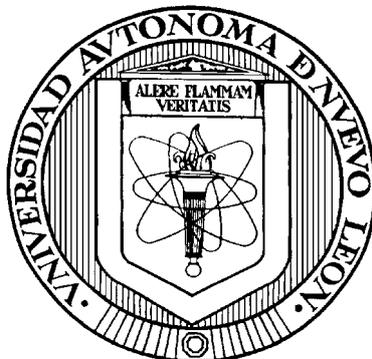


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CLAR-DAD PARA ESTABLECER EL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE *Turnera diffusa* COMO HERRAMIENTA DE CONTROL DE CALIDAD**

**Por**

**M.C. AURORA DE JESÚS GARZA JUÁREZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica**

**Febrero, 2 0 0 8**

## **DEDICATORIA**

*A los hombres de mi vida y dueños de mi corazón  
René, Renecito, Edgar, Erick y Santiago,  
con todo mi amor*

*A mis padres Alonso y Aurora  
con profundo amor y agradecimiento*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por nunca dejarme sola, ser mi guía y permitirme llegar hasta este momento

A René, mi esposo por estar siempre a mi lado, por su infinita paciencia, apoyo y comprensión. Gracias papi, porque juntos lo logramos.

A mis grandes tesoros, René, Edgar, Erick y Santiago por su gran comprensión y paciencia

A mis papas, porque siempre están ahí cuando los necesito

A la Dra. María de la Luz Salazar, por su infinita comprensión, paciencia, y apoyo en los momentos difíciles, por todos sus conocimientos y su gran amistad

A la Dra. Noemí Waksman, por creer en mí y darme la oportunidad de hacer el doctorado, gracias Doctora Waksman por todo su apoyo

A los miembros de mi comisión, Dra. Rosalba Ramírez, Dr. Ricardo Salazar y Dra. Rocío Castro, por su tiempo en la revisión de este trabajo y sus valiosas aportaciones

A Maribel e Ivonne por su valiosísima ayuda incondicional, pero sobre todo por ser mis amigas

A Normita, Maestra Lidia, Idalia, Mary y Anabel, gracias por estar ahí cuando lo necesitaba, con ustedes siempre me sentí acompañada

A Gloria y Martha, por su gran ayuda pero sobre todo por tener siempre una palabra de aliento

A los del grupo de la 1:00 p.m., (Agustín, Chela, Vero, Martha, Lucy, Rocío, Alex Maestra Elsa e Ivonne) por darme un espacio en su mesa y hacerme pasar ratos muy agradables

A la Maestra Elsa Ramírez y la Maestra Angélica Romero, por su apoyo incondicional

Al Dr. Jordi Coello y Ricardo Lucio por su ayuda, y asesoría para el análisis quimiométrico

A Chely e Isaac, Sra. Martha, Dr Lorenzo Heyer, Dr. Amador Osorio, Dra. Bertha Juárez, Dra. Martha Santoyo, Dr. Benjamín Serrano, M.C. Marcela Orozco y Q.C.B. Estela Pozos por su colaboración invaluable en las colectas de la planta

A CONACYT, por el apoyo de manutención durante el doctorado

A PAICYT SA 1437-06, por el apoyo económico para el desarrollo de esta tesis

Por el apoyo recibido de la convocatoria Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias

## RESUMEN

M.C. Aurora de Jesús Garza Juárez  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Febrero de 2008

**Título del estudio: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CLAR-DAD PARA ESTABLECER EL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE *Turnera diffusa* COMO HERRAMIENTA DE CONTROL DE CALIDAD**

Número de páginas: 85

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con  
Orientación Terminal en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica.

### Propósito y Método de Estudio:

La eficacia de una gran cantidad de productos herbales ha sido demostrada desde el punto de vista científico, sin embargo, para asegurar su efectividad es necesario que cada producto herbal cumpla con una serie de requisitos que garanticen calidad y seguridad. La utilización de los perfiles cromatográficos (huellas dactilares) y espectroscópicos es una de las aproximaciones más poderosas para el control de calidad de medicinas herbales. *Turnera diffusa* (Damiana) es una planta medicinal de alto consumo en nuestra región, para la cual no existe hasta la fecha método oficial para el análisis de calidad de productos de esta planta.

El objetivo del trabajo fue desarrollar y validar un método por CLAR-DAD combinado con técnicas quimiométricas para establecer el perfil cromatográfico de *Turnera diffusa* como herramienta de control de calidad.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas se probaron diferentes columnas y fases móviles. Las mejores condiciones se seleccionaron en función de: el número de señales, el tiempo de análisis y la separación de algunas señales. Además se probaron dos procesos de extracción: 1) con ultrasonido y 2) agitación con vortex. El método cromatográfico desarrollado se validó, evaluando la precisión, robustez y estabilidad. Se identificaron las señales comunes a 19 especímenes de colecta de diferentes regiones geográficas del país en función del  $t_R$  y corroborando con su espectro de absorción UV-visible. Se construyó un modelo quimiométrico por PCA con los datos de las áreas relativas de las señales comunes, aplicando el programa Us scramble 9.2 y finalmente se aplicó el método analítico desarrollado y el modelo quimiométrico por PCA en productos comerciales de *Turnera diffusa* empleando el análisis discriminante SIMCA. Los mejores resultados se obtuvieron con una columna AccQ Tag C<sub>18</sub>, (150 x 3.9 mm x 4µm) y una fase móvil constituida por TFA 0.1% y MeOH. Se empleó un programa de gradiente con duración de 40 minutos. Los cromatogramas fueron monitoreados a 254 nm. El proceso de extracción seleccionado fue el de agitación con vortex, ya que fue más preciso y proporcionó el mayor número de señales. En la evaluación de la precisión las %DER estuvieron dentro de los valores establecidos. Los resultados de robustez mostraron que la temperatura de la columna, y la concentración del TFA pero principalmente la % de metanol en el solvente de elución afectan significativamente los  $t_R$ . El estudio de estabilidad mostró que la solución del extracto de *Turnera diffusa* es estable hasta el día 60 posterior a su preparación. Se identificaron 14 señales comunes en las 19 muestras de *Turnera diffusa*. Se estableció un modelo quimiométrico de PCA con los datos de 12 señales comunes a las 19 muestras de colecta de la planta. Al aplicar el método SIMCA a los productos comerciales, basándonos en el modelo previamente construido de PCA, se encontró que 37% de los productos fueron aceptados o reconocidos como Damiana.

### Conclusiones y contribuciones:

Se desarrolló y validó un método cromatográfico por CLAR-DAD para el análisis de extractos de *Turnera diffusa* y se estableció un modelo quimiométrico por PCA para el análisis de calidad de productos comerciales de la planta. Se cuenta con un método cromatográfico y de análisis quimiométrico como herramienta para el control de calidad de productos comerciales de *Turnera diffusa*.

FIRMA DEL DIRECTOR

---

Dra. María de la Luz Salazar Cavazos

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Aurora de Jesús Garza Juárez**

**Candidato para el grado de**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica**

**Tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CLAR-DAD PARA ESTABLECER EL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE *Turnera diffusa* COMO HERRAMIENTA DE CONTROL DE CALIDAD.**

**Área de estudio: Química Biomédica**

### **Biografía:**

**Datos personales:** Nacida en Monterrey, N.L. el 12 de octubre de 1968, hija de Alonso Garza Escobedo y Aurora Juárez Treviño. Casada con René Montemayor Garza. Hijos: René de Jesús, Edgar Adrián, Erick Andrés y Santiago.

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grados obtenidos: Licenciatura de Químico Clínico Biólogo en 1990, Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica en el 2001.

**Experiencia Profesional:** Personal Profesional no docente de 1991 a 1998 en la Unidad de Hígado y de 1998 a la fecha en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Maestro colaborador en los Laboratorios de Química Analítica I y II. Dos publicaciones en revistas nacionales. Dos premios por trabajos de investigación. Premio Mejor alumno de Maestría en 2000 y premio de Alumno Distinguido en el Doctorado en 2007.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.1	Gráfico de doble dimensión de los scores (muestras) del PCA.	13
1.2	Gráfico de las variables (loading).	14
1.3	<i>Turnera diffusa</i> (Damiana).	19
3.1	Cromatograma del extracto estandarizado de <i>Turnera diffusa</i> con el sistema cromatográfico establecido. (Fase móvil TFA 0.1%:MeOH, fase estacionaria columna AccQ·Tag C <sub>18</sub> , velocidad de flujo 0.4 mL/ min, longitud de onda 254 nm).	41
3.2	Cromatograma de la planta nativa autenticada obtenido con el proceso de extracción 1 de agitación en vortex. (Sistema cromatográfico descrito en la sección 3.1).	43
3.3	Cromatograma de <i>Turnera diffusa</i> de planta nativa, extracto estandarizado y estándar de Rutina.	44
3.4	Cromatograma de <i>Turnera diffusa</i> (planta nativa) con las 17 señales de mayor intensidad.	45
3.5	Gráfico de estabilidad de la solución del extracto de <i>Turnera diffusa</i> . El extracto fue disuelto en 1 mL de DMSO.	49
3.6	Cromatogramas sobrepuestos de los cromatogramas de las 19 muestras de colecta de Damiana, obtenidos con el método cromatográfico final.	54

3.7	Cromatograma promedio del extracto de <i>Turnera diffusa</i> con las 14 señales comunes.	54
3.8	Gráfico de varianza explicada del PCA.	55
3.9	Gráfico de doble dimensión del PCA de los cromatogramas de las diecinueve muestras.	56
3.10	Gráfico de doble dimensión de las variables (14 señales).	57
3.11	Gráfico de doble dimensión del PCA de los cromatogramas de las diecinueve muestras sin señales 1 y 2.	57
3.12	Gráfico de doble dimensión de los datos vectoriales (señales) sin las señales 1 y 2.	58
3.13	Gráfico de distancia de las muestras al modelo.	59
3.14	Gráfico de clasificación SIMCA con un nivel de significancia de 1%.	60
3.15	Gráfico que explica la contribución de la variable en el modelo.	61
4.1	Cromatograma de <i>Turnera diffusa</i> que muestra señal a tiempo de retención de 2.77 minutos de baja resolución.	69

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO</b>	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Plantas Medicinales	1
1.1.1 Importancia	1
1.1.2 Control de calidad de productos herbales	2
1.2 Técnicas analíticas empleadas para establecer huellas dactilares de productos herbales	5
1.2.1 Perfil espectroscópico	5
1.2.2 Perfil electroforético	6
1.2.3 Perfil cromatográfico	6
1.2.3.1 Cromatografía en Capa Fina	8
1.2.3.2 Cromatografía de Gases	8
1.2.3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	9
1.2.3.4 Factores que afectan el establecimiento del perfil cromatográfico	9
1.3 Quimiometría	11
1.3.1 Técnicas de análisis multivariable	12
1.3.1.1 Análisis de Componente Principal (PCA)	12
1.3.1.2 Modelado Independiente Suave de Analogía de Clase (SIMCA)	14
1.4 Antecedentes	15
1.5 Justificación	21
1.6 Objetivo General	22
1.7 Objetivos Específicos	22
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
2.1 Equipo	23
2.2 Material	24
2.3 Solventes, Reactivos y Material Biológico	25
2.4 Métodos	26
2.4.1 Preparación de soluciones	26
2.4.1.1 Extracto estandarizado	26

2.4.1.2	Ácido Trifluoroacético 0.1%	26
2.4.2	Condiciones Cromatográficas	26
2.4.3	Estandarización del Proceso de Extracción	28
2.4.3.1	Proceso de extracción 1	28
2.4.3.2	Proceso de extracción 2	28
2.4.4	Validación del Método Cromatográfico	29
2.4.4.1	Precisión	30
2.4.4.1.1	Proceso cromatográfico	30
2.4.4.1.2	Precisión del proceso de extracción	30
2.4.4.2	Robustez del sistema	30
2.4.4.3	Estabilidad de la solución del extracto de <i>Turnera diffusa</i>	32
2.4.5	Selección de los Componentes Comunes de Diferentes Especímenes	32
2.4.6	Establecimiento del Modelo Quimiométrico	34
2.4.7	Aplicación del Método Analítico Desarrollado	36
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
3.1	Condiciones cromatográficas	38
3.2	Proceso de Extracción	40
3.3	Validación del Método Cromatográfico	45
3.3.1	Precisión	45
3.3.1.1	Precisión proceso cromatográfico	45
3.3.1.2	Precisión del proceso de extracción	46
3.3.2	Robustez del sistema cromatográfico	47
3.3.3	Estabilidad de la solución del extracto de la planta nativa de <i>Turnera diffusa</i>	48
3.4	Componentes Comunes de <i>Turnera diffusa</i>	50
3.5	Modelo Quimiométrico	55
3.5.1	Análisis de PCA	56
3.6	Aplicación del Método Analítico Desarrollado	58
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
4.1	Condiciones cromatográficas	63

4.2	Proceso de Extracción	65
4.3	Validación del Método Cromatográfico	67
4.3.1	Precisión	68
4.3.2	Robustez del sistema cromatográfico	69
4.3.3	Estabilidad de la solución del extracto de <i>Turnera diffusa</i>	70
4.4	Componentes Comunes de <i>Turnera diffusa</i>	70
4.5	Modelo Quimiométrico	72
4.6	Aplicación del Método Analítico Desarrollado	75
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
5.1	Conclusiones	77
5.2	Perspectivas	78
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>79</b>

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%	Por ciento
%DER	Desviación estándar relativa
AcN	Acetonitrilo
Aest	Área estandarizada
AOAC	Oficial Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist
Aprom	Área promedio
Aseñal	Área de cada señal
B.C.S.	Baja California Sur
C <sub>18</sub>	Columna cromatográfica de fase inversa de octadecilsilano
C <sub>8</sub>	Columna cromatográfica de fase inversa de octasilano
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG	Cromatografía de Gases
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a detector de Espectrometría de Masas
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR-EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a detector de Espectrometría de Masas
CLAR-RMN	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a detector de Resonancia Magnética Nuclear
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSHEA	Dietary Supplement Health and Education Act
EC	Electroforesis Capilar
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
h est	Altura estandarizada
h prom	Altura promedio
h señal	Altura de cada señal
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetro
°	Grado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Componente Principal
PC1	Primer Componente Principal
PC2	Segundo Componente Principal
PCA	Análisis de Componente Principal
PCR	Análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Locales
pH	Potencial de Hidrógeno
PLS	Análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S.L.P.	San Luis Potosí
SIMCA	Modelado Independiente Suave de Analogía de Clase
TFA	Ácido trifluoroacético
UV	Ultravioleta visible
v/v	Relación volumen volumen
X	Promedio o media
$\alpha$	Factor de separación
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\Sigma$	Suma
$^1\text{HRMN}$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1.1	Parámetros para evaluar la calidad de productos herbales.	4
2.1	Variables modificadas para evaluar la robustez del método.	31
2.2	Colectas de <i>Turnera diffusa</i> .	33
2.3	Tabla de productos comerciales.	36
3.1	Programa de gradiente para los sistemas 1 y 2.	39
3.2	Valores del factor de separación ( $\alpha$ ) calculados para las señales más intensas en los dos sistemas cromatográficos seleccionados.	40
3.3	Resultados obtenidos con los dos procesos de extracción.	42
3.4	Precisión intra e interdía del proceso cromatográfico.	46
3.5	Precisión del proceso de extracción.	47
3.6	Resultados de Robustez del sistema cromatográfico.	48
3.7	Resultados de estabilidad de la solución del extracto de la planta nativa de <i>Turnera diffusa</i> .	50
3.8.a	Señales comunes en los 19 extractos de <i>Turnera diffusa</i> .	52
3.8.b	Señales comunes en los 19 extractos de <i>Turnera diffusa</i> .	53
3.9	Productos comerciales aceptados como <i>Turnera diffusa</i> .	62

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Plantas Medicinales**

##### **1.1.1 Importancia**

Historicamente las plantas han sido utilizadas como medicamentos. Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos para el tratamiento de enfermedades (Hazle M.1999, Cañigüeral S. 2002).

Se estima que han sido identificadas de 250,000 a 350,000 especies de plantas en el mundo y cerca de 35,000 son ampliamente usadas con propósitos medicinales (Duke J.A. 1990, Kong J.M. 2003 ). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha confirmado que el 80 % de la población mundial, especialmente millones de personas de las áreas rurales de los países en desarrollo, hacen uso de las medicinas herbales para atender sus necesidades de salud (OMS 2002).

La medicina tradicional herbolaria y sus preparaciones han sido ampliamente empleados por miles de años en muchos países orientales y su popularidad se ha extendido en las últimas décadas a países occidentales, sin ser aún aceptada oficialmente en muchos de

ellos. Esto es debido principalmente a que no hay datos suficientes de eficacia y seguridad que cumplan con los criterios requeridos para que su uso sea universal. Las razones para la falta de datos se debe, no solamente a la falta de políticas de salud pública adecuadas, sino también de control de calidad de estos productos, ya que no se dispone de metodologías adecuadas y aceptadas para su evaluación. Esta falta de metodología es debida a que a diferencia de los compuestos de síntesis de alta pureza, una fórmula herbal puede consistir en cientos de compuestos (World Health Organization 1998).

Desde tiempos prehispánicos México cuenta con una gran tradición de métodos curativos, basados principalmente en el empleo de plantas medicinales. Bien podríamos decir que México es una farmacia natural, pues cuenta con una extensa y muy variada flora medicinal en todo su territorio. Se considera que hay alrededor de tres mil plantas en el territorio nacional reconocidas por sus propiedades curativas (Adame M. 2000).

Las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias utilizadas por la población mexicana para enfrentar sus enfermedades cotidianas. El uso de plantas medicinales se da en nuestro país no solamente en el medio indígena y rural, sino en las zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la considerable diversidad biológica del país y de la necesidad de recursos accesibles para enfrentar a muy diversos padecimientos (Farmacopea Herbolaria Mexicana 2001).

### 1.1.2 Control de calidad de productos herbales

La seguridad en el consumo de un producto herbal debe ser garantizada por un proceso completo de control de calidad. Este debe ser un proceso estandarizado, detallado, claro,

conciso y reproducible que pueda ser utilizado para evaluar a otros productos de la misma naturaleza. El aseguramiento de calidad de productos herbales, es un prerrequisito para realizar ensayos clínicos con resultados reproducibles (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2001, World Health Organization 1998).

Una gran parte de los productos herbales son clasificados como suplementos dietéticos, por lo que no están sujetos a los mismos procesos de monitoreo de los medicamentos; es por ello que en Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) emitió la guía DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act of 1994) para la regulación de este tipo de productos. La guía permite a las compañías hacer afirmaciones sobre los beneficios de sus productos en la conservación de la salud, sin embargo no revisa que se cumplan los estándares de control de calidad en cuanto a seguridad, eficacia y pureza (U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition 1995).

La OMS en su manual de métodos de control de calidad para plantas medicinales y la Farmacopea Herbolaria Mexicana presentan una colección de procedimientos recomendados para evaluar la identidad, pureza y contenido de los materiales de plantas medicinales; con estos procedimientos intentan proporcionar a los laboratorios una herramienta para llevar a cabo el control de calidad en los productos herbales (Tabla 1.1) (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2001, World Health Organization 1998).

**Tabla 1.1 Parámetros para evaluar la calidad de productos herbales**

<b>1) Pruebas de identidad</b>	<b>2) Valoración</b>	<b>3) Pruebas de pureza</b>
a) Macroscópicas b) Microscópicas c) Organolépticas <b>d) Perfil cromatográfico</b>	a) Principios activos b) Marcadores	a) Humedad b) Cenizas c) Materia extraña d) Disolventes residuales e) Contaminantes microbianos f) Aflatoxinas g) Metales pesados h) Residuos plaguicidas

Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2001, World Health Organization 1998.

Los parámetros que incluyen estas referencias para describir la calidad de los productos herbales usados como medicamentos son : 1) Pruebas de identidad, donde consideran las características macroscópicas, microscópicas y organolépticas, así como el perfil cromatográfico (huella dactilar); 3) Pruebas de pureza para determinar humedad, cenizas, materia extraña, disolventes, la presencia de contaminantes microbianos, aflatoxinas, metales pesados y residuos de plaguicidas; y 2) La valoración de principios activos y/o marcadores, (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos 2001, World Health Organization 1998) .

Tradicionalmente, el contenido de algunos componentes activos o marcadores de los productos herbales ha sido usado para evaluar su calidad. Sin embargo, es reconocido que este tipo de determinaciones no proporciona por sí una idea completa de un producto herbal, ya que son múltiples los constituyentes responsables de sus efectos terapéuticos. Estos constituyentes pueden trabajar sinérgicamente y pueden variar dependiendo no únicamente de la especie, sino también de las condiciones de crecimiento (cultivo), de la época de cosecha, del origen, de los métodos de proceso y

secado y del tiempo de almacenaje, entre otros factores. Es por estas razones que se hace necesario determinar la mayoría de los constituyentes de las plantas medicinales con el propósito de asegurar la confiabilidad y precisión de las investigaciones farmacológicas y clínicas, para conocer su bioactividad y los posibles efectos colaterales de los compuestos activos, así como mejorar el control de calidad de sus productos (Liang Yi-Zeng 2004).

Es así, que el perfil cromatográfico comúnmente también llamado huella dactilar cromatográfica, parece ser la herramienta más conveniente para llevar a cabo el control de calidad de los productos herbales, de tal manera que el producto herbal como un todo sea considerado el componente activo (Yang Li-Wei 2005, Ji Yi-Bing 2005, Sun Yi 2003, Wang L. 2005, Zhang Xuan 2003).

## **1.2 Técnicas Analíticas Empleadas para Establecer Huellas Dactilares de Productos Herbales**

### **1.2.1 Perfiles espectroscópicos**

Si bien, los métodos cromatográficos han sido ampliamente utilizados para establecer los perfiles de un producto herbal, también ha habido algunos avances en el uso de los perfiles espectroscópicos empleando espectroscopia Infrarrojo o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución. Las huellas dactilares obtenidas por <sup>1</sup>H RMN han sido muy utilizadas, sobre todo, en el análisis de alimentos naturales como vino, aceites de oliva, cervezas, entre otros. La ventaja de esta técnica consiste en permitir la

construcción de una huella dactilar sin previa preparación de la muestra (Pauli G. 2005, Bilia A. 2002, Pereira G. 2005, Jaki B. 2002).

A pesar de las ventajas en el empleo de los perfiles espectroscópicos, los cromatográficos siguen siendo los más empleados para evaluar la calidad de las plantas medicinales (Liang Yi-Zeng 2004).

### 1.2.2 Perfil electroforético

La electroforesis capilar (EC) fue introducida a principios de los 80s como una poderosa técnica analítica de separación que ha sido desarrollada rápidamente. Los métodos electroforéticos, especialmente la EC han sido empleada en el análisis de plantas medicinales en la última década. La EC permite la separación y análisis de los ingredientes activos en las plantas medicinales; tiene la ventaja de que requiere poca cantidad de muestra y permite realizar análisis rápidamente con muy buena capacidad de separación. También es una buena herramienta para la generación de huellas dactilares de las medicinas herbales. La EC es una técnica de características similares a la cromatografía de líquidos. Estudios recientes de alcaloides y flavonoides en plantas medicinales han empleado la EC. (Liang Yi-Zeng 2004)

### 1.2.3 Perfil Cromatográfico

El análisis de los perfiles cromatográficos o electroforéticos ha sido aceptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una estrategia para el ensayo de productos herbales y recientemente la Agencia de Administración de Drogas en China (The Drug Administration Bureau of China) lo ha solicitado para la estandarización de

preparados a partir de productos herbales (Sun Yi 2003). Los perfiles se usan también para la identificación de plantas y para evaluar la estabilidad de la misma.

La huella dactilar cromatográfica de un producto herbal es un patrón del extracto de algunos componentes químicos comunes en sus características químicas o farmacológicas. Este perfil cromatográfico debe proporcionar las atribuciones fundamentales de integridad para representar químicamente el producto herbal investigado. Las huellas dactilares cromatográficas permiten autenticar el material vegetal, aún si el número y/o concentración de los constituyentes no es idéntico en diferentes muestras; es decir las huellas dactilares cromatográficas podrían demostrar las semejanzas y diferencias entre varias muestras. Al analizar la huella cromatográfica de un producto herbal se consideran los múltiples constituyentes y no solamente uno o dos marcadores en el proceso de evaluación de la calidad de estos productos (Sun Yi 2003, Ji Yi-Bing 2005, Yang Li-wei 2005, Wang L.C. 2005, Zhang Xuan 2003, Gong Fan 2004).

En cualquier producto herbal existen cientos de componentes desconocidos y muchos de ellos se encuentran en baja concentración. Además, usualmente existen variabilidades entre muestras del mismo producto herbal. En consecuencia, obtener huellas dactilares cromatográficas confiables que representen componentes químicamente característicos no es tarea fácil.

La cromatografía posee una capacidad muy poderosa para la separación de los complejos componentes químicos de los extractos de los productos herbales, siendo

posible separarlos en muchas subfracciones relativamente simples (Liang Yi-Zeng 2004).

#### 1.2.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Durante mucho tiempo la cromatografía de capa fina ha sido la técnica de elección para el análisis de productos herbales y es aún usada con mucha frecuencia, (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2001, The Complete German Commission E Monographs 1999, Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para Infusión y Tisana 1998, Ramírez Durón 2007). CCF es usada como un método de rastreo que provee perfiles cromatográficos característicos y permite identificar adulteraciones en los productos. Las principales ventajas de esta técnica es que es sencilla, rápida, versátil y permite analizar muchas muestras a la vez. Sin embargo presenta como desventajas, que es una técnica de análisis cualitativo de poca sensibilidad (Liang Yi-Zeng 2004).

#### 1.2.3.2 Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía de gases ha sido empleada en el análisis de compuestos volátiles presentes en los productos herbales, con el propósito de establecer perfiles de identificación de las mismas, ya que la composición y concentración relativa de los compuestos orgánicos volátiles (aceites esenciales) son característicos de algunas plantas. Cambios en la composición de los aceites volátiles (aceites esenciales), pueden indicar adulteraciones o indicar cambios enzimáticos, de oxidación o fermentación. El empleo de los acoplamientos de la CG con la espectrometría de masas (CG-EM), proporciona información de identidad de los compuestos. La principal desventaja de la CG es que no puede ser empleada para análisis de compuestos polares y no volátiles, a menos que se realice una derivatización previa de la muestra (Liang Yi-Zeng 2004).

### 1.2.3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La CLAR ha sido el método de elección para el análisis de medicinas herbales. Es una técnica relativamente sencilla y muy versátil, ya que permite analizar compuestos tanto volátiles como no volátiles, así como polares, no polares y hasta iónicos (Liang Yi-Zeng 2004). En general, la CLAR puede ser empleada para analizar la mayoría de los compuestos en las plantas medicinales, tal y como lo revelan las publicaciones a este respecto. Las columnas de fase inversa son las más empleadas. El detector más comúnmente empleado es el UV- visible. El uso de detectores de arreglo de diodos (DAD) proporcionan información adicional a los perfiles cromatográficos obtenidos a longitudes de onda simples, ya que además se pueden obtener los espectros relacionados con cada uno de los picos, lo cual puede ser empleado como criterio de identificación y análisis de pureza de cada uno de ellos. Los acoplamientos como CLAR-EM, CLAR-RMN, también han sido utilizados con estos mismos propósitos y proporcionan información espectral adicional, que es muy útil tanto para el análisis cualitativo, así como para la elucidación estructural (Liang Yi-Zeng 2004, Schaneberg B. 2002, Meng J. 2005, Ji Yi-Bing 2005).

### 1.2.3.4 Factores que afectan el establecimiento del perfil cromatográfico

Obtener un buen perfil cromatográfico que represente la fitoequivalencia de un producto herbal depende de varios factores, tales como el procedimiento de extracción, el instrumento de medición y las condiciones de separación, entre otros. (Sun Y. 2003, Ji Yi-Bing 2005, Yang Li-wei 2005, Wang L.C. 2005, Zhang X. 2003, Ward J. 2003).

El método de extracción y preparación de muestra es muy importante para los buenos resultados del perfil cromatográfico, ya que si se quiere tener una buena información del

mismo, es necesario contar con un método que extraiga la mayoría de los componentes activos de las plantas, que garantice la integridad de la medicina herbal y a la vez que sea un método preciso y ofrezca buenas recuperaciones. Se han reportado en la literatura diferentes métodos de extracción empleados para plantas, tales como: sonicación, extracción líquido-líquido, extracción Soxhlet, extracción asistida por microondas, extracción con fluidos supercríticos, extracción acelerada con solventes, extracción líquida presurizada y extracción asistida con surfactantes, entre otros. La mayoría de los procesos de extracción para productos herbales, emplean mezclas hidroalcohólicas como solvente de extracción y los solventes más comúnmente utilizados son agua, metanol y etanol. Para el caso de la extracción por fluidos supercríticos se emplea como solvente dióxido de carbono solo o con algún modificador como el metanol (Ong E. 2004).

Es importante considerar que la optimización de las condiciones de separación involucra muchos factores tales como: la composición de las fases, el pH, la temperatura, flujos, etc., por lo que se requiere de un buen diseño experimental que permita optimizar y controlar estos factores (Zhang J. 2005, Ji Yi-Bing 2005, Yang Li-Wei 2005, Sun Yi 2003, Gong Fan, 2003).

Una vez optimizadas las condiciones de tratamiento de muestra y separación, el siguiente reto es el análisis de los datos obtenidos. Como ya se ha mencionado es posible emplear las técnicas cromatográficas para obtener perfiles relativamente completos de las medicinas herbales que permitan predecir la fitoequivalencia. Sin embargo, la interpretación de estos perfiles se complica cuando el número de componentes es grande y más aún cuando se presentan señales no resueltas.

La quimiometría permite enfrentar las dificultades en el análisis de calidad de las plantas medicinales. El empleo de técnicas quimiométricas facilita el análisis de datos tanto cromatográficos como espectrales.

### **1.3 Quimiometría**

La quimiometría es una herramienta empleada para el tratamiento matemático y estadístico de datos espectrales y cromatográficos. El perfil cromatográfico de un producto herbal, es un sistema multivariable ya que involucra la mayoría de los constituyentes de la planta.

Las huellas dactilares se construyen, generalmente, con matrices de datos concernientes al área de los picos y tiempos de retención en cromatografía o área de los picos en RMN, incluyendo sólo algunos picos seleccionados del cromatograma o espectro (Zhang J. 2005, Ji Yi-Bing 2005, Yang Li-wei 2005, Sun Y. 2003, Gong F. 2003). Las desventajas de la detección e integración de las señales, tanto espectroscópicas como cromatográficas y la selección subjetiva de las mismas puede evitarse usando todos los datos adquiridos por medio del análisis quimiométrico que permite, entre otras cosas, deconvolucionar los picos solapados de tal manera que se asegure la resolución completa de las señales (Gong F. 2004, Gong F. 2005). De tal manera que si la Cromatografía acoplada a diferentes detectores es además combinada con los avances quimiométricos, pueden desarrollarse imágenes claras de las huellas dactilares cromatográficas obtenidas.

Aunque son pocos los reportes de estudios de perfiles cromatográficos que incluyan un tratamiento quimiométrico de datos, la mayoría de ellos hacen uso de técnicas de análisis multivariable, entre las que se incluyen el análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) o locales (PCR) así como el análisis de componente principal (PCA) (Zhang J. 2005, Ji Yi-Bing 2005, Yang Li-Wei 2005, Sun Y., 2003, Gong F. 2003).

### 1.3.1 Técnicas de análisis multivariable

El análisis multivariable en sus diferentes versiones (PCR, PCA, PLS), es una técnica que ha sido empleada en diversos procesos de la química analítica, entre ellos, análisis espectroscópicos y cromatografía, principalmente para fines cuantitativos. Estas consisten en el tratamiento de datos empleando cálculos de álgebra matricial, para obtener una correlación entre los mismos y permite reconstruir o modelar un conjunto de datos desconocido (por ejemplo un espectro o un cromatograma), a partir de una serie de datos analizados (Liang Yi-Zeng 2004, Gong F. 2004, Gong F. 2003, Gong F. 2001, Ward J. 2003, Gong F. 2005).

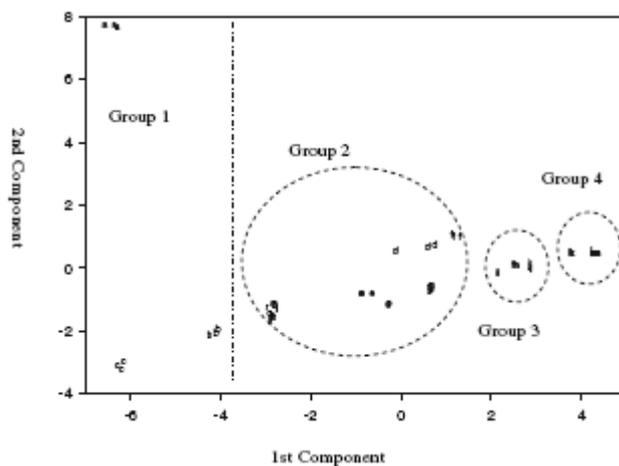
#### 1.3.1.1 Análisis de Componente Principal (PCA)

El PCA es una técnica empleada para reducir la cantidad de datos cuando existe una correlación. Es importante afirmar que no es una técnica útil cuando las variables no están correlacionadas.

La idea principal del PCA es encontrar combinaciones principales que sean combinaciones lineales de variables originales. La información llevada por las variables originales es proyectada sobre un número más pequeño de variables subyacentes

llamadas componentes principales. El primer componente cubre la mayor parte de la variación de los datos. El segundo componente principal es ortogonal al primero y cubre la segunda varianza más grande de los datos (Uscramble 9.2, López de A. 1996, Millar J. 2002).

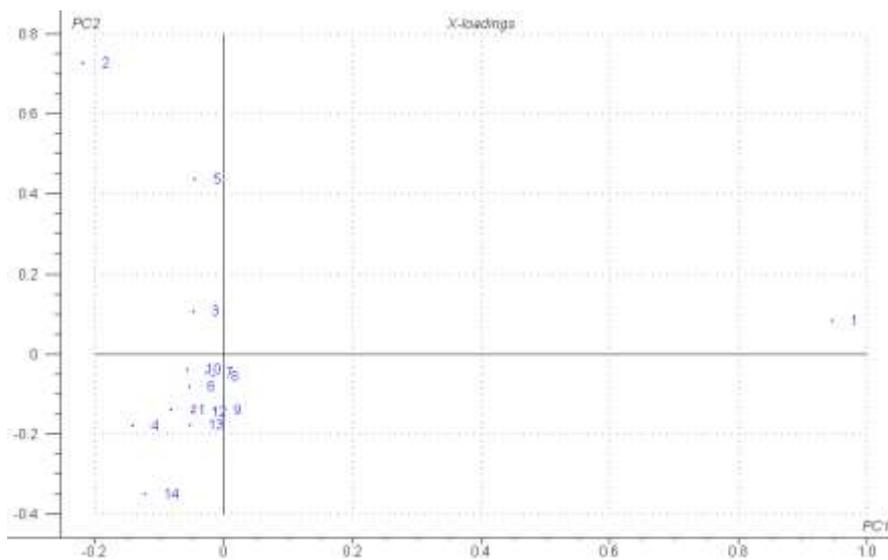
En los gráficos de los componentes principales es posible ver la correlación entre las diferentes variables y detectar e interpretar patrones de muestras, agrupamientos, similitudes o diferencias (Figura 1.1). Del gráfico de doble dimensión de las muestras (scores) para dos componentes específicos del PCA, se puede obtener información sobre los patrones de las muestras. Muestras muy cercanas son similares y de manera contraria muestras muy alejadas entre si son diferentes.



**Figura 1.1** Gráfico de doble dimensión de los scores (muestras) del PCA.

Los loading describen la correlación de las variables (Figura 1.2). En el PC cada variable tiene un loading que refleja la contribución de la variable al PC. Analizando conjuntamente el gráfico de muestras y variables se pueden encontrar diferencias y

similitudes entre las muestras. Así se puede determinar cuáles variables son responsables de las diferencias entre las muestras. Por ejemplo una variable con valor grande a la derecha del gráfico de loading (variable 1 en figura 1.2), indica que las muestras a la derecha del gráfico de scores tienen una influencia grande de esta variable (Uscramble 9.2, López de A.1996, Miller J. 2002).



**Figura 1.2 Gráfico de las variables (loading).**

### 1.3.1.2 Modelado Independiente Suave de Analogía de Clase (SIMCA)

Es un método de clasificación basado sobre un modelo previo de PCA, que permite discriminar entre la pertenencia o no de una muestra a una clase dada. Esto se llama modelado de clase disjunta, al cual pertenece el SIMCA. Una muestra nueva podría ser reconocida como un miembro de la clase, si su similitud a los miembros de esa clase es suficiente. Una vez que cada clase ha sido modelada mediante PCA, una nueva muestra puede ser ajustada o proyectada en el modelo. Para cada muestra los valores de todas las variables son computadas usando los scores y los loading del modelo y se compara el

valor predictivo con el valor real de las variables. La regla de decisión está basada en una aproximación estadística. Si una muestra pertenece a una clase, podría tener una pequeña distancia al modelo (la situación ideal es una distancia igual a cero). Para una muestra dada, se necesita comparar su distancia al modelo reflejando la probabilidad de distribución de un objeto a la distancia del modelo alrededor de cero (Uscramble 9.2, Miller 2002).

#### **1.4 Antecedentes**

La eficacia de gran cantidad de productos herbales ha sido demostrada desde el punto de vista científico. Sin embargo, como lo hemos señalado, para asegurar su efectividad es necesario que cada producto herbal cumpla con una serie de requisitos que garanticen calidad y seguridad. Estos requisitos van desde el examen macro y microscópico al examen fitoquímico (huella dactilar), los cuales son determinantes para llegar a la identificación de la planta; además se incluye la determinación de carga microbiana, residuos de pesticidas y metales pesados (Farmacopea Herbolaria Mexicana 2001).

Mientras que en países como Alemania, Austria y Suiza, el simple procedimiento de registro de productos herbales implica un estricto control de calidad, en países como el nuestro, la situación es completamente contraria. En México, la venta de productos herbales se realiza libremente, sin exigir que el producto se someta a algún tipo de análisis que como mínimo asegure la autenticidad de la planta. La Secretaría de Salud, contempla una serie de artículos incluidos en la Ley General de Salud, que regulan la venta, uso y comercialización de productos herbales, sin embargo, se considera a estos productos como suplementos alimenticios y no como productos con fines terapéuticos,

por lo que no se les exige un control de calidad. (Artículo 215 de la “Ley General de Salud”)

Debido a esta problemática y al hecho de que en México la herbolaria es una práctica médica desde tiempos prehispánicos y a que representa una alternativa económica para el cuidado de la salud, diversos grupos de trabajo entre ellos la misma Secretaría de Salud, han visto la necesidad de fomentar la regulación sanitaria y la investigación de la medicina herbolaria en México.

En este sentido, surgió en el 2001 la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, que tiene 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”.

La Farmacopea Herbolaria Mexicana se centró en la inclusión de plantas empleadas en México con fines medicinales, que contasen con información sobre seguridad en su uso, métodos de análisis validados, o bien referencias farmacopéicas de otros países. De acuerdo a esta selección, quedaron fuera la mayoría de las especies autóctonas que son utilizadas en la herbolaria mexicana, ya que no cuentan con información que respalde su uso, careciendo de referencias sobre su control analítico, efectividad, toxicidad, caracterización e identificación de metabolitos, o determinación del perfil cromatográfico, entre otros.

Recientemente en el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., se desarrolló un proyecto de investigación titulado “La medicina herbolaria. Rastreo sistemático de la calidad de los productos más utilizados por la población del Noreste de México”. Resultado de esta investigación en el año 2004 se publicó un artículo en el que se reportaron los productos herbolarios que se consumen más en nuestra región, para lo cual se aplicaron encuestas a la población y visitas a establecimientos comerciales en Nuevo León. Se obtuvo un listado de 40 productos herbales de mayor consumo en la región, entre los cuales se encontraba Damiana (Salazar A. 2004).

Como resultado de este mismo proyecto, Ramírez y colaboradores reportan en el año 2007, la evaluación de la calidad de algunos productos comerciales que contenían algunas de las 40 plantas de mayor consumo en la región, incluyendo *Turnera diffusa*. En este trabajo se desarrolló y validó metodología de Cromatografía en Capa Fina para el análisis de estos productos empleando como referencia extractos estandarizados. Para el caso de *Turnera diffusa* se reportó que de once productos comerciales, únicamente el 18 % de ellos concordaban con las características cromatográficas del extracto estandarizado (Ramírez Durón 2007). Este método por Cromatografía en Capa Fina para el análisis de *Turnera diffusa* permite discernir en forma general, cuando existen marcadas diferencias entre las distintas muestras; sin embargo, para realizar un análisis más profundo es necesario desarrollar otras técnicas con mayor sensibilidad.

No se encontró en la literatura ningún otro criterio cromatográfico para la evaluación de la calidad de productos con *Turnera diffusa*. Así mismo, hasta el momento no se

conocen el marcador o los componentes activos de la planta, a pesar de que han sido aislados e identificados algunos compuestos de la misma (Jiamping Z. 2007).

A continuación se presentan algunos datos de la Damiana (*Turnera diffusa*).

Es una planta medicinal que se encuentra principalmente en México, América Central y las Islas del Caribe. Es ampliamente empleada y de gran uso popular en nuestro país. También se le conoce como Hierba de la Pastorcilla, Hierba del Ahorcado, Hierba del Venado, Malva Blanca, Mejorana, Orégano o Cimarrón (Adame M. 2000, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2001, Alcaraz M. 2004). La Damiana es un pequeño arbusto aromático de la familia de las Turneraceas que mide entre 30 y 70 cm de altura (Figura 1.1). Su tallo es ramoso, con hojas alternas, ovadas y aromáticas, con el envés cubierto de vellos. Sus flores son pequeñas, de color amarillo, solitarias, salen de las axilas de las hojas y están provistas de cinco pétalos. Los frutos de la Damiana son cápsulas de color café que se abren en 3 valvas al madurar. Florece entre los meses de julio y noviembre. La parte medicinal de la planta son las hojas las cuales son cosechadas durante la estación de floración.. *Turnera diffusa* y *Turnera aphrodisiaca* son generalmente consideradas como la misma planta en el comercio herbal. El nombre botánico latino de *Turnera aphrodisiaca* describe el uso ancestral como afrodisiaco (Adame M. 2000, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2001, Alcaraz M. 2004).



**Figura 1.3 *Turnera diffusa* (Damiana)**

En la antigua civilización Maya, la Damiana fue usada como un afrodisiaco, así como para los mareos y la pérdida del equilibrio. Un misionero español fue el primero en reportar que los Indios Mexicanos preparaban una bebida de hojas de Diamana que tomaban con propósito de potencionador sexual. Además de afrodisiaco se cree que actúa como antidepresivo, tónico diurético y un laxante suave. Ha sido empleado también para tratar la ansiedad, impotencia sexual y úlceras gástricas, entre otras enfermedades ( Adame M. 200, Alcaraz M. 2004).

Solamente se ha reportado un estudio para demostrar el uso tradicional de la Damiana en la disfunción e impotencia sexual: Arletti R. y colaboradores en 1999, administraron Damiana a ratas macho, sexualmente potentes e impotentes. El extracto no tuvo efecto sobre las ratas sexualmente potentes, pero en las que presentaban impotencia sexual se observó un incremento en el porcentaje de ratas que tuvieron una eyaculación completa y que aumentaron su actividad sexual (Arletti R. 1999).

Recientemente un grupo de investigadores en la India demostró la actividad ansiolítica de tres preparados de *Turnera diffusa* verificando que en los tres había flavonoides, alcaloides y esteroides que podría ser responsables del efecto observado (Kumar Z. 2005).

La Damiana también ha sido empleada en combinación con otras plantas por su actividad termogénica y retardo en el vaciamiento gástrico. Dos reportes científicos a este respecto, mencionan una pérdida significativa de peso (3 kg por mes) con respecto al grupo control (Anderson T 2001, Ruxton C.H.S. 2004).

Además la Damiana tiene un uso tradicional en el tratamiento de la diabetes mellitus, el cual ha sido estudiado científicamente. Alarcón Aguilar y colaboradores estudiaron el efecto anti-hiperglucemiante de 28 plantas empleadas en el tratamiento de la diabetes mellitus. Cada planta fue procesada de manera tradicional (agua caliente) y administrada intragástricamente a conejos con hiperglicemia temporal. Los resultados demostraron que ocho de las 28 plantas estudiadas, incluyendo *Turnera diffusa*, disminuyeron significativamente los niveles de glucosa y/o el área bajo la curva de tolerancia de glucosa (Alarcón F.J. 1998). En un estudio más reciente (2002), Alarcón Aguilar reporta que el extracto hidroalcohólico de *Turnera diffusa* no evidencía la actividad hipoglucemiante. Por lo que sugiere, que los componentes de la Damiana con actividad hipoglucemiante podrían ser extraídos con agua caliente y que se pierden o no se extraen en alcohol o que son generados por el calor (Alarcón F.J. 2002).

Así mismo, extractos hexánicos de *Turnera diffusa* han mostrado actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas. Este hallazgo reportado por T. Hernández y colaboradores, correlaciona con la frecuencia de mención sobre el uso de la planta en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Hernández T. 2003).

Por otro lado Salazar Aranda y colaboradores probaron la actividad antioxidantes de extractos hidroalcohólicos de diferentes partes de la planta *Turnera diffusa*. Ellos reportaron que la mayor actividad se encontraba en la parte aérea de la misma (Salazar A. 2008).

La *Turnera diffusa* es una planta con gran uso como fitofármaco. A pesar de su ya amplia comercialización y uso, los extractos estandarizados que se consiguen en el mercado (algunos de compañías extranjeras) presentan como reporte de calidad, sólo el contenido total de flavonoides, el cual es un dato muy ambiguo. No existe método analítico oficial para la evaluación de la calidad de los productos elaborados con Damiana, lo cual fue corroborado recientemente por la FDA y AOAC.

## 1.5 Justificación

*Turnera diffusa* es una de planta medicinal de gran uso popular en nuestro país, sin embargo no hay métodos estandarizados oficiales para llevar acabo el control de calidad en esta planta. La OMS ha aceptado e introducido el análisis del perfil cromatográfico como una de las principales herramienta para el control de calidad de las medicinas herbales, por ello se propone el presente trabajo para desarrollar un método estandarizado para establecer el perfil cromatográfico característico de *Turnera diffusa* como herramienta para el control de calidad de la planta.

## 1.6 Objetivo General

Desarrollar y validar un Método por CLAR-DAD para establecer el perfil cromatográfico de *Turnera diffusa*, como parte del análisis de calidad de extractos de esta planta.

## 1.7 Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones cromatográficas por CLAR-DAD para optimizar la separación de los componentes de un extracto estandarizado de *Turnera diffusa*.
2. Estandarizar el proceso de extracción de la planta.
3. Validar el método cromatográfico.
4. Definir los componentes comunes de diferentes especímenes de la planta.
5. Establecer el perfil cromatográfico característico de *Turnera diffusa* por CLAR-DAD, aplicando técnicas quimiométricas.
6. Aplicar el/los métodos analíticos desarrollados para el análisis de calidad de productos comerciales de *Turnera diffusa*.

## **CAPÍTULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Equipo**

- Cromatógrafo de Líquidos Analíticos Waters 2695 Alliance, con Detector UV-visible de Arreglo de Diodos modelo 996, equipado con automuestreador, desgasificador y controlador de temperatura de columna cromatográfica.
- Balanza Analítica A&D GR-120
- Placa de calentamiento, Thermolyne nuova
- Rotavapor Laborota 4000 Heidolph
- Campana de Extracción Lumistell
- Estufa, Shel Lab Sheldom Manufacturin
- Mini Vórtex, VWR Scientific Products
- Licuadora, MAN 7 velocidades
- Refrigerador General Electric
- Baño de agua con sonicador FS 20 Fisher Scientific
- Horno para control de temperatura de columna cromatográfica. Metachem technologies Inc.

## 2.2 Material

- Columna AccQ· Tag C<sub>18</sub> 150 x 3.9 mm de diámetro interno, tamaño de partícula 4µm (Waters Corporation)
- Columna Chromolith 100 x 4.6 mm (Merck)
- Columna Metachem BDS C<sub>8</sub> 125 x 4.0 mm de diámetro interno, tamaño de partícula 5 µm (Beckman)
- Pipetas automáticas de 100 a 1000 µL y de 5 a 50 µL (Brand)
- Tamiz No. 10 malla 2 mm de apertura. (Fisher Scientific)
- Jeringa de vidrio hipodérmica de 5 mL (Becton Dickinson)
- Puntillas azules y amarillas para pipetas automáticas
- Embudo de filtración rápida 5 x 11 cm (Pyrex)
- Matraz Erlenmeyer de 125 mL con tapón de vidrio esmerilado (Pirex)
- Probetas de 50, 250 y 500 mL(Pyrex)
- Vasos de precipitado de 50, 125 y 250 mL(Pyrex)
- Tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Matraz de aforación de 1000 mL
- Matraz bola Pyrex de boca esmerilada 24/40
- Pipetas Pasteur
- Filtros para HPLC de nylon para solventes (13 x 47 mm, 0.45 µm) (Waters Corporation)
- Acrodiscos Millipore de 0.45 µm de 13 mm de membrana PTFE modificada (Waters Corporation)
- Insertos de vidrio capacidad de 150 µL (Waters Corporation)

- Viales ámbar de 2 mL con tapón de rosca de PTFE/ septa de silicone (Waters Corporation)
- Cronómetro con reloj alarma de cuatro canales (Traceable)
- Bolsas de plástico con cierre deslizable de 26.8 x 27.9 cm de 3.78 L
- Papel filtro Whatman No. 40
- Programas computacionales Microsoft Excel 2003 y Unscramble 9.2 (Umetrics).

### **2.3 Solventes, Reactivos y Material biológico**

- Metanol (MeOH) grado HPLC (Tedia)
- Acetonitrilo (AcN) grado HPLC (Tedia)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)( Fermont)
- Agua bidestilada Plus (Laboratorios Monterrey S.A. de C.V.)
- Metanol grado analítico (Fermont)
- Etanol grado analítico (Fermont)
- Nitrógeno gaseoso 99% de pureza (AGA)
- Ácido Trifluoroacético (TFA) (Sigma Aldrich)
- Extracto estandarizado de *Turnera diffusa* (Bioextractos)
- Plantas recolectadas de diferentes áreas geográficas del país (Tabla 2.2)

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Preparación de Soluciones

#### 2.4.1.1 Extracto estandarizado

Se pesaron 15 mg del extracto estandarizado de Damiana, y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se almacenó en un vial ámbar a 4°C.

#### 2.4.1.2 Ácido Trifluoroacético (TFA) 0.1 %

A 800 mL de agua bidestilada plus contenida en un matraz de aforación de 1000 mL, se añadió 1 mL de TFA. Se mezcló y se llevó al volumen final con agua.

### 2.4.2 Condiciones Cromatográficas

Se trabajó con el extracto estandarizado de *Turnera diffusa*, el cual se analizó bajo diferentes condiciones cromatográficas para optimizar la separación de los componentes.

Las variaciones cromatográficas se realizaron en el sistema de solventes, el gradiente, la fase estacionaria y la longitud de onda de análisis, manteniendo constante el volumen de inyección (10 $\mu\text{L}$ ), la velocidad de flujo (0.4 mL/ min) y la temperatura de la columna (30°C).

Las fases estacionarias que se probaron fueron las siguientes:

- Columna Chromolith C<sub>18</sub>, 100 x 4.6 mm
- Columna Metachem hypersil BDS C<sub>8</sub>, 125 x 4 mm x 5 μm
- Columna AccQ Tag C<sub>18</sub>, 150 x 3.9 mm x 4μm

Las siguientes son las fases móviles que se probaron:

- MeOH – H<sub>2</sub>O
- AcN – H<sub>2</sub>O
- MeOH – TFA 0.1% en agua
- AcN – TFA 0.1% en agua

Se probaron diferentes gradientes de elusión, así como diferentes longitudes de onda en un intervalo de 200 – 400 nm para la obtención de los cromatogramas.

Los parámetros que se emplearon para seleccionar las mejores condiciones cromatográficas fueron, el número de señales, el tiempo de análisis y la separación de las señales de mayor intensidad, calculando para ello el factor de separación ( $\alpha$ ), el cual se determinó aplicando la siguiente fórmula.

$$\alpha = t_{R2} / t_{R1} \quad (\text{ecuación 2.1})$$

### 2.4.3. Estandarización del Proceso de Extracción

Para estandarizar el proceso de extracción del extracto crudo de *Turnera diffusa*. Se empleó planta colectada en el municipio de Zuazua N.L. México en diciembre del 2005. La planta fue autenticada en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. (No. de registro 8272).

La planta colectada se secó a temperatura ambiente. La parte aérea de la planta (hojas tallo y flor), se molió en licuadora y posteriormente se pasó a través de una criba de 2mm. Se probaron dos procesos de extracción descritos en la literatura (Orozco H. 2001, Sun Y., 2003).

#### 2.4.3.1 Proceso de extracción 1

Se pesó 1g de la planta molida y se sometió a extracción con 5 mL de una solución hidroalcohólica (etanol- agua 9:1 v/v) agitando en vortex por tres minutos, enseguida se filtró empleando papel filtro Whatman No. 40. La extracción se repitió tres veces la extracción y se combinaron los extractos. El solvente de extracción se eliminó mediante destilación a presión reducida a 37°C.

#### 2.4.3.2 Proceso de extracción 2

Se pesaron 2.0 g de la planta molida y se sometió a extracción con 24 mL de una solución hidroalcohólica (etanol- agua 6:4 v/v) en ultrasonido por 30 minutos, enseguida se filtró. La extracción se repitió tres veces y se combinaron los extractos. El solvente de extracción se eliminó mediante destilación a presión reducida a 37 °C.

Una vez eliminado el solvente de extracción, los extractos se recuperaron con 4 mL de metanol grado analítico y 0.5 mL de agua. El extracto recuperado se colocó en un tubo de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca, posteriormente el solvente se eliminó con nitrógeno gaseoso. El extracto seco se almacenó a 4°C en ambiente de nitrógeno protegido de la luz.

La solución del extracto se preparó pesando 15 mg del extracto seco obtenido por cada proceso de extracción. Éste se disolvió en 1 mL de DMSO. La solución se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 µm, para ser inyectado en el cromatógrafo.

Para seleccionar el mejor proceso de extracción se calculó el % de recuperación y la desviación estándar relativa (%DER) del número total de señales detectables y de los tiempos de retención ( $t_R$ ) y las áreas y alturas relativas de las señales más intensas.

La %DER se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\%DER = (\bar{X}/DE)*100 \quad (\text{ecuación 2.2})$$

#### **2.4.4 Validación del Método Cromatográfico**

Una vez establecidos el sistema cromatográfico y el proceso de extracción se procedió a la validación del método.

En la validación se evaluó la precisión del sistema cromatográfico y del proceso de extracción, la robustez del sistema y la estabilidad de la solución del extracto de

*Turnera diffusa* en DMSO. Para la validación se trabajó con el extracto de la planta nativa autenticada, obtenido por el proceso de extracción previamente seleccionado.

#### 2.4.4.1 Precisión

##### 2.4.4.1.1 Proceso cromatográfico

La precisión se evaluó en el mismo día (intradía) y en días diferentes (interdía). Para evaluar la precisión intradía se realizaron cinco inyecciones del extracto de *Turnera diffusa* y se determinó la desviación estándar relativa (%DER) de los  $t_R$ , de las áreas (% área) y de las alturas relativas (% altura) de las señales más intensas, así como la %DER del número total de señales detectables. La precisión interdía se evaluó de la misma manera que para la precisión intradía, pero inyectando en cinco ocasiones el extracto de *Turnera diffusa* en tres días diferentes.

##### 2.4.4.1.2 Precisión del proceso de extracción

La precisión del proceso de extracción se determinó preparando cuatro extractos a partir de la planta molida y seca, empleando el proceso previamente establecido. Cada extracto se preparó en fechas diferentes. Se calculó la % DER del número total de señales, de los  $t_R$ , de las áreas (% área) y de las alturas relativa (% altura) de las señales más intensas.

##### 2.4.4.2 Robustez del sistema cromatográfico

Se probó el efecto de pequeñas modificaciones en las siguientes variables cromatográficas:

- Temperatura de la columna
- Concentración del TFA

- Proporción inicial del modificador orgánico (MeOH)

Para todas las variables, las modificaciones se establecieron con valores por arriba y por abajo de la condición optimizada (Tabla 2.1)

**Tabla 2.1 Variables modificadas para evaluar la robustez del método.**

Variable	Condición optimizada	Condición modificada	
		Valor alto	Valor bajo
Temperatura de la columna (°C)	30	32	28
Concentración del TFA (%)	0.1	0.15	0.05
% Modificador orgánico (MeOH)	30	32	28

Cada prueba se realizó por triplicado y el parámetro a evaluar fue el promedio de los  $t_R$  de las señales.

Para evaluar cada condición cromatográfica (Temperatura de la columna, concentración del TFA y % de MeOH) se aplicó la siguiente ecuación (Quattrocchi 1992):

$$|V| = \bar{V}_A - \bar{V}_a \quad (\text{ecuación 2.3})$$

Donde  $|V|$  es el valor absoluto de la diferencia entre los promedios de los tiempos de retención obtenidos a la condición alta respecto de la optimizada ( $\bar{V}_A$ ) menos el

promedio de los tiempos de retención obtenidos a la condición baja respecto de la optimizada ( $\bar{V}_a$ ).

Si  $|V| > DE \cdot 2^{1/2}$  la diferencia es significativa. (ecuación 2.4)

donde:

DE: desviación estándar del análisis de precisión.

2: constante referente al nivel estadístico de confiabilidad del 95%.

#### 2.4.4.3 Estabilidad de la solución del extracto de *Turnera diffusa*

El extracto de la planta nativa se almacenó a 4°C y se analizó en los días 30, 60, 90 y 120 posteriores a su preparación. La estabilidad se evaluó tomando en cuenta el número total de señales detectadas y las alturas relativas de las señales más intensas. Los datos se registraron en gráficas control. Se estableció como límite de estabilidad  $\pm 2$  DE del estudio de precisión.

#### **2.4.5 Selección de los Componentes Comunes de Diferentes Especimenes**

Para definir los componentes principales de *Turnera diffusa*, se realizó la colecta de especimenes de la planta en diferentes fechas y regiones geográficas del país (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2 Colectas de *Turnera diffusa*.**

	<b>Procedencia</b>	<b>Fecha de colecta</b>
<b>1</b>	Cadereyta Jiménez, N.L.	Diciembre de 2004
<b>2</b>	Zuazua, N.L.	Diciembre de 2005
<b>3</b>	Ciudad Victoria , Tamaulipas	Octubre de 2006
<b>4</b>	La Cruz de Elota, Sinaloa	Octubre de 2006
<b>5</b>	Rayones, N.L.	Noviembre de 2006
<b>6</b>	Jaumave, Tamaulipas	Diciembre de 2006
<b>7</b>	Marín, N.L.	Enero de 2007
<b>8</b>	San Luis Potosí, San Luis Potosí (S.L.P.)	Enero de 2007
<b>9</b>	Cañada del Lobo, S.L.P.	Enero de 2007
<b>10</b>	Zuazua, N.L.	Febrero de 2007
<b>11</b>	Nuevo Padilla, Tamaulipas	Julio de 2007
<b>12</b>	Marín, N.L.	Octubre de 2007
<b>13</b>	Dr. González, N.L.	Octubre de 2007
<b>14</b>	Linares, N.L.	Octubre de 2007
<b>15</b>	Cadereyta Jiménez, N.L.	Octubre de 2007
<b>16</b>	Pesquería, N.L.	Octubre de 2007
<b>17</b>	Zuazua, N.L.	Octubre de 2007
<b>18</b>	Rayones, N.L.	Octubre de 2007
<b>19</b>	Villaldama, N.L.	Octubre de 2007

Cada una de estas muestras fue autenticada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Las plantas colectadas se secaron a temperatura ambiente, la parte aérea se separó, se molió y se pasó por una criba de 2 mm. Las plantas colectadas se sometieron al proceso de extracción y análisis cromatográfico previamente establecidos.

Para establecer las señales comunes que sirvieran como criterio de identificación de la planta, se analizaron los cromatogramas obtenidos de los extractos de las plantas colectadas en diferentes regiones geográficas para:

- A) Identificar las señales de mayor intensidad comunes a todos los cromatogramas en función al tiempo de retención y

B) Corroborar con el espectro de absorción UV-Visible de cada señal. Cada espectro se corrigió por sustracción del espectro de la línea base.

#### 2.4.6. Establecimiento del Modelo Quimiométrico

Para establecer el perfil cromatográfico característico de *Turnera diffusa* por CLARIDAD aplicando técnicas quimiométricas, se trabajó con los datos estandarizados tanto de área como de altura relativa de las señales cromatográficas comunes en las 19 muestras de colecta de *Turnera diffusa*.

Las áreas y alturas relativas se calcularon dividiendo el área o altura individual de cada señal entre la suma de las áreas o alturas totales aplicando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Área relativa} = (\text{Área señal} \times 100) / \Sigma \text{ Áreas totales} \quad (\text{ecuación 2.5})$$

$$\% \text{ Altura relativa} = (\text{Altura señal} \times 100) / \Sigma \text{ Alturas totales} \quad (\text{ecuación 2.6})$$

Cada dato original se estandarizó restando la media a ese dato y luego dividiendo por su correspondiente desviación estándar (ecuación 2.7, ecuación 2.8).

$$A_{est} = (A_{señal} - A_{prom}) / DE \quad (\text{ecuación 2.7})$$

donde:

$A_{est}$  = área estandarizada

$A_{señal}$  = área de cada señal

$A_{prom}$  = área promedio

$$h_{\text{est}} = (h_{\text{señal}} - h_{\text{prom}}) / DE \quad (\text{ecuación 2.8})$$

donde:

$h_{\text{est}}$  = altura estandarizada

$h_{\text{señal}}$  = altura de cada señal

$h_{\text{prom}}$  = altura promedio

Los datos obtenidos de los cromatogramas fueron procesados en Excel 2003 y posteriormente exportados al Programa Unscramble 9.2, para ser procesados mediante Análisis de Componente Principal (PCA), con el fin de construir el modelo quimiométrico y establecer el perfil cromatográfico de la planta.

Como primer paso se determinó el número de componentes óptimos al aplicar el análisis de PCA. Para esto se realizó una corrección de fondo (Leverage correction) que es una aproximación de la validación cruzada que permite estimar con cuántos componentes es recomendable establecer el modelo al aplicar el PCA. Este dato se obtuvo por observación del gráfico de la varianza explicada en el que se seleccionó el número de componentes que explicara el 90% de la variación.

A continuación se procedió a realizar el PCA con los datos extraídos de los cromatogramas de las diferentes muestras de colecta de *Turnera diffusa* aplicando el número de componentes determinado anteriormente, para de esta manera establecer el modelo quimiométrico de PCA.

### 2.4.7 Aplicación del Método Analítico Desarrollado

Finalmente el método cromatográfico y el modelo de PCA desarrollado se aplicó para el análisis de calidad en productos comerciales de *Turnera diffusa* adquiridos en las zonas metropolitanas de Monterrey, San Luis Potosí (S.L.P), Torreón Coahuila, Baja California Sur (B.C. S.) y Veracruz (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3** Tabla de productos comerciales.

<b>Producto</b>	<b>Lugar de compra</b>
<b>1</b>	Monterrey
<b>2</b>	Monterrey
<b>3</b>	Monterrey
<b>4</b>	Baja California Sur
<b>5</b>	San Luis Potosí
<b>6</b>	Veracruz
<b>7</b>	Torreón Coahuila
<b>8</b>	Monterrey
<b>9</b>	Monterrey
<b>10</b>	Monterrey
<b>11</b>	Monterrey

Todos los productos fueron adquiridos en negocios expendedores de productos herbales y se verificó que en la etiqueta (en aquellos casos que la presentaban) describiera como único componente a Damiana (*Turnera diffusa*). Cinco productos no presentaron ninguna etiqueta.

Los productos fueron procesados por el proceso de extracción previamente seleccionado y analizados bajo el sistema cromatográfico desarrollado. De cada uno de los cromatogramas obtenidos se identificaron las señales comunes (establecidas en el objetivo 4) corroborando con el espectro de absorción de cada señal. Se obtuvieron los

datos de respuestas relativas de estas señales cromatográficas, se procesaron en Excel 2003 y se exportaron al programa Usramble 9.2.

Para evaluar la calidad de los productos comerciales se empleó el modelo previamente establecido de PCA aplicando el método discriminante SIMCA (Modelado Independiente Suave de Analogía de Clase) a un nivel de significancia del 1%.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Condiciones Cromatográficas**

De los diferentes sistemas cromatográficos que se probaron, se seleccionaron dos por ser los que proporcionaron el mayor número de señales, en el menor tiempo de análisis y la mejor separación.

##### Sistema 1

Se empleó como fase estacionaria una columna Chromolith C<sub>18</sub> de 100 x 4.6 mm y como fase móvil agua (A) y MeOH (B).

##### Sistema 2

La fase estacionaria fue una columna AccQ·Tag C<sub>18</sub> de 150 x 3.9 mm x 4 µm y la fase móvil consistió en TFA 0.1% (A) y MeOH (B).

En la Tabla 3.1 se muestra el programa de gradiente que se empleó en ambos sistemas.

El volumen de inyección de la muestra fue de 10µL, la velocidad de flujo de 0.4

mL/min y la temperatura de la columna de 30°C. Los espectros fueron tomados en un intervalo de 200 a 400 nm.

**Tabla 3.1 Programa de gradiente de elución para los sistemas 1 y 2.**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>	<b>Velocidad de flujo (mL/ min)</b>
0	70	30	0.4
20	40	60	0.4
25	30	70	0.4
30	30	70	0.4
35	70	30	0.4
40	70	30	0.4

*Longitud de onda de monitoreo 254 nm.*

El número de señales obtenidas con el sistema 1 fue de 36 y con el sistema 2 fue de 49.

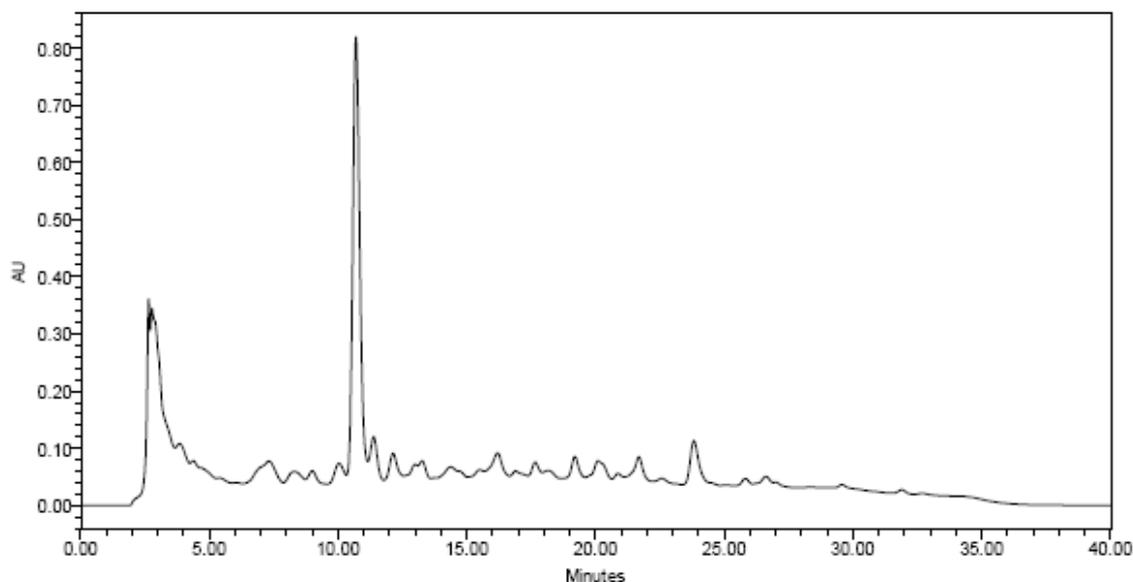
En la Tabla 3.2 se presentan los valores de  $\alpha$  calculados para las señales más intensas en los dos sistemas cromatográficos.

**Tabla 3.2 Valores del factor de separación ( $\alpha$ ) calculados para las señales más intensas en los dos sistemas cromatográficos seleccionados.**

<b>1. Chromolith MeOH-H<sub>2</sub>O</b>		<b>2. AccQTag TFA 0.1%-MeOH</b>	
<b>Señal</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>Señal</b>	<b><math>\alpha</math></b>
1 y 2	1.05	2 y 3	1.08
6 y 7	1.07	11 y 10	1.08
12 y 13	1.02	16 y 15	1.04
14 y 15	1.05	18 y 17	1.04
20 y 19	1.02	25 y 26	1.02
30 y 29	1.01	33 y 34	1.02
36 y 35	1.01	42 y 41	1.02

El sistema cromatográfico que proporcionó el mayor número de señales y la mejor separación fue el sistema 2. La longitud de onda de análisis seleccionada fue de 254 nm.

El cromatograma del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* obtenido con el sistema cromatográfico establecido se presenta en la figura 3.1.



**Figura 3.1** Cromatograma del extracto estandarizado de *Turnera diffusa* con el sistema cromatográfico establecido. (Fase móvil TFA 0.1%:MeOH, fase estacionaria columna AccQ· Tag C<sub>18</sub>, velocidad de flujo 0.4 mL/ min, longitud de onda 254 nm).

### 3.2 Proceso de Extracción

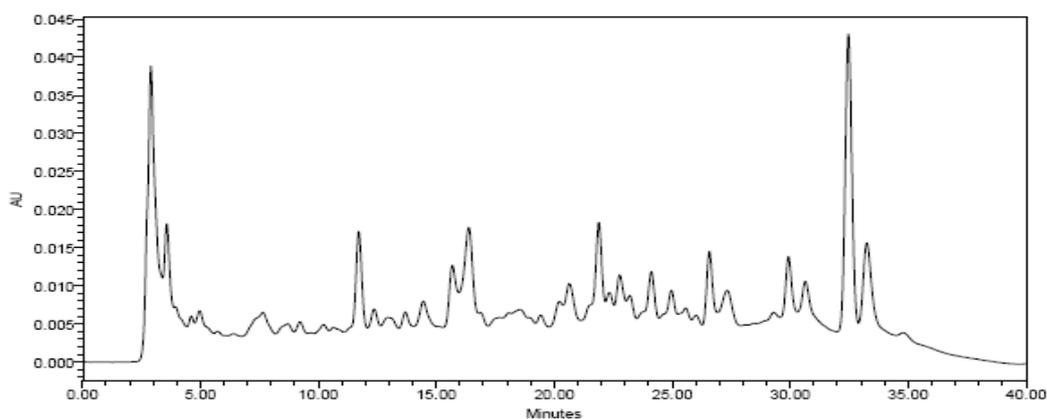
Los resultados obtenidos para los dos procesos de extracción se presentan en la Tabla 3.3.

El proceso de extracción 1 de agitación en vortex, fue el que mostró el mayor número de señales y la mejor precisión. Considerando estos resultados, el proceso de extracción a partir de la planta nativa de *Turnera diffusa* consistió en pesar 1 g de planta seca, molida y cribada realizar tres extracciones con una mezcla etanol : agua (90:10 v/v) en cada ocasión, se agitó por tres minutos en vortex, se filtró, se reunieron los filtrados y finalmente se eliminó el solvente de extracción a presión reducida a 37 °C.

**Tabla 3.3 Resultados obtenidos con los dos procesos de extracción.**

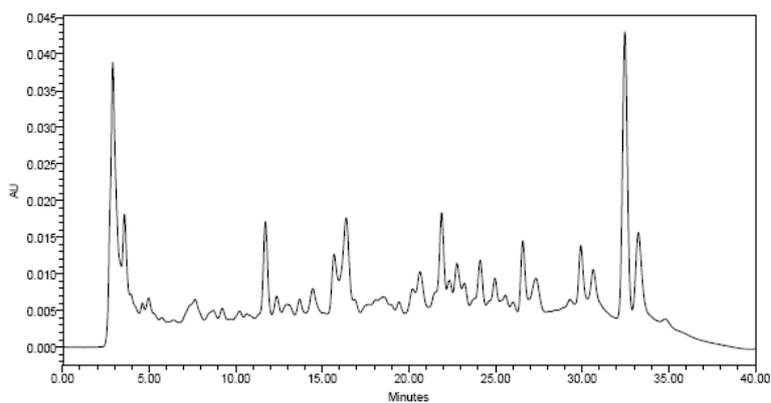
<b>Parámetros</b>	<b>Proceso 1 (Vortex)</b>	<b>Proceso 2 (Ultrasonido)</b>
<b>% recuperación (% RSD)</b>	5.82 (8.05)	14.29 (8.01)
<b>No. de señales (% RSD)</b>	63 (2.74)	58 (3.93)
<b>% RSD <math>t_R</math></b>	0.078 – 0.546	0.231 – 9.497
<b>% RSD Áreas relativas</b>	7.35 – 37.72%	5.94 – 56.94
<b>%RSD Alturas relativas</b>	4.93 -23.43	14.19 – 42.45
<b>No. de señales de mayor intensidad</b>	17	15

En la Figura 3.2 se presenta el cromatograma del extracto de *Turnera diffusa* a partir de la planta nativa autenticada (colectada en Zuazua N.L. en diciembre de 2005) empleando el proceso de extracción seleccionado.

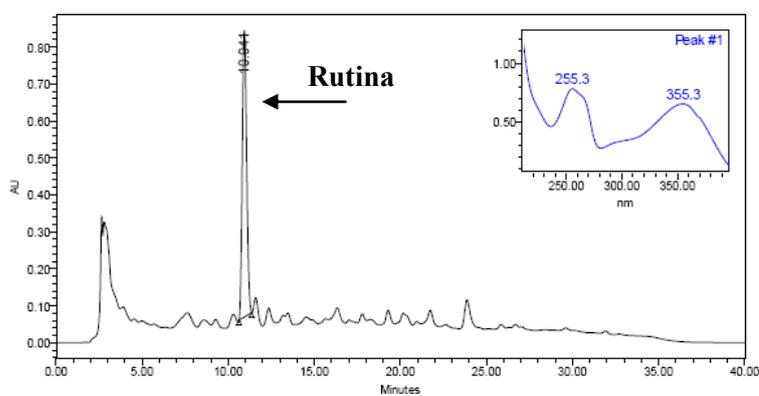


**Figura 3.2 Cromatograma del extracto de la planta nativa autenticada obtenido con el proceso de extracción 1 de agitación en vortex. (Sistema cromatográfico descrito en la sección 3.1).**

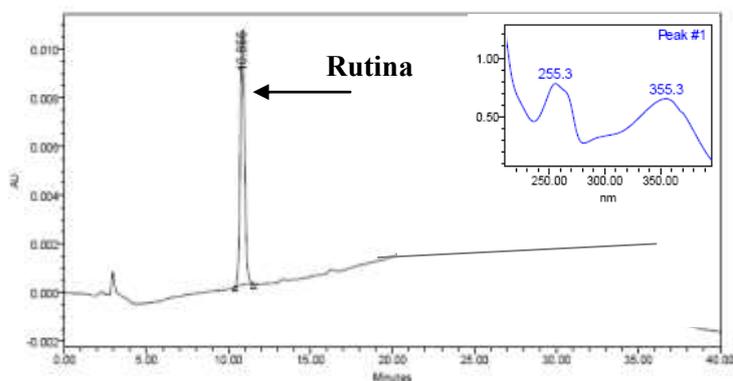
El cromatograma del extracto estandarizado presenta una señal a  $t_R$  10.9 minutos que no se encontró presente en los extractos de las plantas nativas. Esta señal se identificó como Rutina mediante comparación con el  $t_R$  y espectro UV-visible de un estándar obtenido comercialmente (Figura 3.3).



**Planta nativa autenticada**



**Extracto estandarizado**



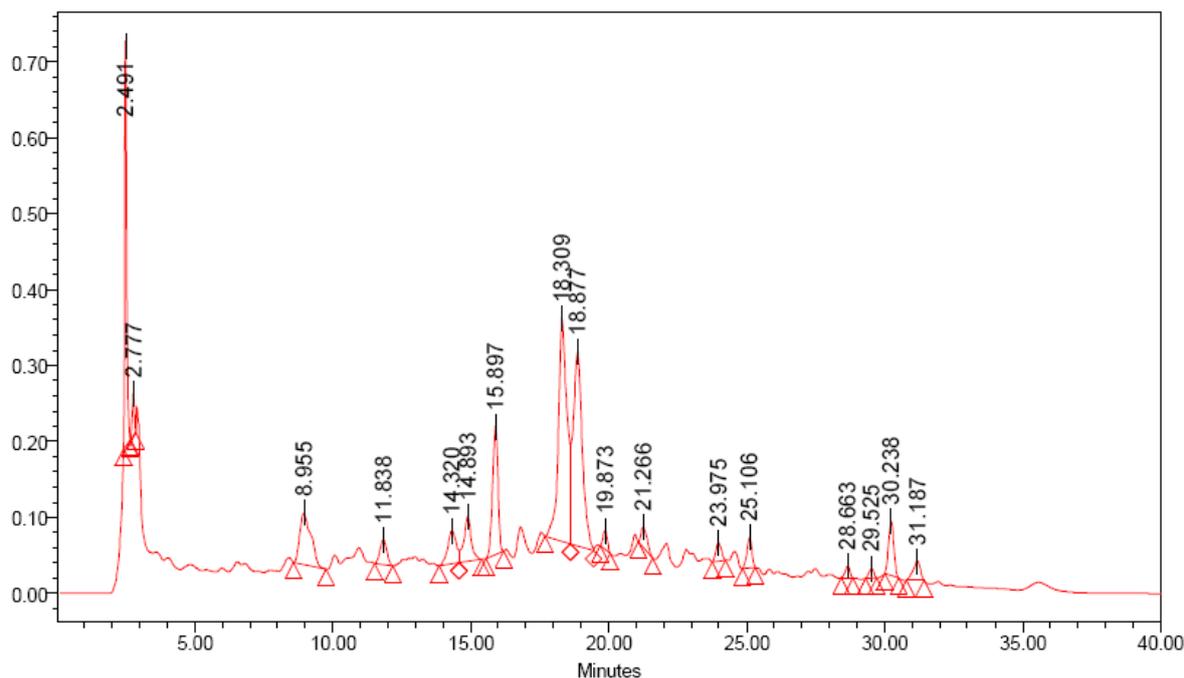
**Estándar de Rutina**

**Figura 3.3** Cromatograma de *Turnera diffusa* de planta nativa, extracto estandarizado y estándar de Rutina.

### 3.3 Validación del Método Cromatográfico

La validación del método se realizó empleando la planta nativa autenticada.

En la Figura 3.4 se presenta el cromatograma de *Turnera diffusa* con las 17 señales de mayor intensidad empleadas para la validación.



**Figura 3.4 Cromatograma del extracto de *Turnera diffusa* (planta nativa) con las 17 señales de mayor intensidad.**

#### 3.3.1 Precisión

##### 3.3.1.1 Precisión proceso cromatográfico

Los resultados del análisis de precisión intra e interdía se muestran en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4 Precisión intra e interdía del proceso cromatográfico.**

<b>Parámetro</b>	<b>INTRADÍA %</b>	<b>INTERDÍA %</b>
	<b>DER</b>	<b>DER</b>
<b>No. total de señales</b>	2.82	3.39
<b>t<sub>R</sub></b>	*0 – 1.42	*0.10 - 2.82
<b>%Área</b>	*0.84 – 8.02	*2.35 – 11.12
<b>Señal 2 (2.77 min)</b>	15.01	17.85
<b>% Altura</b>	*0.87 – 7.95	* 2.71 – 11.47
<b>Señal 2 (2.77 min)</b>	12.05	16.15
<b>n</b>	5	15

*\* Evaluación para 17 señales*

Las variaciones en el número total de señales así como en los tiempos de retención fueron menores del 4% tanto en la precisión intradía como interdía, mientras que para las áreas y alturas relativas las variaciones intra e interdía en ambos casos fueron menores al 12%. Para la señal designada con el número 2 los valores de precisión del área relativa intra e interdía fueron de 15.01 y 17.85 respectivamente y para la altura relativa los valores de %DSR intra e interdía fueron de 12.05 y 16.15.

### 3.3.1.2 Precisión del proceso de extracción

En la Tabla 3.5 se presentan los resultados de precisión del proceso de extracción.

**Tabla 3.5 Precisión del proceso de extracción.**

<b>Parámetro</b>	<b>%DER</b>
No. total de señales	8.14
tR	*0.40 - 3.33
% Área	*7.93 – 19.91
%Altura	*5.07 – 19.54
n	4

*\* Evaluación para 17 señales*

La % DER para el número total de señales fue de 8.14%, mientras para los tiempos de retención de las señales de mayor intensidad fue menor del 4%. En lo que respecta a las áreas y alturas relativas de estas mismas señales presentaron % DSR inferiores al 20% en ambos casos.

### 3.3.2 Robustez del sistema cromatográfico

En la Tabla 3.6 se presentan los resultados de robustez. Pequeños cambios en la concentración del TFA, así como en la temperatura de la columna, pero principalmente en la proporción del MeOH, causan cambios significativos en los tiempos de retención al nivel de significancia que se trabajó (95%).

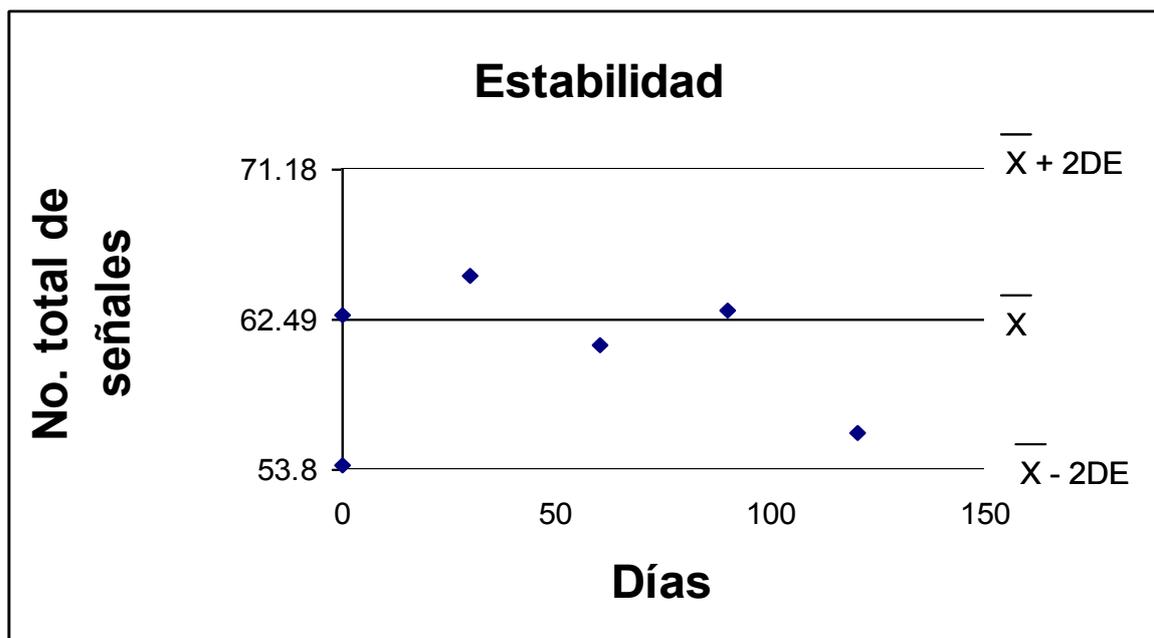
Tabla 3.6 Resultados de Robustez del sistema cromatográfico.

Señal	DE*2 <sup>1/2</sup> t <sub>R</sub>	V  Temp °C 28/32	V  % TFA 0.05/0.15	V  % MeOH 28/32
1	0	<u>*0</u>	<u>0</u>	0.01
2	0.06	<u>*0.06</u>	0.10	0.07
3	0.07	0.87	0.08	1.81
4	0.10	1.02	<u>*0.06</u>	1.97
5	0.11	1.02	<u>*0.03</u>	1.87
6	0.05	0.89	<u>*0.03</u>	1.89
7	0.03	0.37	<u>*0.01</u>	1.47
8	0.09	0.87	0.14	1.48
9	0.09	0.88	0.33	1.41
10	0.12	0.25	<u>*0.07</u>	1.32
11	0.08	0.51	0.46	1.09
12	0.12	<u>*0.02</u>	0.24	0.96
13	0.13	1.05	<u>*0.13</u>	0.69
14	0.07	0.63	0.18	0.33
15	0.04	0.37	0.17	0.26
16	0.04	0.70	0.14	0.14
17	0.09	0.78	0.16	0.20

\*No hay diferencia estadística significativa  $p= 0.05$

### 3.3.3 Estabilidad de la solución del extracto de la planta nativa de *Turnera diffusa*

El extracto de *Turnera diffusa* fue estable hasta el día 120 en función del número total de señales. Los resultados se presentan en el gráfico control (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Gráfico de estabilidad de la solución del extracto de *Turnera diffusa*. El extracto fue disuelto en 1 mL de DMSO.

Los resultados de estabilidad en función a las alturas relativas de las señales de mayor intensidad, mostraron que el extracto fue estable hasta el día 60 posterior a su preparación cuando se almacenó a 4 °C. En el día 90, cuatro de los componentes del extracto de *Turnera diffusa*, pierden estabilidad, mientras que para el día 120 un mayor número de ellos ya no son estables. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7 Resultados de estabilidad de la solución del extracto de la planta nativa de *Turnera diffusa*.**

Señal	Promedio % Altura	Promedio +2DE	Promedio -2DE	Día 30	Día 60	Día 90	Día 120
1	9.84	10.80	8.88	10.77	10.38	10.69	10.03
2	3.71	4.91	2.51	4.41	4.3	3.77	3.61
3	2.10	2.33	1.87	2.28	2.24	2.07	<b>*0.78</b>
4	1.27	1.45	1.08	1.4	1.37	1.28	1.31
5	1.40	1.73	1.06	1.71	1.7	1.70	1.68
6	1.59	1.80	1.39	1.76	1.98	1.79	1.66
7	5.69	6.36	5.02	6.18	5.31	5.26	5.33
8	9.73	11.59	7.88	10.11	9.16	<b>*7.87</b>	<b>*7.83</b>
9	5.08	5.44	4.72	5.05	4.91	4.75	<b>*4.52</b>
10	1.85	2.33	1.37	1.89	1.4	<b>*1.28</b>	<b>*1.28</b>
11	2.36	2.81	1.90	2.8	2.80	<b>*3.33</b>	<b>*3.59</b>
12	2.00	2.27	1.72	2.18	2.06	1.78	1.86
13	1.53	1.72	1.33	1.7	1.68	1.62	1.35
14	1.40	1.58	1.22	1.5	1.46	1.33	<b>*1.21</b>
15	1.23	1.38	1.07	1.3	1.1	<b>*0.84</b>	<b>*0.76</b>
16	4.13	4.95	3.31	4.23	3.57	4.93	4.66
17	1.91	2.06	1.75	1.89	1.76	1.86	<b>*2.12</b>

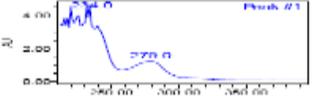
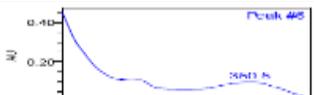
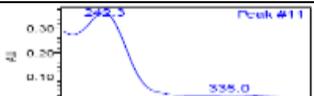
\* Componentes del extracto no estables.

### 3.4 Componentes comunes de *Turnera diffusa*

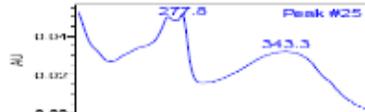
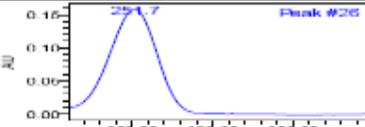
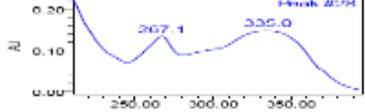
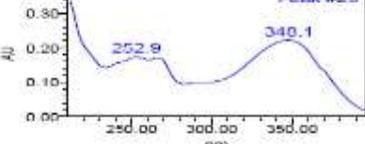
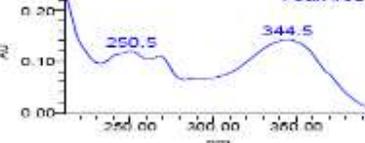
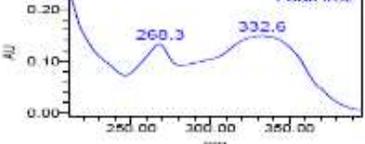
Se identificaron 14 señales cromatográficas comunes en los 19 especímenes de *Turnera diffusa*. Los datos de cada una de las señales se muestran en las Tablas 3.8 a y 3.8 b. Para cada una de las señales se muestra el tiempo de retención promedio, así como su espectro de absorción UV-visible y los datos del promedio e intervalo tanto de altura como área relativa.



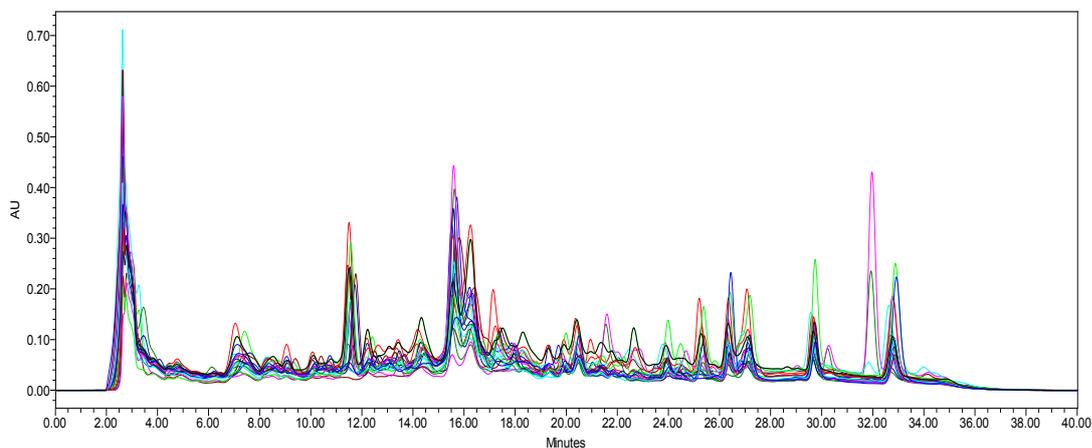
Tabla 3.8.a Señales cromatográficas comunes en los 19 extractos de *Turnera diffusa*.

Señal	t <sub>R</sub> (DE)	Intervalo t <sub>R</sub>	Espectro de absorción UV-visible	Promedio % Altura (DE)	Intervalo % Altura	Promedio % Área (DE)	Intervalo % Área
1	2.64 (0.04)	2.60 - 2.78		30.15 (11.01)	10.60 – 52.46	26.01 (14.86)	7.03 – 59.59
2	2.87 (0.19)	2.76 - 2.45		16.15 (5.41)	7.50 – 24.45	20.16 (7.87)	7.20 – 34.82
3	7.19 (0.19)	6.97 - 7.40		2.54 (1.54)	0.72 – 5.76	5.02 (2.87)	1.02 – 10.73
4	11.48 (0.09)	11.36 - 11.66		7.33 (4.37)	0.33 – 14.21	6.55 (4.18)	0.36 – 14.30
5	15.53 (0.08)	15.37 - 15.65		9.81 (4.98)	2.73 – 17.34	9.44 (5.18)	2.69 – 17.38
6	16.22 (0.09)	16.04 - 16.33		4.28 (3.21)	0.60 – 10.90	4.18 (3.09)	0.58 – 11.71
7	17.35 (0.66)	17.03 - 19.60		2.27 (1.90)	0.44 – 6.73	2.32 (2.10)	0.30 – 6.50

**Tabla 3.8.b Señales cromatográficas comunes en los 19 extractos de *Turnera diffusa*.**

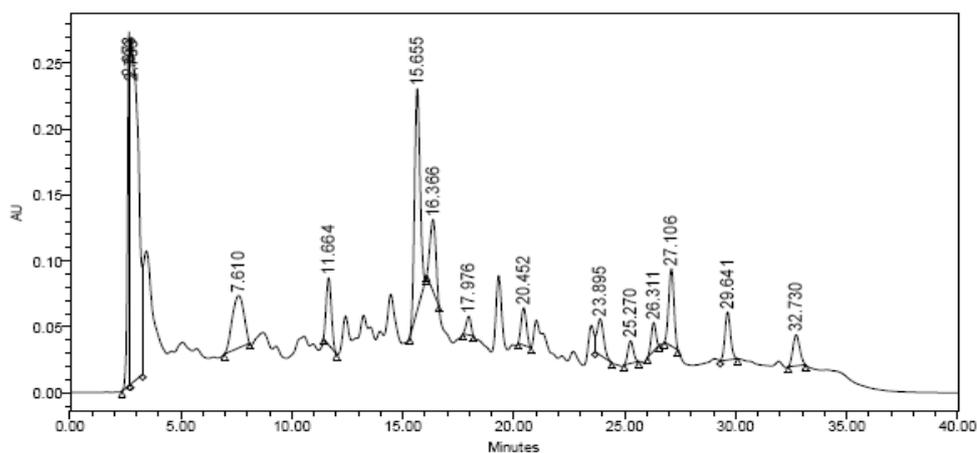
Señal	t <sub>R</sub> (DE)	Intervalo t <sub>R</sub>	Espectro de absorción UV- visible	Promedio % Altura (DE)	Intervalo %Altura	Promedio % Área (DE)	Intervalo % Área
8	20.36 (0.07)	20.22 -20.50		3.05 (1.01)	1.46 – 4.66	2.75 (0.97)	1.26 – 4.31
9	23.85 (0.07)	23.73 – 24.01		1.92 (1.64)	0.22 – 5.97	1.97 (1.95)	0.15 – 6.68
10	25.07 (0.28)	24.39 – 25.28		3.09 (2.18)	0.50 – 7.83	2.83 (1.98)	0.46 – 6.86
11	26.26 (0.06)	26.17 - 26.44		4.55 (2.91)	1.11 – 13.38	3.58 (2.57)	0.98 – 11.23
12	27.02 (0.06)	26.91 - 27.14		3.12 (1.92)	0.52 – 7.59	3.17 (2.20)	0.27 – 8.19
13	29.60 (0.05)	29.67 - 29.51		5.72 (2.33)	2.89 – 12.26	5.36 (2.22)	2.78 – 11.86
14	32.70 (0.07)	32.59 - 32.92		5.82 (3.92)	1.43 – 13.63	6.54 (4.47)	1.24 – 15.47

En la Figura 3.6 se muestra la sobreposición de los cromatogramas de las diecinueve muestras de colecta de *Turnera diffusa*.



**Figura 3.6** Cromatogramas sobrepuestos de las 19 muestras de colecta de *Damiana*, obtenidos con el método cromatográfico establecido.

Las 14 señales comunes en las diferentes muestras de *Turnera diffusa* se indican en el cromatograma de la Figura 3.7.



**Figura 3.7** Cromatograma promedio del extracto de *Turnera diffusa* con las 14 señales comunes.

### 3.5 Modelo quimiométrico

Los resultados obtenidos con los datos de áreas y alturas relativas (Apéndice 1 y 2) fueron muy semejantes, sin embargo resultó más preciso y reproducible trabajar con los datos de áreas. Los resultados mostrados en este apartado son en función a las áreas relativas.

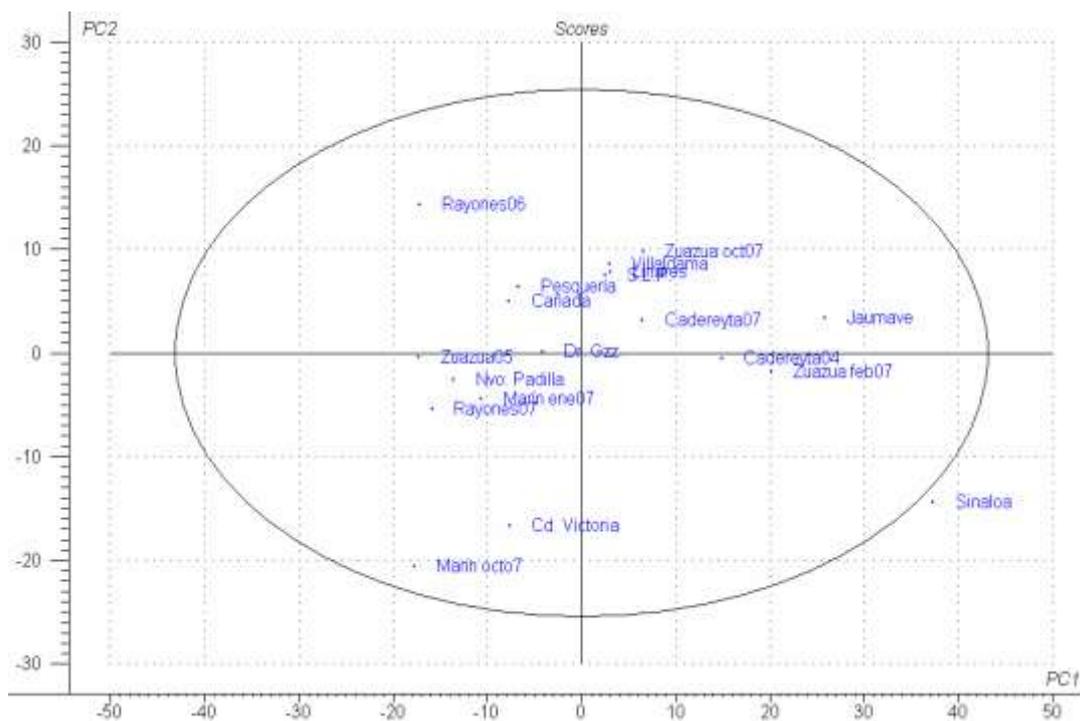
Se determinaron seis componentes principales (PC), número suficiente para explicar el 90% de la varianza. Este dato se muestra en la Figura 3.8.



**Figura 3.8** Gráfico de varianza explicada del PCA.

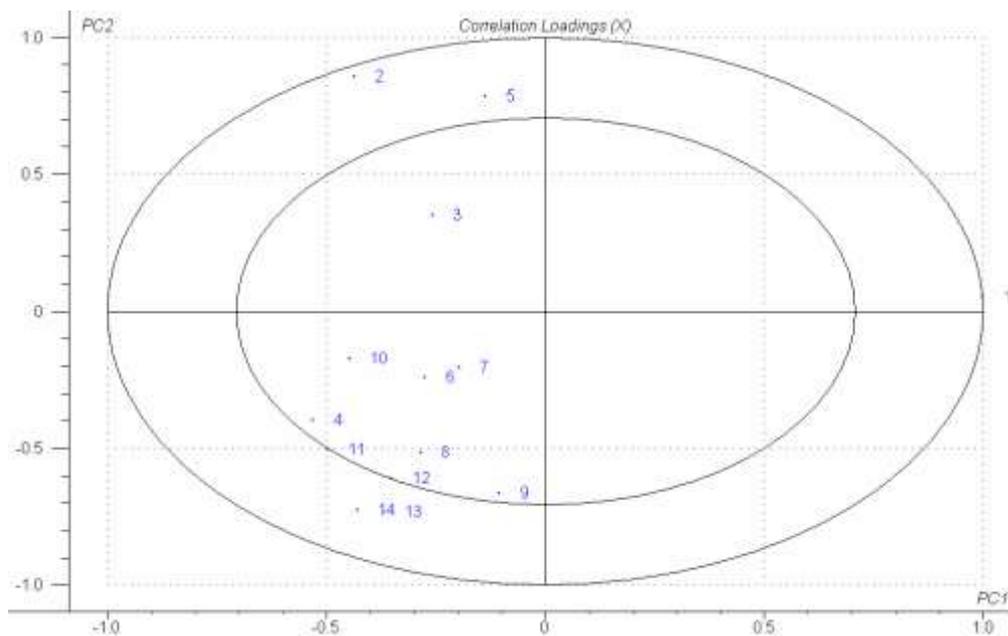
### 3.5.1 Análisis de PCA

En la Figura 3.9 se observa la distribución de las muestras con los valores de PC1 y PC2. En esta Figura se muestra que dieciocho de las diecinueve muestras caen dentro del modelo, excepto la muestra de Sinaloa.



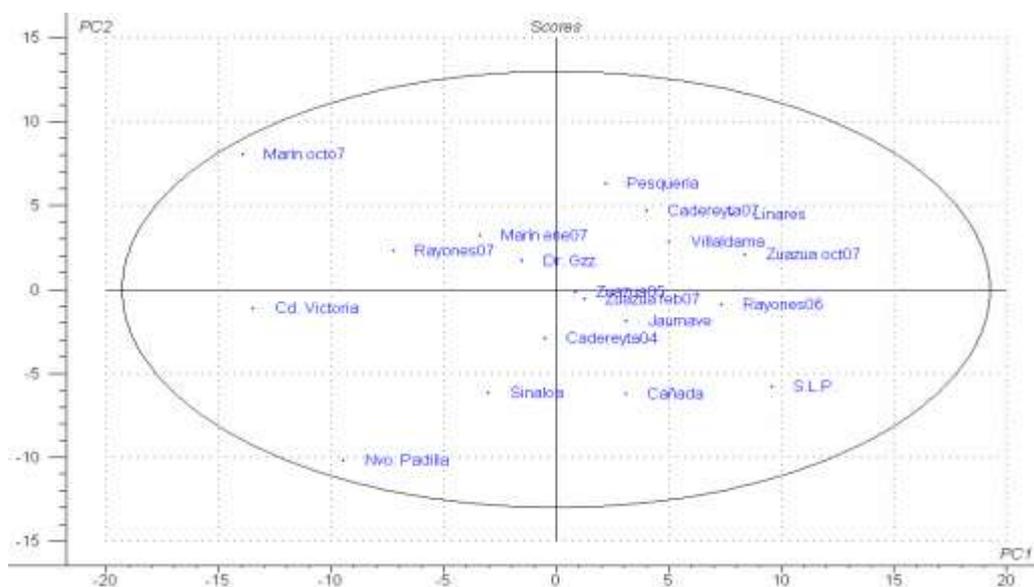
**Figura 3.9 Gráfico de doble dimensión del PCA de los cromatogramas de las diecinueve muestras.**

El gráfico de las variables (Figura 3.10) indica que las señales 1 y 2 son las que presentan la mayor variación.



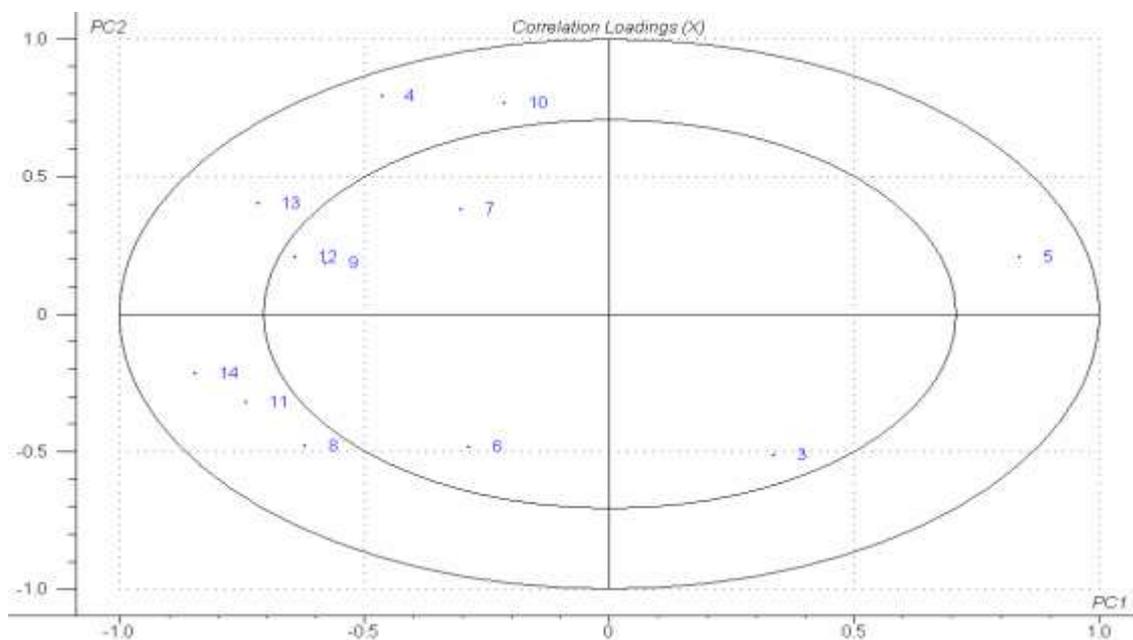
**Figura 3.10** Gráfico de doble dimensión de las variable ( 14 señales).

En la Figura 3.11 se presenta el gráfico de PCA construido con los mismos datos de % área sin las señales 1 y 2. Todas las muestras caen dentro del modelo.



**Figura 3.11** Gráfico de doble dimensión del PCA de los cromatogramas de las diecinueve muestras sin las señales 1 y 2.

En la Figura 3.12 se presenta el gráfico de doble dimensión de los datos vectoriales sin las señales 1 y 2, en el cual se observa que todas las señales tienen influencia.

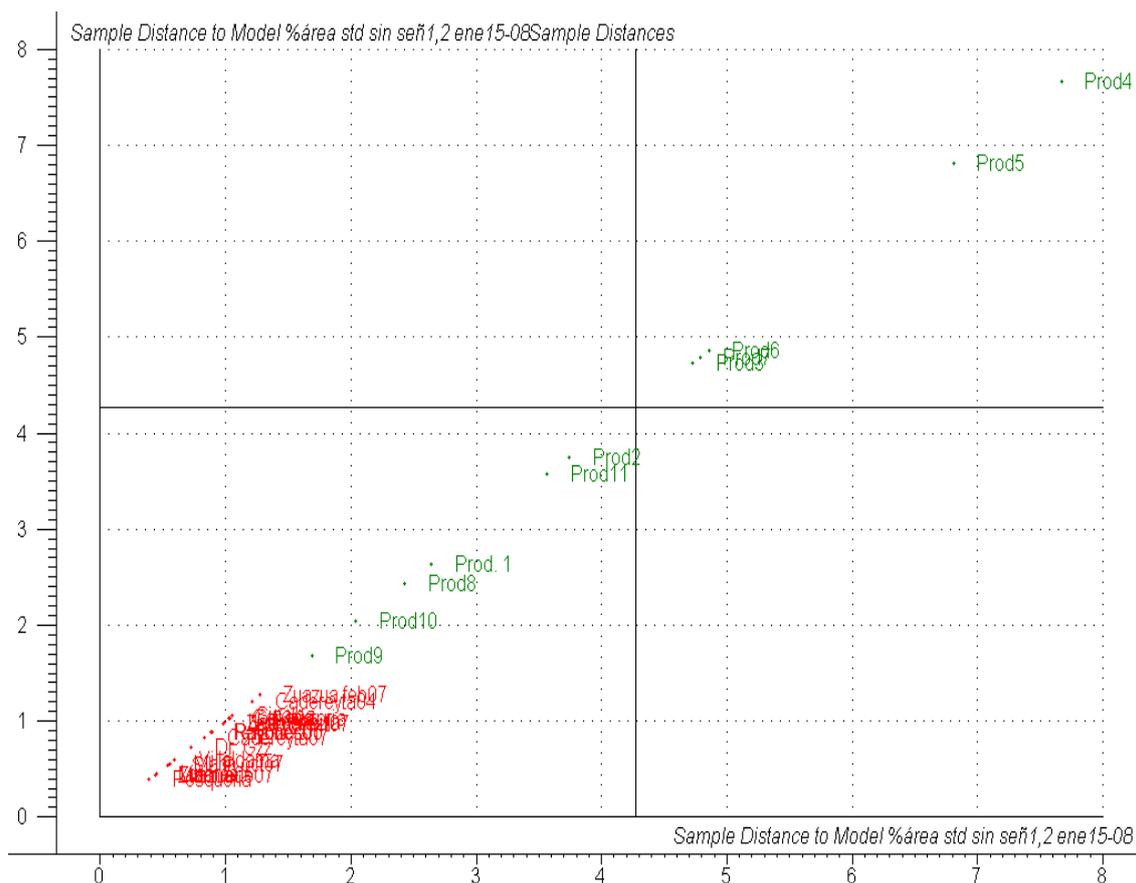


**Figura 3.12** Gráfico de doble dimensión de los datos vectoriales (señales) sin las señales 1 y 2.

### 3.6 Aplicación del Método Analítico Desarrollado

Con el modelo establecido cinco de los once productos comerciales (Tabla 2.3) fueron identificados como Damiana correspondiendo a los productos 1, 2, 8, 10 y 11.

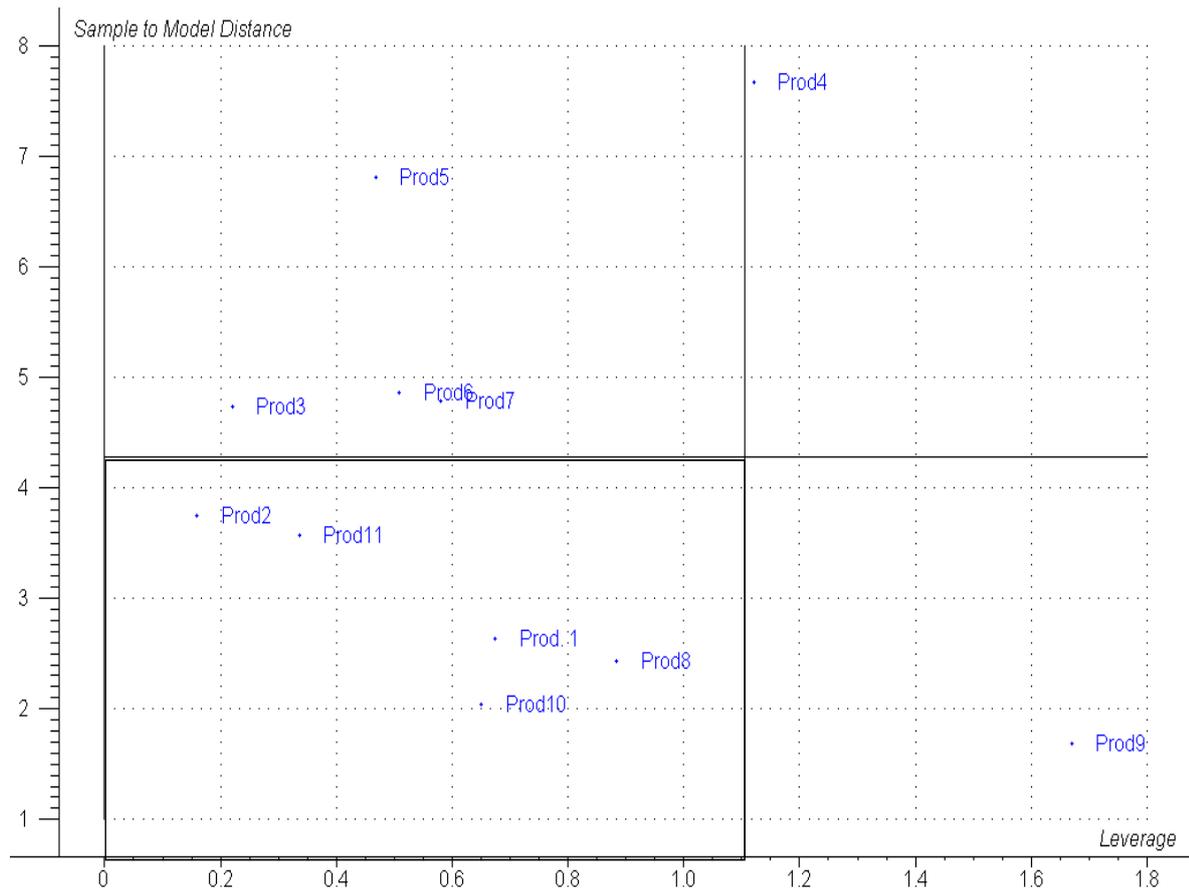
La Figura 3.13 representa la distancia de las muestras (productos) al modelo.



**Figura 3.13 Gráfico de distancia de las muestras al modelo.**

En la Figura 3.14 se presenta el gráfico de clasificación SIMCA de los productos comerciales analizados.

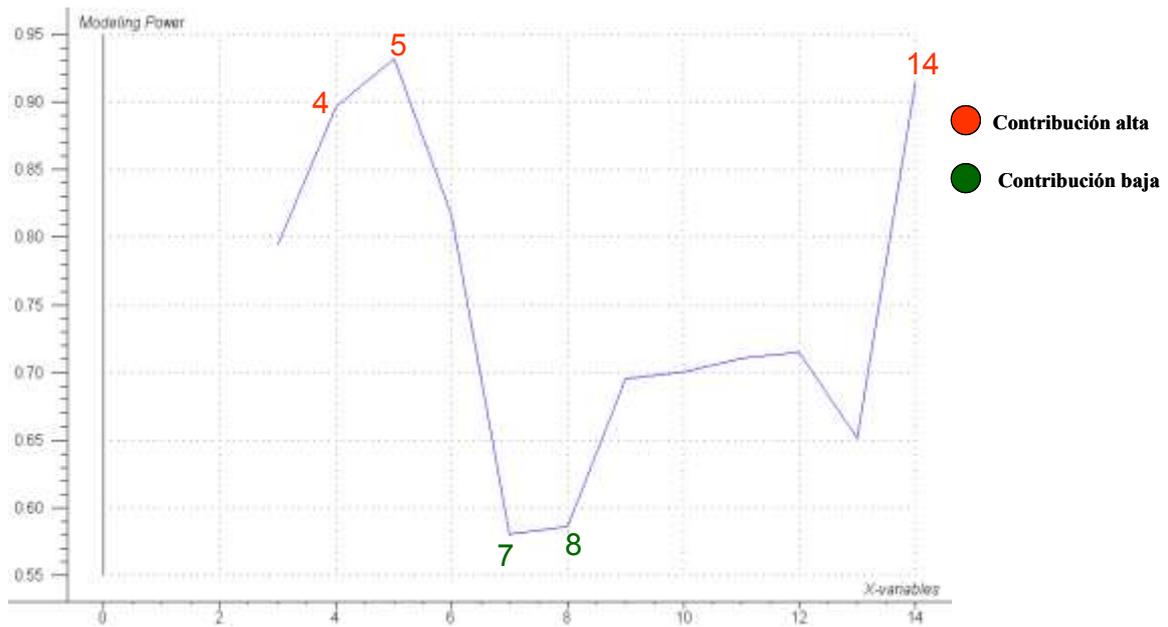
Los productos aceptados o reconocidos como *Turnera diffusa* (Damiana) aparecen proyectados en el cuadrante inferior izquierdo del gráfico de clasificación SIMCA con un nivel de significancia de 1% (Figura 3.14). Los límites de clasificación fueron una distancia de la muestra al modelo (eje vertical) de 4.3 y una varianza (eje horizontal) de 1.1. El resto de los productos comerciales fueron rechazados o no reconocidos por el modelo quimiométrico previamente establecido.



**Figura 3.14 Gráfico de clasificación SIMCA con un nivel de significancia de 1%.**

El producto nueve cuya distancia al modelo es pequeña (Figura 3.13) tiene una varianza muy grande (Figura 3.14) por lo que no es reconocido por el método SIMCA como *Turnera diffusa* (Tabla 3.9).

En la Figura 3.15 se presenta el gráfico que explica la contribución de las variables en el modelo. Las señales 4, 5 y 14 tuvieron la mayor contribución al modelo al aplicar el método de clasificación SIMCA mientras que las señales 7 y 8 presentaron una contribución baja.



**Figura 3.15** Gráfico que explica la contribución de la variable en el modelo.

En la Tabla 3.9 se marcan los productos comerciales que fueron aceptados o reconocidos como *Turnera diffusa* por el modelo. Estos resultados muestran que el 37 % de los productos comerciales analizados fueron aceptados como *Turnera diffusa*.

**Tabla 3.9 \*** Productos comerciales aceptados como *Turnera diffusa*.

<b>Producto</b>	<b>Lugar de compra</b>
1	<b>Monterrey *</b>
2	<b>Monterrey *</b>
3	Monterrey
4	Baja California.Sur
5	San Luis Potosí
6	Veracruz
7	Torreón
8	<b>Monterrey *</b>
9	Monterrey
10	<b>Monterrey *</b>
11	<b>Monterrey *</b>

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

En este trabajo se desarrolló y validó un método por CLAR-DAD para establecer el perfil cromatográfico de *Turnera diffusa*. CLAR se eligió por ser la técnica cromatográfica más empleada para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de las plantas medicinales, además que es muy versátil, y permite analizar compuestos tanto volátiles como no volátiles, polares, no polares y hasta iónicos. Se analizaron diecinueve muestras de plantas provenientes de diferentes regiones de la república mexicana y con los cromatogramas obtenidos y mediante el uso de la técnica quimiométrica de análisis de componente principal, se estableció un modelo quimiométrico, que posteriormente fue empleado para analizar la calidad de once productos comerciales utilizando para ello la técnica de análisis discriminante SIMCA.

#### 4.1 Condiciones Cromatográficas

Nuestro primer criterio para establecer las condiciones cromatográficas fue seleccionar los sistemas que proporcionaron el mayor número de picos y el menor tiempo de análisis, con la finalidad de tener dentro de lo posible la mayor parte de los componentes de la planta.

Para seleccionar la fase estacionaria nos basamos en reportes previos sobre la presencia de flavonoides en extractos de esta planta, los cuales son compuestos altamente polares (Piacente S. 2002), así como en lo reportado en la literatura para otras plantas (Liang Y. 2004).

Las columnas de fase inversa han sido las más utilizadas. Para este trabajo se decidió probar dos tipos de fase inversa  $C_8$  y  $C_{18}$ . Con la columna Metachem hypersil BDS  $C_8$  únicamente se detectaron 22 señales. Así que realizamos pruebas con dos columnas  $C_{18}$ . La columna Chromolith  $C_{18}$  (Merck 100 x 4.6 mm) y la columna AccQ· Tag  $C_{18}$  (Waters 150 x 3.9 mm x 4  $\mu$ m).

La columna Chromolith es una columna monolítica de estructura bimodal de poro con una combinación de macroporos y mesoporos. Los macroporos permiten un flujo rápido de la fase móvil a baja presión y los mesoporos forman una estructura fina de poros creando una gran área superficial uniforme sobre la cual tiene lugar la adsorción (Lubda D. 2001). Es ampliamente usada para el análisis de extractos de plantas. Aunque esta columna proporcionó buenos resultados al emplear agua y MeOH como fase móvil, la separación de las señales fue mejor con la columna AccQ· Tag  $C_{18}$ .

Al emplear la columna AccQ· Tag  $C_{18}$  como fase estacionaria y como fase móvil TFA 0.1% y MeOH se detectaron un mayor número de señales (49 señales cromatográficas) en un tiempo razonable de análisis (40 min). La columna AccQ· Tag presenta un bajo contenido de carbono entre 18 a 19% por lo que permite una buena retención de compuestos polares (Waters Inc 2003-2004).

Para tratar de optimizar las condiciones cromatográficas se empleó como fase acuosa TFA 0.1%, esto mejoró los resultados empleando la columna AccQ·Tag como fase estacionaria. Este cambio proporcionó en el sistema una mejoría en la simetría y separación de los picos y por lo tanto un aumento en el número de señales detectables. El TFA puede ser usado no solamente para controlar el pH de la fase móvil sino también para mejorar la selectividad. La presencia del TFA incrementa la cantidad de iones  $H^+$  en el medio que probablemente al interactuar con los grupos silanol favorecen la retención de los solutos en la columna ( Quattrochi 1992).

Se trabajó en el rango de longitud de onda de 200 a 400 nm. Se analizaron los cromatogramas a diferentes longitudes de onda tratando de tener el mayor número de señales con una buena respuesta al detector. Aún cuando los espectros de los componentes del extracto de *Turnera diffusa* presentan máximos diferentes, la longitud de onda de 254 nm fue la que proporcionó la mejor respuesta para la mayoría de los componentes del extracto de la planta.

## **4.2 Proceso de Extracción**

Comúnmente para la obtención de extractos de plantas medicinales se emplean mezclas hidroalcohólicas. Los procesos de extracción probados emplean estas mezclas en diferente proporción, con tiempos y sistemas de agitación diferentes (sección 2.4.3).

El proceso de extracción señalado como 1 fue el que proporcionó el mayor número de señales y la mejor precisión de los resultados (sección 3.2).

Si bien la recuperación del método 2 de agitación con ultrasonido fue mejor, no lo fue para el número total de señales ni para la precisión (Tabla 3.3). El proceso de extracción seleccionado fue el señalado como 1 que utilizó como solvente de extracción una mezcla EtOH: H<sub>2</sub>O (90:10 v/v) y agitación en vortex por tres minutos. Este sistema proporcionó el mayor número de señales y la mejor precisión, lo cual es indispensable en la evaluación de un perfil cromatográfico. Además la duración de este proceso es menor que el proceso de agitación con ultrasonido

Una desventaja que observamos en el método de agitación con ultrasonido fue que durante la etapa de agitación, que duró 30 min., fue difícil mantener el baño de agua a temperatura menor a los 50°C. A temperatura superior a este valor existe el riesgo latente que algunos de los componentes del extracto herbal se descompongan, ya que los glicósidos que se sabe, contiene la planta son termolábiles. Esta desventaja de la temperatura podría eliminarse probando con un baño de ultrasonido con temperatura controlada.

Para la recuperación del extracto luego de su evaporación fue necesario la adición de agua, ya que algunos de los componentes del extracto no se solubilizaban en MeOH.

Inicialmente se optimizaron las condiciones de separación con el extracto estandarizado, sin embargo al comparar el cromatograma obtenido del extracto de la planta nativa autenticada con el cromatograma del extracto estandarizado, observamos que este último presentaba una señal que predominaba y que no estaba presente en el extracto de la planta nativa (Figura 3.3). Por lo que se procedió nuevamente a la optimización de las condiciones cromatográficas empleando el extracto de la planta nativa autenticada.

Se probaron los mismos sistemas cromatográficos empleados con el extracto estandarizado. Los resultados fueron muy similares, siendo el mismo sistema previamente establecido (sección 3.1) el que proporcionó los mejores resultados con la planta nativa autenticada. Esta señal, presente solo en el extracto estandarizado, fue identificada como Rutina al comparar el  $t_R$  y el espectro, con los de su estándar inyectados bajo las mismas condiciones (Figura 3.3). También se corroboró mediante co-cromatografía, adicionando un volumen del estándar de Rutina a la solución del extracto.

La Rutina es un flavonoide muy común en vegetales superiores y es empleada como marcador en otras especies de plantas (Pastene E.R. 2001). Sin embargo hasta la fecha no hay reportes de su presencia en *Turnera diffusa* (Piacente 2002), lo cual fue corroborado en el presente trabajo. Es posible que fuera adicionada al extracto intencional y fraudulentamente para cumplir con el contenido de flavonoides declarado en el reporte de calidad del extracto estandarizado comercial de *Turnera diffusa*. De ahí la importancia de contar con metodología analítica estandarizada para llevar a cabo el control de calidad en los productos herbales.

#### **4.3 Validación del Método Cromatográfico**

La validación del método cromatográfico desarrollado se llevó a cabo empleando el extracto de la planta nativa autenticada obtenido a partir del proceso de extracción previamente establecido. Se realizó en función a las 17 señales de mayor intensidad. Se consideró este criterio, ya que como se mencionó con anterioridad, aún no se conocen ni los marcadores ni los componentes activos de la planta, de tal forma que no

se contó con material o estándares de referencia para *Turnera diffusa*. Cada una de las señales se identificó por su tiempo de retención y orden de elución y se corroboró siempre con el espectro de absorción UV-visible de cada señal. Se observó que en algunos casos, sobre todo cuando se trataba de las señales más pequeñas, existía interferencia del espectro de la fase móvil. Fue por tal motivo que se decidió realizar la corrección espectral sustrayendo al espectro de la señal del pico el espectro de la línea base. Este procedimiento mejoró notoriamente los espectros.

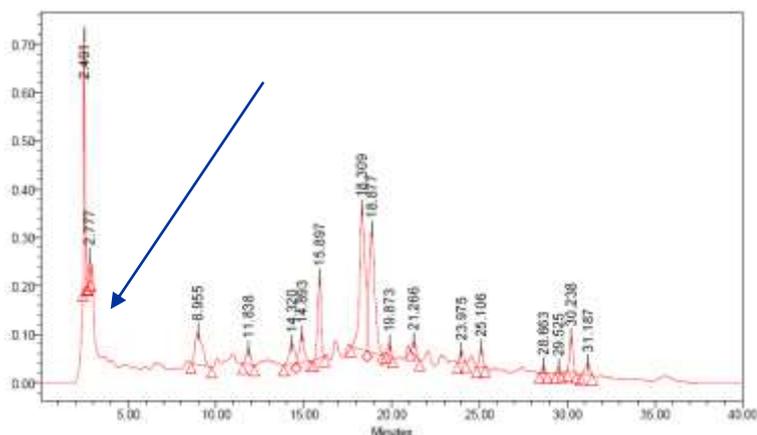
El análisis de perfiles cromatográficos es un procedimiento principalmente cualitativo, es por ello que los criterios de validación considerados para este trabajo fueron: precisión, robustez y estabilidad.

#### 4.3.1 Precisión

La precisión intradía se calculó realizando mediciones de la solución del extracto el mismo día, mientras que la precisión interdía se obtuvo con mediciones de la solución en diferentes días. Es de esperarse que las variaciones en el mismo día sean menores que en días diferentes, ya que en este caso se introducen nuevas variables. Los resultados de precisión obtenidos en este trabajo (Tabla 3.4) concuerdan con lo mencionado anteriormente.

Para 16 de las 17 señales cromatográficas analizadas, las variaciones obtenidas en todos los parámetros empleados para evaluar la precisión del sistema cromatográfico, estuvieron dentro de los valores aceptables por las guías de la FDA para la industria de drogas y productos botánicos (US Food and Drug Administration 2000), que establece que deben ser  $\leq$  al 15%. La señal señalada como 2 que fue la que presentó variaciones

superiores a este valor para los parámetros de áreas y alturas relativas, presentó también una pobre separación en los cromatogramas lo que explica las altas variaciones en estos parámetros (Figura 4.1). Las señales 1 y 2 fueron incluidas inicialmente en el análisis quimiométrico posterior, a pesar de que no se encontraban bien resueltas ya que eran señales que estaban en todas las muestras y de gran intensidad.



**Figura 4.1 Cromatograma de *Turnera diffusa* que muestra señal a tiempo de retención de 2.77 minutos de baja resolución.**

En el proceso de extracción, para todos los parámetros medidos, las variaciones obtenidas se encuentran por debajo del valor límite establecido por la FDA en su guía de validación (US Food and Drug Administration 2000) (Tabla 3.5).

#### 4.3.2 Robustez del sistema cromatográfico

Los resultados obtenidos para evaluar robustez demostraron que todas las variables cromatográficas modificadas afectan los tiempos de retención (Tabla 3.6). La variable que afecta más significativamente fue la proporción inicial del modificador orgánico (MeOH), ya que al analizar los  $t_R$  para la mayoría de las señales, los valores absolutos de las diferencias entre las condiciones modificadas (altas y bajas) respecto a la

condición optimizada, fueron mayores; además de acuerdo al criterio estadístico establecido ( $p = 0.05$ ) para todas las señales la diferencia fue significativa. La temperatura de la columna y la concentración del TFA también afectan pero en menor grado (Tabla 3.6).

#### 4.3.3 Estabilidad de la solución del extracto de *Turnera diffusa*

La estabilidad de la solución del extracto de *Turnera diffusa* en DMSO se evaluó tanto en función del número total de señales detectables (Figura 3.5) así como a las alturas relativas de las señales de mayor intensidad (Tabla 3.7), ya que para el caso de extractos obtenidos a partir de plantas no solo es importante que se mantenga el número de componentes, sino también la proporción de los mismos. Considerando lo anterior establecimos que nuestro extracto fue estable hasta 60 días, tiempo después del cual algunos de los componentes del extracto se encuentran fuera de los límites de estabilidad que establecimos ( $\pm 2$  DE).

#### 4.4 Componentes comunes de *Turnera diffusa*

Las colectas de *Turnera diffusa* se llevaron a cabo a lo largo de un periodo de 3 años. La mayor parte de ellas se realizó en época de otoño o invierno, ya que se reporta que es la temporada en que la planta es más activa (Ferrara M. comunicación personal).

Para el caso de la muestra de colecta de Sinaloa fue necesario desde un principio trabajar con una solución del extracto más concentrada, ya que algunos de los componentes estaban presentes en muy baja concentración y las señales se confundían con el ruido del equipo. Sin embargo el perfil cromatográfico en general se mantenía.

La identificación de las señales comunes de mayor intensidad a los diferentes especímenes de la planta se realizó en función al  $t_R$  y en todos los casos se corroboró con el espectro de absorción UV- visible de cada señal. Esta corroboración fue imprescindible ya que en algunos casos se presentaron pequeños cambios en los  $t_R$  de las señales. Estas variaciones en los  $t_R$  pueden ser causados por fluctuaciones no controladas en la temperatura y presión, o por efectos de la matriz o degradación de la fase estacionaria (Pierce K. 2005).

Además se observó a veces, cambios en el orden de elución, de las señales 13 (29.60 min) y 14 (32.40 min), no obstante siempre fue posible llevar a cabo una adecuada identificación de las mismas ya que se trataba de señales bien resueltas cuyos espectros UV-visible fueron muy distintos. Este reportado que efectos como desactivación o saturación de la columna, así como interacciones irreversibles de la muestra con la fase estacionaria pueden conducir a cambios en el orden de elución (Dolan J. W. 1989).

Los cambios en los tiempos de retención por pequeñas variaciones en estas variables, no nos permitió, en el análisis quimiométrico posterior, trabajar con los datos completos de los cromatogramas de las diferentes muestras de colecta de *Turnera diffusa*.

Catorce de las diecisiete señales de mayor intensidad del extracto de la planta nativa de *Turnera diffusa* empleadas durante el desarrollo y validación del método cromatográfico, fueron las señales comunes a diferentes especímenes de la planta.

En todos los casos las señales 1 (2.64 min) y 2 (2.87 min) fueron las más intensas. La muestra de colecta de Sinaloa fue la que presentó el valor más alto para ambas señales. Como se señaló anteriormente estas señales fueron las que presentaron mayor problema para resolverse, ya que eluyen a  $t_R$  cercanos al tiempo muerto, probablemente se trate de compuestos altamente polares.

En los cromatogramas obtenidos de las dos colectas del estado de S.L.P se observaron dos señales de intensidad media que no se presentaron en ningún otro cromatograma de las diferentes colectas de *Turnera diffusa*. Estas señales se presentaron a  $t_R$  de 12 y 14 minutos y se corroboraron con su espectro UV-visible. De la misma manera en las muestras de colecta de dos regiones del estado de Tamaulipas, Jaumave y Cd. Victoria, se observaron dos señales que tampoco se presentaron en el resto de las muestras de colecta de *Turnera diffusa*. Ambas señales se corroboraron con los espectros UV-visible en los cromatogramas. Las señales eluyeron a  $t_R$  alrededor de 21 y 31 minutos. La señal que se presentó a los 31 minutos fue la de mayor intensidad en los dos cromatogramas. En ambos casos estas señales pudieran ser empleadas en un futuro como criterio de identificación de origen de colecta de la planta.

#### 4.5 Modelo Quimiométrico

Inicialmente nuestro objetivo era trabajar con los datos completos de los cromatogramas, sin embargo esto no fue posible, debido a los pequeños cambios que se presentaban en los tiempos de retención de las señales por la variabilidad analítica, lo cual ya se discutió con anterioridad. Debido a estas variaciones al realizar el análisis quimiométrico con los datos crudos de los cromatogramas, no fue posible analizar

correlaciones. Sofisticados modelos matemáticos han sido desarrollados para la alineación de cromatogramas tratando de dar solución a este problema (Bo-Yan L. 2004, Gong Fan 2003). Desafortunadamente estos modelos tienen aplicabilidad limitada. Esto lo confirmamos al intentar alinear nuestros cromatogramas aplicando estos modelos matemáticos. Se realizaron varios intentos pero no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por tal motivo decidimos trabajar con los datos extraídos de las áreas y alturas relativas de las 14 señales comunes de los diferentes especímenes de la planta.

Recientemente se publicó un artículo en el que se reporta el análisis del perfil cromatográfico para la evaluación de productos de *Ginkgo biloba* empleando técnicas quimiométricas, en donde los autores emplean también los datos extraídos de los cromatogramas y ponen de manifiesto la dificultad de trabajar con los datos completos de los cromatogramas por la variabilidad analítica en los tiempos de retención (Chen P 2007). Yongnian Ni en enero del 2008 reportó también el empleo de los datos extraídos para el análisis quimiométrico del perfil cromatográfico de *Eucomia Bark* (Yongnian N. 2008).

En primer lugar trabajamos tanto con los datos de altura como de área relativa de las señales comunes. Con ambos grupos de datos los resultados fueron muy similares, pero resultó más consistente el resultado con los datos de área relativa, por lo que se decidió trabajar con estos datos.

Todos los datos se estandarizaron antes de realizar el análisis quimiométrico por PCA a media cero y varianza unidad, tal como lo recomienda Miller y Miller. Si las variables

no se estandarizan y una variable tiene una varianza mucho más grande, entonces esta variable será la que controle el primer componente principal (Miller J. 2002).

El número de componentes que se aplica al modelo debe explicar el 90% de la varianza, es decir el 90% de la información original. Para nuestro modelo, el número de componentes que cumplió este criterio fue seis.

El objetivo principal en el establecimiento del modelo quimiométrico, fue construir un modelo incluyente y no excluyente, que nos permita tener un número suficiente de muestras de colecta de *Turnera diffusa* representativas de las diferentes regiones del país. Fue por ello que en la construcción del modelo solamente se incluyeron las señales comunes a todas las muestras.

En el establecimiento del modelo quimiométrico los resultados obtenidos del PCA mostraron que las señales 1 y 2 que presentaron las varianzas más grandes (Figura 3.10), fueron también las que causaron diferencias entre las muestras de colecta. Para el caso específico de la muestra de Sinaloa, al comparar el gráfico de scores (Figura 3.9) con el gráfico de loading (Figura 3.10) observamos que en el PC1 es la variable 1 la que mayor influencia tiene sobre la muestra y es la que causa que se ubique fuera del modelo. Además previamente se detectó que las intensidades de las señales 1 y 2 en la muestra de Sinaloa se observaron más altas que para el resto de las muestras de colecta.

Cuando se aplicó el análisis de PCA sin estas señales, se observó que todas las colectas ajustan al modelo y que además se disminuye la dispersión entre las muestras. Al analizar el gráfico de doble dimensión de los datos vectoriales sin las señales 1 y 2 se

observa que todas las variables tienen una influencia similar en el modelo, ya que muestran una distribución proporcional (Figura 3.12).

Con el análisis quimiométrico por PCA fue posible observar algunas correlaciones entre las muestras en relación a la fecha de colecta y estado o región de colecta. Muestras que se colectaron en el mismo año se proyectaban muy cercanas. Las muestras de las dos regiones de S.L.P. (S.L.P. y Cañada del Lobo) aparecen proyectadas en el mismo cuadrante en el gráfico de scores (Figura 3.11) y lo mismo sucede para dos de las tres regiones de Tamaulipas (Jaumave y Nuevo Padilla).

#### **4.6 Aplicación del Método Analítico Desarrollado**

Todos los productos comerciales de *Turnera diffusa* que se adquirieron fueron en presentación de hojas y tallos para preparar té. La mayoría de ellos no presentaban etiqueta y los que la presentaban solo mencionaban el nombre común y científico de la planta, no indicaban fecha de caducidad ni lugar de origen de la planta.

En este trabajo utilizamos el método discriminante SIMCA, ya que es un método que nos permite discriminar entre la pertenencia o no a una clase dada, para lo cual establece dos límites de clasificación: uno dado por la distancia de la muestra al modelo central previamente establecido (eje vertical) y el otro por la varianza (eje horizontal). En nuestro caso estos límites correspondieron a una distancia de la muestra al modelo de 4.3 y una varianza de 1.1 con un nivel de significancia de 1%.

Los resultados mostraron que únicamente 5 de los 11 productos analizados fueron reconocidos o aceptados como *Turnera diffusa* de acuerdo con nuestro modelo, lo que representó un 37%. El producto nueve a pesar de que presentó una distancia pequeña al modelo, no fue reconocida como *Turnera diffusa* ya que mostró una varianza muy grande. Llama la atención que los productos que ajustaron al modelo fueron algunos de los adquiridos en Monterrey. Dado que nuestro modelo fue mayormente construido con plantas nativas del estado de Nuevo León, consideramos necesario en un futuro incrementar el número de plantas nativas de otros estados de la República Mexicana y verificar el modelo construido e incrementar con ello la confiabilidad del mismo.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 Conclusiones

1. Se desarrolló y validó un método cromatográfico por CLAR-DAD para el análisis de extractos de *Turnera diffusa*.
2. Se estableció el perfil cromatográfico de *Turnera diffusa* empleando técnicas quimiométricas.
3. Se estableció un modelo de análisis quimiométrico por PCA para el análisis de calidad de productos comerciales de *Turnera diffusa*.
4. Se aplicó el método cromatográfico y de análisis quimiométrico (PCA/SIMCA) a muestras comerciales encontrando que solo el 37 % de ellas fueron aceptadas como *Turnera diffusa* por el modelo desarrollado.

5. Se cuenta con un método cromatográfico y de análisis quimiométrico como herramienta de control de calidad para el análisis de productos comerciales de *Turnera diffusa*.

## 5.2 Perspectivas

1. Incrementar el número de muestras de *Turnera diffusa* de otros estados del país y de diferentes épocas de colecta, para evaluar diferencias y similitudes entre las mismas.
2. Continuar con el desarrollo de metodología analítica para el control de calidad de otras plantas que crecen en nuestro territorio y que son de alto consumo por la población.
3. Incluir en el modelo pruebas de actividad biológica para evaluar la posible correlación con el perfil cromatográfico de la planta.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adame J., Adame H. Plantas Curativas del Noreste Mexicano, 1ª edición. Ed Castillo. México, (2000).
2. Alarcón A., Roman R., Pérez G., Aguilar C., Contreras W., Flores S. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. J. of Ethnopharmacology, 61 (2), 101-110.
3. Alarcón A., Roman R., Flores S., García A. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. Phytother. Res. 16 (4) (2002), 383-386.
4. Alcaraz M., Delgado R., Real C. Análisis of essential oils from wild and micropropagated plants of Damiana (*Turnera diffusa*). Fitoterapia, 75 (2004), 696-701.
5. Anderson T., Fogh J.. Weight loss and delayed gastric emptying following a south American herbal preparation in overweight patients. J. Hum. Nutr. Dietet, 14 (2001), 243-250.
6. Arletti R., Benelli A., Cavazzuti E., Scarpetta G., Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual-behavior of male rats. Psychopharmacology, 143 (1) (1999) 13-19.
7. Bilia A., Bergonzi M., Maíz G., Francesco V.. NMR spectroscopy: a useful tool for characterization of plant extracts, the case of supercritical CO<sub>2</sub> arnica extract. J. Pharm. Biomed. Anal., 30 (2) (2002), 321-330.
8. Blumenthal, M. The Complete German Commission E Monographs. Therapeutic Guide to Herbal Medicines. 1ª edición. Ed American Botanical Council. Texas, (1998).

9. Cañigüeral S., Vila R. y Wichtl M. Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para Infusión y Tisana, 1ª edición. Ed. OEMF internacional srl. Barcelona, (1998).
10. Cañigüeral S. La fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? Revista de Fitoterapia. Vol. 2 (2) (2002), 101-121.
11. Chen P., Ozcan M., Harnly J.. Chromatographic fingerprint analysis for evaluation of Ginkgo biloba products. Anal Bioanal Chem, 389 (2007), 251-261.
12. Chromatography Columns and Supplies Catalog. Waters 2003-2004.
13. Cartaya O. Reseña bibliográfica. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales, 22 (2) (2001), 5-14.
14. Dolan J. W. and Snyder L.R. Troubleshooting L C systems. Humana Press Clifton, New Jersey, 1989.
15. Duke J. A. Promising phytomedicinals. Advances in new crops. Timber Press, (1990), 491-498.
16. Eskinazi D. Botanical Medicine: efficacy, quality assurance, and regulation. Mary Ann Liebert, Inc publishers, 1999.
17. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. OMS Ginebra, 2002-2005.
18. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, SSA. México (2001).
19. Gan F., Ye R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine. Journal of Chromatography A, 1104 (2006), 100-1005.
20. Gong Fan, Liang Yi-Z., Xu Quing-Song. Evaluation of separation quality in two-dimensional hyphenated chromatography. Analytica Chimica Acta, 450 (1-2) (2001), 99-114.

21. Gong Fan, Liang Yi-Zeng, Xie Pei-Shan. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *Journal of Chromatography A*, 1002 (2003), 25-40.
22. Gong Fan, Liang Yi-Zeng, Fung Ying-Sing. Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, 1029 (2004), 173-183.
23. Gong Fan, Wang Bo-Tang, Chau Foo-Tim. Data preprocessing for chromatographic fingerprint of herbal medicine with chemometric approaches. *Analytical Letters*, 38 (2005), 2475-2492.
24. Jaki B., Sticher O., Veit M., Frohlich R. and Pauli G. Evaluation of glucoiberin reference material from *Iberis amara* by spectroscopic fingerprinting. *J of Nat Prod.*, 65 (2002), 517-522.
25. Ji Yi-Bing, Xu Qing-Song, Hu Yu-Zhu. Development, optimization and validation of fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1066 (2005), 97-104.
26. Knorr F. J., Thorsheim H.R. and Harris J.M. Multichannel detection and numerical resolution of overlapping chromatographic peaks. *Anal. Chem.*, 53 (1981), 821-825.
27. Kong Jin-Ming, Gon Ngoh-Khang, Chia Lian-Sai. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacological Sinica*, 24 (1) (2003), 7-21.
28. Kumar S., Sharma A.. Anti-anxiety activity studies on homeopathic formulations of *Turnera aphrodisiaca* ward. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (1) (2005), 117-119.
29. Liang Yi-Zeng, Xie Peishan, Chan K.. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812 (2004), 53-70.

30. Li Bo-Yan, Hu Yun, Liang Yi-Zeng, Huang Lan-Fang. Spectral corrective chromatography and its application to análisis of chromatographic fingerprints of herbal medicines. *J. Sep. Sci.*, 27 (2004), 581-588.
31. López de A., López M., Amador H.. Metodos de calibración multivariante. *Revista de la Sociedad Química de México*, 41 (1), (1996), 34-44.
32. Manne R., Grande Bjorn-Vidar. Resolution of two-way data from hyphenated chromatography by jeans of elementary matriz transformations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 50 (2000), 35-46.
33. Mathews H., Lucier G.; Fischer K.. Medicinal herb in the United States: research needs. *Environmental Health Perspectivas*, 107 (10) (1999), 773-778.
34. Meng J., Sze K., Leung Y., Jiang Z. Establishment of HPLC-DAD-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 53 (12) (2005), 1604-1609.
35. Miller J., Miller J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ª edición. Editorial Pearson, Madrid (2002) 221-243.
36. Ni Y., Peng Y., Kokot S.. Fingerprint análisis of *Eucommia* by LC-DAD and LC-MS with the aid of chemometrics. *Chromatographia*, (2008).
37. Ong E. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Journal of Chromatography B*, 812 (2004), 23-33.
38. Pastene E., Wilkomirsky T., Bocaz G., Havel J., Peric I. Uso de espectroscopia de RMN y MALDI-TOF MS en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes provenientes de la planta medicinal chilena *Cheilanthes glauca* (Cav.) Mett. *Boletín Soc. Chil. Química*, 46 (4) (2001), 447-457.

39. Pauli G., Jaki B. and Lankin D.. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products*, 68 (2005), 133-149.
40. Pereira G., Gaudillere J., Van Leeuwen C. Hilbert G., Laviolle O., Maucourt M..  $^1\text{H}$  NMR and chemometrics to characterize mature grape berries in four wine-growing areas in Bordeaux, France. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005), 6382-6389.
41. Piacente S., Camargo E., Zampelli A., Gracioso J., Souza A. Flavonoids and Arbutin from *Turnera diffusa*. *Z. Naturforsch*, 57 (11-12) (2002), 983-985.
42. Pierce K., Wood L., Wrigth B. and Synovec R. A comprehensive Two-Dimensional retention time alignment Algorithm to enhance chemometric analysis of comprehensive two-dimensional separation data. *Anal Chem*, 77 (23) (2005), 7735-7743.
43. Quattrochi O., Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica, (1992), 108-114.
44. Ramírez D., Cenicerros A., Salazar A., Salazar C. and Waksman de Torres. Evaluation of Thin-Layer Chromatography methods for quality control of commercial products containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Pasiflora incarnate* and *Tila occidentalis*. *J. of AOAC International*, 90 (4), (2007), 920-924.
45. Ruxton C. Efficacy of Zotrim: a herbal weight loss preparation. *Nutrition and Food Science*, 34 (1) (2004), 25-28.
46. Salazar A., Garza J., Cenicerros A., Caballero Q., Ramírez D., Alcorta G., Salazar C., Rivas G. y Waksman de T. El consumo de productos herbolarios en Nuevo León. *Medicina Universitaria*, 6 (25), (2004), 248-254.

47. Salazar A., Pozos S., Cordero P., Pérez M., Salinas C. y Waksman T. Determination of the antioxidant activity of six plants from Northeast México. *Pharmaceutical Biology*, (2008). En prensa.
48. Schaneberg B., Crockett S., Bedir E.. The rol of chemical fingerprinting: application to Ephedra. *Phytochemistry*, 62 (2003), 911-918.
49. Sun Yi, Guo T., Sui Y., Li F. Fingerprint analysis of *Flos carthami* by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 792 (2003), 147-152.
50. The Index Merck. An Encyclopedia of Chemicals, drugs and biologicals. Merck Co. & Co. Thirteen edition. 2001.
51. U S Food and Drug Adminnistration. FDA Guidance for Industry-Botanical Drug Products (Draft Guidance), (200), New York.
52. Wang L.C., Cao Y.H., Xing X.P.. Fingerprint studies of *Radix scutellariae* by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 62 (2005), 283-288.
53. Ward J., Harris C., Lewis J.. Assessment of <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariable analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Pytochemistry*, 62 (2003), 949-957.
54. WHO. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Tradicional Medicines. (200), Geneva.
55. World Healt Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 1998.
56. Yang Li-Wei, Wu Ding-hong, Tang X.. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1070 (2005), 35-42.

57. Zhang J., Ke Y.. Fingerprint analysis of *Flos carthami* and safflower yellow pigments by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 38, (2005), 981-995.
58. Zhang X., Cui Z., Wang D.. High performance liquid chromatographic fingerprint evaluation of the quinolizidine alkaloids from commercial *Radix sophorae flavescentis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5 (3), (2003) 171-182.
59. Zaho J., Pawar R., Ali Z. and Khan I. Phytochemical Investigation of *Turnera diffusa*. *J. of Natural Products*, 79 (2007), 289-292.

**Apéndice 1 Datos de % áreas estandarizadas para las 14 señales comunes.**

Señal	Cadereyta04	Zuazua05	Rayones06	Marín ene07	Zuazua feb07	Marín octo7
1	38.30146808	7.36409813	8.82904852	13.24996313	43.30146807	5.2847962
2	15.98008251	17.9334898	32.2615136	15.97318927	11.98012803	4.64979291
3	2.816042425	7.05712676	6.06423717	6.774116666	3.793922288	-0.73013924
4	2.824108971	9.50112641	2.82410897	8.235617018	4.565579537	12.7411289
5	1.633379823	10.9490951	13.8855542	3.046112297	4.790094585	3.27159053
6	4.896224391	10.360759	3.99045658	2.42808348	0.564884924	0.31249512
7	5.35356703	-1.1031678	0.02271917	5.405096816	0.877748028	3.85254691
8	0.847856873	0.60173339	-0.30642202	1.299134405	-0.307295607	0.27171163
9	-0.134983435	0.87830691	2.08946749	0.424120717	0.903799222	5.35828897
10	0.012231933	1.74995767	0.14710592	5.443274464	0.648425518	5.22140258
11	0.392992807	2.41730737	0.30742818	1.405990194	1.307691803	4.11914987
12	0.696233121	1.07962947	3.76585242	6.607122846	0.670401223	6.75546657
13	0.377258904	2.54013934	1.00355899	3.110711778	0.528212227	9.45466349
14	1.724722726	4.79893774	1.24391006	2.726006153	2.503479384	13.6633239

Señal	Dr. Gzz.	Linares	Cadereyta07	Pesquería	Zuazua oct 07	Rayones07
1	20.56903859	27.610592	30.74191106	18.91484264	31.15985102	9.318655609
2	19.65824464	20.644699	17.60774287	25.1814795	22.54484997	18.42446761
3	2.889361343	2.3618473	2.33784668	-0.164147935	1.128351791	1.591847729
4	5.68118087	5.9990344	7.073303422	8.438884438	3.179679648	11.35996432
5	6.63979218	14.737369	10.6458503	10.8297123	14.83391987	4.081874691
6	0.844646083	-0.2940479	-0.658424492	0.134060827	-0.214361615	8.24157345
7	2.699723732	1.989674	0.598683832	0.295522191	-0.265134793	2.595209202
8	-0.353881789	-1.1920655	-1.502025376	-1.23782866	-1.563835952	-0.114377997
9	-0.059760196	-0.4149257	-0.332926668	1.614777086	1.832197539	-0.535138359
10	3.788534544	1.6480462	2.409010119	2.383716604	0.479731715	3.150376692
11	2.94948069	0.3231824	0.805481616	0.8224118	0.255627637	4.253113994
12	0.279739947	-1.0267428	0.662705096	1.956196095	0.563674629	2.602192277
13	4.311988661	2.233013	3.647909358	4.114287942	0.500649473	3.169167809
14	6.230449939	1.5088637	2.09147141	2.844624411	1.693338308	7.989612216

Señal	Villaldama	Cd. Victoria	Jaumave	Nvo. Padilla	S.L.P.	Cañada del Lobo	Sinaloa
1	27.9866792	15.905712	49.3690867	12.0550698	26.2143095	17.02483861	57.8465889
2	24.3533094	8.22257312	16.9913106	23.8379582	18.5560697	22.23557169	-2.55916329
3	1.02691071	1.04791653	1.48635488	4.66667487	8.98786712	8.109636713	0.99932973
4	3.91236995	8.94486393	1.89578945	-0.06260797	-1.19748005	0.043643846	-1.19748005
5	10.7703852	0.87087432	4.1421128	0.99948824	15.5568385	10.87625657	2.28039959
6	-0.76401795	4.76880336	1.86705957	4.61372005	3.99756734	4.154688029	4.65906198
7	3.27337302	-0.41119822	-1.10316777	1.19343795	-0.80020839	-0.473182337	-0.80020839
8	-0.91963766	1.48781867	-0.1431341	1.10744651	-0.5233507	1.333476996	-0.13738834
9	-0.73072436	5.67553699	-0.24436453	0.14855059	-0.85871895	-0.625303699	3.26725813
10	2.46037194	-0.81599199	-0.22762229	-0.96154815	-0.60222047	0.744439368	-0.96154815
11	1.19745727	6.93077677	-0.41143556	9.83866707	1.89317618	2.070906718	0.67724344
12	-1.16644002	3.12785465	1.31929258	2.20393229	-0.30342463	0.220649352	2.90547495
13	2.51083688	6.86708176	1.40336858	2.47852214	1.83253026	2.411697551	3.60554463
14	2.21766566	13.5059174	-0.21611169	14.0092276	3.3755838	8.001219824	6.6785527

**Apéndice 2 Datos de % altura estandarizadas de las 14 señales comunes.**

Señal	Cadereytra 04	Zuazua 05	Rayones06	Marín ene07	Zuazua feb07	Marín oct07
1	31.06256536	16.4804212	22.342428	17.2878566	41.98647918	7.86835712
2	19.67218828	13.8398415	21.4699122	10.6998483	10.90193578	4.52344726
3	0.512159256	2.81881666	2.06531576	3.70298204	1.500206913	-0.92550549
4	3.067123843	10.2294929	3.06712384	9.02860326	5.52852498	12.5416828
5	2.893579313	7.801793	13.7561206	2.96284146	4.81935303	2.62269017
6	9.452523154	9.5700767	3.73933663	1.7904574	0.526749437	0.2892622
7	1.236571986	-1.19507501	0.13737173	5.53516713	1.236571986	3.17797309
8	0.015579727	0.73625714	-0.34695074	1.67017035	0.015579727	0.3315284
9	-0.092931637	0.90264065	1.39533629	0.23518834	1.011038699	4.80890567
10	0.174767683	2.28032205	0.17476768	6.41907873	0.973396523	5.45318284
11	3.441551532	3.09753616	0.45340034	2.19019365	1.933527119	5.42268698
12	0.349076556	0.94769812	3.88082004	6.00398223	0.349076556	5.1906818
13	0.446138587	2.5845415	0.94543754	3.7324715	0.889834346	9.80910416
14	0.703682729	3.68974005	0.70368273	2.52526164	2.111828333	10.805114

Señal	Dr Gzz	Linares	Cadereyta07	Pesquería	Zuazuaoct07	Rayones07
1	26.06256536	32.1468788	30.9768572	25.3704017	34.12600311	13.8051461
2	12.32570395	15.8800463	12.8442387	13.5744609	15.45936183	10.6486081
3	0.552570449	0.50905934	0.03951006	-0.51211331	-0.297027754	-0.33235931
4	7.195568932	6.04483707	8.09256218	9.53460666	4.980234588	12.424472
5	7.389137283	14.3520845	11.767174	11.7298353	15.37925268	5.07625034
6	0.847911253	0.01259025	-0.2211399	0.15815454	-0.008108967	7.52429969
7	2.770761437	1.81820448	0.79741143	0.52745745	0.010967847	3.20437652
8	-0.429896236	-1.22482355	-1.36916392	-1.21186696	-1.533180961	0.29058263
9	-0.092931637	-0.52180574	-0.33487168	1.38023803	1.705741775	-0.55822278
10	3.978143803	1.70764483	2.80301473	2.64541023	0.847725644	3.83236615
11	3.441551532	0.57846659	1.25933806	1.21763795	0.594232224	5.49559574
12	0.541510657	-0.90983348	1.05478033	2.3419986	0.361985881	1.76725896
13	4.248957875	2.28460247	4.32361207	4.5767963	0.712319209	3.71910111
14	4.952547948	1.10615074	1.75077942	2.45108514	1.444595503	6.88662747

Señal	Villaldama	Cd. Victoria	Jaumave	Nvo. Padilla	S.L.P.	Cañada del Lobo	Sinaloa
1	29.6202441	15.5532459	46.0206083	21.0016135	32.83645662	26.69487988	49.73066007
2	16.158934	12.8590565	12.3158972	16.3337235	16.07346753	17.69883287	-2.985635119
3	-0.27685398	-0.43713763	-0.01065229	1.14296937	3.069470798	4.11618429	-0.184338581
4	5.99116404	9.15904145	3.47037833	-0.36402736	-1.342534889	0.159710399	-1.342534889
5	11.8208538	0.78483065	6.21914644	0.76352295	14.97794972	10.13028638	3.871444833
6	-0.7307016	3.2781946	2.32835955	4.00160728	4.468038507	3.686497062	5.403330181
7	3.68412803	-0.74805206	-1.19507501	1.72452089	-0.657100372	-0.259615034	-1.195075011
8	-0.82630197	1.6630106	0.63159393	1.63994715	-0.403845414	0.793350471	0.61499347
9	-0.8221197	4.06024918	-0.08358236	0.03248524	-0.94033677	-0.684024246	2.94392242
10	3.03111557	-0.67105559	0.1254716	-0.91713932	-0.404533789	0.889545705	-1.417505358
11	2.12599023	7.56110821	-0.44730567	11.8163486	2.366974211	2.792769954	1.50113512
12	-1.06433144	2.07393011	2.00861428	1.72794271	-0.561967265	-0.253920831	3.301653856
13	3.01138909	6.60794713	2.44490891	2.73287952	1.480112715	1.766742672	5.799973032
14	2.06059244	12.0397336	-0.04426062	12.1477086	2.821951013	6.252863034	8.075636186

## **APENDICES**

