla 21 Resultados de la prueba de exactitud para pulegona

Pulegona			
Concentración adicionada µg	Área bajo la curva	Respuesta analítica µg	% de Recobro
0.2039	1740.6	0.2062	101.1
	1750.3	0.2074	101.7
	1713.9	0.2032	99.6
	1714.1	0.2032	99.6
	1746.1	0.2069	101.5
	1718.4	0.2037	100.0
	%CV	0.96	

Tabla 22 Resultados de la prueba de exactitud para linalool

Linalool			
Concentración adicionada µg	Área bajo la curva	Respuesta analítica µg	% de Recobro
0.1313	850.3	0.1300	99.0
	868.4	0.1330	101.3
	845.2	0.1292	98.4
	849.7	0.1300	99.0
	854.6	0.1308	99.6
	860.8	0.1317	100.3
	%CV	1.06	

De acuerdo con los valores obtenidos, el método sí cumple con el criterio de exactitud.

5.3 Resultados del extracto

5.3.1 Resultados del tamizaje fitoquímico

En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas químicas que detectaron la presencia de los diferentes grupos químicos en las diferentes fracciones. Estos ensayos permitieron seleccionar la fracción rica en flavonoides.

Tabla 23 Resultados del tamizaje fitoquímico

Extracto	Nombre de la Prueba	Resultado
Hexánico	Börntrager	-
	Liebermann- Burchard	+ +
	Dragendorff	-
	Hager	-
	Wagner	-
	Ac. Silicotúngstico	-
	Mayer	-
Acetato de Etilo	Espuma	+ + +
	Baljet	++
	Baljet (Fase orgánica)	-
	Cloruro Férrico	+ + +
	Rosenthaler	+ + +
	Dragendorff	-
	Hager	-
	Wagner	-
	Ac. Silicotúngstico	-
	Mayer	-
	Amoniaco	-
	Börntrager (residuo)	-
	Börntrager (Fase orgánica)	-
	Liebermann- Burchard	+ +
	Shinoda (Fase acuosa)	-
	Shinoda (Fase orgánica)	-

Tabla 23 Continuación de los resultados del tamizaje fitoquímico

Extracto	Nombre de la Prueba	Resultado
Extracto Hidroalcohólico Etanol-Agua (70:30)	Espuma	+++
	Baljet	-
	Baljet (Fase orgánica)	-
	Cloruro Férrico	+++
	Rosenthaler	-
	Dragendorff	-
	Hager	-
	Wagner	-
	Ac. Silicotúngstico	-
	Mayer	-
	Amoniaco	-
	Börntrager (residuo)	-
	Börntrager (Fase orgánica)	-
	Liebermann- Burchard	+++
	Shinoda (Fase acuosa)	-
	Shinoda (Fase orgánica)	-

Nota: Los resultados se registraron de la siguiente manera abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), dudoso (+/-) y negativo (-)

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y a partir de ahí, orientar la extracción y o fraccionamientos de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

En la experimentación las pruebas de interés fueron amoniaco y Shinoda, debido a que éstas identifican a los flavonoides presentes; ambas dieron un resultado negativo como se muestra en la tabla 23, por lo que se procedió a hacer la prueba con un extracto de metanol-agua (80:20) en el que finalmente, se obtuvo un resultado positivo; después se efectuó una evaluación fitoquímica completa, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 24.

Tabla 24 Resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto metanol-agua (80:20)

NOMBRE DE LA PRUEBA	RESULTADO	IMAGEN DE LA PRUEBA	IMAGEN DEL BLANCO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	METABOLITO ENCONTRADO
	+++			Un color o precipitado rojo naranja	Agrupamiento lactónico
Espuma	+++			La aparición de espuma estable por un par de minutos	Saponinas
Cloruro Férrico	+++			Un color o precipitado verde oscuro	Fenoles y/o Taninos
Rosenthaler	+++			Un color violeta	Saponinas de Triterpenos pentacíclicos
Dragendorff	-			La presencia de un precipitado rojo ladrillo	Alcaloides
Wagner	-			Precipitado de color rojo	Alcaloides

Tabla 24 Continuación de resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto metanol-agua (80:20)

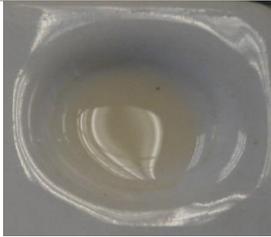
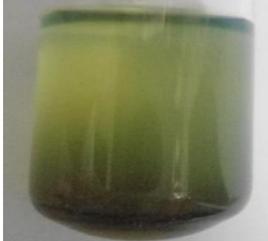
NOMBRE DE LA PRUEBA	RESULTADO	IMAGEN DE LA PRUEBA	IMAGEN DEL BLANCO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	METABOLITO ENCONTRADO
Hager	-			La aparición de cristales en forma de aguja	Alcaloides
Ac. silicotúngstico	-			Turbidez y precipitado	Alcaloides
Mayer	-			Precipitado blanco o de color crema	Alcaloides
Börntrager residuo	+++			Coloración de la fase alcalina rosa-rojo	Quinonas
Liebermann Burchard residuo	++			Aparición de colores rojo, rosa, verde púrpura o azul	Triterpenos y/o Esteroles
Börntrager Fase orgánica	-			Coloración de la fase alcalina rosa-rojo	Quinonas

Tabla 24 Continuación de resultados del tamizaje fitoquímico para el extracto metanol-agua (80:20)

NOMBRE DE LA PRUEBA	RESULTADO	IMAGEN DE LA PRUEBA	IMAGEN DEL BLANCO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	METABOLITO ENCONTRADO
Baljet Fase orgánica	+++			Un color o precipitado rojo naranja	Agrupamiento lactónico
Shinoda	+++			La inmediata aparición de colores que van del anaranjado, rojo, rojo azulado o violeta	Flavonas, Flavononas, Flavonoles, Flavononoles o Xantonas
Amoniaco	+++			La aparición de un amarillo ocre	Flavonoides

Nota: Los resultados se registraron de la siguiente manera abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), dudoso (+/-) y negativo (-). Las pruebas de Shinoda y Amoniaco se realizaron directamente en el extracto sin tratamiento previo.

5.3.2 Elección del extracto y técnica de maceración

Como se puede apreciar en la tabla 24 sólo se muestra un resultado para cada prueba y esto se debe a que en ambas técnicas de maceración: estática y dinámica los resultados fueron los mismos.

Por lo tanto, la selección del tipo de extracción se tomó utilizando los siguientes criterios: menor cantidad de disolvente y materia prima vegetal; siendo la maceración dinámica la que cumplió con ambos requisitos.

5.3.3 Obtención del perfil cromatográfico

5.3.3.1 Monitoreo manual

El monitoreo manual consistió en la indagación de las condiciones de trabajo. Las muestras se aplicaron con la ayuda de un capilar y se concentró el punto de aplicación. Para el desarrollo de la placa se utilizó la cámara saturada utilizando diferentes mezclas de disolventes hasta que se encontró el sistema de elución que permitió la resolución de la mezcla: n-butanol, ac. acético y agua (2:3.5:0.5). Como agente revelador se empleó el reactivo de Natural Products – polietilenglicol (NP/PEG)

5.3.3.2 Monitoreo automático

En las figuras 32 y 33 se aprecian los perfiles cromatográficos obtenidos en el monitoreo automatizado.



Figura 32 Perfil cromatográfico del extracto metanol-agua (80:20) de la especie *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* utilizando NP/PEG como revelador y luz UV a 365 nm



Figura 33 Perfil cromatográfico del extracto metanol-agua (80:20) de la especie *A. mexicana* ssp. *xolocotziana* con lámpara UV a 254.

Nota: [Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

Una vez obtenido el perfil cromatográfico para la cuantificación de los compuestos encontrados, se consideró el número de repeticiones necesarias para extraer la mayor cantidad de compuestos de la muestra. Se realizó el perfil de cada uno de los extractos obtenidos a diferentes tiempos y se obtuvo el

cromatograma para saber hasta qué repetición se lograba el marco agotado, es decir, dejaban de aparecer los picos.

A continuación, se muestra el cromatograma de los extractos de cada repetición.

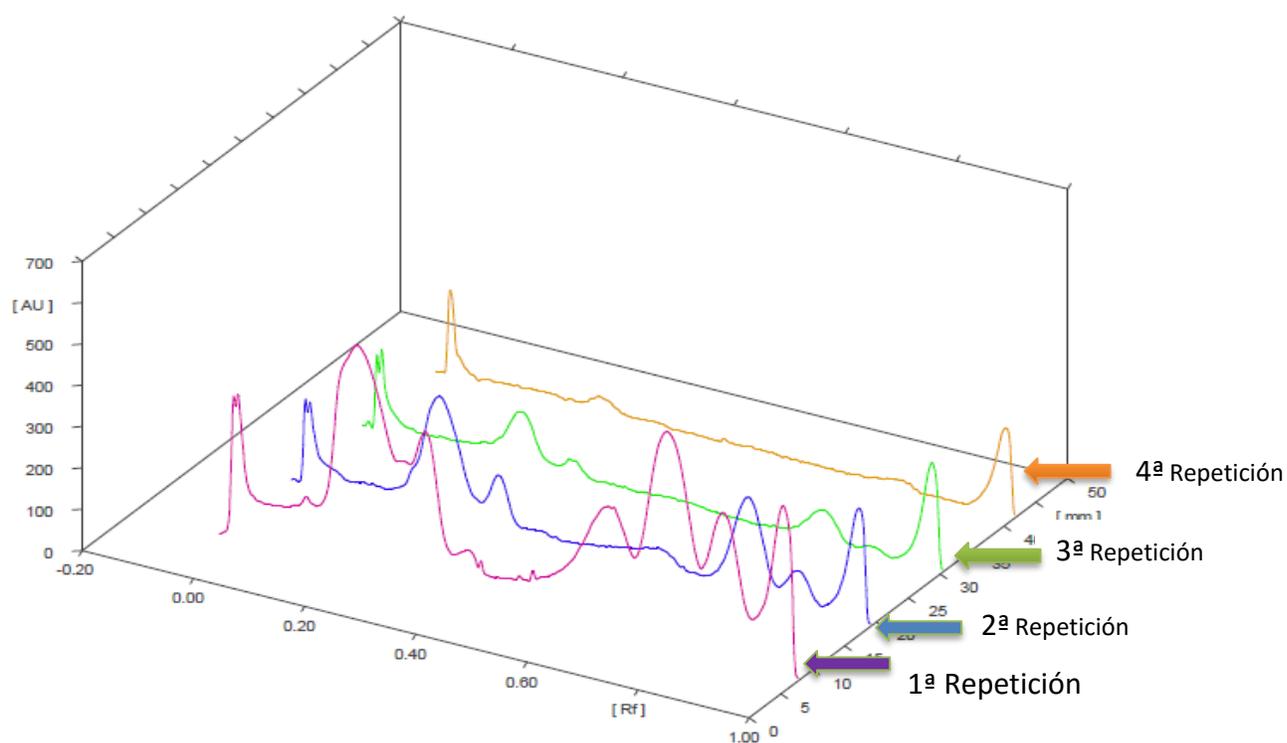


Figura 34 Cromatograma de los extractos obtenidos en cada repetición.

En la figura 34 se observan los cromatogramas correspondientes a cada repetición. Prestando atención que en la cuarta repetición los compuestos de interés han desaparecido y solo se aprecian los picos que corresponden al punto de aplicación y al frente del disolvente, respectivamente. En base a estos resultados se decidió que el proceso de extracción era suficiente con tres repeticiones. En el anexo 5 se encuentran los cromatogramas correspondientes de cada repetición y sus áreas bajo la curva.

5.3.3.3 Identificación de compuestos

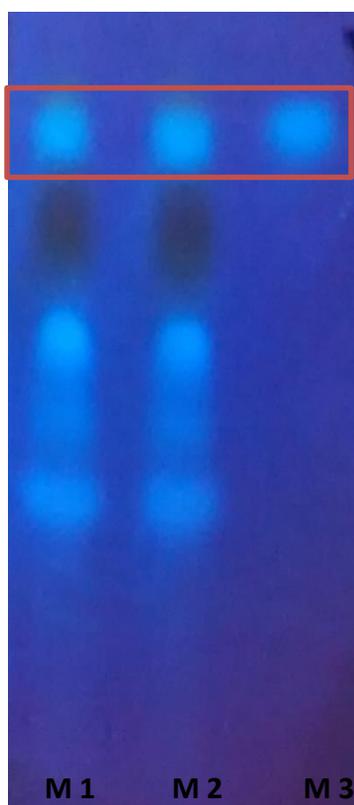
Se comparó el extracto hidroalcohólico con los siguientes estándares: acacetina, rutina, kaempferol, miricetina, apigenina, ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido rosmarínico (AR), encontrándose en la

muestra solamente éste último, cuyos valores experimentales de longitud de onda y Rf se muestran en la tabla 25.

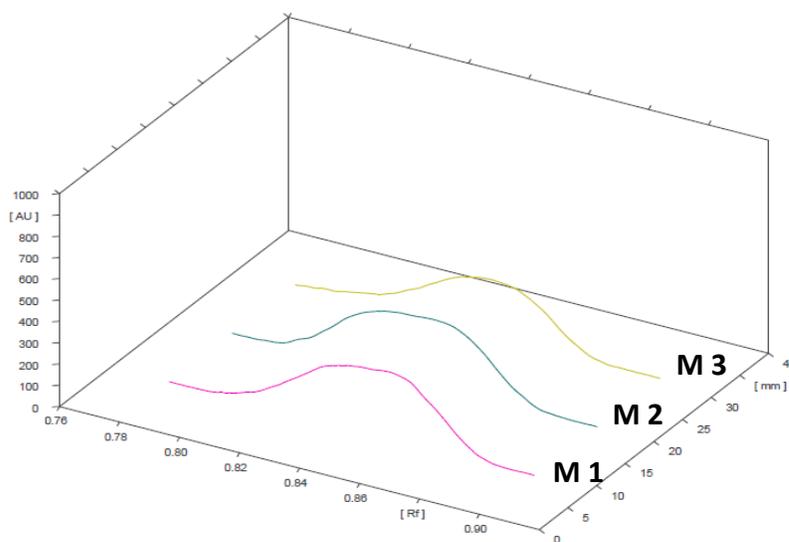
Tabla 25 Resultados de los Rf, longitudes de onda máxima, así como la estructura del estándar identificado en el extracto

Nombre	Rf	Longitud de onda máxima
Ácido rosmarínico	0.86	380

◆ Especificidad del ácido rosmarínico



(A)



(B)

Figura 35 Especificidad del ácido rosmarínico.

Nota: (A) extracto y (B) cromatograma en donde M1 es la muestra (EH), M2 la muestra enriquecida con AR y M3 el std de AR

[Fotografías de Imelda Jaramillo] (Laboratorio de Farmacognosia. 2015). Archivo propio. Cuautitlán Izcalli, México

Tabla 26 Áreas bajo la curva de la prueba de especificidad del ácido rosmarínico

Muestra	ABC
Extracto Hidroalcohólico (EH)	16289.2
EH + AR	17073.5
AR	12743.6

5.3.3.4 Cuantificación

◆ Curva de calibración del ácido rosmarínico

Preparación: Pesar 0.7 mg de muestra y aforar a 25 mL con metanol y aplicar los siguientes volúmenes de alícuota por triplicado: 3, 5, 7, 9 y 11 µL

µg de banda	Área bajo la curva
0.0823	1934.6
	1957.5
	1945.5
0.1372	3334.2
	3196.6
	3200.3
0.1921	4644.8
	4612.9
	4643.7
0.2469	5790.7
	5862.7
	5834.3
0.3018	7452.8
	7327
	7477.7

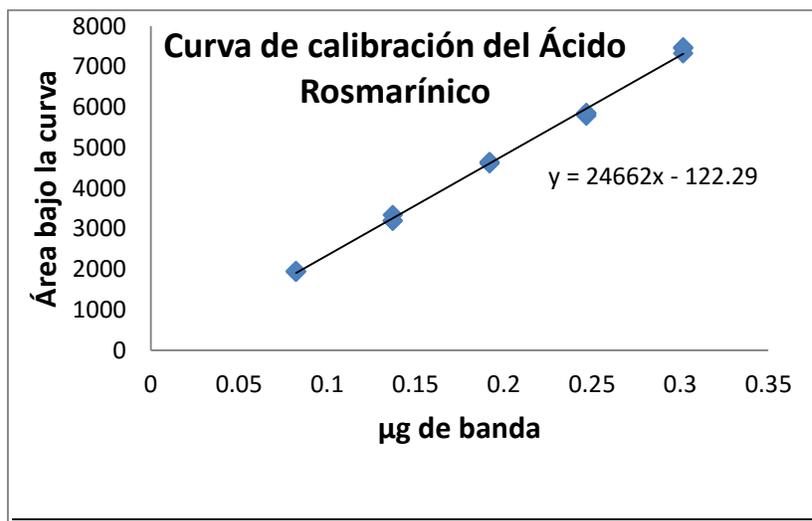


Gráfico 4 Curva de calibración del ác. rosmarínico

Tabla 27 Parámetros de la linealidad del sistema ác. rosmarínico.

Parámetros	Valor obtenido	Criterio de Aceptación	Observación
R²	0.99	R ² ≥ 0.98	Sí cumple
IC(B0)	(-266.01) - (21.440)	IC (B0) Debe incluir a cero	Sí cumple
CV	1.96%	CV ≤ 5%	Sí cumple

5.3.3.5 Evaluación de linealidad y exactitud

Como se observa en la tabla 27 la curva de calibración cumple con los parámetros de linealidad del sistema. Por lo que se procedió a cuantificar el compuesto identificado, el resultado obtenido se muestra en la tabla 28.

Tabla 28 Cuantificación del compuesto en el extracto

Nombre	ABC en el extracto	Concentración en µg/µL en el extracto
Ácido rosmarínico	2945.3	1.24

Tabla 29 Resultados de la prueba de exactitud para ác. rosmarínico

Ácido rosmarínico			
Concentración adicionada µg/ µL	Área bajo la curva	Respuesta analítica µg	% de Recobro
1.24	2940.1	1.241	100.0
	2977.2	1.258	101.5
	2976.1	1.256	101.3
	2994.8	1.264	101.9
	3001.6	1.267	102.2
	2940.1	1.241	100.1
	%CV	0.91	

6 CONCLUSIONES

- El material vegetal utilizado en este proyecto se identificó en el herbario IZTA como toronjil blanco cuyo nombre científico es *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* de la familia Lamiaceae.
- Los métodos de extracción que se seleccionaron fueron: para el aceite esencial hidrodestilación y para el extracto hidroalcohólico, la maceración dinámica, la primera por rendimiento y la en base a los resultados experimentales obtenidos.
- Se obtuvo el perfil de huellas dactilares del aceite esencial por HPTLC con las condiciones: Fase móvil tolueno-acetato de etilo (7:0.4). Sistema de detección; por derivatización con anisaldehído-ácido sulfúrico y luz UV a 254 nm.
- Se identificaron y cuantificaron en el aceite esencial los compuestos pulegona (0.2039 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), linalol (0.1313 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y mentol (0.1008 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).
- Se obtuvo el perfil de huellas dactilares en el extracto metanol-agua (80:20) por HPTLC con las siguientes condiciones: Fase móvil n-butanol-ac. acético-agua (2:3.5:0.5) y como detección el reactivo Natural Products-polietilenglicol (NP/PEG) y luz UV 254 nm.
- En el extracto metanol-agua se identificó y cuantificó al ácido rosmarínico en una concentración de 0.124 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7 PROSPECTIVAS

- Completar el perfil cromatográfico del aceite esencial y extracto metanol-agua de la especie *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana* utilizando estándares diferentes a los del presente trabajo.
- Evaluar la reproducibilidad y robustez del método desarrollado en este trabajo de tesis.
- Continuar ensayando los extractos de otras plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con el fin de obtener su perfil de huellas digitales por HPTLC.

ANEXO 1 Preparación de reactivos

Ácido silicotúngstico: Disolver 12 g de ácido silicotúngstico en 100 mL de agua.

Anisaldehído-ácido sulfúrico: Mezclar 0.2 mL de anisaldehído con 4 mL de ácido acético glacial continuar con 34 mL de metanol y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado en ese orden; es importante considerar la inestabilidad del reactivo revelador por lo que al cambiar su coloración rojo-violeta no deberá usarse.

Baljet: Solución "A": pesar 1 g de ácido pícrico y disolver en 100 mL con etanol; solución "B": pesar 10 g de hidróxido de sodio y disolver en 100 mL de agua.

Cloruro Férrico: Disolver 1.25 g de cloruro férrico en 25 mL de agua y aforar a 50 mL con alcohol metílico (Barba, 1997).

Dragendorff: Comprende dos soluciones: Solución a: 0.85 g de subnitrito de bismuto disueltos en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua. Solución b: 8 g de yoduro de potasio disueltos en 20 mL de agua. Se mezclan 5 mL de solución a con 5 mL de solución b y 20 mL de ácido acético para luego completar a 100 mL con agua (Arango, 2011).

Fehling: Solución "A": pesar 3.5 g de sulfato de cobre pentahidratado se afora a 50 mL. Solución "B": 17.5 g de tartrato de sodio y potasio más 5 g de hidróxido de sodio se aforan a 50 mL (Barba, 1997).

Hager: Solución saturada de ácido pícrico en agua (Barba, 1997).

Mayer: Disolver 1.3 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 mL. Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol (Domínguez, 1988).

Natural Products/polietilenglicol (NP/PEG): Solución A: Se disuelve 1g de aminoetiléster del ácido difenilborínico en 100 mL de metanol. Solución B: Disolver 5 g de polietilenglicol 400 (macrogol) en 100 mL de etanol. La placa se calienta a 100°C por 3 min. La placa caliente se sumerge en la solución A, se seca al aire y entonces se sumerge en la solución B. En algunos casos, solo con la solución A es suficiente.

Rosenthaler: Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de etanol.

Wagner: Disolver 1.27 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; aforar la solución a 100 mL con agua destilada. La mayoría de las soluciones aciduladas de los alcaloides forman precipitados aglomerados color marrón.

ANEXO 2 Realización e interpretación de las pruebas

Alcaloides: Del filtrado en ácido clorhídrico diluido se toman 2 mL y se dividen en tres tubos de ensaye.

1. Se mezcla con una gota de reactivo de Dragendorff. Un precipitado de color anaranjado marrón indica presencia de alcaloides.
2. Se mezcla con una gota de reactivo de ácido silicotúngstico. Un precipitado blanco y fino indica presencia de alcaloides.
3. Se mezcla con una gota de reactivo de Hager. Agujas de color amarillo indica la presencia de alcaloides

Amoniaco: Se toma una fracción de 2 mL y se impregna una tira de papel filtro con el extracto diluido y se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se someterá a la acción de vapores de amoniaco (este paso se llevará a cabo en la campana). La aparición de color amarillo ocre se considera positiva para Flavonoides.

Anisaldehído-ácido sulfúrico: La aparición de manchas coloridas muestran la presencia de terpenos, saponinas, esteroides, iridoides, muchos compuestos lipofílicos.

Baljet: Se toma una fracción de 1 mL del extracto etanólico y se le adicionan unas gotas de una mezcla recién preparada de 1 mL de Baljet solución A y 1 mL de Baljet solución B. Un color o precipitado rojo naranja indica la presencia de agrupamientos lactónicos.

Börntrager: Disolver una porción del residuo con 1 mL de cloroformo, se agita con 1 mL de hidróxido de sodio al 5%. Si la fase alcalina se colorea rosa-rojo, indica la presencia de Quinonas.

Cloruro Férrico: A 1 mL del extracto etanólico, se le agregan unas gotas de una solución de cloruro férrico. La aparición de colores como azul, verde, violeta o rojo indica la presencia de Fenoles y/o Taninos.

Espuma: A la fracción disuelta con 1 mL de etanol se le adicionan 5 mL de agua, se tapa y se agita fuertemente durante 2 min. La formación de espuma estable por unos minutos con apariencia de panal de abejas se considera positiva, indicando la presencia de Saponinas.

Grignard: Una tira de papel filtro impregnado con reactivo de Grignard se pone en la boca de un tubo que contenga 5 mL del extracto etanólico con unas gotas de cloroformo. Calentar a 30°C-35°C y ver la coloración que aparece en el papel. Un color rojo o rosa se considera positivo para glucósidos cianogénicos

Liebermann-Burchard: Disolver una porción del residuo con 1 mL de cloroformo agregar 1 mL de anhídrido acético y enfriar a 0°C, después se adiciona 1 ó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de colores rosa, rojo, verde, púrpura o azul son indicativos de una prueba positiva para triterpenos y/o esteroides.

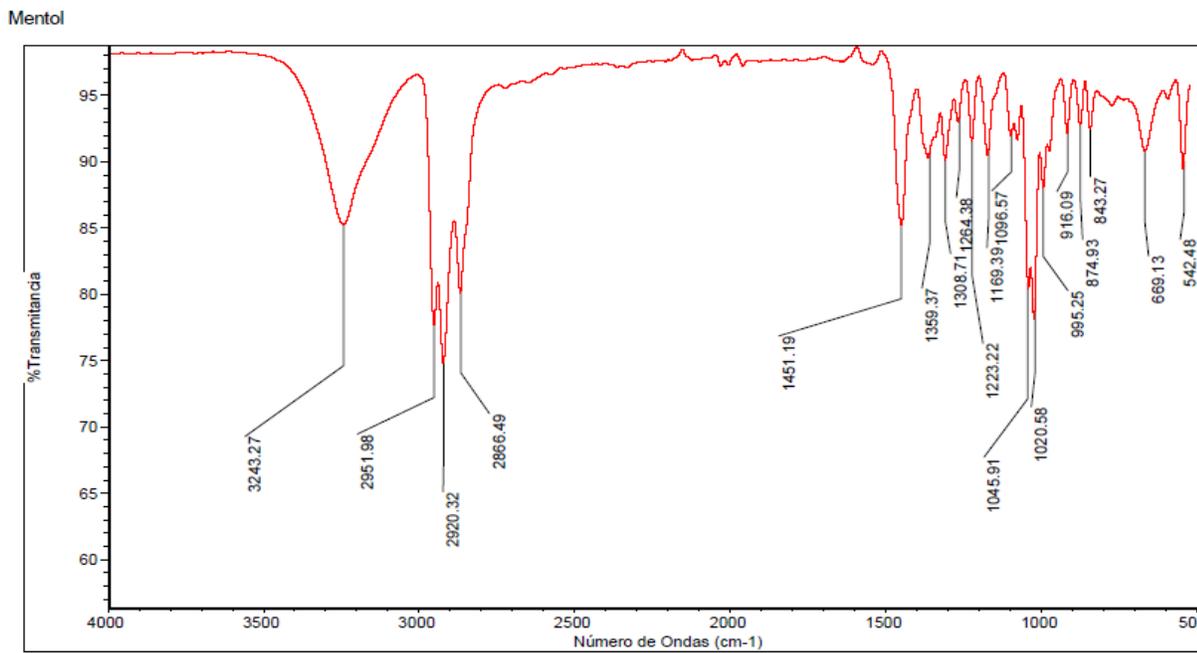
Natural Products/Polietilenglicol: Sumergir la placa con la solución A (1% aminoetiléster del ácido difenilborínico) en 100 mL de metanol, posteriormente aplicar la solución B (5% polietilenglicol) y calentar la placa 3 minutos a 100°C. El reactivo detecta flavonoides produciendo una intensidad en fluorescencia en UV-365 nm.

Rosenthaler: A la fracción disuelta en 1 mL de etanol se le adiciona una gota del reactivo de Rosentahler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Un color violeta indica la presencia de saponinas de triterpenos pentacíclicos.

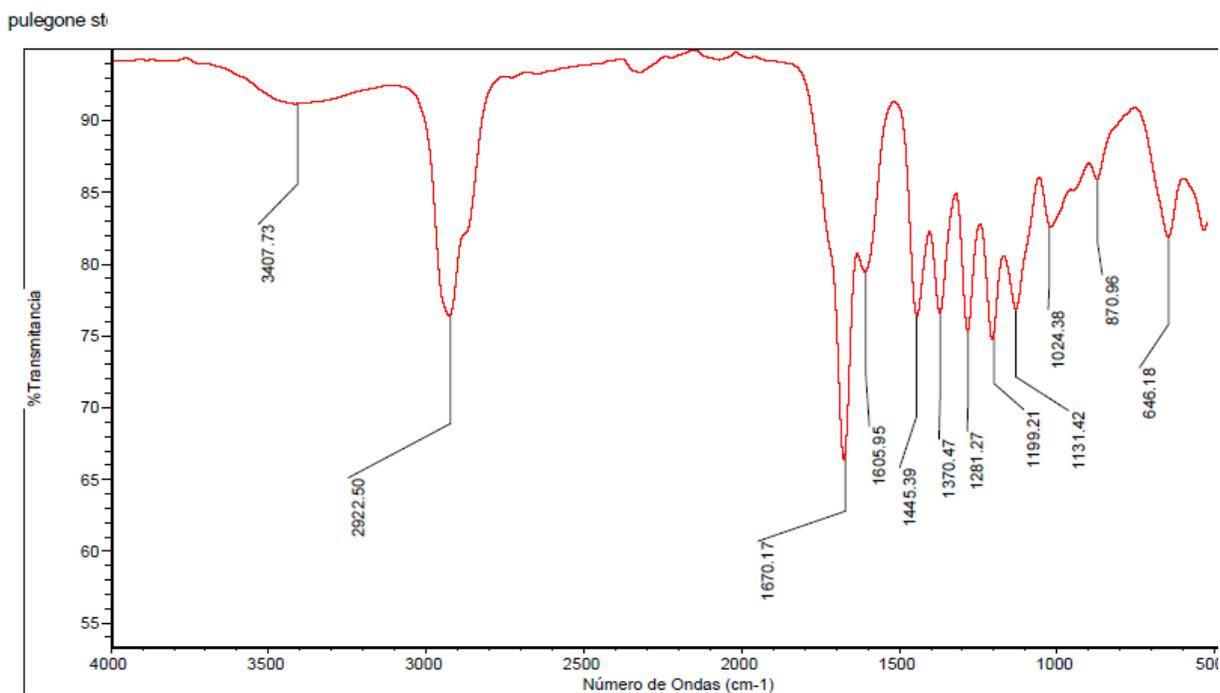
Shinoda: Un tubo con el extracto diluido con 2 mL de etanol se le agrega un trocito de viruta de magnesio amalgamado y se le agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (este es el reactivo de Shinoda). La inmediata aparición de colores que van del anaranjado, rojo, rojo azulado o violeta es indicativo de Flavonas, Flavononas, Flavonoles, Flavononoles o Xantonas. Ocasionalmente las flavanoles, las flavanonas y flavononoles dan colores verdes o azules.

ANEXO 3 IR de los estándares

IR de Mentol

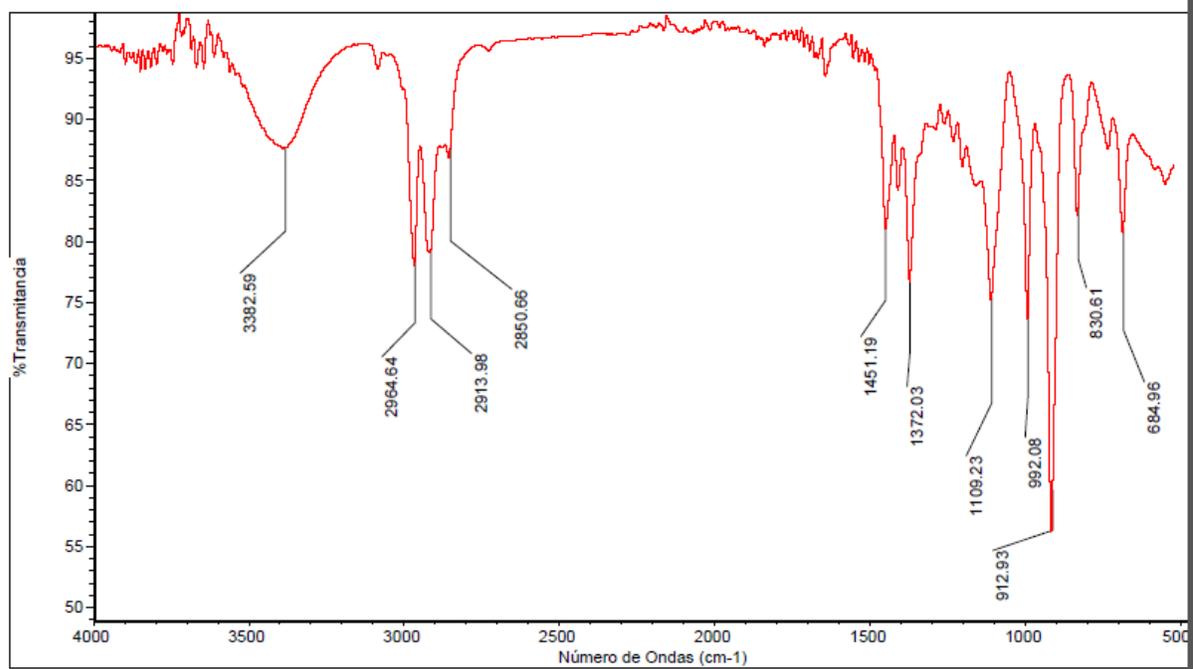


IR de Pulegona



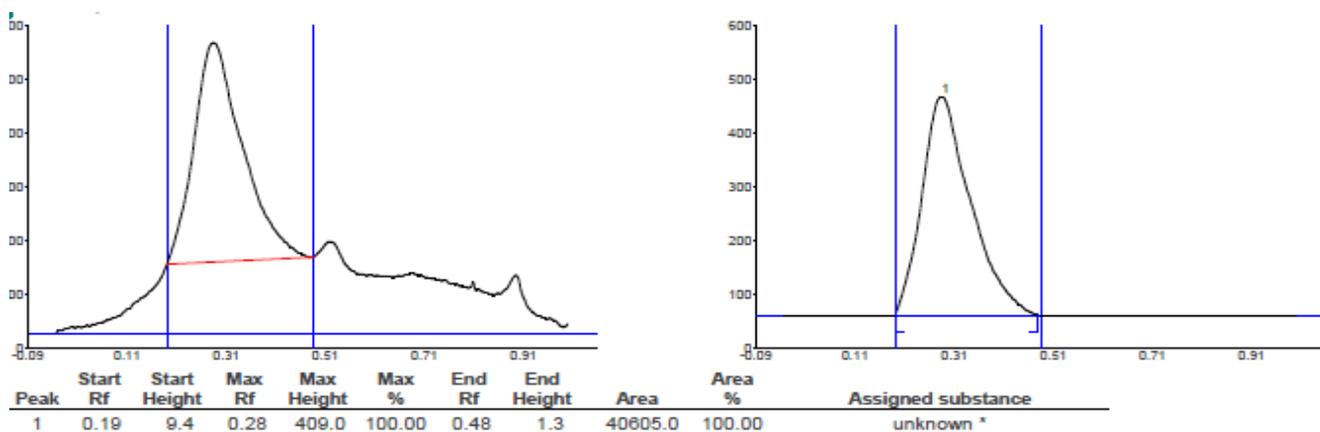
IR de Linalool

LINALOOL



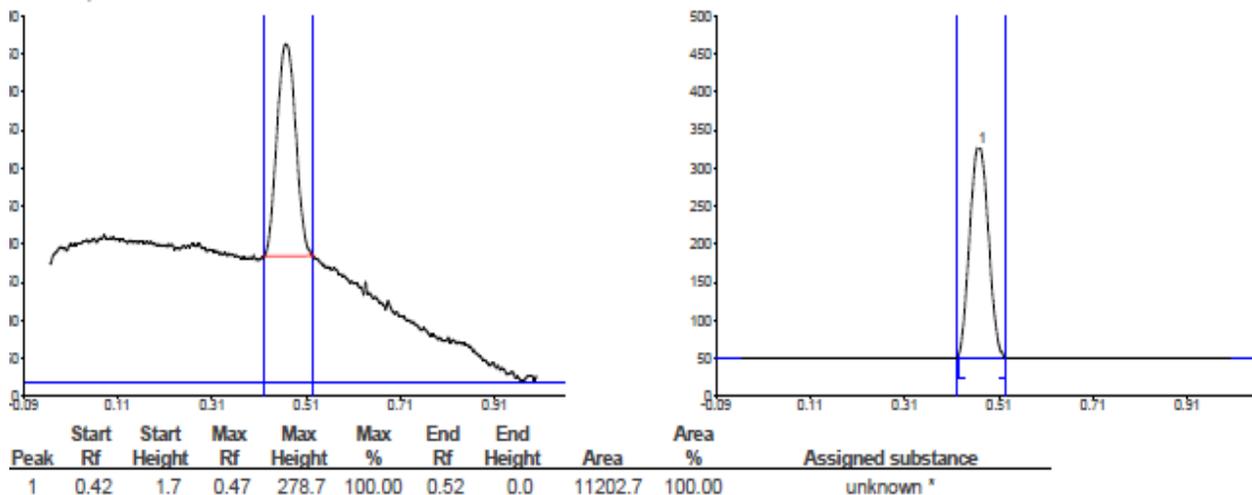
ANEXO 4 Identificación de Rf de los estándares

Mentol

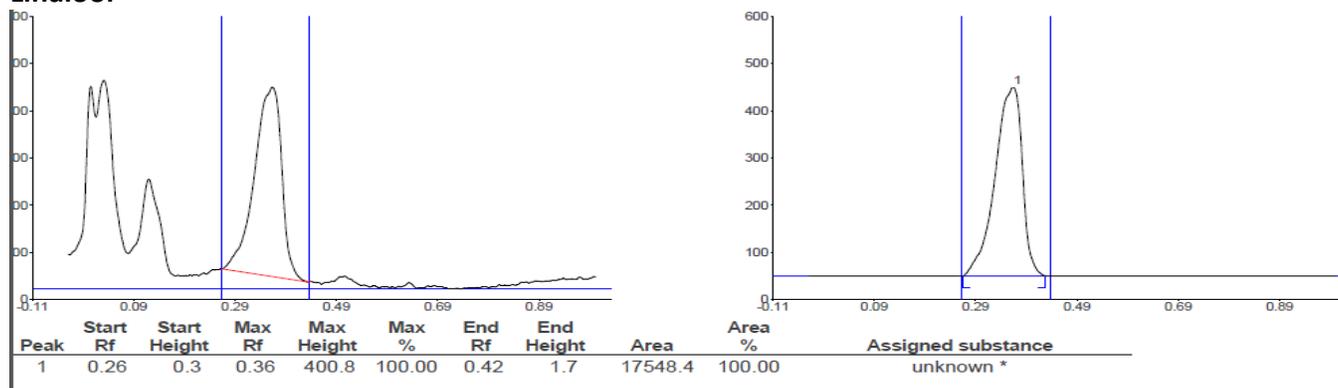


Pulegona

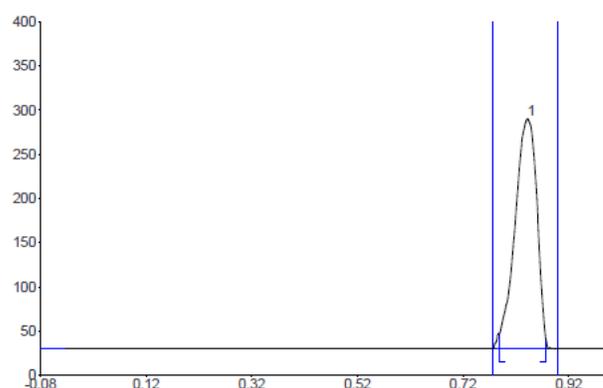
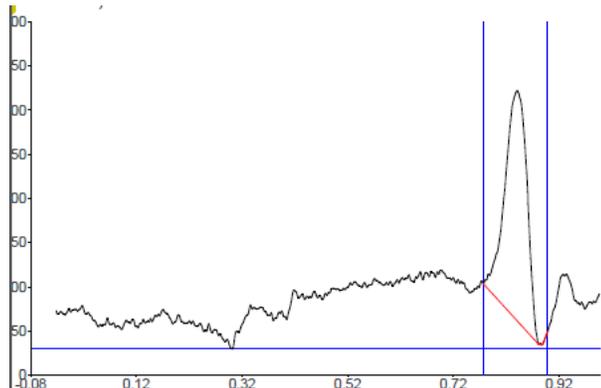
Track 1, ID:



Linalool



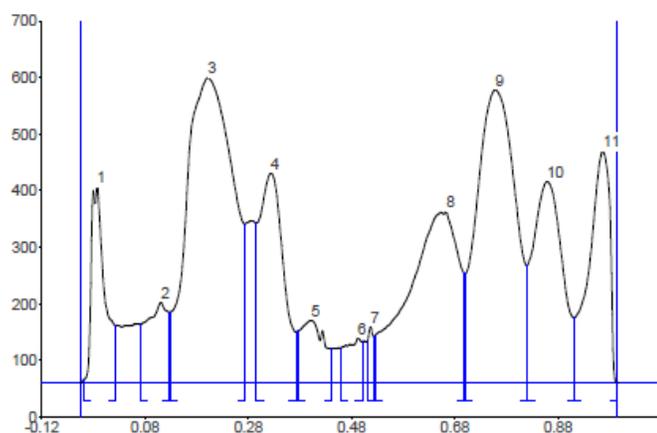
Ácido Rosmarínico



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.79	17.2	0.85	260.5	100.00	0.88	10.1	12743.6	100.00	unknown *

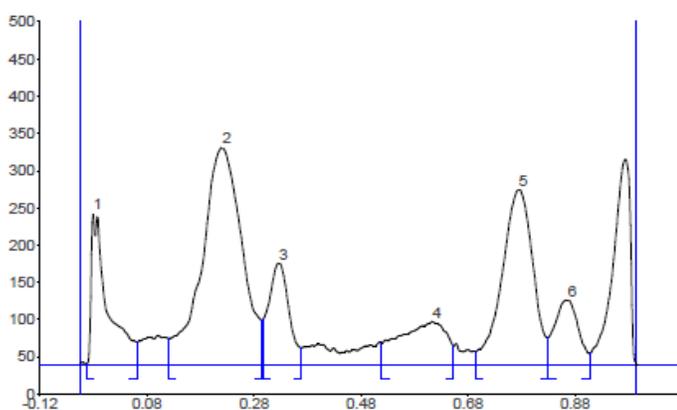
ANEXO 5 Determinación del número de extracciones

Cromatograma de la primera extracción (20 min)



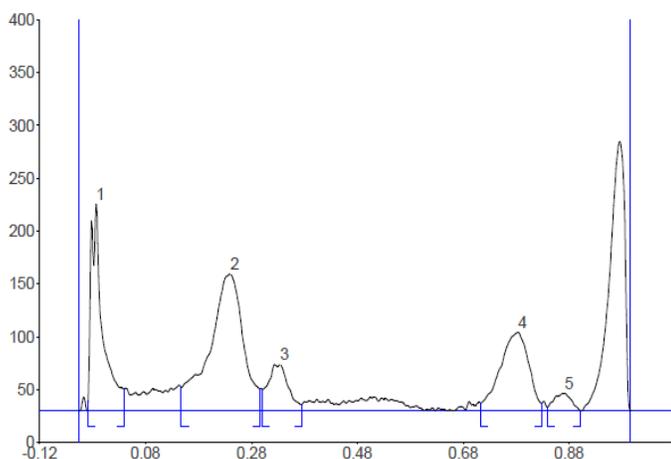
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
1	-0.04	6.9	-0.01	348.0	10.60	0.02	102.6	7093.4	4.67
2	0.07	103.9	0.11	143.0	4.36	0.13	125.6	4745.3	3.12
3	0.13	125.9	0.20	539.9	16.45	0.27	282.0	37604.7	24.75
4	0.30	283.2	0.33	371.7	11.32	0.37	90.6	13595.7	8.95
5	0.38	93.1	0.40	111.4	3.40	0.44	60.8	3984.2	2.62
6	0.46	62.7	0.49	80.0	2.44	0.50	73.8	2023.5	1.33
7	0.51	72.7	0.52	100.1	3.05	0.53	82.5	873.5	0.58
8	0.53	85.4	0.67	303.1	9.23	0.70	193.4	23054.2	15.18
9	0.70	193.6	0.76	518.5	15.80	0.82	207.5	30283.8	19.94
10	0.82	209.1	0.86	356.8	10.87	0.91	115.8	15726.9	10.35
11	0.91	115.9	0.97	409.8	12.48	1.00	1.5	12925.6	8.51

Cromatograma de la segunda extracción (40 min)



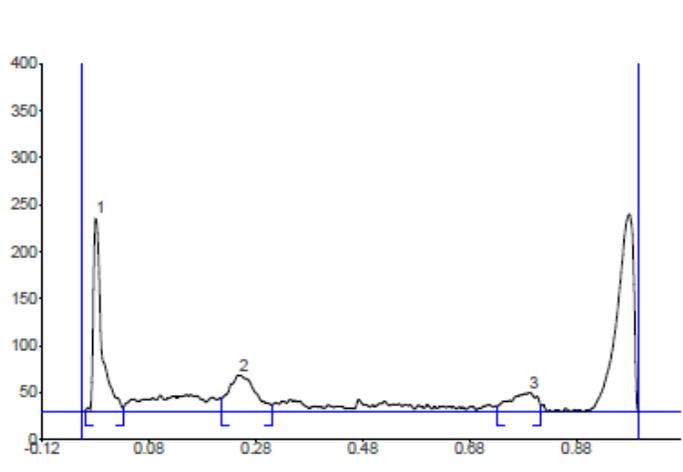
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
1	-0.03	0.4	-0.02	203.3	20.11	0.06	30.1	4845.8	11.23
2	0.12	35.0	0.22	291.7	28.85	0.30	59.7	16881.1	39.14
3	0.30	60.6	0.33	136.2	13.47	0.37	22.2	4026.6	9.34
4	0.52	29.4	0.62	57.9	5.73	0.66	24.8	3932.2	9.12
5	0.70	17.1	0.78	235.1	23.25	0.83	36.4	10485.2	24.31
6	0.83	36.6	0.87	86.8	8.59	0.91	15.0	2960.9	6.86

Cromatograma de la tercera extracción (60 min)



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
1	-0.03	9.6	-0.01	195.8	42.52	0.04	21.1	3333.0	22.93
2	0.15	22.4	0.24	129.5	28.13	0.30	21.1	6338.0	43.60
3	0.30	20.5	0.34	44.1	9.57	0.38	5.8	1310.6	9.02
4	0.71	7.7	0.79	74.4	16.15	0.83	7.3	3124.2	21.49
5	0.84	3.7	0.87	16.7	3.64	0.90	0.9	432.5	2.98

Cromatograma de la cuarta extracción (80min)



Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
1	-0.04	1.2	-0.02	206.4	77.53	0.03	4.2	2521.3	52.70
2	0.22	14.2	0.25	39.0	14.63	0.31	7.3	1483.7	31.01
3	0.73	5.6	0.80	20.9	7.83	0.82	6.3	779.5	16.29

ANEXO 6 Equipos utilizados en la experimentación.



Figura 36 Cámara de elución para las placas con muestra del extracto Metanólico.



Figura 37 Detector de HPTLC, TLC Scanner 3



Figura 38 Aplicador de HPTLC ATS 4



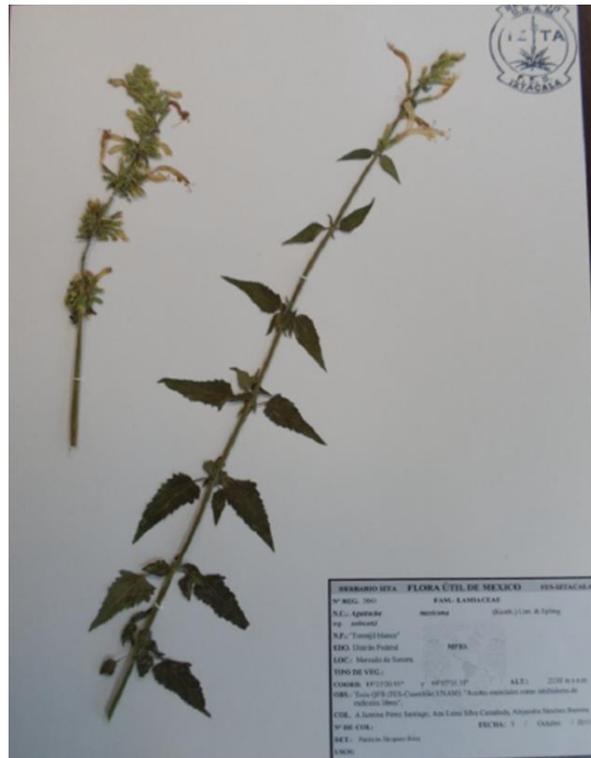
Figura 39 Cámara de elución utilizada para las placas con muestra de AE

ANEXO 7 MONOGRAFÍA

Herba Toronjil blanco

Droga Oficial:

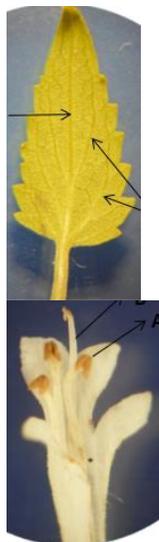
Agastache mexicana (Kunth.) Lint. & Epling. ssp. *xolocotziana*



Sinonimia científica: *Cedronella mexicana* Benth. (Martínez, 1987)

Sinonimia vulgar: toronjil de casa, toronjil de monte. Puebla: pinkil (tepehua), tama, toroji, toronji (otomí) (UNAM, 2009)

Definición: La droga vegetal consiste en las partes aéreas con flores, de *Agastache mexicana* (Kunth.) Lint. & Epling. ssp. *xolocotziana*. Familia Lamiaceae.



Descripción de la droga: La droga vegetal consiste en la parte aérea de la planta. Es una hierba de unos 40 a 60 cm, aunque puede llegar hasta 1.5m de altura. Sus tallos son cuadrados. Sus hojas tienen forma de lanza y anchas en la base. Los bordes son dentados y con pelos por el envés. Tiene flores en racimos terminales, en número de 5 hasta 20, con forma tubular, de color rojo vivo o rojo-morado y sus frutos son color café. Es una planta con un aroma especiado, débil a limón. Su sabor es suave y especiado (UNAM, 2009) (SSA, 2013).

Pretratamiento de la droga cruda: Planta cultivada en Puebla y Estado de México, para su conservación la planta fresca se seca de manera natural a la sombra.

Usos tradicionales: En el tratamiento de enfermedades de los nervios y el susto, que se adquieren cuando se reciben impresiones fuertes (UNAM, 2009).

Actividad Farmacológica: Se probó la actividad farmacológica en ratas Wistar. El extracto acuoso se preparó con 10 g de droga vegetal en 90 mL de agua hirviendo por 10 min. A dosis bajas del extracto acuoso (1.0mg / kg) indujeron las acciones de tipo ansiolítico; mientras que dosis más altas (más de 10mg / kg) indujeron sedación y redujeron la actividad locomotriz, ejerciendo una inhibición general en el sistema nervioso central (SNC) (Estrada-Reyes, y otros, 2014).

Aceite Esencial	
Definición	Aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la parte aérea seca de <i>Agastache mexicana</i> (Kunth.) Lint. & Epling. ssp. <i>xolocotziana</i>
Descripción	Líquido claro, de color ligeramente amarillo. Olor característico, floral que recuerda al anís
Ensayo de identidad	
Soporte:	Sílica Gel 60F ₂₅₄
Fase móvil:	Tolueno-acetato de etilo (7:0.3)
Detección:	Directa luz UV a 254 nm y derivatización con anisaldehído-ácido sulfúrico.
Longitud de la banda	3 mm
Preparación de referencia:	Aplicación directa de los estándares pulegona, mentol y linalool
Preparación de la muestra:	Aplicación directa del aceite esencial

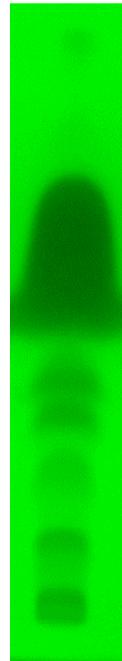
Procedimiento:

- Aplicación de la muestra: se aplican las muestras en forma de banda con una longitud de 3 mm con ayuda de CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4).
- Desarrollo de la placa: Saturar la cámara de elución durante 30 minutos con la fase móvil, dejando que la placa cromatográfica se eluya 90 mm de distancia sobre la fase estacionaria; secar la placa de forma vertical.
- Documentación de la placa desarrollada: Revisar la placa con luz UV con longitud de onda de 254.
- Derivatización: Derivatizar con la solución de anisaldehído-ácido sulfúrico, para su aplicación se coloca el revelador en un cristizador de vidrio y la placa se sumerge en posición horizontal durante 10 segundos, se saca y nuevamente se deja secar en su totalidad en posición vertical, una vez seca se calentó a 100°C durante 1 min, observándose las bandas directamente.

Nombre	Rf Experimental	Rf Referencia	λ máx. experimental
Pulegona	0.47	0.48 ^a	267
Mentol	0.28	0.28 ^a	587
Linalool	0.34±0.02	0.33 ^a	430



Anisaldehído-ácido sulfúrico



UV 254 nm

Nota: a: (Wagner & Bladt, 2009)

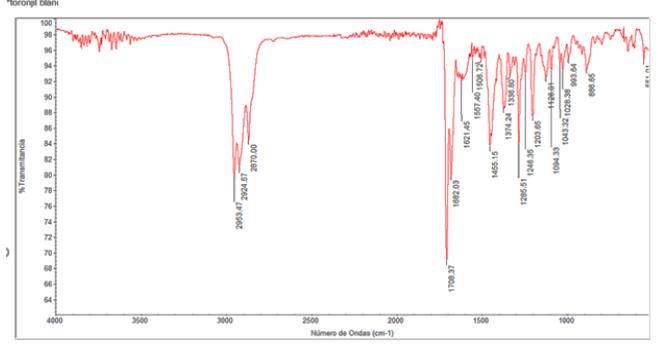
Densidad relativa (20°C)

Entre 0.886-0.891

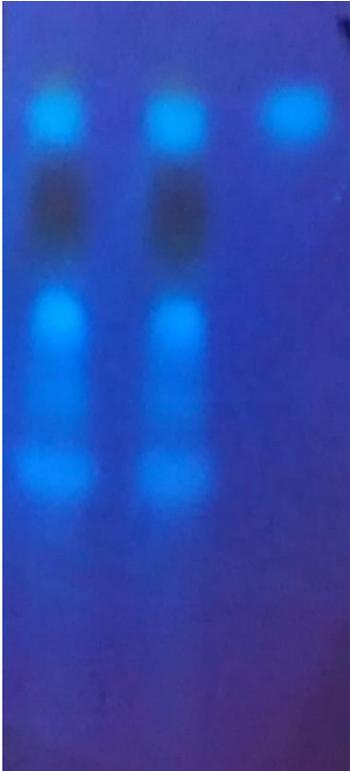
Índice de refracción (20°C)

Entre 1.465-1.4658

Espectroscopia Infrarroja:
 $\nu(\text{cm}^{-1})$: -OH st (3650); C-H st (2953.7-2870); C=O st (1708.37); C=C st (1682.03); -CH(CH₃δ sy)₂ (1374.24); CH₂δ (1455.15); -C-O st (1203.65)



Número de barridos de la muestra: 32
 Número de barridos del fondo: 32
 Resolución: 4.000
 Ganancia de la muestra: 0.0
 Velocidad del espejo: 0.4747
 Apertura: 150.00
 Tiempo de recogida: Jun Feb 17 11:24:43 2011 (GM)

Extracto metanol-agua							
Ensayo de identidad							
Soporte:	Sílica Gel 60F ₂₅₄						
Fase móvil	n-butanol, ácido acético y agua 2:3.5:0.5 (saturar cámara por 30 minutos).						
Detección	Natural Products- polietilenglicol (NP/PEG)						
Tamaño de muestra							
Preparación de referencia	Pesar 0.7 mg de muestra y aforar a 25 mL con metanol.						
Preparación de la muestra	Pesar 100 mg de muestra y adicionar 2 mL de metanol y 0.5 mL de agua. Macerar por 20 min (3 veces). Separar el marco agotado por centrifugación a 2500 rpm por 5 min. Reservar el sobrenadante.						
Procedimiento: -Aplicación de la muestra: Aplicar el extracto, extracto más estándar y estándar en banda (3 mm), programando el equipo CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4). -Desarrollo de la placa: Saturar la cámara de elución con la fase móvil durante 30 min, eluir la placa 90 mm. Secar en posición vertical. -Documentación de la placa desarrollada: Observar la placa con luz UV a 254 nm. -Derivatización: Por inmersión con el reactivo de Natural Products (NP/PEG). Primero sumergir la placa en solución A durante 10 segundos. Secar en posición vertical y después sumergir en la solución B (10 segundos). Secar y observar con la lámpara UV a una longitud de onda de 365 nm.	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nombre</th> <th>Rf</th> <th>Longitud de onda máxima</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ácido rosmarínico</td> <td>0.86</td> <td>380</td> </tr> </tbody> </table> 	Nombre	Rf	Longitud de onda máxima	Ácido rosmarínico	0.86	380
Nombre	Rf	Longitud de onda máxima					
Ácido rosmarínico	0.86	380					

Bibliografía

- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O., Dorantes-Barrón, A., Heinze, G., Moreno, J., & Martínez-Vázquez, M. (2014). Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, *153*, 98-110. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.057>
- Martínez, M. (1987). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México D.F: Fondo de Cultura Económica.
- SSA. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. Ciudad de México: Secretaria de Salud.
- UNAM. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 2 de Junio de 2017, de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Wagner, H., & Bladt, S. (2009). *Plant Drug Analysis: A thin layer Chromaography Atlas*. New Delhi, India: Thompson Press (Springer).

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Adame, J., & Adame, H. (2000). *Plantas curativas del noreste mexicano*. Monterrey: Castillo.
2. Aldabe Bilmes, S., Aramendia, P., Bonazzola, C., & Lacreu, L. (2004). *Química 2: química en acción*. Buenos Aires: Colihue.
3. Arango, G. (4 de Noviembre de 2011). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Recuperado el 3 de Marzo de 2017, de Microsoft Word - ALCALOIDE Sarango.doc - alcaloides.pdf: <http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/856/alcaloides.pdf>
4. Barba, J. M. (1997). *Introducción al Análisis de los productos naturales Laboratorio de Fitoquímica*. Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
5. Boatella Riera, J., & Codony Salcedo, R. (2004). *Química y Bioquímica de los alimentos II*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
6. Borrego Jiménez, M. A. (2014). *La calidad en los procesos gráficos: ARGIO209*. IC Editorial.
7. Camacho, B., Morales, M., Sánchez, A., Velázquez, A., & Ángeles, E. (en revisión). *Manual de Farmacognosia y Fitoquímica*. México: UNAM-FESC.
8. Deanna, M., & Masahisa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
9. Devi Datt, J. (2012). *Herbal Drugs and Fingerprints*. India: Springer.
10. Devi Datt, J. (2012). *Herbal Drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs*. India: Springer.
11. Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México D.F: Limusa S.A de C.V.
12. Estrada Reyes, R., Aguirre Hernández, E., García, A., & Soto Hernández, M. (2004). Comparative chemical composition of Agastache mexicana subsp. mexicana and A. mexicana subsp. xolocotziana. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 685-694.
13. Estrada, R., García, A., Aguirre, E., & Soto, M. (2004). Comparative chemical composition of Agastache mexicana subsp. mexicana and A. mexicana subsp. xolocotziana. *Elsevier*, 685-694.
14. García Nieves, V. (2008). *Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar clenbuterol en orina bovina por electroforesis capilar con detector de fluorescencia inducida por láser*. México: UNAM.
15. Gonzalez Villa, A. A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
16. Guzelmeric, E., Vovk, I., & Yesilada, E. (2014). Development and validation of an HPTLC method for apigenin 7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 108-118.
17. Hernández, R. (2015). *Proceso de revisión y actualización de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y sus suplementos*. Cd. de México, México: Producción Químico Farmacéutica, A.C.
18. Hüsnü Can Baser, K., & Gerhard, B. (2010). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. New York: Taylor & Francis Group.
19. ICH, H. C. (November de 2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2017, de ICH Harmonised Tripartite Guideline: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step 4/Q2_R1_Guideline.pdf

20. Iñaki Etaio, A., Pérez Elortondo, F. J., Albisu Aguado, M., & Salmerón Egea, J. (2007). *Guía para la evaluación sensorial de la calidad*. Vasco: Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia = Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
21. Krasikov, V. D. (2003). Contemporary Planar Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 706-719.
22. Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal*. Barcelona: Omega.
23. Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier.
24. Lock de Ugaz, O. (2010). *Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
25. Lucinda Da Silva, R., G. Couto, A., & B. Bresolin, T. M. (2012). Medicinal Plants and Pharmaceutical Technology. En V. Cechinel Filho, *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*. (pág. 359). Wiley.
26. ManMohan, S. (2011). *High Performance Thin Layer Chromatography*. Berlin: Springer.
27. Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
28. Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
29. Olsen, E. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: Reverté.
30. Orid, V. (2000). *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud*. México: Mexicana.
31. Patel, R., Patel, M., Dubey, N., Dubey, N., & Patel, B. (2012). HPTLC Method Development and Validation: Strategy to Minimize Methodological Failures. *Journal of Food and Drug Analysis*, 794-804.
32. Pérez Santiago, A. J., & Silva Castañeda, A. L. (2015). *Ensayo in vitro de la actividad inhibitoria de radicales libre de aceites esenciales*. México: Facultad de Estudios Superiores UNAM.
33. Plazas González, E. A. (2011). *Curso de aceites esenciales: Química y proceso de producción*. Bogotá: Jardín Botánico Bogotá.
34. PrestaShop. (26 de Octubre de 2016). *Tipos de olores ¿Cuáles son los 10 olores primarios?* Recuperado el 18 de junio de 2017, de Tipos de olores ¿Cuáles son los 10 olores primarios?: http://www.esenzia.com/blog/92_tipos-de-olores-primarios.html
35. Quesada Hernández, A. (2008). Las plantas medicinales. *Biocenosis*, Vol.2.
36. Ramírez, A. D. (2008). *Determinación cuantitativa de ácido ascórbico en tabletas orales por espectroscopia UV*. México: UNAM.
37. Reich, E., & Schibli, A. (2007). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. New York: Thieme.
38. Reyes Mireles, J. (2010). *Comparación del efecto ansiolítico de las plantas medicinales Dracocephalum modavicol L., Agastache mexicana (Kunth) Lint & Epling y Agastache mexicana (Kunth) Lint & Epling ssp xolocotziana (Lamiaceae) y el fitofármaco Dalay*. México, México, México: UNAM.
39. Rodríguez Álvarez, M., Alcaraz Meléndez, L., & Real Cosío, S. M. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

40. Santander García, E. (2008). *Comparación de un método por espectrofotometría UV con un método por infrarrojo cercano, para la cuantificación de clonixinato de lisina en una solución inyectable*. . México: UNAM.
41. Santillán Ramírez , M. (2008). Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de Agastache mexicano ssp. mexicana A. mexicana ssp. xolocotziana. *Mexicana de Biodiversidad*, 513-524.
42. Santillán Ramírez, M. A., & et. al. (2008). Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de Agastache mexicano ssp. mexicana A. mexicana ssp. xolocotziana. *Mexicana de Biodiversidad*, 513-524.
43. Secretaria de Salud. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. México: Publicaciones e impresiones de calidad, S .A de C.V.
44. Shaha, A., & Salunkhe, V. R. (2014). Development and validation of a high performance thin layer chromatographic method for determination of 1, 8-Cineole in Callistemon Citrinus. *Pharmacognosy Research*, 143-147.
45. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello.
46. Thronton, R., & Neilson, R. (1998). *Química Orgánica*. México: Pearson.
47. Troy, D., & Beringer, P. (2006). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (21st ed.). Baltimore, USA: Lippincott William & Wilkins.
48. UNAM. (2009). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado el 13 de Junio de 2016, de toronjil: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html>
49. Villar del Fresno, A. M. (1999). *Farmacognosia General*. España: Síntesis.
50. Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas* . Alemania: Springer.
51. WHO. (1998). *Quality Control of Medicinal Plant materials*. Geneve: WHO Library Cataloging in Publication data.
52. WordPress.com. (6 de Febrero de 2012). *grupo2radiobiologiayradioproteccion2*. Recuperado el 18 de Junio de 2017, de Espectro electromagnético y ondas electromagnéticas: <https://grupo2radiobiologiayradioproteccion2.wordpress.com/2012/02/06/espectro-electromagnetico-y-ondas-electromagneticas/>
53. World Health Organization . (2003). *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva: World Health Organization.
54. Zolla, C. (18 de Octubre de 2012). Medicina Tradicional: esencial para la salud todos los mexicanos. (F. Guzman, Entrevistador) El Universal.