



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
XANTORRIZOL COMO COMPUESTO MARCADOR EN LA RAÍZ
MEDICINAL DE *Iostephane heterophylla*. AISLAMIENTO DE UN EPOXI-
SESQUITERPENOIDO

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN:

ISRAEL ANTONIO BERNAL BAUTISTA
NADIA OSORIO GALINDO



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirnos ser parte de ella y por la formación académica recibida.

Especialmente a la Dra. Isabel Aguilar Laurents por darnos la oportunidad de compartir este tiempo en el que desarrollamos el presente trabajo; gracias por su confianza, enseñanza, apoyo y principalmente su amistad; por compartir su experiencia y por cada recomendación, además por ser un digno ejemplo a seguir; por su tolerancia y paciencia; por ser una excelente mujer que se preocupa por aquellos que la rodean.

Al Dr. Robert Bye por las colectas del material vegetal utilizado en este estudio.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su invaluable asesoría y paciencia.

A la Dirección de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por el apoyo económico recibido del Proyecto IN211205.

A la Dra. Mabel Frago por la facilidad del empleo del sonicador para nuestros análisis.

Al personal técnico de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación), particularmente a los M. en C. Víctor Manuel Arredondo, Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte Lisci, Margarita Guzmán y Marisela Gutiérrez, por los servicios que nos brindaron.

A la QFB María Guadalupe Tsuzuki Reyes, por el apoyo para realizar algunas de las pruebas antimicrobianas.

Al M. en C. Víctor Manuel Navarro, por el apoyo para la realización de algunas pruebas de actividad antimicrobiana.

A la Dra. María Isabel Chávez Uribe por el importante apoyo en la parte espectroscópica para la elucidación estructural del epoxi-sesquiterpenoide.

A los miembros del Jurado designado para la revisión de la tesis, por sus valiosas observaciones.

A los compañeros del Laboratorio 125, por su compañía.

Al Dr. Eugene A. Bratoeff y a la Dra. Elena Ramírez por su amistad.

DEDICATORIAS

NADIA OSORIO GALINDO

A Dios por darme la oportunidad de existir y amar; por la satisfacción que he tenido de la vida al estar con mis padres y hermanos y por permitirme conocer a todas esas personas que me han brindado una sonrisa, un consejo y un conocimiento.

A mis Padres: Felipe Osorio López, Gudelia Galindo José por su confianza y por el amor que me han dado durante todos los años de nuestra convivencia, por su esfuerzo para lograr mis metas.

A mis hermanitos Jaime e Isabel por compartir parte de nuestras vidas juntos.

A mi país por brindarme la oportunidad de asistir a una Universidad Pública: la UNAM

A mis amigos por compartir tantos momentos de nuestra vida en la Universidad

A Jorge por el tiempo que nos ayudamos

A Juan por compartir su alegría

El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona.

Aristóteles

Los sabios son los que buscan la sabiduría, los necios piensan ya haberla encontrado.

Napoleón.I

ISRAEL ANTONIO BERNAL BAUTISTA

A mis papás: Leticia Bautista y Marco A. Bernal, por hacer de mí un ser con valores para afrontar la vida, impulsándome para continuar adelante brindándome su apoyo incondicional en cada momento, por ser los patrocinadores de mi destino y financiar cada sueño. Gracias por ese ejemplo de superación. Este trabajo es gracias a ustedes por todo lo que me dan sin esperar. Los amo y muchas gracias.

Para mi hermana Estefany Bernal con todo mi cariño. Espero que el reflejo de mi trabajo sea su corazón, dejar en ella más que un buen ejemplo. Debes saber que todo lo que hago lleva parte de mi amor hacia ti, porque has sabido ser más que una compañía. Porque en ti encuentro cada sonrisa que me falta, la palabra inocente que no veo en el resto del mundo, la motivación más fuerte para seguir caminando y la prueba más grande de que Dios existe.

A la gran familia que Dios me dio la oportunidad de tener (a mis abuelitas mamá Fina y mama Chana; a mis tíos Sergio, Sandra, Fernando, Luz, Armando, Mauricio y Luís), gracias por todo el apoyo y cariño desde un principio. Gracias por estar siempre a mi lado y continuar aconsejándome para seguir adelante aún cuando el camino parezca imposible de cruzar.

A mis primos, Oscar, Karina, Sarai e Isaac con los que me he desvelado algunas veces por estar de pachangueros y con los que me he divertido tanto que no podría cambiar esos momentos por nada en este mundo.

Por ultimo quiero agregar mi mayor agradecimiento a Dios por permitirme pisar este suelo, por darme la libertad de ser y hacer, por pensar en mi y por darme la bendición de cada mañana. Gracias por cada mensaje que haz dejado sobre mi piel y por cada suspiro que sale de mis labios. Por darme salud, un cuerpo para trabajar y estar con los seres que más quiero (mi familia) y un espíritu que me permite amar y razonar al mismo tiempo. Yo sé que esperas más de mi cada día, por eso trato de ser más para mi, para los míos, pero sobre todo para ti. Gracias por confiar en mi y por no dejarme nunca solo.

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
d.C.	Después de Cristo
A	Área
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CG	Cromatografía de Gases
EM	Espectrometría de Masas
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CL	Cromatografía de Líquidos
CL ₅₀	Concentración Letal Cincuenta
C.V.	Coefficiente de Variación
Desv. Std.	Desviación Estándar
d	Días
Fig.	Figura
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
h	Horas
I.H	<i>Iostephane heterophylla</i>
I.M	<i>Iostephane madrensis</i>
IR	Infrarrojo
L	Litros
LD	Límite de Detección
LQ	Límite de Cuantificación
MHz	Mega Hertz
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos

mL	Mililitros
mm	Milímetros
µg	Microgramo
µL	Microlitros
N	Concentración Normal
nm	Nanómetros
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono Trece
Rel.	Relación
rpm	Revoluciones por Minuto
r ²	Coefficiente de Determinación
STD	Estándar
STD.Int	Estándar Interno
TMS	Tetrametilsilano
USAI	Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación
Xant.	Xantorizol
UV.	Ultravioleta
%	Porcentaje (porciento)
<	Menor que
>	Mayor que
etc.	Etcétera
et al.	Entre Otros
ATCC	American Type Culture Collection
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Mor.	Morelos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VIS	Visible
CCF	Cromatografía en Capa Fina
Rf	Factor de Retención
ppm	Partes Por Millón
n	Muestras

t	Tiempo
m	Pendiente
Fdil.	Factor de Dilución
Xant.	Xantorrizol
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Figs.	Figuras
t_R	Tiempo de Retención
K'	Factor de Capacidad
R	Resolución
R_r	Retención Relativa
T	Factor de Coleo
n	Numero de platos Teóricos
DEPT	(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) Aumento del desacoplamiento causado a un protón con su Carbono por transferencia de polarización
HSQC	(Heteronuclear single quantum correlation) Correlación Heteronuclear simple de Hidrógeno-Carbono
HMBC	(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) Correlación Heteronuclear de Múltiples Ligaduras
NOE-diferencial	(Nuclear Overhauser effect) Efecto Nuclear Overhauser Diferencial

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1: Metabolitos secundarios contenidos en la raíz de *Iostephane heterophylla*
- Cuadro 2: Fracciones obtenidas del extracto hexánico y sistema de elución empleado.
- Cuadro 3: Parámetros y límites establecidos en la adecuabilidad del sistema en CLAE
- Cuadro 4: Soluciones empleadas para elaborar la curva de calibración de Xantorizol
- Cuadro 5: Parámetros y condiciones establecidas para realizar la cuantificación
- Cuadro 6: Estructuras, nombres de los compuestos, peso molecular y porcentaje de los compuestos contenidos en la fracción (FI)
- Cuadro 7: Posibles estructuras de los compuestos presentes en la fracción FXII
- Cuadro 8: Actividad antimicrobiana del aceite expresada en CMI ($\mu\text{g/mL}$)
- Cuadro 9: Relación de áreas obtenidas en la curva de calibración y su C. V.
- Cuadro 10: Valores de pendientes y ordenadas al origen para cada curva
- Cuadro 11: LD y LQ obtenidos experimentalmente
- Cuadro 12: Datos experimentales de Adecuabilidad del Sistema
- Cuadro 13: Parámetros requeridos para la adecuabilidad del sistema; resultados y límites
- Cuadro 14: Relación de áreas obtenidas, C. V. para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema
- Cuadro 15: C.V de pendientes para linealidad del sistema
- Cuadro 16: Resultados; C. V. obtenido de las 6 inyecciones realizadas en precisión del sistema
- Cuadro 17: Relación de áreas y C. V. obtenidos en la Estabilidad de la Muestra.
- Cuadro 18: Relación de áreas y C. V. para cada punto de las tres corridas en linealidad y exactitud del método.
- Cuadro 19: Cantidad adicionada y porcentaje de recobro para cada curva elaborada así como su correspondiente C. V. para cada punto
- Cuadro 20: Relación de áreas obtenida en diferente día y por diferente analista así como su C. V.
- Cuadro 21: mg. de xantorizol por gramo de raíz promedio extraído de cada lote procesado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estructura química del Xantorrizol
- Figura 2: Fotografía de *Iostephane hetephylla*
- Figura 3: Distribución geográfica de *Iostephane hetephylla* en la República Mexicana
- Figura 4: Raíces de *I. heterophylla*
- Figura 5: Maceración de las raíces en hexano
- Figura 6: Destilación al vacío del hexano del extracto hexánico
- Figura 7: Cromatografía en columna correspondiente al fraccionamiento primario del extracto hexánico
- Figura 8: Esquema de la cromatoplaque preparativa empleada en la separación de F-IV-B.
- Figura 9: CG-EM del extracto hexánico de la raíz de *Iostephane heterophylla*
- Figura 10: Espectro de masas del xantorrizol (7)
- Figura 11: Espectro de masas del ácido traquilobanoico (1)
- Figura 12: Espectro de RMN-¹H de FI
- Figura 13: Cromatograma de gases de FI
- Figura 14: Cromatograma de gases del compuesto separado mediante placa preparativa (F-IV-B)
- Figura 15: Espectro de masas del compuesto F-IV-B
- Figura 16: Espectro de RMN-¹H del compuesto F-IV-B
- Figura 17: Expansión de la zona entre 0.7 y 1.4 ppm del espectro de RMN-¹H del compuesto F-IV-B
- Figura 18: Espectro de ¹³C del compuesto F-IV-B
- Figura 19: Espectro DEPT del compuesto F-IV-B
- Figura 20: Espectro HSQC del compuesto F-IV-B
- Figura 21: Espectro HMBC del compuesto FIVB (expansión)
- Figura 22: HMBC del compuesto FIVB (expansión)
- Figura 23: Estructura del Kessano (27).

- Figura 24: Cromatografía en capa fina del extracto hexánico con referencia de xantorrizol
- Figura 25: Espectro IR para xantorrizol
- Figura 26: Espectro de RMN-¹H del xantorrizol
- Figura 27: Espectro de masas del xantorrizol
- Figura 28: Cromatograma de gases de la fracción XII
- Figura 29: Patrón de fragmentación del xantorrizol en espectrometría de masas.
- Figura 30: Espectro de masas del probable compuesto I (o II)
- Figura 31: Espectro de masas del probable compuesto II (o I)
- Figura 32: Espectro de masas del probable compuesto III
- Figura 33: Espectro de masas de un compuesto (IV) con peso molecular 272
- Figura 34: Cromatograma que muestra los tiempos de retención y estructuras del xantorrizol (A) y del estándar interno (B)
- Figura 35: Cromatograma obtenido de la solución de xantorrizol al 100% mediante CLAE
- Figura 36: Cromatogramas obtenidos para cada lote analizado

LISTA DE GRÁFICAS

- Grafica 1: Curva de Calibración para obtener LD y LQ
- Grafica 2: Curva Experimental para determinar la linealidad del sistema
- Gráfica 3: Curva obtenida para la determinación de linealidad y exactitud del método
- Grafica 4: Comportamiento de modelo de corrección de pesada seleccionado

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Plan de trabajo para realizar la validación de la técnica analítica CLAR para determinar la cantidad de Xantorrizol presente en la raíz de *Iostephane heterophylla*.

INDICE GENERAL

Lista de abreviaturas	I
Lista de cuadros	IV
Lista de figuras	VI
Lista de gráficas	VIII
Lista de esquemas	IX
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1 Las plantas medicinales. Antecedentes históricos en México y en el mundo	3
2.2 Cromatografía de líquidos y validación de un método analítico	5
2.3 Antecedentes de <i>Iostephane heterophylla</i>	6
3.- JUSTIFICACIÓN	13
4.- OBJETIVOS	14
5.- PARTE EXPERIMENTAL	16
5.1 Material y equipo utilizado	16
5.2 Material vegetal	18
5.3 Obtención del extracto hexánico de la raíz	18
5.4 Fraccionamiento del extracto hexánico	20
5.5 Aislamiento de la fracción FI	21
5.6 Aislamiento del kessano	21
5.7 Identificación del xantorizol	22
5.8 Obtención de la fracción F-XII	23
5.9 Ensayos biológicos	23
5.9.1 Determinación toxica en el crustáceo <i>Artemia salina</i> leach	23
5.9.1.1 Preparación de los organismos	23
5.9.1.2 Preparación de muestras biológicas de <i>Artemia salina</i> leach.	23
5.9.2 Determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de la fracción FI	24
5.10 Desarrollo y validación del método para la cuantificación de xantorizol por CLAE	25

5.10.1 Selección del estándar interno para la validación	25
5.10.2 Preparación de las soluciones estandar	25
5.11 Determinación de la concentración al 100% de la solución estándar de xantorizol	25
5.12 Plan de trabajo para la validación de la técnica analítica por CLAE	26
5.13 Sensibilidad	27
5.13.1 Limite de detección y Limite de cuantificación	27
5.14 Adecuabilidad del sistema	28
5.15 Linealidad del sistema	28
5.16 Precisión del sistema	29
5.17 Preparación de las muestras (extractos metanólicos de raíces de <i>Iostephane heterophylla</i>)	30
5.18 Estabilidad de la muestra	30
5.19 Linealidad y exactitud del método	31
5.20 Precisión del método	31
5.20.1 Repetibilidad	31
5.20.2 Reproducibilidad	32
5.21 Cuantificación de xantorizol en la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i>	32
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 Obtención del extracto hexánico de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i>	34
6.2 Fraccionamiento del extracto hexánico e identificación de compuestos no reportados anteriormente en la especie	36
6.2.1 Obtención del aceite FI	36
6.2.2 Obtención del kessano (27)	39
6.2.3 Identificación del xantorizol (7)	47
6.2.4 Análisis de la fracción FXII	49
6.3 Ensayos biológicos.	52
6.3.1 Determinación de la toxicidad de la fracción FI al crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	52
6.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de la fracción FI	52
6.4 Validación del método CLAE para la cuantificación de	

xantorizol en muestras de <i>I. heterophylla</i> .	53
6.4.1 Selección del compuesto utilizado como estándar interno	53
6.5 Obtención de la concentración de la solución del estándar de xantorizol al 100%	54
6.6 Sensibilidad	55
6.6.1 Limite de detección y limite de cuantificación	55
6.7 Adecuabilidad del sistema	56
6.8 Linealidad del sistema	57
6.9 Precisión del sistema	58
6.10 Estabilidad de la muestra	59
6.11 Linealidad y exactitud del método	60
6.12 Precisión del método	61
6.12.1 Repetibilidad	62
6.12.2 Reproducibilidad	62
6.13 Cuantificación de xantorizol en la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i>	63
7.- CONCLUSIONES	68
8.-BIBLIOGRAFIA	71
9.- ANEXOS	76

1.- INTRODUCCIÓN

Las raíces de *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth ex Hemsl proporcionan una droga cruda importante usada en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de heridas, en forma de un cataplasma, para aliviar reumas y artritis frotando una tintura alcohólica o el extracto acuoso en las articulaciones y en forma de té para la diabetes, desórdenes gastrointestinales y dolores intensos en el estómago. Esta planta se encuentra a lo largo de la República Mexicana, en varios estados. Los estudios químicos de las raíces de esta planta medicinal han identificado algunos diterpenos y sesquiterpenos como los componentes mayoritarios. Entre estos compuestos, el xantorizol (Figura 1) ha mostrado estar en una concentración mayor en el extracto metanólico de las raíces, así como también ha demostrado ser activo en estudios de actividad antimicrobiana *in-vitro* y en pruebas *in-vivo*, siendo capaz de inhibir la contractilidad uterina y relajar la aorta de la rata (Aguilar, 1993; Campos, 2000; Delgado, 1999).

I. heterophylla se relaciona botánicamente con *I. madrensis* ya que pertenece al complejo "cachana" de plantas medicinales, las raíces de esta última son muy populares, entre otros casos, para tratar esterilidad. Las raíces de ambas especies son similares y se parecen mucho una a la otra. Este hecho puede causar confusión en el uso de las dos especies, provocando adulteración de cualquiera de los dos. La composición química de *I. heterophylla* es principalmente diferente por el contenido que presenta de xantorizol.

El uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) en el control de calidad de los extractos de la planta se debe documentar adecuadamente; consiste en un método apropiado para la identificación y cuantificación de principios marcadores activos que en el futuro podrían usarse para regularización de la calidad de preparaciones herbarias. Por esta razón, la técnica de cromatografía de líquidos fue aplicada para cuantificar el xantorizol como un compuesto del marcador de *I. heterophylla*. Como esta planta crece en varios estados del país, el método de cromatografía de líquidos desarrollado y validado se usará para el análisis del contenido de xantorizol en las raíces de *I. heterophylla*.

Las muestras de *I. heterophylla* se colectaron en diferentes lugares de México y también fueron empleados para compararlos con una muestra de *I. madrensis* en la cual se sabe no hay presencia de xantorizol. El método analítico se llevó a cabo según la pauta de

ICH que requiere la evaluación de linealidad, precisión, exactitud, y parámetros de estabilidad.

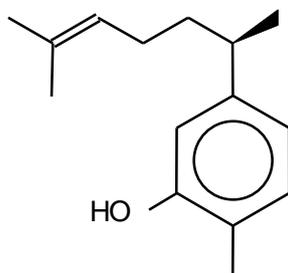


Figura 1: Estructura química del xantorizol

2.- ANTECEDENTES

2.1 LAS PLANTAS MEDICINALES. ANTECEDENTES HISTÓRICOS EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

El uso de las plantas medicinales figura en la historia más primitiva, los datos que existen del antiguo Egipto, Asiria, China e India muestran la utilización de las plantas para fines medicinales, dicho consumo es probablemente una progresión natural ya que el hombre posee un reconocimiento de las plantas que consume, comenzando por las que son puramente alimenticias, pasando por los alimentos necesarios para la salud (vegetales frescos, zanahorias y frutas, que en la actualidad se sabe que proveen de vitaminas esenciales) continuando con los productos consumidos en cantidad razonable como alimento, pero que se sabe poseen efectos medicinales (por ejemplo higos, ciruelas, mucílagos que actúan como laxantes suaves), finalmente con el reconocimiento de plantas puramente medicinales (Bruneton, 2001). La recolección de plantas para fines medicinales data de la más remota antigüedad. Los antiguos sumerios conocían buen número de ellas desde una época tan antigua como el año 2500 a.C. Los papiros de los antiguos egipcios escritos hacia 1600 a.C. registran los nombres de numerosas drogas usadas por los médicos de este periodo, de todos los papiros, el llamado *Papiro de Ebers* encontrado en Tebas cerca del Mar Muerto es el más extenso y famoso.

Los antiguos griegos conocían ciertas drogas que todavía siguen utilizándose; el filósofo griego Pitágoras (528 a.C.) estaba familiarizado con la mostaza, el médico Hipócrates (466 a.C.) conocía el ajeno, la canela, la cicuta, la genciana, la manzanilla, etc. Teofrasto (372 a.C.) escribió diez libros *Sobre la Historia de las Plantas* y otros ocho *Sobre las Causas de las Plantas*, el médico griego Dioscórides (siglo I de nuestra era) fue el primer autor que escribió de manera extensa sobre las plantas medicinales en su obra *De Materia Medica*, Plinio el viejo (23-79 d.C.), soldado y escritor romano, escribió 47 volúmenes sobre *Historia Natural*, Galeno (131-200 d.C.), farmacéutico y médico greco-romano escribió veinte libros en los que incluye fórmulas y dosificaciones adecuadas para

diversas preparaciones, lo que hoy se conoce como preparaciones Galénicas; en sus obras se describen las adulteraciones del azafrán, de la mirra, de la canela, etc. Los árabes continuaron los avances científicos de los griegos y de los romanos y uno de los más notables, Mesué el Viejo (777-857) quien escribió un formulario farmacéutico e introdujo el sen, el tamarindo, entre otras.

Carl von Linné (Linneo) botánico sueco publicó *Genera Plantarum*, obra considerada como punto de partida de la botánica sistemática; la más notable de todas sus obras es *Species Plantarum* la cual incluye una larga lista de especies de plantas junto con sus descripciones y su clasificación, de acuerdo a un sistema natural que se basa en el estudio de las analogías y diferencias de sus órganos sexuales, su sistema de nomenclatura binario, uno para el género y otro para la especie, es empleado en la actualidad por todos los naturalistas. En 1806 el farmacéutico Alemán Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, aísla la morfina del opio demostrando su carácter tóxico, este descubrimiento contribuyó a desviar la atención de los científicos hasta entonces localizada en las plantas medicinales, hacia las drogas crudas y sus principios activos .

Por otra parte el descubrimiento y conquista de América por los españoles en el siglo XVI produce una extensa bibliografía de las plantas y productos naturales del nuevo continente. El historiador Gonzalo Hernández de Oviedo y Valdés (1478-1557) es el primero en ocuparse de los productos naturales de América, sus obras *De la Natural Historia de las Indias e Historia General y Natural de las Indias e Islas y Tierra Firme del Mar Océano*, describe plantas como: el tabaco, el cacao, el guayaco y el achiote. Del siglo XVI data la valiosa recopilación sobre plantas medicinales conocidas por los antiguos mexicanos, el texto escrito en 1552 en Náhuatl por el médico azteca Martín de la Cruz, con ilustraciones a colores, traducido al latín por el xochimilca Juan Badiano, conocido como Códice Badiano el cual describe 263 plantas. Fray Bernardino de Sahagún autor de *Historia de las Cosas de la Nueva España* trabajó de 1558-1582 en varios manuscritos los cuales fueron resumidos dentro del Códice Florentino; Francisco Hernández (1517-1587) es autor de un estudio sistemático de la flora curativa de la nueva España como parte de la *Historia Natural de la Nueva España*. En el siglo XVII el fraile dominico Francisco Ximénes editó *Cuatro Libros de la Naturaleza y Virtudes de la Nueva España*, obra que consta de 17

volúmenes cuyo contenido es lo escrito por Francisco Hernández. Posteriormente en 1950 aparece la primera Farmacopea mexicana en la cual se describen preparados medicinales a base de plantas (Trease, 1989).

La riqueza de las plantas medicinales en México puede ser estimada por el número de especies utilizadas y forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Las plantas medicinales no son inocuas, tienen un efecto terapéutico sobre el ser humano e implican riesgos cuando se emplean de forma inapropiada, por ello es importante establecer lineamientos de control de calidad haciendo énfasis en su identidad, composición y pureza para asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas en nuestro país.

2.2 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La cromatografía es una técnica que permite la separación de las sustancias que se encuentran presentes en una mezcla, es una técnica desarrollada a principios de siglo, el nombre cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se separaron como bandas coloridas.

La cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. La siguiente tabla muestra los tipos de cromatografía de líquidos (FEUM, 2000):

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

Cromatografía planar	Cromatografía en columna
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía líquido-sólido (adsorción)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía líquido-sólido(partición)
	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión

La cromatografía de líquidos es una técnica que permite identificar separar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos y hoy en día es una de las técnicas más utilizadas en los laboratorios analíticos. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) es preferida sobre otras técnicas por su alta especificidad, sensibilidad confiabilidad y la excelente separación de los componentes individuales derivados de la mezcla. La CLAE puede dividirse en dos tipos de acuerdo a la polaridad de las fases móvil y estacionaria: en fase normal y en fase reversa. La fase normal utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, mientras que la fase reversa se basa en una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar (Boylan, 1996).

En la cromatografía de líquidos de alta resolución la migración diferencial es el resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fases, estacionaria y móvil; el éxito de la aplicación de ésta técnica para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: de la fase móvil, el tipo de columna, la longitud y diámetro de la misma, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura etc (FEUM, 2000).

La validación de un método analítico es parte fundamental de la técnica de análisis de control de calidad. Cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra es necesario contar con un método analítico, el cual se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con su propósito. Las características de la validación pueden ser consideradas como: exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad (García, 2002).

2.3 ANTECEDENTES DE *Iostephane heterophylla*

Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsl pertenece a la familia Asteraceae, también conocida con el nombre de Escorzonera (Escorcionera), en el norte de la República

Mexicana y en el Estado de México (Bye, 1995; Martínez, 1989); raíz del manso en el estado de Hidalgo (Villavicencio, 1995); hierba del oso, Hierba del manso (Argueta, 1994). Es una planta herbácea perenne de 60 cm de largo; de raíz tuberosa; hojas radicales, lobuladas, ásperas; flores en cabezuelas lilas y florece en septiembre. En la Figura 2 se muestra una fotografía de *Iostephane heterophylla*.



Figura 2: Fotografía de *Iostephane heterophylla*

Es originaria de México. Habita en climas semiseco y templado; su distribución geográfica abarca el Valle de México, Estado de México, Puebla, Jalisco, Chihuahua, San Luis Potosí, Hidalgo, Durango, entre otros. La Figura 3 muestra la distribución geográfica de *Iostephane heterophylla* en la República Mexicana.



Figura 3: Distribución geográfica de *Iostephane heterophylla* en la República Mexicana (Jerzy, 1978)

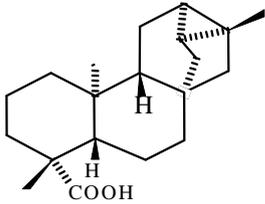
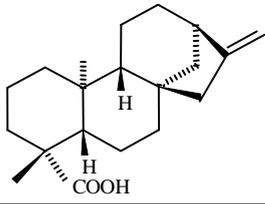
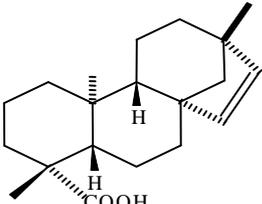
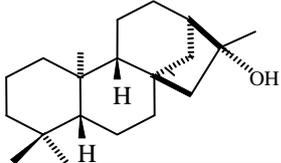
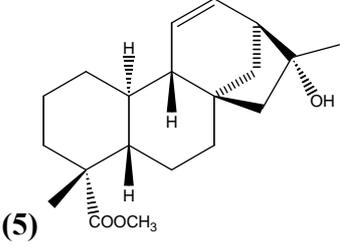
I. heterophylla es una planta que está muy relacionada con *Iostephane madrensis*, las raíces pueden confundirse y utilizarse indistintamente, de hecho se ha llegado a incluir en el “complejo cachana” de plantas medicinales.

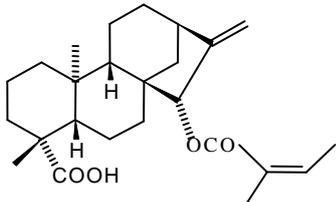
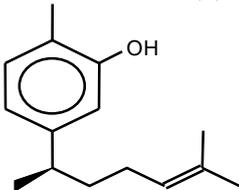
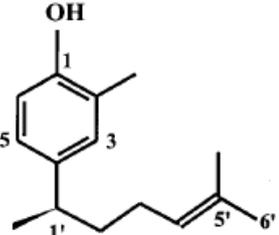
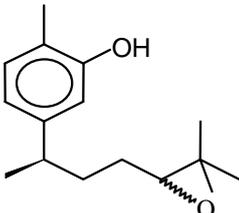
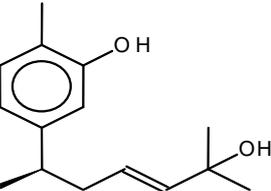
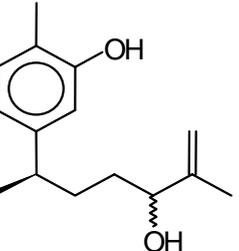
La raíz seca de *I. heterophylla* es usada junto con otras plantas como el cuachalalate, el árnica, la yerba mora y la siricua, como constituyentes del “té úlcero” el cual es muy popular en la ciudad de Chihuahua para curar úlceras estomacales. También es utilizada en combinación con la flor de tila, hierba de teñir (*Dydimaea alsinoides*) para dolores musculares. La maceración de la raíz untada en el cuerpo, es empleada para el dolor de huesos. En el siglo XVI Francisco Hernández relata los usos de la raíz de *I. heterophylla* para afecciones renales, como alcalinizante y antipalúdico, así como para la inflamación de la garganta y tónico aromático y en el siglo XX la Sociedad Farmacéutica de México la señala como antidisentérico y pectoral.

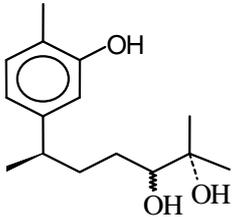
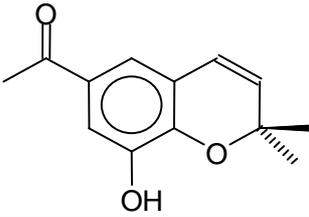
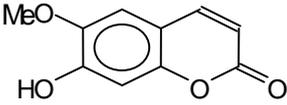
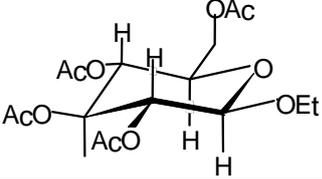
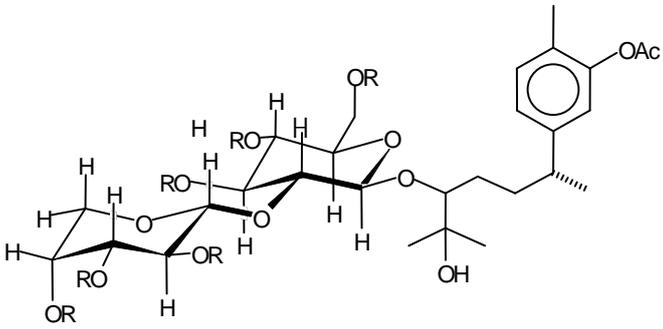
Estudios químicos biodirigidos, enfocados a la búsqueda de componentes antimicrobianos o activos en la tonicidad del músculo liso realizados en los extractos de la raíz de *I. heterophylla* han confirmado la presencia de diterpenos, cromenos, cumarinas,

glicósidos y sesquiterpenoides derivados del bisaboleno de los cuales el xantorizol (2-metil-5-(5-hidroxi-1,5-dimetil-3-hexenil)-fenol) fue mayoritario (Aguilar, 1993; Ponce, 2006). En este estudio, el xantorizol se aisló de los extractos clorofórmico, metanólico y hexánico y la estructura se muestra en el Cuadro 1, siendo éste responsable de la actividad antimicótica que presenta la raíz de *I. heterophylla* sobre los cultivos de los hongos *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *Trichophyton rubrum* y con actividad moderada sobre la levadura *Candida albicans* (Rios, 1988), además el xantorizol mostró actividad de inhibición de la tonicidad del músculo liso de útero de rata y en la aorta torácica de rata. En el Cuadro 1 se mencionan los metabolitos secundarios contenidos en la raíz de la planta.

Cuadro 1: Metabolitos secundarios aislados de *Iostephane heterophylla*

NOMBRE Y FORMULA	REFERENCIAS
<p data-bbox="421 392 818 427">Acido traquiloban-19-oico (1)</p> 	<p data-bbox="1034 392 1262 427">Pyrek et al., 1970</p> <p data-bbox="1034 443 1246 479">Herz et al., 1983</p> <p data-bbox="1034 495 1302 530">Bohlman et al., 1978</p> <p data-bbox="1034 546 1283 582">Aguilar et al., 1993</p>
<p data-bbox="400 683 839 719">Acido <i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico (2)</p> 	<p data-bbox="1034 683 1283 719">Aguilar et al., 1993</p>
<p data-bbox="395 963 844 999">Acido <i>ent</i>-beyer-15-en-19-oico (3)</p> 	<p data-bbox="1034 963 1289 999">Henrick et al., 1964</p> <p data-bbox="1034 1014 1246 1050">Herz et al., 1976</p> <p data-bbox="1034 1066 1262 1102">Oberti et al., 1980</p> <p data-bbox="1034 1117 1283 1153">Aguilar et al., 1993</p>
<p data-bbox="421 1243 818 1279">16-α-Hidroxi-<i>ent</i>-kaurano (4)</p> 	<p data-bbox="1034 1243 1246 1279">Herz et al., 1982</p>
<p data-bbox="220 1473 1018 1509">Ester metílico del ácido 16α-hidroxi-<i>ent</i>-kaur-11-en-19-oico</p> <p data-bbox="448 1720 485 1756">(5)</p> 	<p data-bbox="1034 1473 1246 1509">Herz et al., 1982</p> <p data-bbox="1034 1525 1246 1561">Herz et al., 1983</p> <p data-bbox="1034 1576 1283 1612">Aguilar et al., 1993</p>

<p>Acido 15α-angeloiloxi-ent-kaur-16-en-19-oico (6)</p> 	<p>Bohlman et al., 1977 Herz et al., 1983 Aguilar et al., 1993</p>
<p>Xantorrizol (7)</p> 	<p>Rimpler et al., 1970 Aguilar et al., 1993</p>
<p>4-(1',5'- dimetil-hex-4'-enil)-2-metil fenol(8)</p> 	<p>Mata et al., 2001</p>
<p>12,13-dihidro-12,13-epoxi-xantorrizol (9)</p> 	<p>Aguilar et al., 2000</p>
<p>12,13-dihidro-13-hidroxi-11-en-xantorrizol (10)</p> 	<p>Aguilar et al., 1993</p>
<p>12,13-dihidro-12-hidroxi-13-en-xantorrizol (11)</p> 	<p>Aguilar et al., 1993</p>

<p>12,13-dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol (12)</p> 	Aguilar et al., 2000
<p>8-Hidroxi-6-acetil-2,2-dimetil-cromeno (13)</p> 	Aguilar et al., 1993 Bohlman et al., 1978
<p>Escopoletina (14)</p> 	Dean et al., 1969 Shafizadeh et al., 1970 Ballantyne et al., 1971 Aguilar et al., 1993
<p>1-O-Etil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranososa (15)</p> 	Aguilar et al., 1995
<p>Peracetil-1'-O-[12-O-(12R)-12,13-Dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol]-β-L-arabinopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido (R=Ac) (16)</p> 	Aguilar et al., 1995

3.- JUSTIFICACIÓN

El gran uso y consumo de las plantas medicinales para el cuidado de la salud, indica la importancia que presentan al ser empleadas en el tratamiento de diversos padecimientos. En el caso particular de *Iostephane heterophylla*, es ésta una planta que se conoce desde hace siglos la cual ha sido y es actualmente empleada para tratar algunos síntomas como dolores diversos (musculares, pulmonares, etc.), para facilitar la cicatrización de heridas, para la infertilidad y para infecciones gastrointestinales, entre otros. El hecho de que esta raíz sea expandida en mercados sin ningún control, requiere que sea necesario regular y reglamentar su venta mediante el establecimiento de datos sobre la planta que comprueben su identidad, así como la composición de sus metabolitos secundarios y su pureza. Mediante los datos que se aporten por medio de un estudio integral a la planta, podría además evitarse su adulteración por su similitud con la raíz conocida comúnmente como cachana (*Iostephane madrensis*) y asimismo, crear una monografía de esta especie que eventualmente pudiera insertarse en la Farmacopea Herbolaria de los Estado Unidos Mexicanos, para la correcta difusión al público sobre la planta.

Por otra parte, es necesario apoyar la fitoterapia e introducirla en el ámbito regulatorio, y aunque existen muchos trabajos en la literatura en donde se mencionan los parámetros necesarios para realizar la validación de un método analítico, se posee poca información de la aplicación de estos métodos en materias primas de origen natural.

Por ello es que una de las partes de este trabajo propone una metodología analítica para cuantificar el analito mayoritario y marcador de esta planta (xantorizol).

4.- OBJETIVOS

- a) Desarrollar y validar un método analítico por CLAE para cuantificar xantorizol, metabolito secundario mayoritario y con actividad biológica presente en la raíz de la planta *Iostephane heterophylla*.
- b) Aislar y caracterizar metabolitos secundarios adicionales a los previamente descritos en la literatura, presentes en la raíz de *Iostephane heterophylla* para completar el estudio del perfil químico de la especie y evaluar su actividad antimicrobiana y toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Preparación del extracto hexánico de la raíz de *Iostephane heterophylla*.
- 2) Realizar el fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico por columna abierta de sílice para aislar al xantorizol y a los compuestos adicionales a los ya obtenidos con anterioridad.
- 3) Determinar la toxicidad de los compuestos adicionales sobre *Artemia salina* Leach.
- 4) Realizar las pruebas antimicrobianas a los compuestos adicionales.
- 5) Determinar la estructura molecular de los compuestos adicionales mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- 6) Establecer un plan de trabajo y determinar las condiciones experimentales óptimas para la separación del compuesto de referencia (xantorizol) del extracto metanólico de la raíz de *I. heterophylla* por medio de CLAE.
- 7) Determinación de los siguientes parámetros requeridos para la validación del método de cuantificación de xantorizol por CLAE:
 - i. Linealidad del sistema
 - ii. Precisión del sistema
 - iii. Adecuabilidad del sistema
 - iv. Exactitud y repetibilidad
 - v. Linealidad del método
 - vi. Precisión del método

- vii. Estabilidad de la muestra
- viii. Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LQ)

8) Determinación de la cantidad de xantorizol presente en 11 lotes comerciales diferentes de raíz de *I. heterophylla* y comprobar la ausencia de este compuesto en un lote de *I. madrensis*, demostrando así que se puede emplear como compuesto de referencia de la especie.

5.- PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO

La limpieza del material vegetal se realizó mediante un escobillón, y posteriormente para su fragmentación se requirió del uso de un molino de cuchillas. La maceración se efectuó en un matraz de bola de 5 L marca PYREX y el disolvente de la extracción se eliminó mediante el uso de un rotavapor BÜCHI modelo R-124.

La cromatografía en columna abierta utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) Merck. El análisis por cromatografía en capa fina tipo analítico se llevó a cabo en placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas por una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (silica gel Kiesegel 60 F₂₅₄). Como agentes reveladores se emplearon: una lámpara UV Spectroline modelo ENF-260C Fluorescence Analysis Cabinet a 254 y 365 nm y solución de sulfato cérico amoniacal ((NH₄)₄Ce(SO₄)₄·2H₂O) al 1% en ácido sulfúrico 2N.

La separación y purificación de los compuestos se efectuó por medio de cromatografía en capa fina preparativa con placas de vidrio de 20 por 20 cm recubiertas con silica gel 60 F₂₅₄ Merck con un espesor de 1.0mm. En otros casos, la purificación se realizó por cristalización fraccionada.

El peso de los compuestos se registró con una balanza analítica Explorer Ohaus con alcance de 160 gramos y una linealidad de ± 0.2 mg.

Las pruebas biológicas preliminares emplearon al crustáceo *Artemia salina* Leach en la prueba de toxicidad; para la prueba de actividad antibacteriana de la fracción FI se utilizaron cepas American Type Culture Collection (ATCC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 6358, *Streptococcus faecalis* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8937 y *Salmonella typhi* ATCC 06539 y para la prueba antifúngica se utilizaron las siguientes

cepas *Trychophyton mentagrophytes* ATCC 28185, *Trichophyton rubrum* ATCC28188, *Aspergillus Níger* ATCC10535 y para levaduras, *Candida albicans* ATCC 10321, las cuales se mantuvieron en medios de cultivo de papa dextrosa agar (PDA, Merck) a 27°C (bacterias) y en Agar sabouraud glucosado (SGA, Merck) (hongos y levadura). Los análisis de actividad antibacteriana se efectuaron en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y los de actividad antifúngica en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Investigación Biomédica del Sur del IMSS en Xochitepec, Mor., a cargo del M. en C. Víctor M. Navarro.

Los espectros en el IR se determinaron en un espectro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B; los espectros de masas se obtuvieron de un espectrómetro de masas HP-5890, los espectros de resonancia magnética protónica (RMN-¹H) y de carbono (RMN-¹³C) fueron registrados en un aparato Unity Inova, marca Varian VXR-300S el cual se operó a 300 MHz; empleando CDCl₃ como disolvente y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los análisis espectroscópicos y espectrométricos anteriormente citados se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la facultad de química UNAM.

Para el desarrollo y validación del método de cuantificación de xantorizol se empleó un sonicador marca AQUASONIC modelo 150HT, una centrífuga marca HERMLE modelo Z 230 AmkII, tubos tipo Ependorff de plástico marca BD FALCON de 15mL, un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., Milford MA, USA) modelo 515 con bombas marca Waters modelo 7725I, inyector manual marca Rheodyne, un controlador automático de gradiente marca Waters modelo 680, un detector UV/VIS marca Waters modelo 2487 con 2-canales, y un equipo de cómputo que contiene el software Waters Millenium 32.

La separación se llevó a cabo en una columna Symmetry® C18 (Waters 4.6 x 150 mm I.D.; con tamaño de partícula de 5 µm; Waters Corp., Milford MA, USA) y prefiltros Acrodisc marca Waters. La fase móvil consistió de acetonitrilo y agua (85:15) aplicada isocráticamente. Se utilizó el compuesto 2,6-diterbutil-4-metil fenol como estándar interno.

5.2 MATERIAL VEGETAL

Las raíces de once muestras de *I. heterophylla* (IH) y una de *I. madreensis* (IM) fueron colectadas en diversas partes de México: las muestras IH-34767, IH-34772, IH-34773, IH-34430, IH-34839, IH-34826 y IM-34764, se compraron en el mercado Reforma, Ciudad de Chihuahua en la parte norte de México en 2004; la muestra IH-7153 se colectó en el estado de Puebla en 1998, la muestra IH-26535 se colectó en el Estado de México en 2000, las muestras IH-11-0601 (Toluca, Edo. de México), IH-11-0602 (seca) y IH-11-0603 (fresca) (Edo. de Morelos) se compraron en el mercado Sonora, México. Este material fue identificado por el Profesor Robert Bye. (figura 4)



Figura 4: Raíces de *I. heterophylla*

5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LA RAÍZ

630 g de material vegetal molido se dejaron reposar en 3 L de hexano a temperatura ambiente durante 48 h, la operación se repitió hasta agotar los compuestos solubles. El disolvente fue eliminado por destilación al vacío en cada ocasión obteniéndose 105 g de extracto (Figuras 5 y 6).



Figura 5: Maceración de las raíces en hexano.



Figura 6: Destilación al vacío del hexano del extracto hexánico

5.4 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO

100 g del extracto hexánico se fraccionaron mediante cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice (0.063-0.2 mm) un kilogramo y como fase móvil hexano y acetato de etilo (Figura 7), realizando las mezclas pertinentes de dichos disolventes (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60,30:70, 20:80, 10:90) el fraccionamiento fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina para juntar las fracciones semejantes. El cuadro 2 presenta las diferentes porciones de las mezclas de elución utilizadas y las fracciones obtenidas. El xantorrizol se obtuvo de las fracciones FV-FIX como un compuesto aceitoso, separándose de las aguas madres de dichas fracciones.

Cuadro 2: Fracciones obtenidas del extracto hexánico y sistema de elución empleado

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas		Peso (mg)
Hexano	100 %	1-30	FI	3465
Hexano:Acetato de Etilo	99:1	31-104	FII	89
Hexano:Acetato de Etilo	98:2	105-120	FIII	119
Hexano:Acetato de Etilo	95:5	121-127	FIV	2817
Hexano:Acetato de Etilo	95:5	128-141	FV	2800
Hexano:Acetato de Etilo	95:5	142-155	FVI	3263
Hexano:Acetato de Etilo	95:5	156-169	FVII	173
Hexano:Acetato de Etilo	93:7	170-183	FVIII	526
Hexano:Acetato de Etilo	90:10	184-206	FIX	80
Hexano:Acetato de Etilo	90:10	207-246	FX	668
Hexano:Acetato de Etilo	85:15	247-259	FXI	123
Hexano:Acetato de Etilo	80:20	260-295	FXII	5856
Hexano:Acetato de Etilo	80:20	296-306	FXIII	33
Hexano:Acetato de Etilo	70:30	307-320	FXIV	98
Hexano:Acetato de Etilo	70:30	321-332	FXV	551
Hexano:Acetato de Etilo	65:35	333-357	FXVI	45
Hexano:Acetato de Etilo	60:40	358-387	FXVII	2834
Hexano:Acetato de Etilo	30:70	388-405	FXVIII	3118
Hexano:Acetato de Etilo	20:80	406-435	FXIX	4300
Acetato de Etilo	100	436-442	FXX	3013



Figura 7: Cromatografía en columna correspondiente al fraccionamiento primario del extracto hexánico.

5.5 AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN FI

De las fracciones 1-30 (FI) se aisló un aceite incoloro y translúcido como una mancha homogénea en CCF. Este aceite se analizó por cromatografía de gases/espectrometría de masas y RMN-¹H mostrando la presencia de varios componentes (Figuras 12 y 13).

5.6 AISLAMIENTO DEL KESSANO

Las fracciones 121-127 (100 mg, F-IV) se aplicaron en dos placas preparativas (hexano-acetato de etilo: 95-5%) (Figura 8), aislándose de la segunda banda menos polar, 25 mg de un compuesto semisólido a temperatura ambiente que tuvo las siguientes características físicas y espectroscópicas:

Kessano (27): $[\alpha]_D = -8.55$ (2.22 *c* EtOH), RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ_{-H} 0.79 (d, *J*= 6.8 Hz, CH₃-15), 1.12 (s, CH₃-16), 1.25 (s, CH₃-13 ó 14), 1.26 (s, CH₃-14 ó 13), 1.72 m, H-4), 1.95 (m, Ha-5), 1.34 (m, Hb-5), 2.08 (m, H-6), 2.0 (m, Ha-7), 1.04 (m, Hb-7), 1.5 (m, Ha-8), 1.38 (m, Hb-8), 1.7 (m, H-9), 2.05 (m, H-10), 1.84 (m, Ha-11), 1.55 (m, Hb-11),

2.14 (m, Ha-12), 1.56 (m, Hb-12). RMN¹³C (75 MHz) 18.5 (C-15), 28.2 (C-16), 28.4 (C-14), 31.1 (C-13), 35.8 (C-4), 74.02 (C-1), 74.95 (C-3), 33.3 (C-5), 32.9 (C-6), 32.1 (C-7), 28.2 (C-8), 35.8 (C-9), 41.5 (C-10), 34.8 (C-11), 24.2 (C-12).

EMIE (m/z, int rel): 222 (M⁺, 1.8), 189 (M⁺, 5.3), 161 (M⁺, 9.7), 149 (M⁺, 17.7), 126 (M⁺, 100), 108 (M⁺, 61), 81 (M⁺, 35.4), 69 (M⁺, 16.8), 67 (M⁺, 12.4), 43 (M⁺, 10.6).

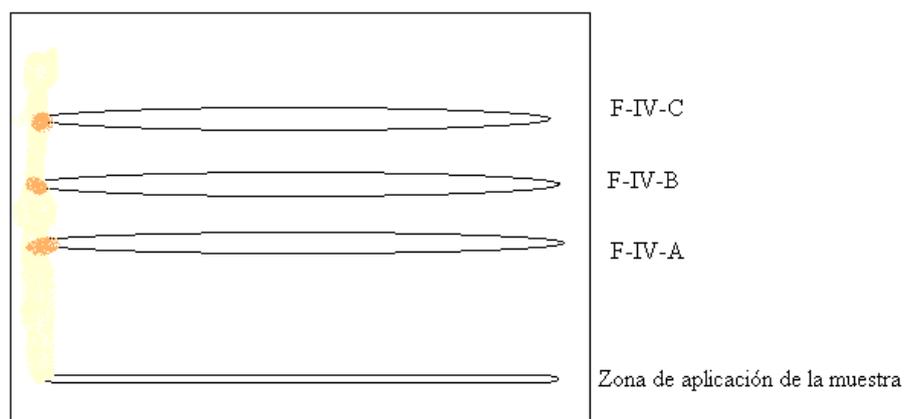


Figura 8: Esquema de la cromatoplaqueta preparativa empleada en la separación de F-IV-B

Asimismo, se realizó la determinación del índice de refracción del compuesto aislado en la USAI.

5.7 IDENTIFICACIÓN DEL XANTORRIZOL

De las fracciones 156 a 169 de la columna preparativa, se aisló un compuesto aceitoso de color amarillo pálido que se purificó por cromatografía en capa fina empleándose una mezcla de hexano: acetato de etilo (90:10, Rf=0.59) como disolvente de elución. Su estructura se elucidó comparándose los resultados de la espectroscopia en el infrarrojo y por RMN-¹H de ese compuesto con los de una muestra analítica obtenida en nuestro laboratorio en experimentos anteriores.

5.8 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN F-XII

De las fracciones 260 a 295 de la columna cromatográfica (hexano: acetato de etilo 80:20, F-XII) se aisló un aceite amarillento muy denso, que al ser analizado por CG-EM, mostró una mezcla de por lo menos cuatro componentes en mayor concentración que fueron caracterizados con base en la interpretación de sus espectros de masas como compuestos análogos del xantorizol).

5.9 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos realizados son determinación tóxica en el crustáceo *Artemia salina* Leach y determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica de la fracción FI.

5.9.1 DETERMINACIÓN TOXICA EN EL CRUSTÁCEO *Artemia salina* Leach

5.9.1.1 PREPARACIÓN DE LOS ORGANISMOS

Se preparó una solución de agua de mar comercial (38g de medio salino artificial por 1L de agua destilada) dentro de un recipiente de vidrio previamente acondicionado con una bomba de burbujeo de oxígeno, un termómetro y una lámpara. Se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach y se dejaron en maduración durante 48 horas a 28°C.

5.9.1.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE *Artemia salina* Leach.

20 mg de la fracción FI se disolvieron en 2 mL de hexano y 500, 50 y 5 µL se transfirieron independientemente a tres tubos de ensaye y se dejó evaporar el disolvente. Se colocó solución de agua de mar comercial a los tubos de ensaye (3 mL) y se colocaron 10 larvas de *Artemia salina* Leach a cada tubo aforándose a 5 mL, con lo que se obtuvieron concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/mL. Transcurridas 24 h se contaron los crustáceos vivos y los muertos (Teng, 1993).

La prueba con cada muestra se realizó por triplicado (Meyer, 1982 y McLaughlin, 1991). El resultado se expresó por medio de la CL_{50} calculada. Para la interpretación de los resultados, se considera que un extracto o fracción es tóxico para el crustáceo si presenta un valor de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ y en el caso de compuestos puros, un valor de $CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ indica toxicidad.

5.9.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DE LA FRACCIÓN FI

La actividad antibacteriana fue determinada mediante la concentración mínima inhibitoria empleando la técnica de dilución en agar (Rios, 1988). La fracción FI se disolvió en DMSO al 2% v/v para lograr obtener una concentración de 10 mg/mL. De esta solución mediante dilución se prepararon concentraciones de 1.5 a 400 $\mu\text{g/mL}$. El inóculo para cada microorganismo fue preparado de cultivos que contenían 10^8 UFC/mL, tomando de una dilución 1:20 una asada de microorganismos que estaba calibrada para contener 0.002mL, conteniendo finalmente 10^4 UFC. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 37°C. Se utilizó como estándar de referencia gentamicina (2.5-120 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma). Lo anterior se realizó por duplicado y los resultados se expresaron con base en la concentración mas baja de la fracción que produce un halo de inhibición, expresando los resultados como la MIC

En el ensayo de actividad antifúngica se realizó el método de dilución en agar utilizando cajas Petri de la marca Falcon (Rahalison,1994; Gadhi, 2001) la solución concentrada de la fracción FI y los compuestos de referencia (nistatina, Merck y miconazol, Sigma) fueron preparados por diluciones hasta llegar a concentraciones dentro del rango de 1.5-400 $\mu\text{g/mL}$ y de 1-128 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Los inóculos fueron: para *Candida albicans* de 10^5 células por mililitro y de 10^6 esporas por mililitro para hongos filamentosos los cuales se colocaron en agar sólido; la experimentación se realizó por duplicado incubándose a 29 °C y el crecimiento del hongo fue observado de manera independiente, primero en las placas control (sin fracción ni compuesto de referencia), después las placas con la fracción y compuestos de referencia a las 24, 48 y 72 horas dependiendo del periodo de incubación necesario para un crecimiento visible: 24 horas para *Candida albicans* y para *Aspergillus niger* y 72 horas para los dermatofitos.

5.10 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE XANTORRIZOL POR CLAE.

5.10.1 SELECCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO PARA LA VALIDACIÓN

Se ensayaron los siguientes compuestos de acuerdo a su parecido estructural con el xantorrizol:

- a) 2,5-dimetil-fenol
- b) 3,5-dimetil-fenol
- c) 2,4,6-trimetil-fenol
- d) 2,6-diterbutil-4-metil-fenol

5.10.2 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR

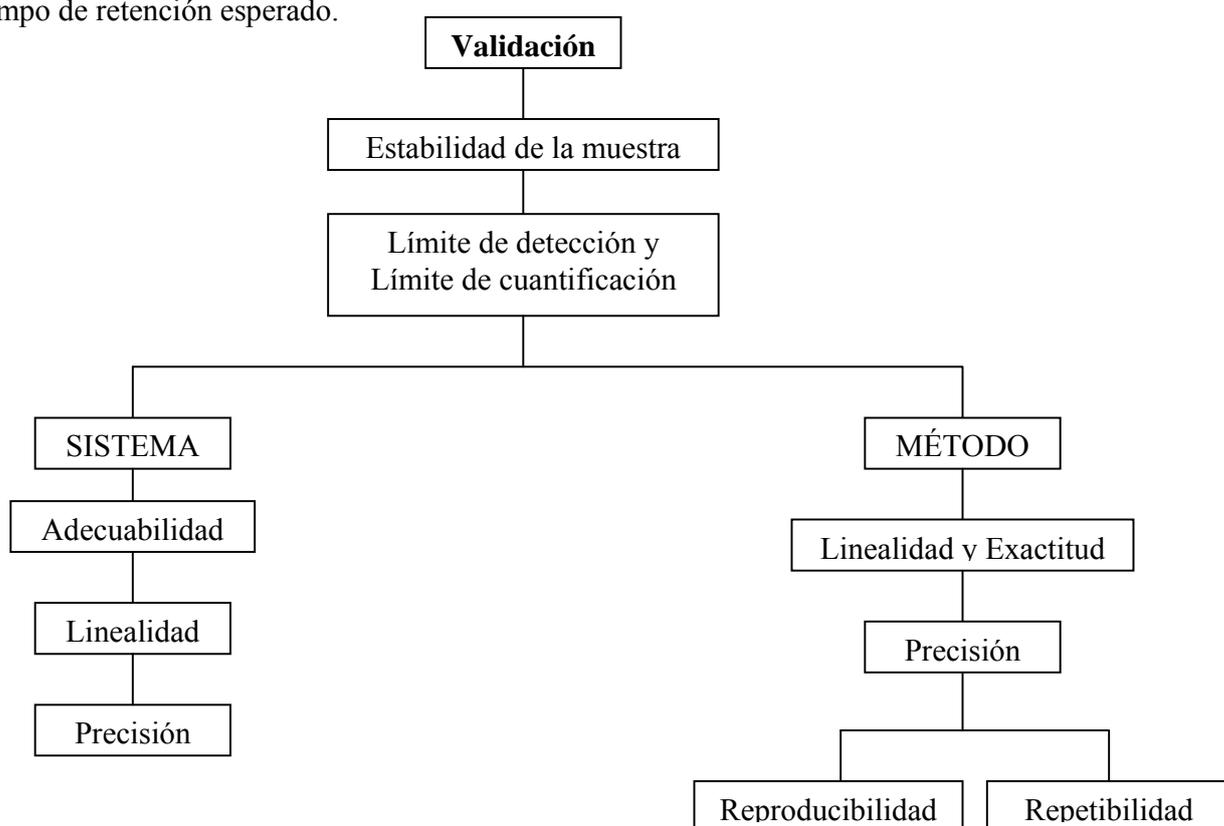
Se preparó una solución stock de xantorrizol conteniendo un miligramo por mililitro en metanol y por otra parte una solución stock de estándar interno con 2,6-diterbutil-4-metilfenol en una concentración de un mg/mL en metanol. Ambas soluciones fueron preparadas diariamente según su empleo.

5.11 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN AL 100% DE LA SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE XANTORRIZOL

Se prepararon soluciones de xantorrizol y estándar interno a partir de las soluciones estándar a distintas concentraciones, y cada una se inyectó al cromatógrafo de líquidos verificando sus respuestas con la finalidad de disminuir el ruido del equipo y que la relación de altura de pico entre el xantorrizol y el estándar interno fuera la misma y cercana a uno.

5.12 PLAN DE TRABAJO PARA LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA POR CLAE

En el esquema 1 se presenta el plan de trabajo para realizar la validación de la técnica analítica por CLAE para determinar la cantidad de xantorizol presente en la raíz de *Iostephane heterophylla*. Previo al desarrollo de la metodología para efectuar el plan de trabajo, se corrieron muestras tanto del extracto, del disolvente, del estándar interno y del compuesto que se utilizaría como referencia, para establecer las condiciones cromatográficas idóneas de trabajo. Así, el tiempo de retención del xantorizol se detectó como una señal simple aproximadamente a 3.7 min y el estándar interno a 5.3 min. Con el objetivo de verificar el tiempo de retención del xantorizol, una muestra del extracto metanólico fué co-inyectada con una cantidad conocida de xantorizol considerado como el de referencia, observándose el incremento en la intensidad de la respuesta cromatográfica al tiempo de retención esperado.



Esquema 1: Plan de trabajo para realizar la validación de la técnica analítica por CLAE para determinar la cantidad de xantorizol presente en la raíz de *Iostephane heterophylla*.

A continuación se describirán los parámetros analíticos para determinar la validación del método por CL. El volumen de inyección durante las determinaciones fue de 20 µL y los límites de las determinaciones se consideraron según lo establecido en la FEUM (2000) y en las Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional De Químicos Farmacéuticos Biólogos México (2002).

5.13 SENSIBILIDAD

En este apartado, se lograron obtener los valores para el límite de cuantificación y el límite de detección en el cromatógrafo con el que se trabajó y a las condiciones que resultaron ser las mas adecuadas para el ensayo. Esta determinación consta de los siguientes parámetros.

5.13.1 LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se obtuvieron con base en una curva de calibración, preparada a partir de siete concentraciones por triplicado (2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL) por dilución de la solución stock de xantorizol y adicionando a cada una de las soluciones el estándar interno en una concentración constante de 20 µg/mL.

Se calculó el valor de las pendientes, el intercepto (Y) y se determinó el coeficiente de determinación (r^2), para posteriormente obtener los límites (LD, LQ) con las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 * \frac{Desv.Std.Y}{m}$$

$$LQ = 10 * \frac{Desv.Std.Y}{m}$$

5.14 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Se inyectó por quintuplicado una solución conteniendo 50 µg/mL de xantorizol incluyendo el estándar interno en una concentración de 20 µg/mL. Se determinó el C.V., cuyo límite se establece en ser $\leq 2\%$.

En el cuadro 3 se muestran los parámetros y límites que deben ser tomados en cuenta para este apartado.

Cuadro 3: Parámetros y límites establecidos para la adecuabilidad del sistema en CLAE.

Parámetro	Límite
Factor de capacidad (K')	>2
Resolución (R)	>2
Retención Relativa (Rr)	----
Factor de Coleo (T)	>2
Número de platos teóricos (n)	----
Repetibilidad de inyección	$n \geq 5, C.V. \leq 2$

5.15 LINEALIDAD DEL SISTEMA

SOLUCIÓN ESTÁNDAR DE XANTORRIZOL

Se pesaron 10 mg de xantorizol en un matraz aforado de 10 mL y se llevó a volumen con metanol. De la solución *stock* se realizaron las diluciones pertinentes para obtener las siguientes concentraciones: 2, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL, en matraces volumétricos de 10 mL.

SOLUCIÓN STOCK DEL ESTÁNDAR INTERNO.

Se pesaron 10 mg de 2,6-diterbutil-4-metil-fenol y se llevó a volumen en un matraz aforado de 10 mL. Posteriormente, de este último matraz se tomaron alícuotas de 200 µL y se colocaron a cada una de las muestras mencionadas anteriormente de la curva de calibración.

Para cada punto de la curva, el límite del C.V. debe ser $\leq 2\%$ y el coeficiente de correlación (r^2) >0.98 .

En el cuadro 4 se muestran las soluciones empleadas para la curva de calibración de xantorizol, así como la relación de concentraciones involucradas en cada caso.

Cuadro 4: Soluciones empleadas para elaborar la curva de calibración de xantorizol.

Solución No.	Conc. Xant. (µg/mL)	Conc. Std. Int. (µg/mL)	Relación de Conc. (Xant./Std. Int)
1	2	20	0.1
2	5	20	0.25
3	10	20	0.5
4	25	20	1.25
5	50	20	2.5
6	75	20	3.75
7	100	20	5

5.16 PRECISIÓN DEL SISTEMA

Se preparó un sextuplicado de soluciones a una concentración de 50 µg/mL de la solución stock de Xantorizol, adicionando el estándar interno a una concentración de 20 µg/mL. El límite establecido es para un C.V. $\leq 2\%$.

5.17 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS (EXTRACTOS METANÓLICOS DE RAÍCES DE *Iostephane heterophylla*)

Los rizomas del material vegetal primeramente fueron ablandados con un martillo, posteriormente dicho material se molió en un mortero y el pulverizado obtenido se tamizó en una malla de 2 mm. Se pesaron 200 mg de este material en un tubo para centrifuga de 15 mL, adicionando 5 mL de MeOH y se sonicó por 15 min. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar por 10 min a 3500 rpm; el sobrenadante fue colocado en un matraz aforado de 25 mL. Esta metodología se realizó por triplicado con un mismo material vegetal obteniendo así un volumen de aproximadamente 15 mL de extracto. Se llevó a volumen con MeOH y se tomó 1 mL que se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, añadiéndose 200 μ L de la solución stock del estándar interno. Antes de inyectar las muestras se filtraron a través de los prefiltros.

5.18 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Para esta prueba, se sometieron de manera simultánea e independiente cuatro muestras del mismo extracto metanólico para almacenarse en las siguientes condiciones:

- ✓ Temperatura ambiente con luz
- ✓ Temperatura ambiente sin luz
- ✓ 4° C con luz
- ✓ 4° C obscuridad

La estabilidad de las mismas se analizó determinando la respuesta en el cromatógrafo de líquidos por triplicado para cada muestra a diferentes tiempos ($t = 0$ h, $t = 20$ h, $t = 45$ h, $t = 8$ d). Las especificaciones para este análisis fueron obteniendo un C.V. $\leq 2\%$.

- ✓ $|di| \leq 2\%$ (Anexo 1)

5.19 LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Se llevó a cabo mediante la cuantificación del recobro de una solución de una concentración conocida de solución *stock* de xantorrizol (25, 50, 75 $\mu\text{g/mL}$ que constituyen una por debajo y otra superior a la muestra considerada como la del 100% de la concentración) añadida a la raíz (200 mg) seca (al ambiente) después de haber sido extraída tres veces con 5 mL de metanol. Se analizaron tres muestras del lote 34430 independientemente y por triplicado, construyendo una curva de calibración con tres niveles con las concentraciones de la solución *stock* añadidas. Se calcularon los límites para el C.V. para cada punto de la curva que deben ser $\leq 2\%$

5.20 PRECISIÓN DEL MÉTODO

En este apartado resulta necesario analizar tanto la repetibilidad como la reproducibilidad.

5.20.1 REPETIBILIDAD

Estas determinaciones fueron realizadas con el lote 34430, mediante el recobro de la solución *stock* de xantorrizol añadida al material vegetal de la misma manera que se describió para “linealidad del método” ensayándose por triplicado y siguiendo la misma metodología de “preparación de la muestra”, y añadiendo los mismos tres diferentes niveles de concentración de la solución *stock* de xantorrizol (25, 50 y 75 $\mu\text{g/mL}$) construyéndose así una curva de calibración. Se determinó el C.V. para cada punto de la curva, siendo el límite aceptable $\leq 2\%$ y para el recobro un porcentaje entre 98 y 102.

5.20.2 REPRODUCIBILIDAD

La prueba se realizó siguiendo la metodología de “preparación de la muestra”, analizando por triplicado una muestra homogénea preparada a un nivel cercano al 100% en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Se determinó el C.V., cuyo límite es $\leq 2\%$.

5.21 CUANTIFICACIÓN DE XANTORRIZOL EN LA RAÍZ DE *Iostephane heterophylla*

Para determinar la cantidad de xantorrizol presente en la raíz de *Iostephane heterophylla*, se utilizó el método descrito en “preparación de la muestra” utilizando 11 lotes IH-34767, IH-34772, IH-34773, IH-34430, IH-34839, IH-34826, IH-7153, IH-26535, IH-11-0601, IH-11-0602 y IH-11-0603 además de un lote de *Iostephane madrensis* IM-34764 para demostrar que el xantorrizol es el compuesto marcador para la especie *heterophylla*.

Una vez procesadas las muestras fueron inyectadas al Cromatógrafo de Líquidos con las condiciones que se muestran en el cuadro 5:

Cuadro 5: Parámetros y condiciones establecidas para realizar la cuantificación.

PARÁMETRO	CONDICIÓN ESTABLECIDA
Longitud de onda del detector UV:	230nm
Volumen de inyección:	20 μ L
Tiempo de análisis:	6.5 min
Flujo:	1mL/min
Temperatura:	35°C +/- 2
Fase móvil	Acetonitrilo : agua (85:15)
Fase estacionaria	Columna C ₁₈ (Octadecil silano)

Los resultados obtenidos en el ensayo de “linealidad del sistema” fueron ajustados mediante la metodología descrita por Almeida y colaboradores (2002), para obtener la ecuación para calcular la concentración del xantorizol en cada uno de los lotes ensayados y posteriormente realizar el cálculo del xantorizol en la raíz de *Iostephane heterophylla*.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los objetivos del estudio de la raíz de *Iostephane heterophylla* fue la evaluación de la actividad antimicrobiana y toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach de compuestos adicionales a los previamente aislados para lo cual, se realizó el análisis químico del extracto hexánico.

6.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LA RAÍZ DE *Iostephane heterophylla*

Los rizomas fueron triturados usando un molino de cuchillas para extraer los compuestos presentes, mediante un proceso de maceración con hexano, del cual se obtuvieron 105 g.

El cromatograma de gases y los correspondientes espectros de masas obtenidos de los dos picos mayoritarios del extracto hexánico se muestran en la figuras 9, 10 y 11 los cuales comparados con datos obtenidos en nuestro laboratorio, señalaron que se trataba del xantorizol y del ácido traquilobanoico.

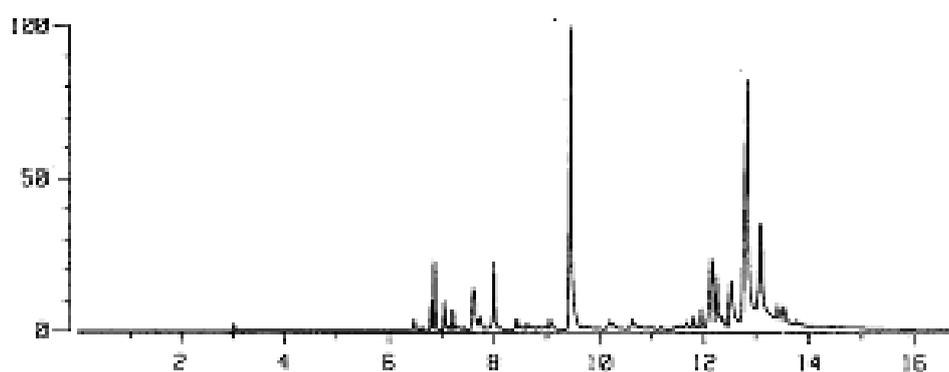


Figura 9: CG-EM del extracto hexánico de la raíz de *Iostephane heterophylla*.

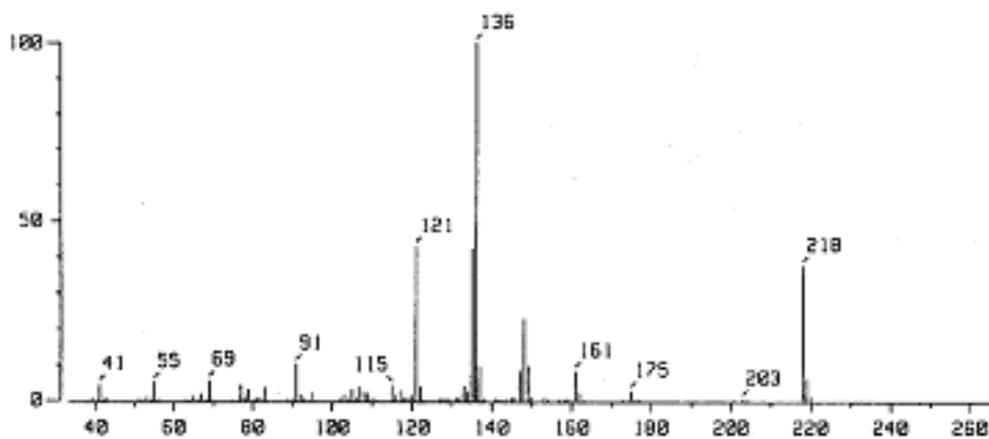


Figura10: Espectro de masas del xantorrizol (7)

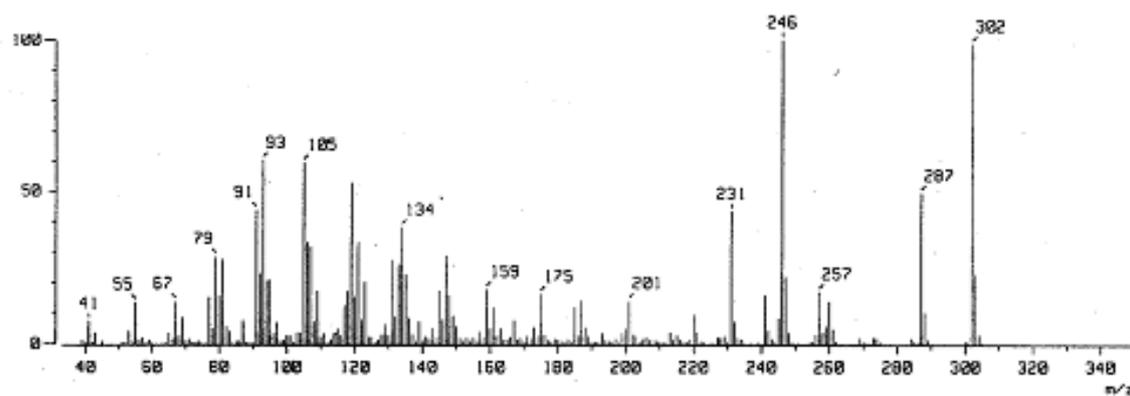


Figura 11: Espectro de masas del ácido traquilobanoico (I)

6.2 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS NO REPORTADOS ANTERIORMENTE EN LA ESPECIE

6.2.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE FI

De los 100g de extracto hexánico que se sometieron a fraccionamiento cromatográfico en columna se obtuvieron 442 fracciones de las cuales en la fracción FI (aparición aceitosa, translúcida y aromática) se encontró una mezcla de sesquiterpenoides de muy poca polaridad por elución con hexano 100% (no reportados aún en la literatura para esta planta) que no pudo separarse por los métodos cromatográficos convencionales.

El espectro de RMN ^1H (Figura 12) muestra señales a campo alto como singuletes en 1.04 , 1.56, 2.32 y 2.0 (doblete) ppm, correspondientes a hidrógenos de grupos metilo. De 0.8 a 2.8 aparecen señales múltiples de menor intensidad asignadas a grupos metileno y metino, algunos de tipo alílico y una señal doble en 7.07 ppm correspondiente a hidrógenos bencénicos. Adicionalmente se observa un grupo de señales entre 4.6 y 5.4, una parte de ellas (arriba de 5 ppm) correspondientes a dobles enlaces vinílicos en las moléculas.

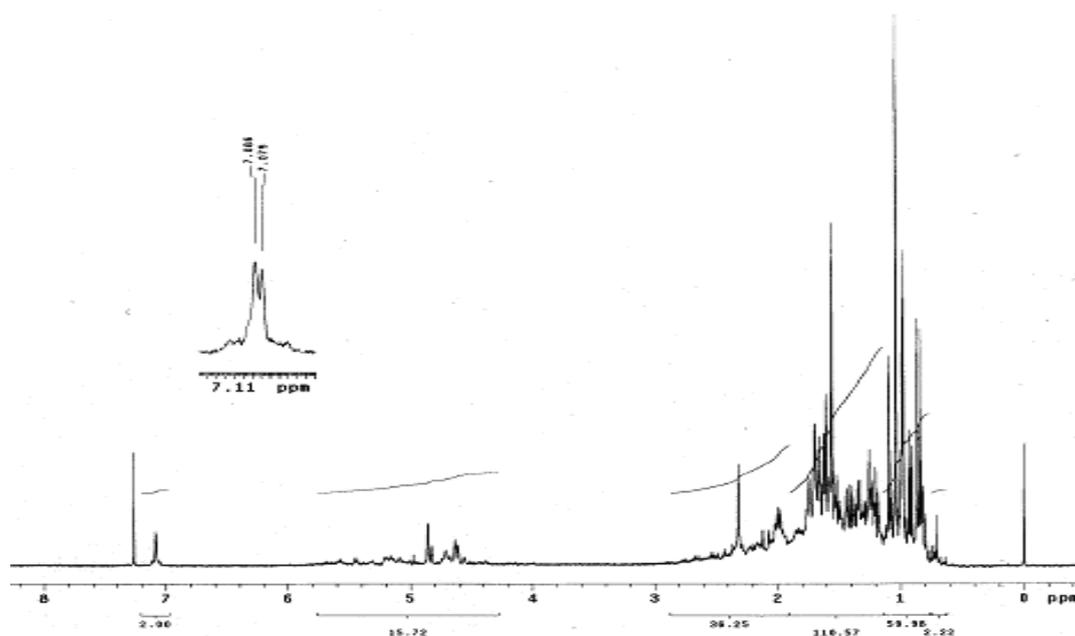


Figura 12: Espectro de RMN- ^1H de FI

El cromatograma de gases de FI, muestra la presencia de 11 compuestos de los cuales 8 presentan el mismo peso molecular de 204 (Figura 13) y cuya estructura puede relacionarse estructuralmente si se considera una mezcla compleja de sesquiterpenos con la fórmula molecular $C_{15}H_{28}$, acorde al peso molecular.

Las estructuras probables de los componentes de la fracción FI se elucidaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, comparando contra los compuestos de referencia localizados en la biblioteca del aparato. Estas estructuras concuerdan con lo analizado en el espectro de RMN- 1H . Las estructuras, peso molecular, nombres de los compuestos contenidos en la fracción (FI) y porcentaje de los mismos en la mezcla se muestran en el cuadro 6.

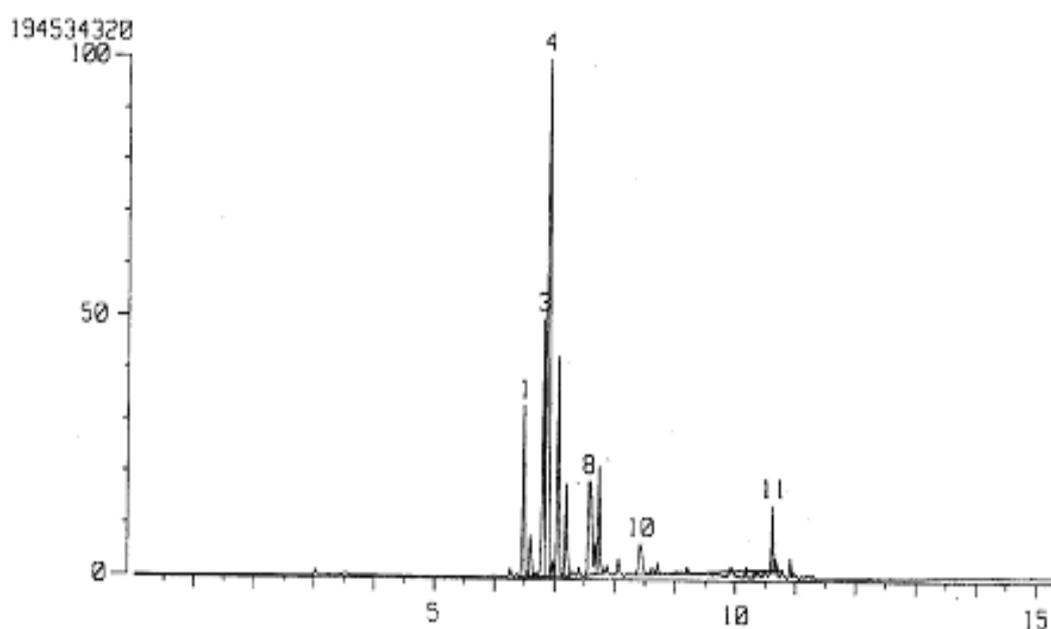
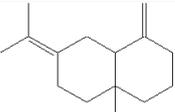
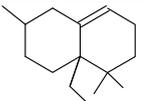
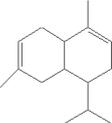
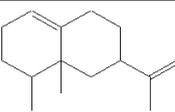
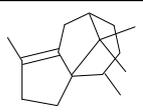
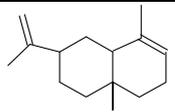
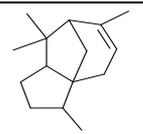
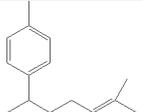
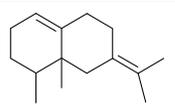
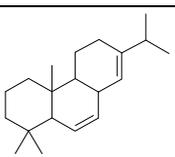


Figura 13: Cromatograma de gases de FI

Cuadro 6: Estructuras, nombres de los compuestos, peso molecular y porcentaje de los compuestos contenidos en la fracción (FI) (n.e.: no elucidado).

ESTRUCTURA	NOMBRE QUÍMICO	PESO MOLECULAR	% EN LA MEZCLA	TIEMPO DE RETENCIÓN
	4a-metil-1-metilen-7-(metiletiliden)- decahidro-naftaleno (17)	204	8.18	6.48
	2H-2,4a-etano-1,3,4,5,6,7-hexahidro-2,5,5-trimetil-naftaleno (18)	204	2.67	6.59
	4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-naftaleno (19)	204	14.80	6.81
	1,8a-dimetil-7-(1-metiletenil)-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftaleno (20)	204	36.53	6.89
	2,4,5,6,7,8-hexahidro-1,4,9,9-tetrametil-3H-3a-7-metanoazuleno (21)	204	0.74	6.97
	1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(1-metiletenil)-naftaleno (22)	204	13.48	7.05
	2,3,4,7,8,8a-hexahidro-1h-3a,7-metano-3,6,8,8-tetrametil-azuleno (23)	204	5.12	7.19
	1-(1,5-dimetil-4-hexenil)-4-metil-benceno (24)	202	11.54	7.57
	1,8a-dimetil-7-(metiletiliden)-1,2,3,5,6,8-hexahidro-naftaleno (25)	204	5.38	7.73
n.e.	n.e.	234	1.22	8.41
	13-isopropil-podocarpa-6,13-dieno (26)	272	0.33	10.62

6.2.2 OBTENCIÓN DEL KESSANO (27)

De la fracción F-IV se aisló y purificó mediante cromatografía en placa preparativa un aceite translúcido. La figura 14 muestra el cromatograma de gases del compuesto separado (F-IV-B) mediante placa preparativa y la figura 15, su espectro de masas que muestra un ión molecular de 222.

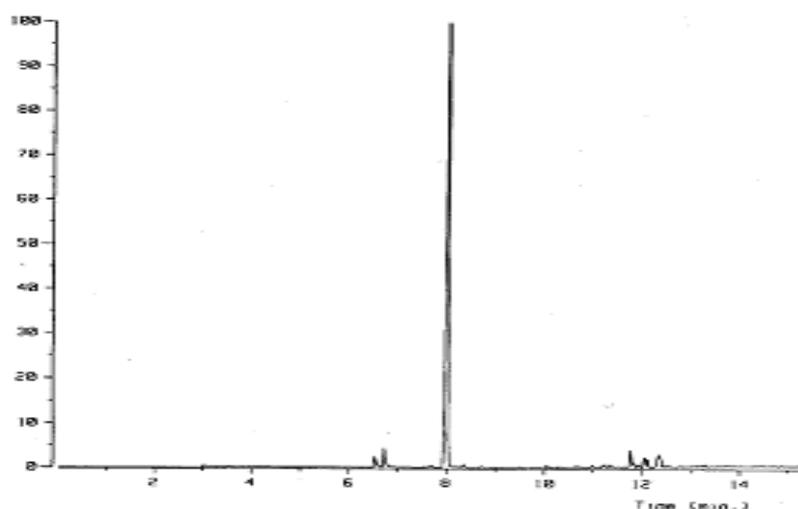


Figura 14: Cromatograma de gases -del compuesto separado mediante placa preparativa (F-IV-B)

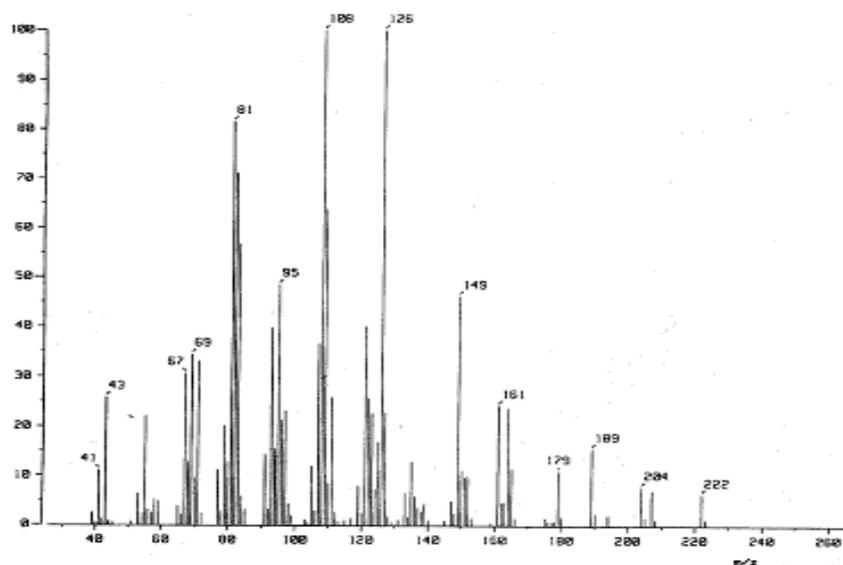


Figura 15: Espectro de masas del compuesto F-IV-B

El espectro en el IR del compuesto no mostró señales para grupos carbonilo ni oxhidrilo y presentó una banda intensa en 1129 (C-O). El espectro de RMN-¹H (Figura 16) de F-IV-B muestra señales en la zona de hidrógenos alifáticos entre 0.75 a 2.2 ppm. Una expansión de la zona entre 0.70 a 1.40 ppm (Figura 17) mostró señales en δ_{H} 0.79 (d, $J=6.8$ Hz, δ_{C} 18.5), δ_{H} 1.12 (s, δ_{C} 28.38), δ_{H} 1.25 (s, δ_{C} 28.24), δ_{H} 1.26 (s, δ_{C} 31.12) asignadas a tres metilos aislados y uno vecino a un grupo metino. Las señales en 1.25 y 1.26, deben pertenecer a metilos unidos a un carbono base oxígeno, lo que fue corroborado por el desplazamiento a campo bajo en el espectro de ¹³C de estas mismas señales. Sin embargo uno de los metilos restantes [δ_{H} 1.12 (s, δ_{C} 28.38)] también debe estar cercano en la molécula a un grupo electronegativo.

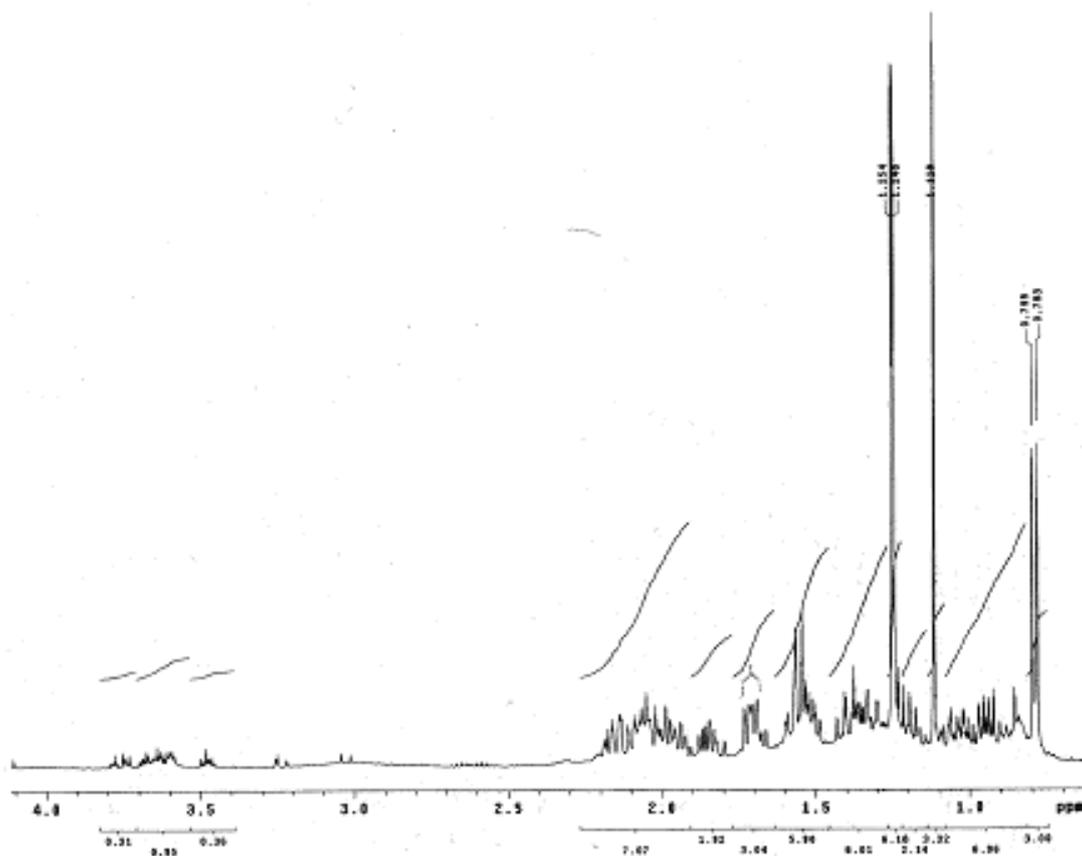


Figura 16. Espectro de RMN-¹H del compuesto F-IV-B.

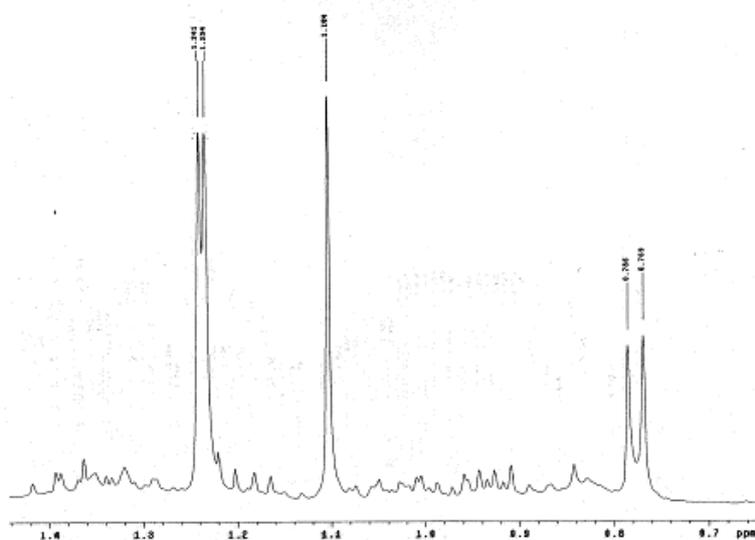


Figura 17. Expansión de la zona entre 0.7 y 1.4 ppm del espectro de RMN-¹H del compuesto F-IV-B.

El espectro de carbono 13 (figura 18) mostró quince señales; el espectro de ¹³C en su modalidad DEPT (figura 19) discriminó el tipo de carbonos y se encontraron 4 metilos, 5 metilenos, 4 metinos y el resto para 15 carbonos de la molécula deben pertenecer a carbonos cuaternarios mismos que se localizan en δ_{C} 74.02 y 74.95.

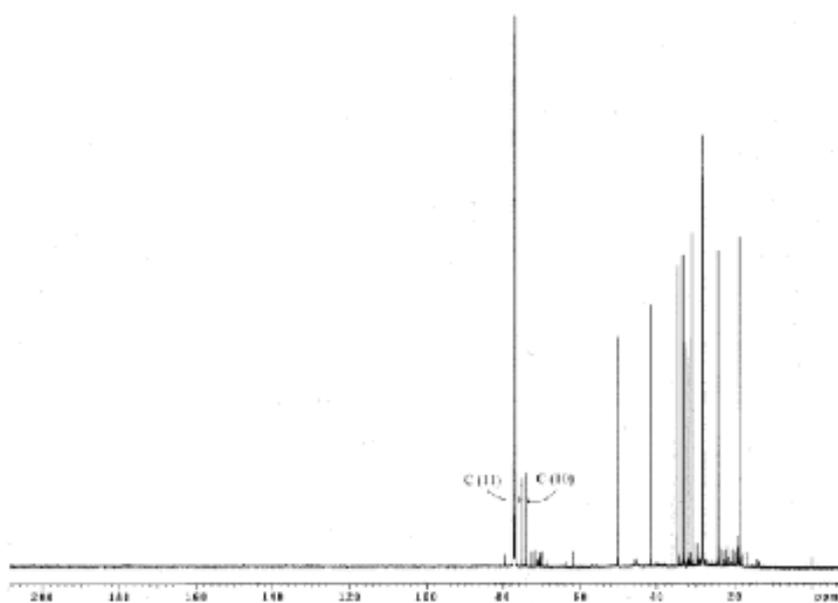


Figura 18. Espectro de ¹³C del compuesto F-IV-B.

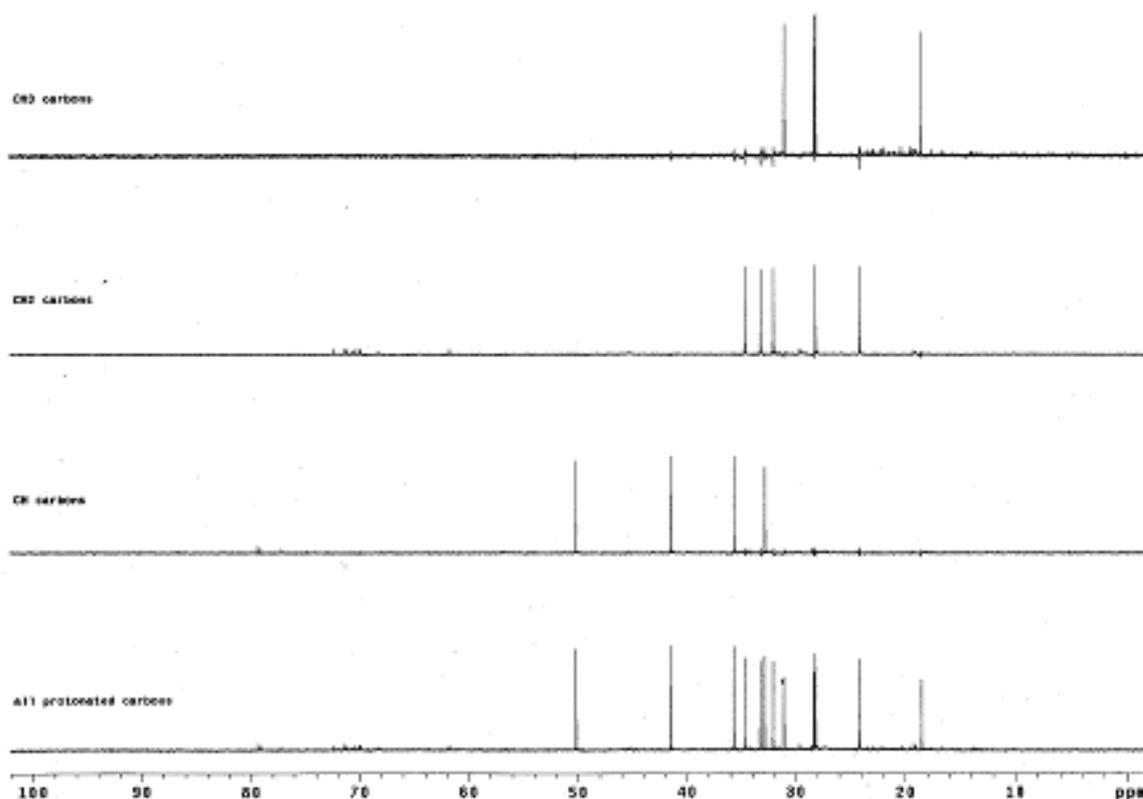
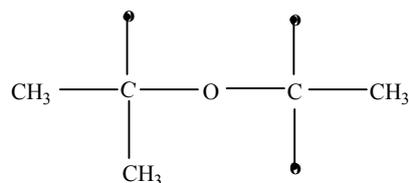
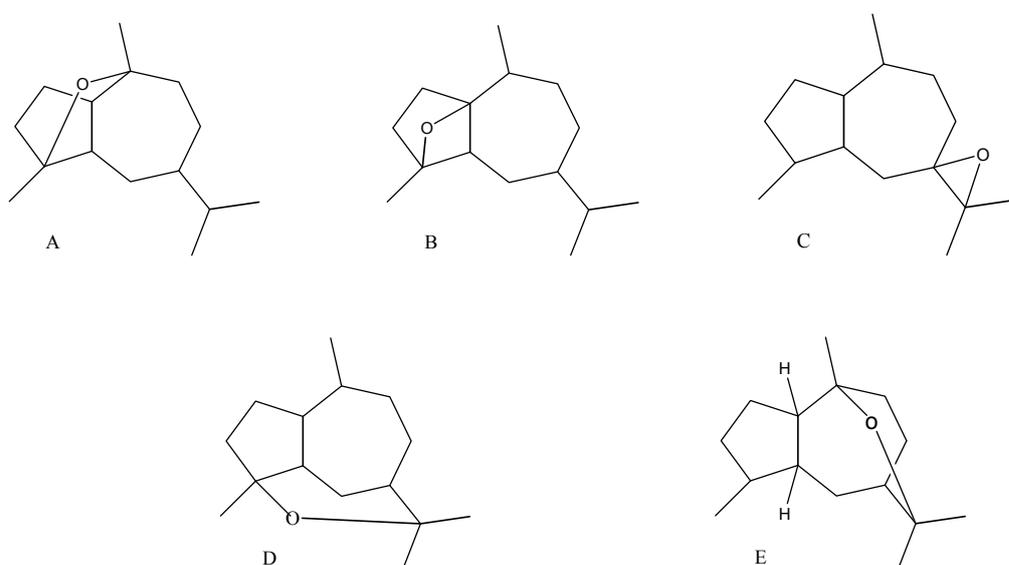


Figura 19: Espectro DEPT del compuesto F-IV-B.

Hasta este momento, el análisis espectroscópico permitió calcular un peso molecular de 206, pero como el ión molecular señaló un peso de 222, la diferencia constituye el peso de un átomo de oxígeno que debe estar localizado en un carbono cuaternario base de un grupo gem dimetilo (dado el desplazamiento químico de ese grupo: δ_H : 1.25 y 1.26) y ese mismo átomo de oxígeno debe estar unido al segundo carbono cuaternario base de otro grupo metilo (δ_H : 1.12). Por lo anterior, la molécula debe tener un residuo con el siguiente arreglo:



De acuerdo al peso molecular y a la fórmula molecular calculada, la estructura debe contener un índice de insaturación de 3. Como los espectros de RMN- ^1H y de carbono 13 no mostraron señales para grupos vinílicos o grupos carbonilo, las insaturaciones deben ser debidas a tres ciclos en la molécula: dos carbociclos fusionados entre sí y un heterociclo con un oxígeno. Con los datos anteriores se podría inferir para este compuesto una estructura de tipo terpenoide tricíclico con uno de los ciclos perteneciente al grupo epóxido mencionado. De acuerdo con esto, se tenían las siguientes posibilidades estructurales:



Las estructuras A y B se descartaron por la comparación de nuestros datos espectroscópicos con los reportados para esos compuestos; la del compuesto C también se descartó por presentar dos señales para metilo doblete y dos señales para metilo singulete siendo que en nuestro caso el espectro de RMN ^1H muestra tres señales de metilo singulete y una de doblete, además por estar las tres singulete de los metilos, desplazadas a campo bajo por interacción con un átomo electronegativo. Por otra parte, el espectro HSQC (Figura 20) permitió correlacionar las señales de hidrógeno a sus correspondientes carbonos y el espectro HMBC las señales de carbonos con hidrógenos a dos y tres ligaduras de distancia. Así, se correlacionó la señal para el metilo localizado en 1.12 ppm a tres ligaduras con la señal de un metino y también de un metileno (Figura 21) (Estructura E), y

con el carbono cuaternario en 74.02 ppm (Figura 22), quedando un fragmento en la molécula del siguiente tipo:

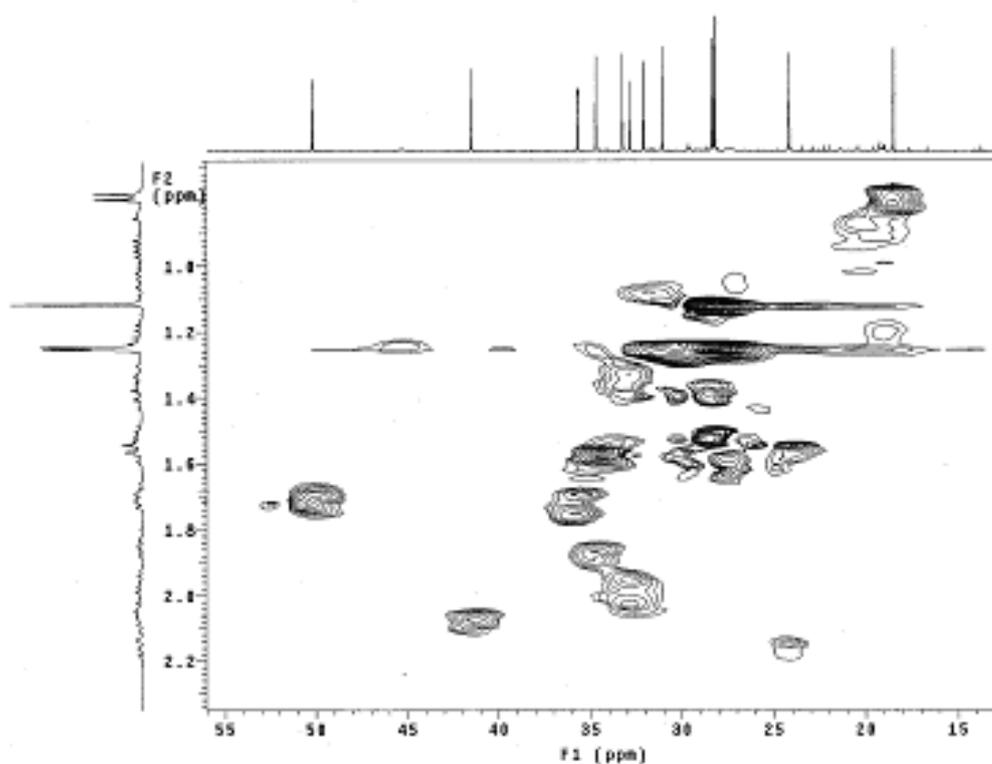
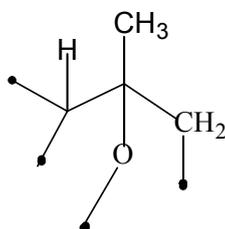
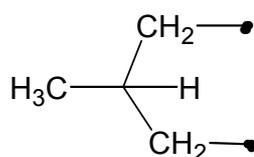


Figura 20: Espectro HSQC del compuesto F-IV-B.

Por otra parte, también en el espectro HMBC (Figura 21) se observa la correlación para el grupo metilo en 0.79 a dos y tres ligaduras con dos grupos metino y un metileno sugiriendo el siguiente arreglo en la molécula:



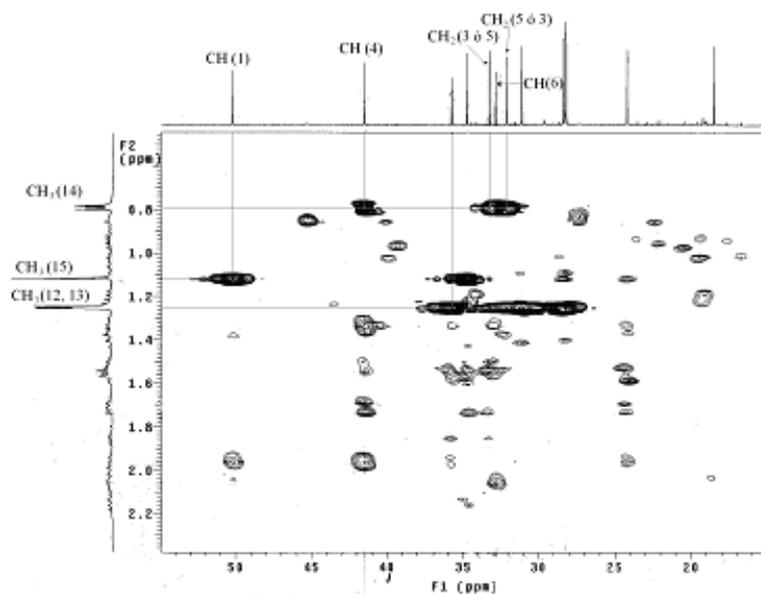


Figura 21: Espectro HMBC del compuesto FIVB (expansión).

Asimismo, en el espectro HMBC (Figura 22) también se observa la correlación para el grupo gem dimetilo en 1.25 y 1.26 a dos ligaduras con el carbono cuaternario en 74.95 ppm.

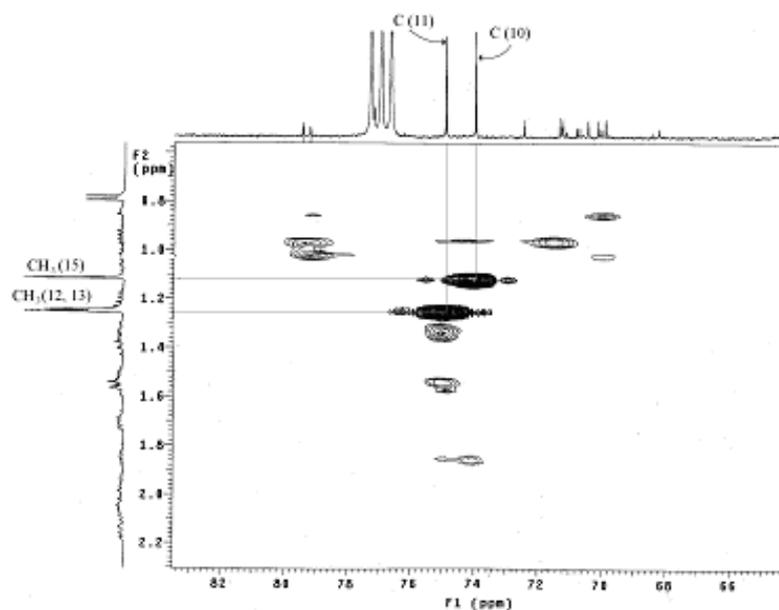


Figura 22. HMBC del compuesto FIVB (expansión).

Las evidencias espectroscópicas anteriores permiten proponer para el compuesto F-IV-B (27) la estructura E (Figura 23), 1H-ciclopenta[C]oxepina-octahidro-1,3,3,6-tetrametil-1,4-etano (kessano)

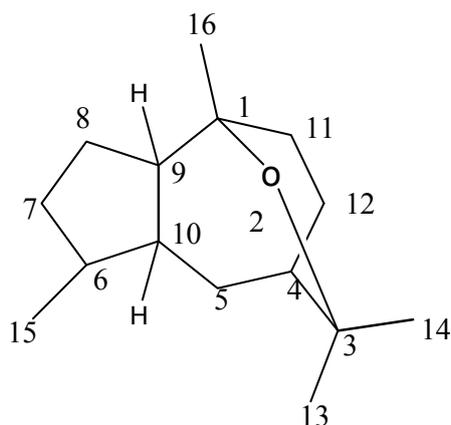


Figura 23. Estructura del Kessano (27).

De acuerdo a la literatura, únicamente se han aislado 4 derivados con esqueleto del guayano por aislamiento de productos naturales, análogos al encontrado en este trabajo.

6.2.3 IDENTIFICACIÓN DEL XANTORRIZOL (7)

Se llevó a cabo por cromatografía en capa fina, comparándose con una muestra analítica obtenida en nuestro laboratorio. En la Figura 25 se puede observar la cromatografía en capa fina realizada ($R_f=0.59$).



Figura 24: Cromatografía en capa fina del extracto hexánico con referencia de xantorrizol.

La pureza del xantorrizol se comprobó mediante sus características espectroscópicas (IR y RMN- ^1H) y espectrométricas por CG-EM. En las figuras 25, 26 y 27 se pueden observar dichos espectros.

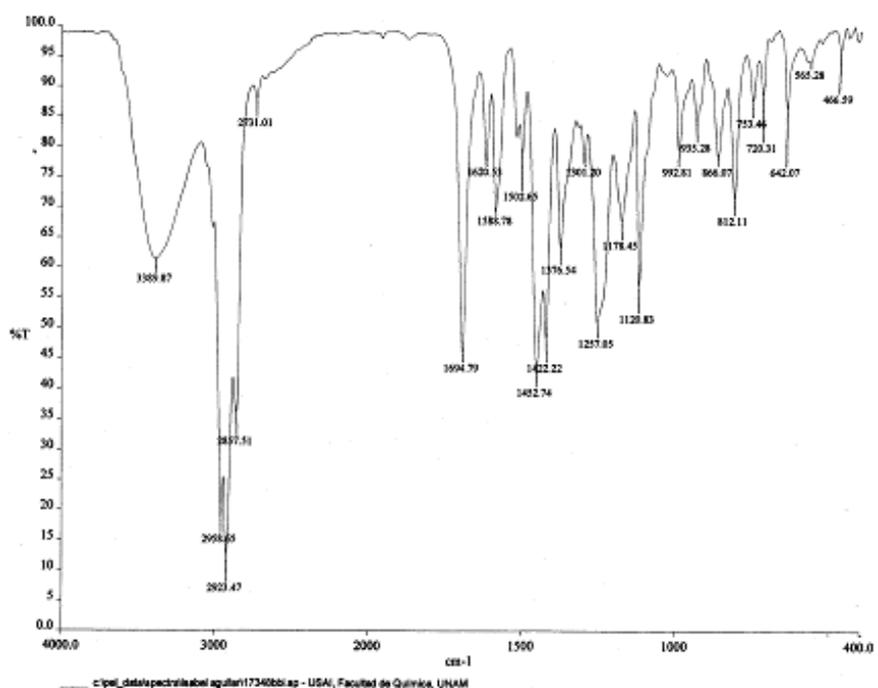


Figura 25: Espectro IR para xantorrizol.

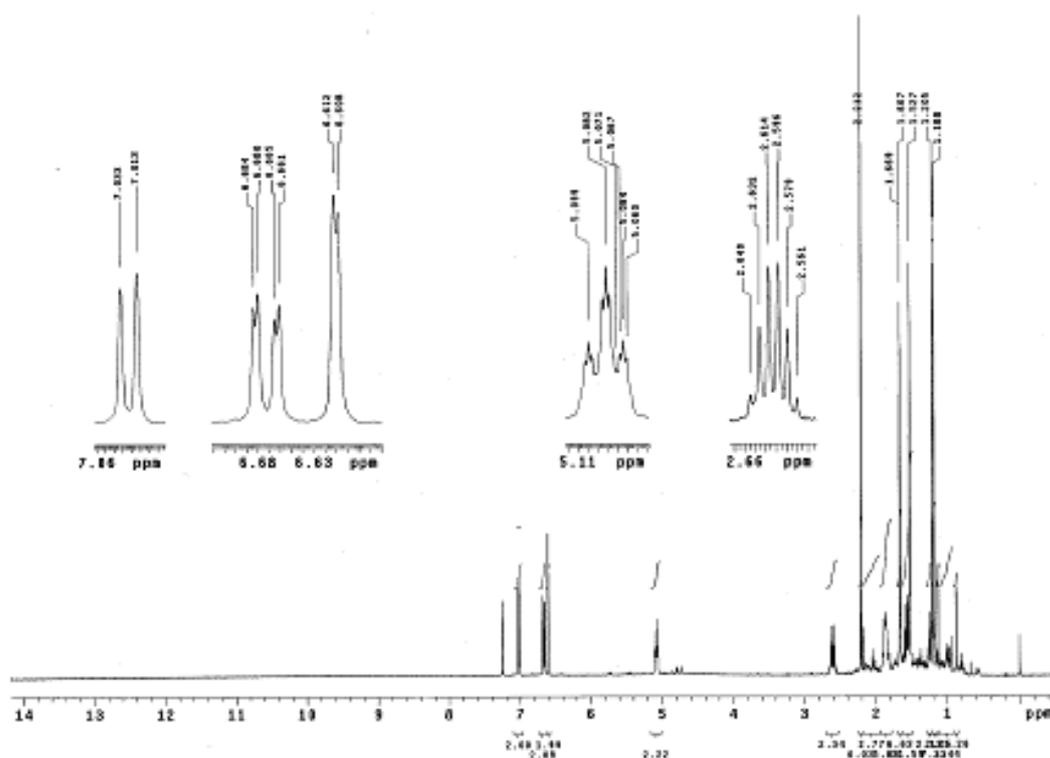


Figura 26: Espectro de RMN-¹H del xantorrizol.

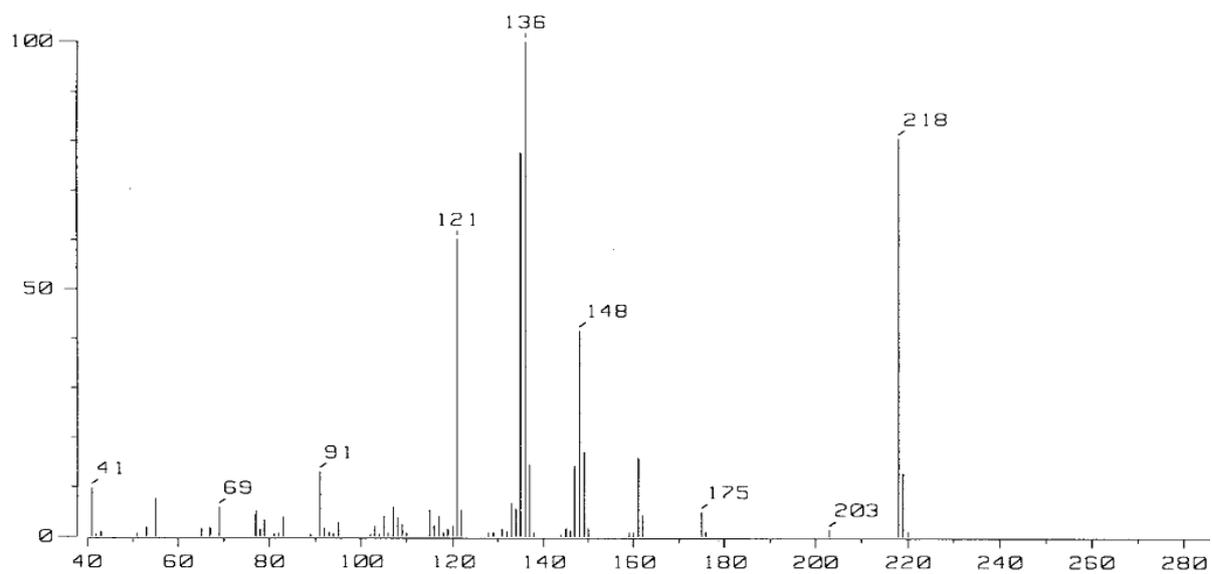


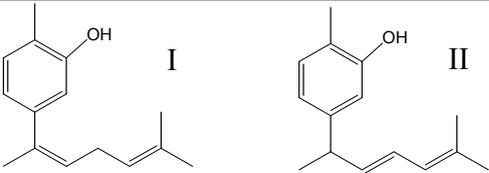
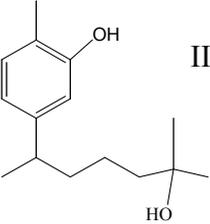
Figura 27: Espectro de masas del xantorrizol.

6.2.4 ANALISIS DE LA FRACCIÓN FXII

Esta fracción se analizó por cromatografía de gases espectrometría de masas (Figura 28). El cromatograma muestra la presencia de cuatro compuestos en cuya fragmentación molecular se observa en todos los casos picos característicos del xantorrizol con picos base en m/z 135 y 148 correspondientes en el primer caso al rompimiento bencílico de una cadena lateral C_8 isoprenoide y por la eliminación de un residuo C_5 isoprenoide en el segundo (Figura 29) (Rimpler, 1970), por lo que es de suponer que poseen una estructura molecular parecida. Dos de los compuestos (I y II, Cuadro 7) presentan un peso molecular de 216 (t_R 9.66 y 10.12 min, Figs. 30 y 31), siendo dos unidades menores al xantorrizol lo cual significa que puede existir una insaturación adicional en dichas moléculas; el tercer compuesto (III) con peso molecular de 236 (t_R 10.31 min, Fig. 32) sugiere la presencia de un oxígeno adicional al existente en la molécula del xantorrizol y finalmente el compuesto IV con peso molecular de 272 (Fig. 33) en el que dentro del mismo esqueleto del xantorrizol, podrían existir cuatro funciones oxigenadas. Las estructuras propuestas se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7 Posibles estructuras de los compuestos presentes en la fracción FXII.

(n. i. = no identificado)

Estructura propuesta	Peso molecular
 <p>I II</p>	216
 <p>III</p>	236
n. i.	272

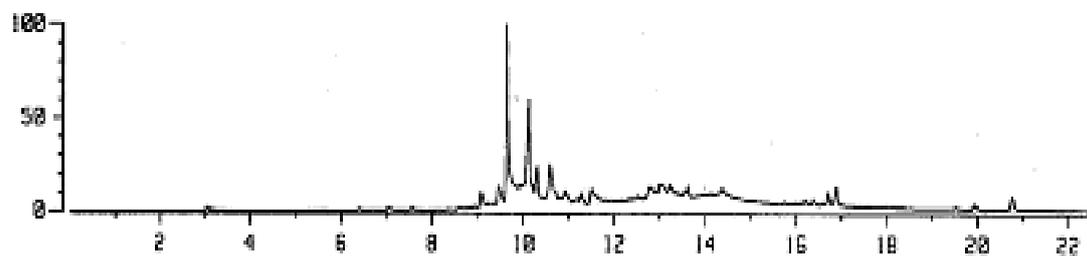


Figura 28. Cromatograma de gases de la fracción XII.

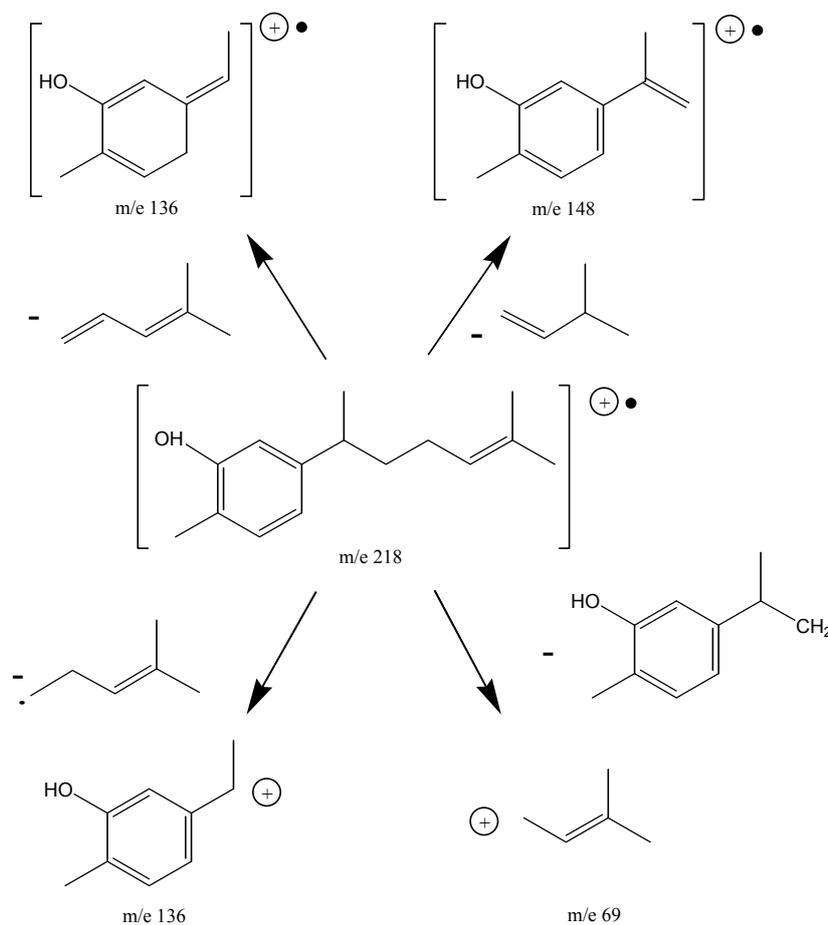


Figura 29. Patrón de fragmentación del xantorrizol en espectrometría de masas.

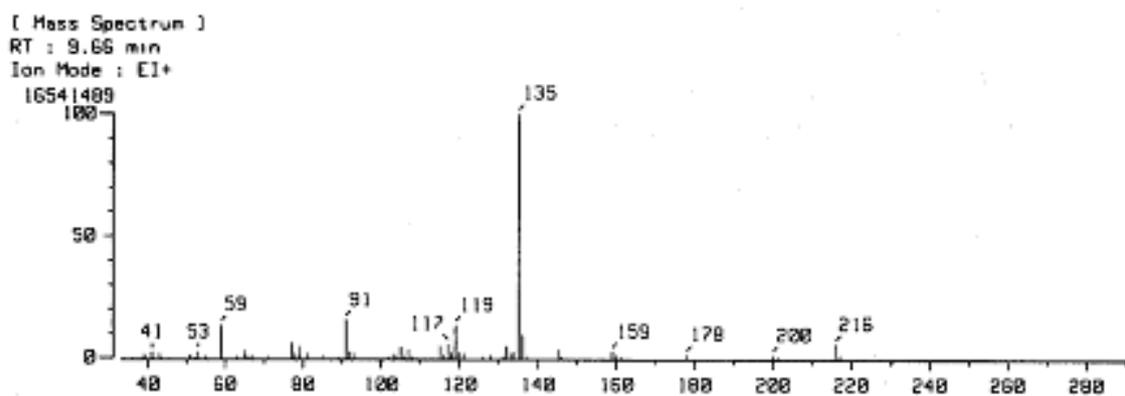


Figura 30. Espectro de masas del probable compuesto I (o II).

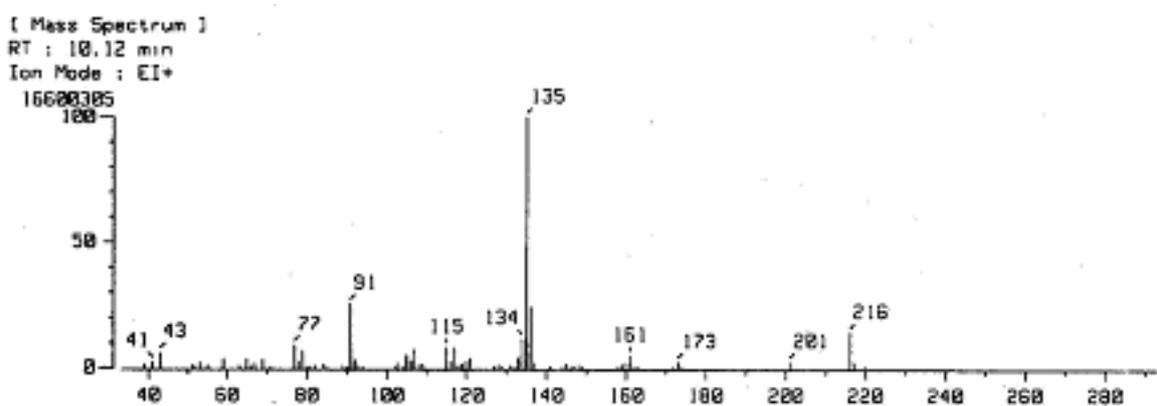


Figura 31. Espectro de masas del probable compuesto II (o I).

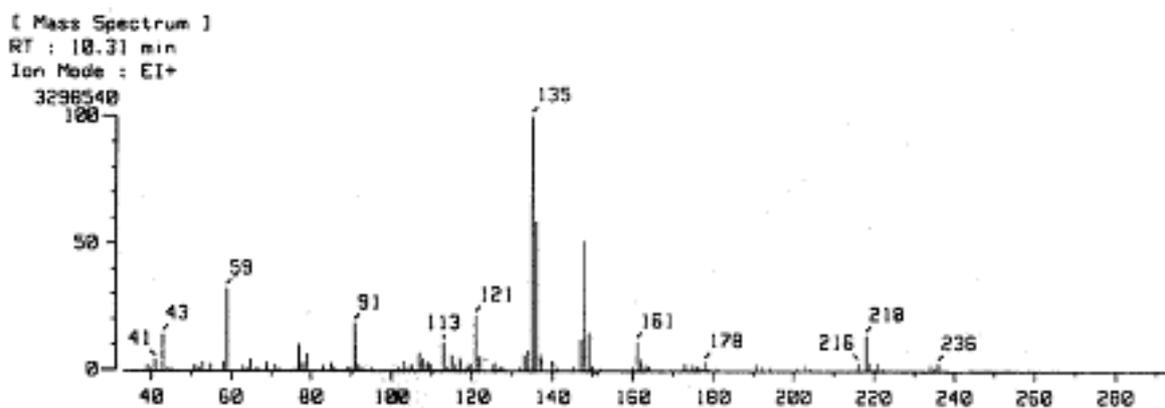


Figura 32. Espectro de masas del probable compuesto III.

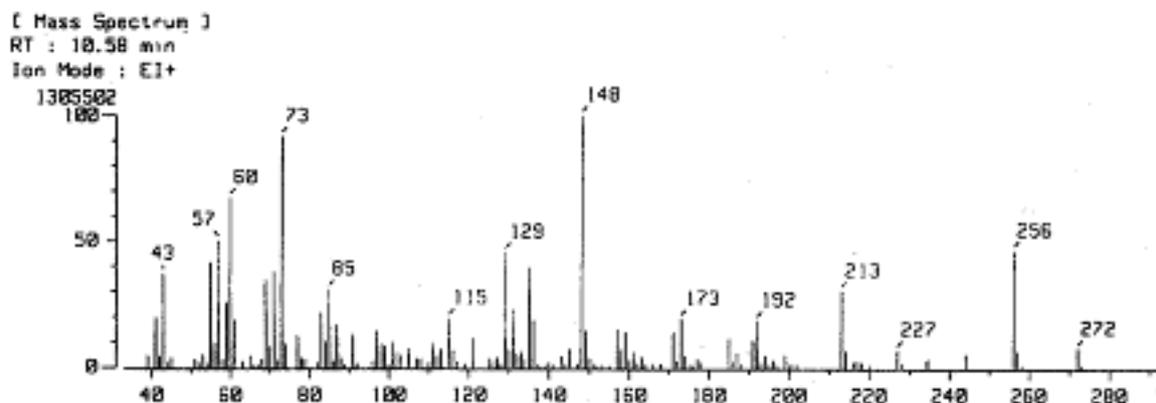


Figura 33. Espectro de masas de un compuesto (IV) con peso molecular 272.

6.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS

6.3.1 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LA FRACCIÓN FI AL CRUSTÁCEO *Artemia salina* Leach

La prueba de toxicidad a *Artemia salina* Leach no es específica para determinar alguna acción biológica particular, sin embargo en la literatura existen antecedentes de casos en los cuales se ha observado una correlación significativa de actividad con compuestos citotóxicos (Anderson, 1991; Meyer, 1982; Sam 1993).

La fracción FI presentó una CL_{50} de 63 ppm, la cual es considerada actividad tóxica al crustáceo, lo cual indica que esta fracción contiene compuestos bioactivos.

6.3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA FRACCIÓN FI

La prueba de actividad antimicrobiana mostró que la fracción FI (aceite) presenta actividad moderada ante los microorganismos *E. aureus*, *E. faecalis*, *T. mentagrophytes*, y *T. rubrum*, como se puede observar en el cuadro 8; la mayor actividad fue presentada ante *T. rubrum*.

Cuadro 8. Actividad antimicrobiana del aceite expresada en CMI ($\mu\text{g/mL}$)

NP: no ensayado

Muestra	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>E. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>C. albicans</i>	<i>T. mentag.</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>A. niger</i>
Aceite	200	200	>400	>400	>400	200	100	400
Gentamicina	4	4	8	8	NP	NP*	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	4	4	8
Nistatina	NP	NP	NP	NP	8	NP	NP	NP

Como puede observarse, la potencia antimicrobiana del aceite es relativamente baja, pero puede servir de referencia para justificar una vez más el uso tradicional de la planta en el tratamiento de heridas y úlceras en la piel, ya que ésta coincide con la actividad del resto de los componentes aislados y probados previamente, siendo el xantorizol (mayoritario) uno de ellos.

6.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO CLAE PARA LA CUANTIFICACIÓN DE XANTORRIZOL EN MUESTRAS DE *I. heterophylla*.

6.4.1 SELECCIÓN DEL COMPUESTO UTILIZADO COMO ESTÁNDAR INTERNO

Para cuantificar el compuesto marcador de la especie, y dado que este no es accesible comercialmente fue necesario utilizar un estándar interno comercial con un grado de pureza analítica correspondiente a un compuesto con características estructurales similares a las del compuesto de interés. Para esto fue ensayada la respuesta cromatográfica de un grupo de compuestos de los cuales el 2,6-diterbutil-4-metilfenol reunió las características necesarias y además posee un tiempo de retención cercano al del xantorizol.

La separación por CL de la mezcla del estándar interno con el xantorizol se muestra en la figura 34, siendo el tiempo de retención del xantorizol de 3.7 min y 5.3 del estándar interno.

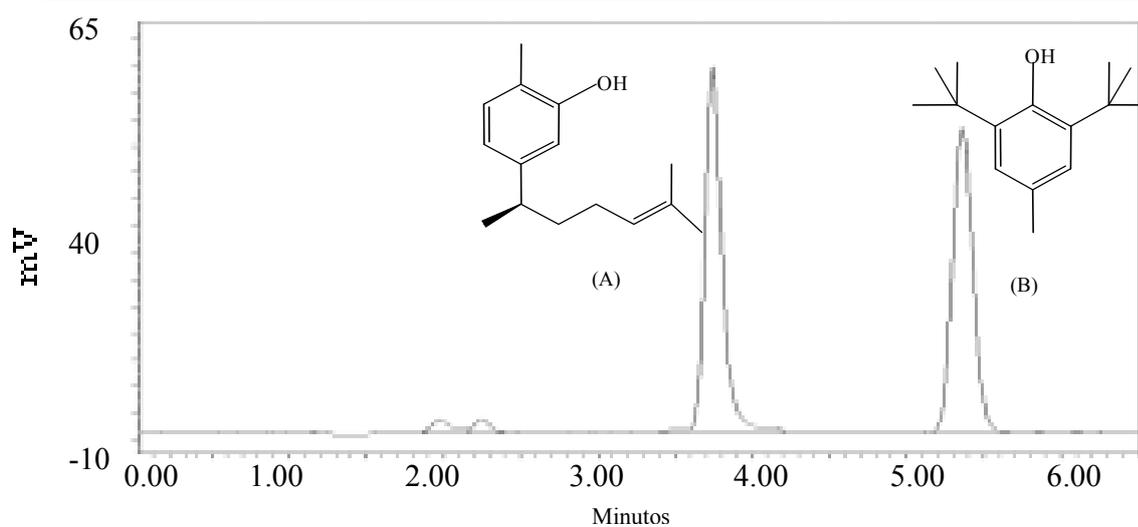


Figura 34: Cromatograma que muestra los tiempos de retención y estructuras del xantorrizol (A) y del estándar interno (B).

6.5 OBTENCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL ESTÁNDAR DE XANTORRIZOL AL 100%

Se prepararon soluciones independientes con distintas concentraciones de xantorrizol y de estándar interno las cuales fueron ensayadas por CL para optimizar tanto su respuesta como la forma del cromatograma. La solución correspondiente al 100% de la concentración resultó ser la que contenía 50 $\mu\text{g/mL}$ para el xantorrizol y de 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35) para el estándar interno.

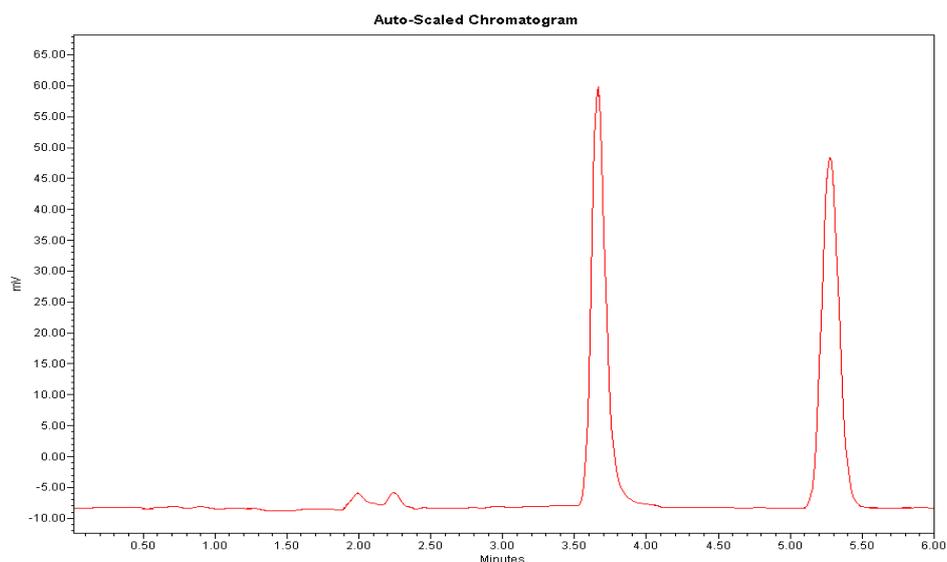


Figura 35: Cromatograma obtenido de la solución de xantorrizol al 100% mediante CLAE.

La validación del método incluyó una fase de prevalidación donde las condiciones de trabajo óptimas fueron establecidas para el desarrollo de la técnica por CL para la solución del estándar interno y de la solución extraída de la raíz de *I. heterophylla*; los factores de respuesta fueron determinados.

Para validar el método por CL se calcularon los siguientes parámetros analíticos.

6.6 SENSIBILIDAD

Para esta prueba se obtuvo una curva de calibración por triplicado con siete niveles de concentración preparadas a partir de las soluciones estándar, conservando constante en todas ellas la concentración del estándar interno, para obtener las pendientes y las ordenadas al origen.

Esta prueba se visualiza mediante los resultados obtenidos para LD y LQ.

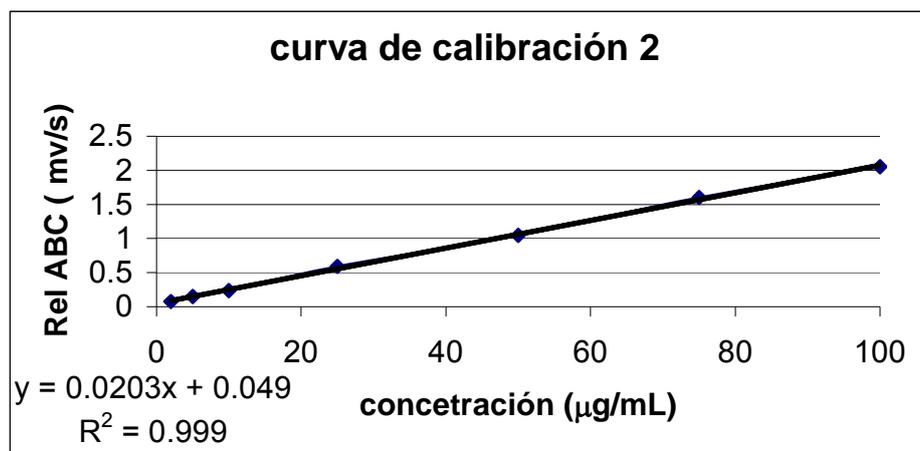
6.6.1 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Los valores de los límites de detección y cuantificación se obtuvieron por la relación señal a ruido de 3 y 10 respectivamente. Mediante la obtención de curvas de calibración.

Los resultados obtenidos para estas determinaciones se muestran en los cuadros 9, 10, 11 y gráfica 1. Las graficas de las tres curvas pueden observarse en el anexo 2.

Cuadro 9: Relación de áreas obtenidas en la curva de calibración y su C. V.

Concentración	Curva 1	Curva 2	Curva 3	C. V.
	a xan/a std	a xan/a std	a xan/a std	
2	0.0767	0.0781	0.0781	1.80
5	0.1478	0.1482	0.1481	1.35
10	0.2396	0.2374	0.2327	1.67
25	0.5924	0.5906	0.6017	1.90
50	1.0487	1.0461	1.0383	1.63
75	1.6142	1.6026	1.5951	0.27
100	2.0692	2.0527	2.0555	0.18



Grafica 1: Curva de Calibración 2 para obtener LD y LQ.

Cuadro 10: Valores de pendientes y ordenadas al origen para cada curva.

intercepto de Y 1	0.0473	Pendiente1	0.0204
intercepto de Y 2	0.049	Pendiente2	0.0203
intercepto de Y 3	0.0491	Pendiente3	0.0202
Desviación estándar	0.001011599	Promedio	0.0203

Cuadro 11: LD y LQ obtenidos experimentalmente.

Limite de detección	0.164447192
Limite de cuantificación	0.498324824

6.7 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Utilizando los cromatogramas obtenidos por la inyección al cromatógrafo de la solución de trabajo, se calcularon todos los parámetros requeridos en este apartado los cuales pueden apreciarse en el cuadro 12 (datos experimentales) y en el cuadro 13 (resultados obtenidos), según lo establecido en la FEUM (2000) y se realizó el análisis estadístico utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos.

Cuadro 12: Datos experimentales de Adecuabilidad del Sistema.

Muestra	t xantorizol	t Std. Int.	Rel. Areas (Axan/AStd.Int.)	to	W1	W2	W0.05	f
1	3.667	5.187	1.2347459	1.703	0.58	0.6	0.26	0.1123
2	3.671	5.297	1.21402452	1.7	0.57	0.56	0.2452	0.1049
3	3.705	5.314	1.20286236	1.714	0.61	0.55	0.2699	0.0992
4	3.757	5.392	1.20210049	1.725	0.61	0.6	0.2525	0.098
5	3.742	5.473	1.20097388	1.711	0.57	0.54	0.2458	0.0981

Cuadro 13: Parámetros requeridos para la adecuabilidad del sistema; resultados y límites.

Parámetro	Resultados obtenidos	Límites
to	1.7106	-----
t1	3.7084	-----
t2	5.3326	-----
k'	2.1173	> 2
R	2.8099	> 2
Rr	1.8128	-----
T	0.0128	≤ 2
N	637.9945	-----

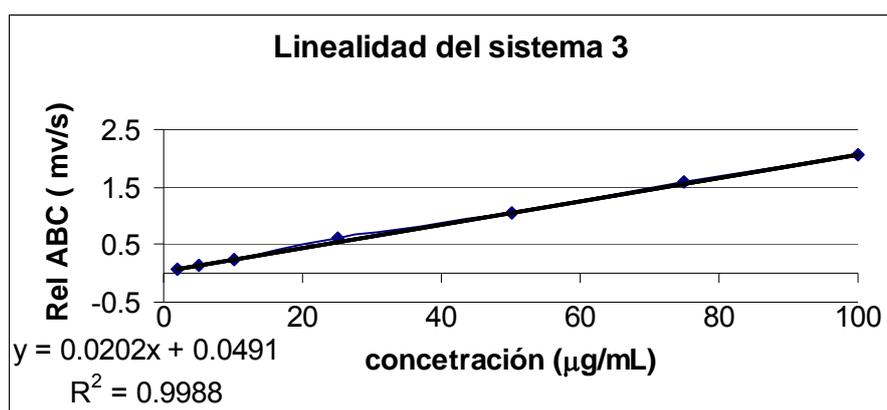
6.8 LINEALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar este parámetro, se realizó una curva de calibración por triplicado tal y como se indicó en la metodología. En los cuadros 14 y 15, y en la gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos. Se realizó el análisis estadístico de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002) utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos.

Las gráficas de las tres curvas realizadas se pueden observar en el anexo 3.

Cuadro 14: Relación de áreas obtenidas, C. V. para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema.

Concentración	(a xan/a std)1	(a xan/a std)2	(a xan/a std)3	Promedio	Desv. Std.	C.V.
2	0.076773675	0.0782	0.07815252	0.0777	0.0008	1.0339
5	0.147857175	0.148209309	0.148124958	0.1481	0.0002	0.1242
10	0.239605046	0.237445259	0.232751194	0.2366	0.0035	1.4810
25	0.592423477	0.590633369	0.601798182	0.5950	0.0060	1.0079
50	1.048747061	1.046170124	1.038319422	1.0444	0.0054	0.5201
75	1.614216069	1.602659457	1.595159283	1.6040	0.0096	0.5985
100	2.06928407	2.052761402	2.055506753	2.0592	0.0089	0.4300



Grafica 2: Curva experimental para determinar la linealidad del sistema.

Cuadro 15: C.V de pendientes para linealidad del sistema.

Pendiente 1	Pendiente 2	Pendiente 3	Promedio	Desv. Std.	C.V.
0.0204	0.0203	0.0202	0.0203	0.0001	0.49

6.9 PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión en un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados individuales, calculando la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los límites establecidos por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos son:

C. V. $\leq 2\%$ para métodos cromatográficos

El cuadro 16 muestra los resultados para este apartado. Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos.

Cuadro 16: Resultados; C. V. obtenido de las 6 inyecciones realizadas en precisión del sistema.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Relación de Areas (A xan/A Std. Int.)
1	50	0.9422
2	50	0.9667
3	50	0.9855
4	50	0.9762
5	50	0.9805
6	50	0.9763
Promedio		0.9712
Desv. Std.		0.0155
C. V.		1.5967

6.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Esta prueba debe ser evaluada después de la preparación de la muestra para tomar en cuenta los posibles cambios que pueda sufrir la solución durante determinado tiempo.

En el cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos para esta prueba, donde se aprecia que sólo hasta las 45 horas de preparada la muestra y almacenada en cualquiera de estas condiciones (ya que ninguna afecta su composición) resulta confiable evaluarla.

Cuadro 17: Relación de áreas y C. V. obtenidos en la Estabilidad de la Muestra.

Condición de Almacenaje	Rel. Areas al inicio (AXant./AStd.Int.)	Rel. Areas 20 h. (AXant./AStd.Int.)	Rel. Areas 45 h. (AXant./AStd.Int.)	Rel. Areas 8d. (AXant./AStd.Int.)
Temp. Amb. con luz	0.471278705	0.465673761	0.464313326	0.396638623
Temp.Amb. sin luz	0.468845201	0.463767029	0.468313984	0.392668803
4°C con luz	0.469586222	0.475148736	0.470750238	0.410999453
4°C sin luz	0.479556245	0.46699512	0.476629012	0.371355744
C.V.	1.04	1.07	1.09	4.2
Idi	0	0.44	0.23	7.94

6.11 LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

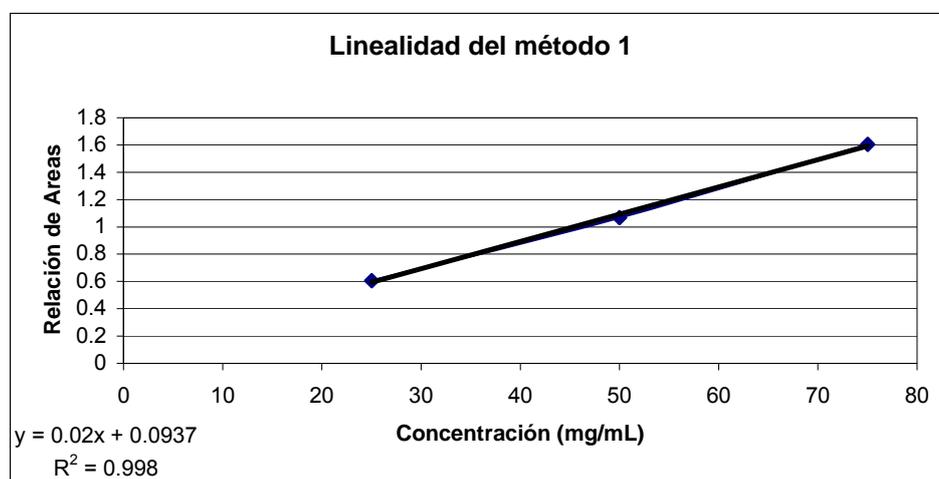
La linealidad de un método analítico es la capacidad de asegurar que los resultados analíticos pueden ser obtenidos directa o indirectamente por transformaciones matemáticas bien definidas, son proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un intervalo determinado. Para lo cual se realizó la curva de calibración para xantorizol con niveles de concentración de 50, 100y 150% de la concentración.

Los resultados obtenidos mediante la experimentación, se muestran en el cuadro 18 y su comportamiento se puede apreciar en la gráfica 3. El comportamiento de las gráficas de las tres curvas puede apreciarse en el anexo 4.

El análisis estadístico se realizó con base en lo establecido en la Guía del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002) utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos.

Cuadro 18: Relación de áreas y C. V. para cada punto de las tres corridas en linealidad y exactitud del método.

Cantidad adicionada $\mu\text{g/mL}$	Curva 1 Rel. Areas (AXant./AStd.Int.)	Curva 2 Rel. Areas (AXant./AStd.Int.)	Curva 3 Rel. Areas (AXant./AStd.Int.)	Desv.Std.	C.V.
25	0.60612069	0.60293617	0.60448627	0.0016	0.0026
50	1.06727659	1.0883583	1.06011838	0.0147	1.37
75	1.60532578	1.62538654	1.62973512	0.0130	0.80



Gráfica 3: Curva obtenida para la determinación de linealidad y exactitud del método.

Los resultados antes mostrados indican que el método es lineal, ya que el C.V. en el análisis resultó ser menor a 2 y $r^2 = 0.99$.

6.12 PRECISIÓN DEL METODO

Esta parte se realizó a dos niveles: calculando repetibilidad y reproducibilidad.

6.12.1 REPETIBILIDAD

Este parámetro se determinó mediante el recobro de 9 muestras, tal y como se menciona en la metodología. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 19, donde se observa que tanto el % de recobro y los coeficientes de variación estuvieron dentro de los límites establecidos.

Cuadro 19: Cantidad adicionada y porcentaje de recobro para cada curva elaborada así como su correspondiente C. V. para cada punto.

Cantidad Adicionada de Xant.	% de Recobro	Resultados	Limites
25	101.294652	Promedio=101.0262	% Recobro (98-102) C. V. \leq 2%
25	100.7624552	Desv.Std.=0.2661	
25	101.0215075	C. V. =0.2634	
50	100.5128532	Promedio=100.9499	
50	102.4982645	Desv.Std.=1.3826	
50	99.83871569	C. V. =1.3696	
75	100.223316	Promedio=101.1488	
75	101.4757445	Desv.Std.=0.8129	
75	101.7472339	C. V. =0.8036	

6.12.2 REPRODUCIBILIDAD

Los resultados que se obtuvieron para este parámetro se lograron después de haber realizado la metodología indicada en la parte experimental y se muestran en el cuadro 20, donde se manifiestan las respuestas obtenidas en los dos días diferentes y por los dos analistas diferentes.

Cuadro 20: Relación de áreas obtenida en diferente día y por diferente analista así como su C. V.

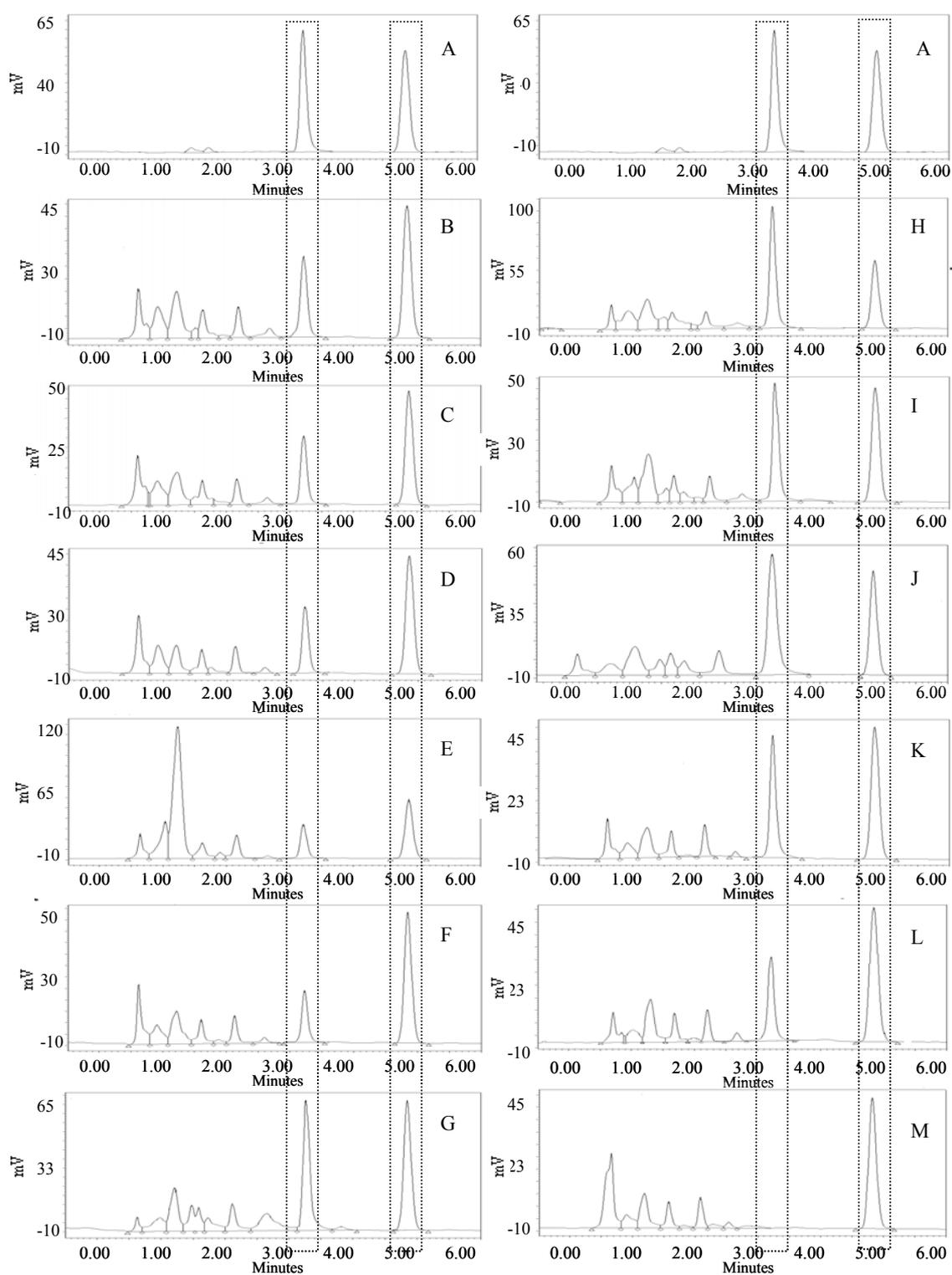
Día de Análisis	Analista I Rel. Areas (Axant/AStd.Int)	Analista II Rel. Areas (Axant/AStd.Int)	Resultados	Limites
Día I	0.926729056	0.919820907	Promedio = 0.9211 Desv. Std. = 0.01323	C. V. \leq 2%
	0.925825282	0.922907819		
	0.939243345	0.925983765		
Día II	0.91236847	0.914358233	C. V. = 1.4371	
	0.9027301	0.923025831		
	0.897401437	0.943264648		

Como se puede apreciar, los coeficientes de variación en cada día y para cada analista cumplieron con lo establecido (menores al 2%).

6.13 CUANTIFICACIÓN DE XANTORRIZOL EN LA RAÍZ DE *Iostephane heterophylla*

Debido a que el xantorrizol es el compuesto mayoritario en la raíz de *Iostephane heterophylla*, después de haber realizado algunas pruebas para validar la metodología propuesta se determinó la cantidad de este compuesto contenido en la raíz de la planta, utilizando 11 lotes de diferentes colectas en México y se realizó la comparación con un lote de *I. madrensis* para lo cual se procedió como lo menciona la metodología antes mencionada.

Los cromatogramas obtenidos para cada lote se muestran en la Figura 36.



Donde: A= Std.Xant + Std.Int. , B= IH-34767, C= IH-34772, D= IH-34773, E= IH-34826, F= IH-34839, G= IH-26535, H= IH-7153, I= IH-34430, J= IH-11-0601, K=,IH-11-0602 L= IH-11-0603, M= IM-34764.

Figura 36: Cromatogramas obtenidos para cada lote analizado.

En cualquier metodología analítica es esencial tener una curva de calibración muy bien diseñada para su mejor interpretación. Las concentraciones de un analito en muestras desconocidas comúnmente se pueden evaluar utilizando los resultados del modelo de regresión lineal; cuando el rango en un número X de valores es grande (normalmente un rango de concentración de mas de un orden de magnitud) puede esperarse que la varianza de cada valor puede ser diferente. Cuando existen grandes desviaciones entre los puntos para altas concentraciones, esto se debe a la pesada y la línea de regresión disminuye la desviación estándar entre los puntos al trabajar con bajas concentraciones y por lo tanto la exactitud en la curva de calibración no es adecuada. Una manera de contrarrestar esta situación es mediante el uso del método de regresión lineal de pesada por mínimos cuadrados, para realizar el ajuste de la linealidad del sistema mediante la metodología descrita por Almeida y colaboradores (2002).

Para esto es necesario calcular los siguientes factores de pesada: $W_i = 1/x^{1/2}$ $W_i = 1/X$ $W_i = 1/X^2$ $W_i = 1/y^{1/2}$ $W_i = 1/y$ $W_i = 1/y^2$

En donde X son los valores de concentración de las curvas de calibración de linealidad del sistema y Y son los valores de la relación de áreas (AXant./Astd.Int) (ver anexo 5).

Posteriormente con base al mismo criterio se determinaron los valores para los siguientes parámetros para cada factor de pesada: $W_i X_i Y_i$, $W_i X_i$, $W_i Y_i$, $W_i X_i^2$, $W_i Y_i^2$

Una vez obtenidos estos valores se buscaron los datos de la ecuación de la recta para cada factor de pesada mediante el uso de las siguientes formulas:

$$b = \frac{\sum W_i * \sum W_i X_i Y_i - \sum W_i X_i * \sum W_i Y_i}{\sum W_i * \sum W_i X_i^2 - (\sum W_i X_i)^2}$$

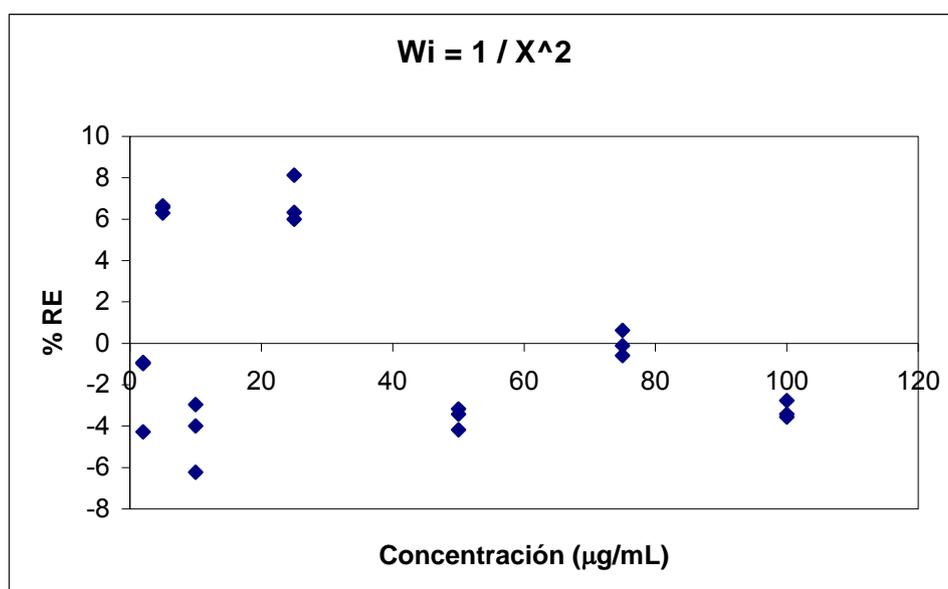
$$a = \frac{\sum W_i X_i^2 * \sum W_i Y_i - \sum W_i X_i * \sum W_i X_i Y_i}{\sum W_i * \sum W_i X_i^2 - (\sum W_i X_i)^2}$$

$$r = \frac{\sum W_i * \sum W_i X_i Y_i - \sum W_i X_i * \sum W_i Y_i}{\sqrt{\sum W_i * \sum W_i Y_i^2 - (\sum W_i Y_i)^2} \sqrt{\sum W_i * \sum W_i X_i^2 - (\sum W_i X_i)^2}}$$

Finalmente con dichas ecuaciones se procedió a determinar la concentración encontrada para cada relación de áreas así como el porcentaje de error relativo.

$$\%RE = \frac{C_{encontrada} - C_{Teorica}}{C_{Teorica}} * 100$$

Una vez obtenidos estos datos, se realizaron las graficas correspondientes de %RE contra la concentración obtenida para cada modelo (factor de pesada). Con lo cual se determino que el mejor factor de pesada es el de $W_i = 1/X^2$. En la grafica 4, se muestra el comportamiento del modelo seleccionado. El análisis completo se muestra en el anexo 5.



Grafica 4: Comportamiento de modelo de corrección de pesada seleccionado.

Mediante el ajuste realizado para la linealidad del sistema, se obtuvo la siguiente ecuación que elimina el error de pesada en las curvas de calibración y ajusta mejor los datos a las condiciones de trabajo, obteniendo así las concentraciones inyectadas al cromatógrafo extraídas de cada lote.

La ecuación obtenida fue:

$$y = 0.020090305x + 0.03675513$$

Con la cual finalmente se estableció la ecuación que considera las diluciones realizadas en cada ensayo.

$$\text{xantorrizol (mg/g raíz)} = \frac{b - \frac{A(Xant)}{A(STD.Int.)}}{m} \times \frac{Fdil}{g(raíz)}$$

donde A(Xant) y A(STD.int) son las áreas de xantorrizol y las áreas del estándar interno (Relación de áreas) obtenidas de los cromatogramas; b es el intercepto (diferente de cero), m es la pendiente de la curva de calibración corregida con el factor del peso $W_i = 1/x^2$ y Fdil es el factor de dilución empleado en la preparación de la muestra; g (raíz) es la cantidad en los gramos de raíz empleados.

Los resultados obtenidos para cada lote ensayado por triplicado se muestran en el cuadro 21.

Cuadro 21: mg de xantorrizol por gramo de raíz promedio extraído de cada lote procesado.

Lote	Relación de Areas			mg Xant. / g de raíz			Promedio mg Xant. / g de raíz
	a	b	c	a	b	c	
7153	1.7849	1.7942	1.8065	10.8766	10.9349	11.0110	10.9408
34430	1.0403	1.0402	0.9980	6.2438	6.2436	5.9809	6.1561
26535	1.0950	1.1505	1.1385	6.5845	6.9299	6.8547	6.7897
34839	0.3333	0.3462	0.3428	1.8360	1.9155	1.8946	1.8820
34767	0.5455	0.5652	0.5702	3.1653	3.2717	3.3193	3.2521
34826	0.4813	0.4944	0.4752	2.7524	2.8331	2.7147	2.7667
34764	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
34773	0.4699	0.4530	0.4562	2.6952	2.5898	2.6096	2.6315
34772	0.5329	0.5271	0.5062	3.0870	3.0510	2.9210	3.0197
IH-11-0601	1.2481	1.3162	1.2996	7.5366	7.9605	7.8575	7.7849
IH-11-0602	0.7625	0.7680	0.7815	4.5155	4.5495	4.6335	4.5662
IH-11-0603	0.6276	0.6008	0.6261	3.6759	3.5095	3.6670	3.6175

7.- CONCLUSIONES

El estudio de la raíz de *Iostephane heterophylla* permitió su evaluación analítica y química generando los siguientes resultados:

La metodología elegida para la cuantificación del compuesto seleccionado como marcador de la especie resultó idónea para desarrollarse y validarse, ya que éste se separó de los demás componentes del extracto con una buena resolución en un tiempo corto de análisis, así como del estándar interno elegido.

Mediante el método desarrollado y validado de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se logró cuantificar el contenido de xantorizol (mg/g de raíz) en 11 lotes diferentes de *Iostephane heterophylla*.

Mediante el método desarrollado y utilizado para la cuantificación se observó que el contenido de xantorizol varía según la localización geográfica de la planta y época del año en que es colectada.

Las especies de mayor contenido de xantorizol fueron los lotes 7153 y IH-11-0601 con 10.9 y 7.8 mg/g de raíz respectivamente que corresponden a colectas en los estados de Puebla y del Mercado Sonora de la Ciudad de México (Toluca); y el lote con menor contenido fue el 34839 con 1.9 mg/g de raíz (Mercado Reforma, Cd. Chihuahua).

El método de CLAE utilizado resultó ser confiable ya que es lineal, preciso, reproducible y exacto.

Los resultados de la cuantificación pueden ser utilizados para determinar que el xantorizol sea usado como compuesto de referencia de la especie, ya que no fue detectado por este método en *Iostephane madrensis* (lote 34764). Por consiguiente, el

empleo de este método podrá evitar la presencia de especies adulterantes en colectas de *Iostephane heterophylla*.

Por medio del estudio fitoquímico se logró aislar un terpenoide de la fracción F-IV-B con esqueleto de guayano cuya estructura fue elucidada mediante los análisis espectroscópicos, espectrométricos y quiroópticos correspondientes e identificado como el kessano (1H-ciclopenta-[C]-oxepina-octahidro-1,3,3,6-tetrametil-1,4-etano). La ubicación de los sustituyentes en la molécula fue confirmada mediante el análisis de los espectros de RMN ¹H (COSY, HMBC) y de ¹³C (DEPT, HSQC).

El extracto hexánico contiene un aceite fluido no aislado con anterioridad cuya composición fue analizada por CG-EM como una mezcla de sesquiterpenos de tipo cadalano y guayano

Las pruebas de actividad antimicrobiana para el aceite mostraron resultados marginales contra *T. rubrum*.

En la fracción FXII se detectaron tres compuestos análogos del xantorizol por medio de CG-EM.

PERSPECTIVAS

Dados los resultados en este estudio, sería conveniente analizar las condiciones climáticas idóneas para realizar el cultivo programado de la especie y así obtener mejores rendimientos del metabolito de interés (xantorizol) y por otra parte, para protección contra la extinción de la materia prima.

Hasta este momento no fue establecida la estereoquímica completa de la molécula del kessano obtenida por nosotros, y para esto, es será necesario analizar con mayor detalle los resultados del espectro NOESY y comparar los datos obtenidos con los encontrados para esta molécula en la literatura.

Por otra parte resulta necesario confirmar las estructuras de la fracción FXII debido a que son análogos del xantorizol; compuesto que a la fecha está siendo ampliamente investigado por sus propiedades antimicrobianas, antitumorales y antiinflamatorias

8.-BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. Delgado, G, Bye, R. and Linares, E. (1993) Bisabolene, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, **33**, 1161-1163.
- Aguilar, M. Delgado, G., (1995) Novel bisabolene glycoside and others constituents from the medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *J. Natural Products*, **7**, 155-162.
- Aguilar, M. Delgado, G., Hernández, M. L. and Villarreal, M. L. (2001) Bioactive compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *Natural Products Letters*, **15**, 93-101.
- Aguilar, M. Delgado, G., and Villarreal, M. L. (2001) New bioactive derivatives of xanthorrhizol. *Revista de la Sociedad Química de México*, **45**, 56-59.
- Almeida, A. M., Castel-Branco, M. M. and Falcao, A. C. (2002) Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods *Journal of Chromatography B*, **774**, 215-222.
- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M.,Tringali, C., Fatorusso, E., Magno, S., Mayol, L.,(1978) Sesquiterpenes based on the cadalane skeleton from the brown alga *Dilophus fasciola* *Experientia*, **35**, 450-451.
- Argueta, V.A.,Cano, A.L.,y Rodarte M. E. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, vol II, primera edición, INI México 1994 p 772.

-
- Ballantyne, M. McCabe, P.H. y Murria, D.H. (1971) Claisen rearrangements-II. Synthesis of six natural coumarins. *Tetrahedron*, **27**, 871.
 - Boylan S. 1996 *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Vol 7* ED. Dekker, inc. USA 1996 Pp 249-251.
 - Bruneton, Jean, *Farmacognosia Fitoquímica de Plantas Medicinales 2ª ed.*, Ed. Acribia S. A., España 2001, Pp 457-465.
 - Bye, R. y Linares, E (1987) A Study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, **19**, 153-183.
 - Campos, M., Oropeza, M., Villanueva, T., Aguilar, M. Delgado, G. and Ponce, H. (2000) Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Life sciences*, **67**, 327-333 .
 - Castañeda, P., Giral, C., Sancha, F. Et al. Guías Oficiales de Validación de la dirección General de control de insumos para la salud, SSA, México (1995), 01-71.
 - Dean, F.M. and Parton, B. (1969) The structure and synthesis of (+)- Obliquin. *J. Chem. Soc (C)*, 526.
 - Delgado, G. (1999) Effect of xanthorrhizol, xanthorrhizol glycoside and trachylobanoic acid isolated from cachani complex plants upon the contractile activity of uterine smooth muscle. *Phytotherapy Research*, **13**, 202-205

-
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Séptima Edición, Secretaria de Salud, México, (2000), 226-237.
 - Fatorusso, E., Magno, S. and Mayol, L., (1979), (1R,4R,10R)-1,4-epoxicadoinade, a new sesquiterpenoid from the brown alga *Dilophus fasciola*, *Gazzeta Chimica Italiana*, **109**, 589-591.
 - Gandhi, C., Benharref, A., Jana, M., Basile, A., Contet-Audonmeau, N., Fortier, B. (2001), Antidermatophic properties of extracts from the leaves of *Aristolochia paucinervis*, *Pomel, Phytoterapy Research*, **15**, 79-81.
 - García, M. A., Soberón, E., Cortés, M. et al.. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional De Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (2002), Pp: 8-43, 57-86, 116-122.
 - Henrick, C. K. y Jefferies, P.R. (1964) The Diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Australian Journal of Chemistry*, **17**, 915-933.
 - Hertz, W., Govindan, S. V. y Watanabe, K. (1982) Diterpenes of *Helianthus rigidus* y *H. salicifolius*. *Phytochemistry* **22**, 2021-2025.
 - Hertz, W. y Kulanthaivel, P. (1983) *Ent*-kauranes and trachylobanes from *Helianthus radula*. *Phytochemistry*, **22**, 2543-2546.
 - Hikino, H., Hikino, Y., Tafeshita, Y., Shiraka, K., Takemota, T. (1963) Structure of kessano. *Chem Pharm, Bull* **11**, 547-8.

-
- ICH Harmonized Tripartita Guideline, ICH Q2B, Validation on Analytical Procedures: Methodology, 1996.

 - ICH Harmonized Tripartita Guideline, ICH Q2A, Text on Validation on Analytical Procedures, 1995.

 - Jerzy, R. Vegetación de México, Limusa, México 1978, Pp: 85-86

 - Lewis, J. A., Snyder, L. and Dolan, J. W. (1996) Initial Experiments in High-performance liquid chromatographic method development. II. Recommended approach and conditions for isocratic separation. *J. of Chromatography A*. **721**, 15-29.

 - Mata, R., Bye, R., Morales, G., et al ,(2001) “Biological and mechanistic activities of xanthorrhizol and 4-(1',5'-Dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol Isolated from *Iostephane heterophylla*” *J. Natural Products*, **64**: 911-914.

 - Oberti, J.C., Pomilio, B. Y Gros, E.(1980) Diterpene and sterols from *Wedelia glauca*. *Phytochemistry*, **19**, 1051-1052.

 - Ponce, H., Campos, M., Aguilar., Navarrete, A., Avula, B., Choi, Y-W. And Khan, I. A. (2006) Chemical fingerprinting of *Valeriana* species: simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. of AOAC International*, **89**, 1-7.

-
- Pyrek, J. (1970) New pentacyclic diterpene acid. Trachyloban-19-oic from sunflower. *Tetrahedron*, **26**, 5029-5032.
 - Rhaalison L, Hamburguer M, Monod M, Frenk E, and Hostettmann (1994) Antifungal test in phytochemical investigation: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta medica* **60** 41-44.
 - Rimpler, H., Hansel, R y Kochendoerfer, L. (1970) Xanthorrhizol, ein neues sesquiterpen aus *Curcuma xanthorrhiza*. *Z. Naturforsch.* **25B**, 995.
 - Rios J, Recio M, Villar A (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity : a review of the literature *J Ethnopharmacology*, **23**, 127-149.
 - Sandoval, E., Bye, R., Rios, G. and Aguilar, M. (2005) Microscopic analysis and histochemical observations of the medicinal roots of *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. Ex Hemsl. (Asteraceae). *Botánica Económica y Etnobotánica*, **77**, 65-73.
 - Shafizadeh, F. Y Melnikoff, A. B. (1970) Coumarins of *Artemisia tridentata* ssp vaseyana. *Phytochemistry*, **9**, 1311-1316.
 - Trease, E.; Farmacognosia, 13ª ed., Ed.McGraw Hill, 1989, México, Pp 741-748.
 - Villavicencio, M. A. Plantas Útiles en el Estado de Hidalgo, Primera Edición, Universidad Autónoma de Hidalgo, México 1995, Pp 25-26.
 - Youngken Heber, Tratado de Farmacognosia, Ed., Atlanta, 1981, México, Pp19-28.

9.- ANEXOS

ANEXO 1

El cálculo de % |DI| para Estabilidad de la muestra se realizó de la siguiente manera:

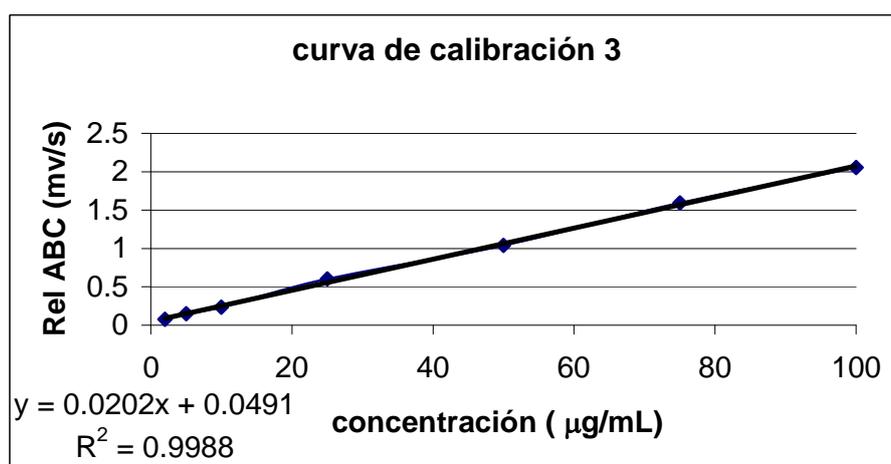
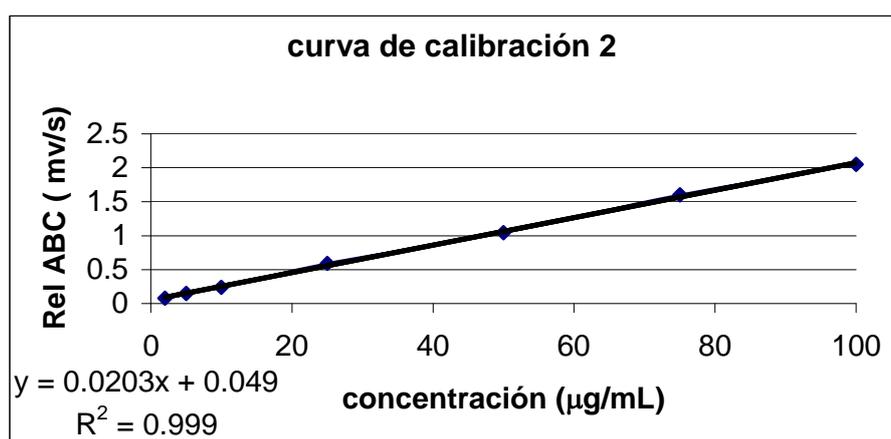
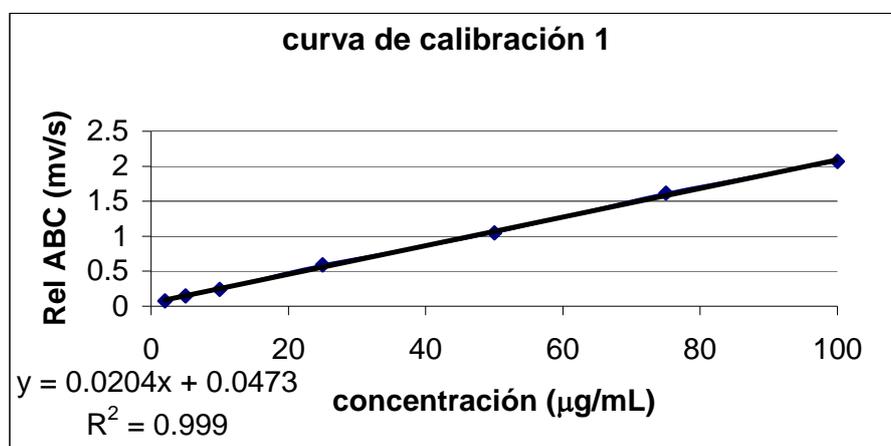
$$\% |DI| : |X_{2\text{promedio}} - X_{1\text{promedio}}| \times 100$$

donde X es la respuesta al tiempo 2 y al tiempo 1 respectivamente.

Muestra	Rel.Areas	Rel.Areas	Rel.Areas	Rel.Areas.
Temperatura ambiente c/luz	0.47127871	0.46567376	0.46431333	0.39663862
Temperatura ambiente s/luz	0.4688452	0.46376703	0.46831398	0.3926688
4° C con luz	0.46958622	0.47514874	0.47075024	0.41099945
4° C sin luz.	0.47955625	0.46699512	0.47662901	0.37135574
Promedio	0.47231659	0.46789616	0.47000164	0.39291566
Dev.Std.	0.00493272	0.00501333	0.00515388	0.01638877
C.V.	1.04436789	1.07146267	1.09656717	4.17106471
Suma	1.88926637	1.87158465	1.88000656	1.57166262
di		-0.00442043	-0.00231495	-0.07940094
% DI		0.44204318	0.23149536	7.94009376

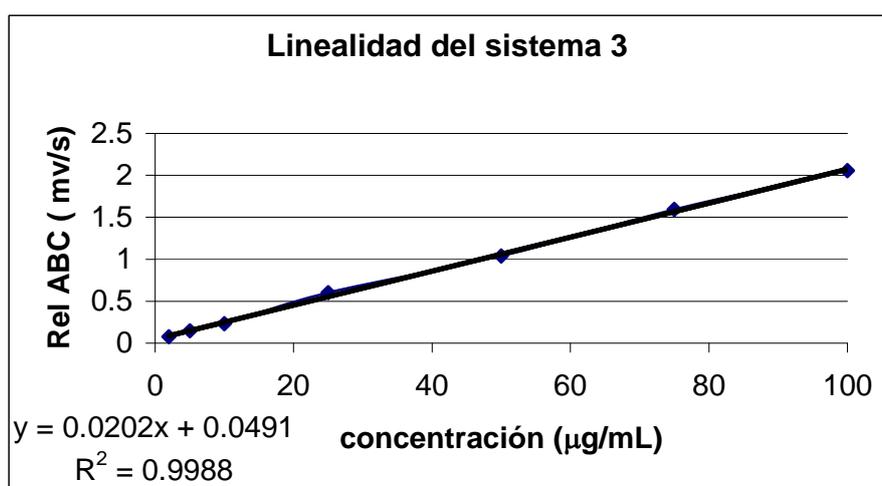
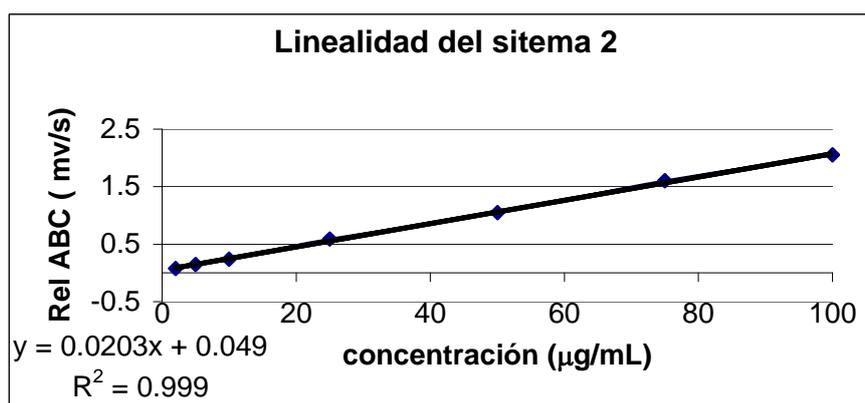
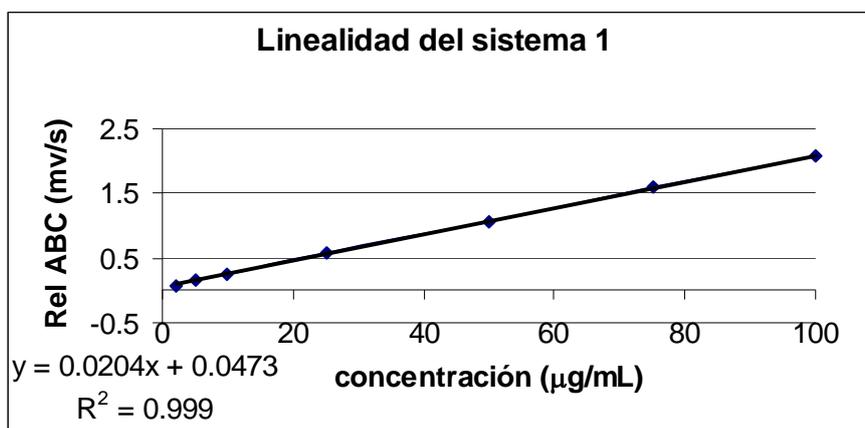
ANEXO 2

Curvas de Calibración para obtener el LD y LQ; los datos se pueden observar en la parte de resultados.



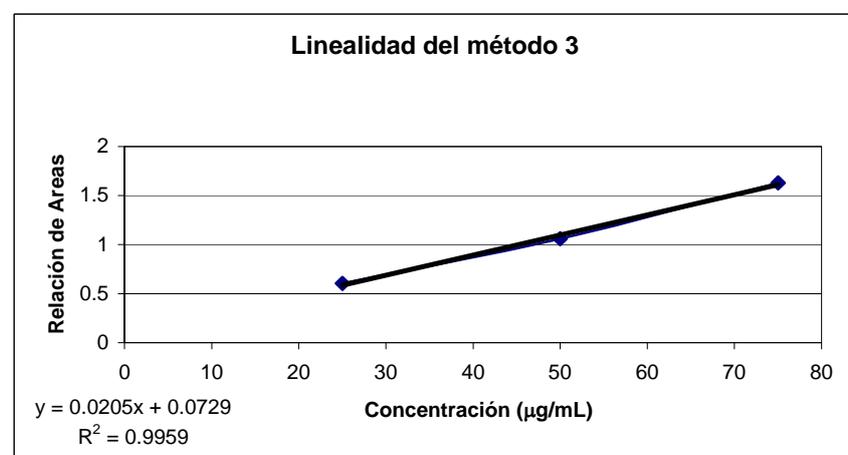
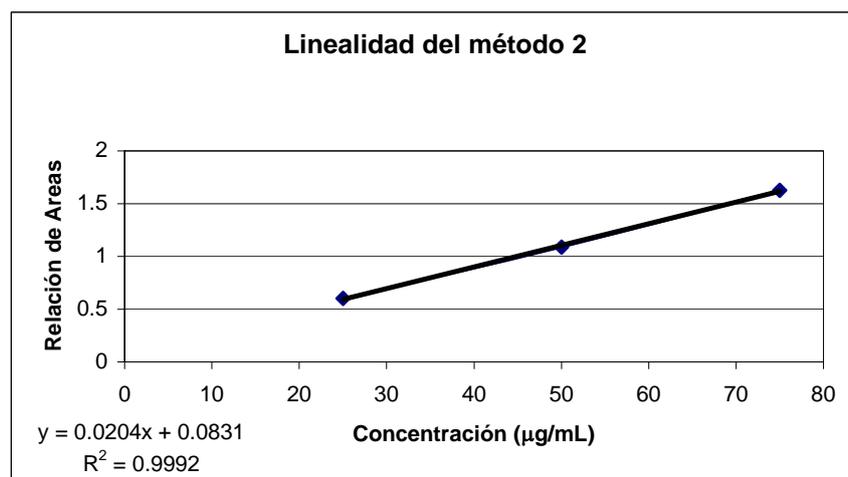
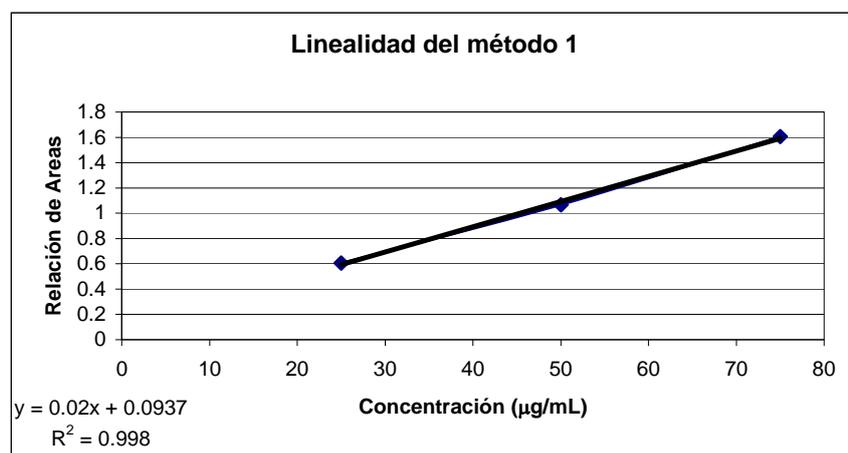
ANEXO 3.

Graficas de linealidad del sistema, cuyos datos experimentales pueden observarse en el apartado de resultados y discusión.



ANEXO 4

Graficas obtenidas del recobro en la linealidad y exactitud del método; los resultados se pueden notar en el apartado de resultados y discusión.



ANEXO 5

Primero se determinó si era necesario hacer corrección a la ecuación de regresión lineal obtenida, utilizando el método de Regresión lineal de mínimos cuadrados por corrección de pesada (WLRSSR), mediante la prueba estadística F.

concentración	(a xan/a std)1	(a xan/a std)2	(a xan/a std)3	Varianza
2	0.076773675	0.0781774	0.07815252	6.45379E-07
5	0.147857175	0.148209309	0.148124958	3.38035E-08
10	0.239605046	0.237445259	0.232751194	1.2279E-05
25	0.592423477	0.590633369	0.601798182	3.59571E-05
50	1.048747061	1.046170124	1.038319422	2.95016E-05
75	1.614216069	1.602659457	1.595159283	9.21615E-05
100	2.06928407	2.052761402	2.055506753	7.83917E-05

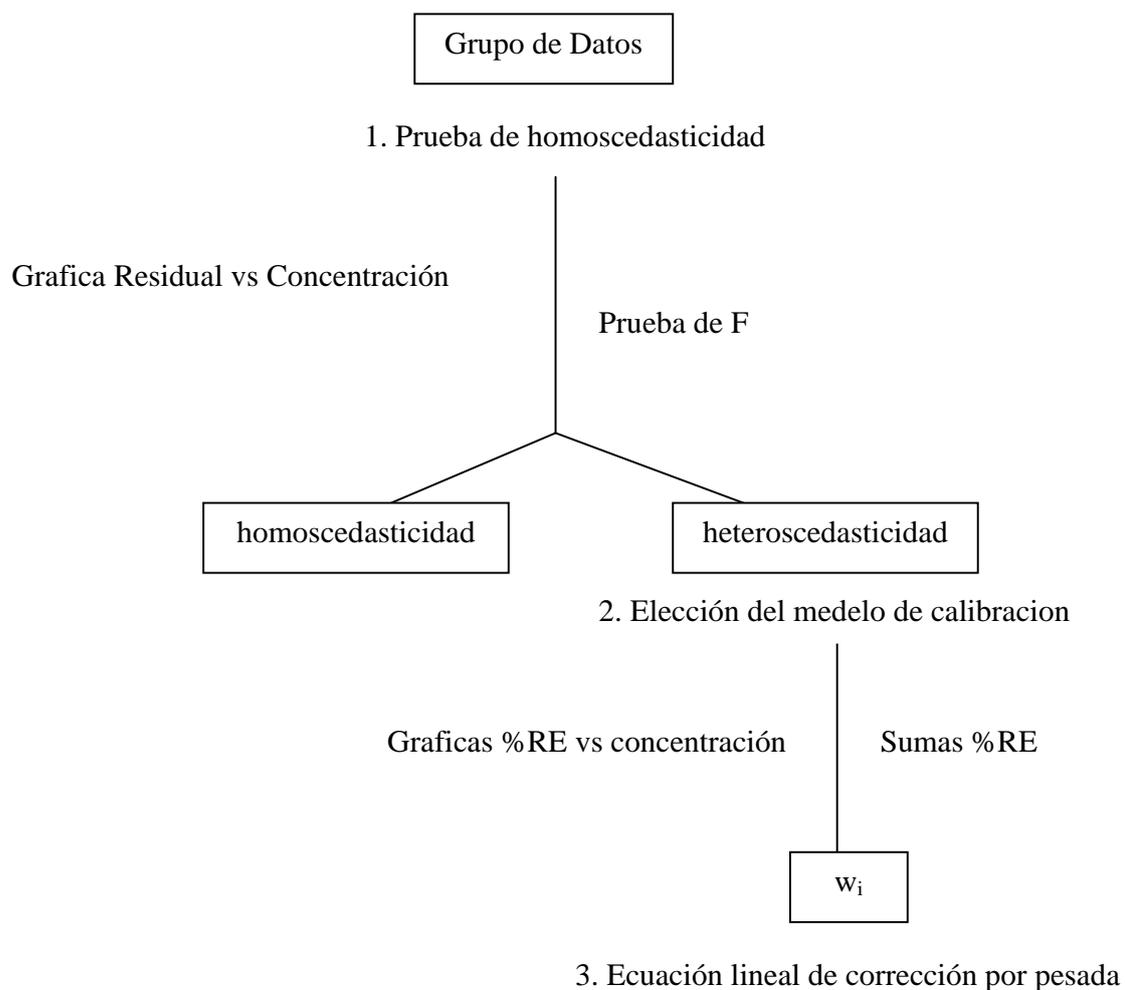
Donde F experimental es:

$$F = \frac{S \text{ min}}{S \text{ max}}$$

Con S siendo la varianza de la concentración mínima y máxima respectivamente.

F experimental	F tablas
121.4660172	8.47

Diagrama genérico para toma de decisión en el análisis de la regresión lineal por corrección de pesada.



Debido a que la F experimental fue mayor que la de tablas, se procedió a realizar la corrección de la regresión lineal por el método de pesadas, tal y como se describe en la parte de resultados y discusión.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Conc.	(a xan/a std)1	$W_i = 1/x^{1/2}$	$W_i = 1/X$	$W_i = 1/X^2$	$W_i = 1/y^{1/2}$	$W_i = 1/y$	$W_i = 1/y^2$
2	0.076773675	0.7071	0.5	0.25	3.6090	13.025	169.6583
2	0.0781774	0.7071	0.5	0.25	3.5765	12.791	163.6204
2	0.07815252	0.7071	0.5	0.25	3.577	12.795	163.7246
5	0.147857175	0.4472	0.2	0.04	2.6006	6.7632	45.74200
5	0.148209309	0.4472	0.2	0.04	2.5975	6.7472	45.52490
5	0.148124958	0.4472	0.2	0.04	2.5982	6.7510	45.57676
10	0.239605046	0.3162	0.1	0.01	2.0429	4.1735	17.41839
10	0.237445259	0.3162	0.1	0.01	2.052	4.2114	17.73670
10	0.232751194	0.3162	0.1	0.01	2.0727	4.2964	18.45977
25	0.592423477	0.2	0.04	0.0016	1.2992	1.6879	2.849282
25	0.590633369	0.2	0.04	0.0016	1.3011	1.6930	2.866578
25	0.601798182	0.2	0.04	0.0016	1.289	1.6616	2.761202
50	1.048747061	0.1414	0.02	0.0004	0.9764	0.9535	0.909131
50	1.046170124	0.1414	0.02	0.0004	0.9776	0.955	0.913682
50	1.038319422	0.1414	0.02	0.0004	0.9813	0.9630	0.927551
75	1.614216069	0.1154	0.0133	0.0002	0.7870	0.6194	0.383774
75	1.602659457	0.1154	0.0133	0.0002	0.7899	0.6239	0.389329
75	1.595159283	0.1154	0.0133	0.0002	0.7917	0.6268	0.392999
100	2.06928407	0.1	0.01	0.0001	0.6951	0.4832	0.233539
100	2.052761402	0.1	0.01	0.0001	0.6979	0.4871	0.237313
100	2.055506753	0.1	0.01	0.0001	0.6974	0.4864	0.236680
	Sumatoria	6.0823	2.65	0.9068333333	36.011	82.797	700.5627

Wi = 1/x ^{1/2}					Wi = 1/X					Wi = 1/X ²							
WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²	WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²	WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²			
0.1086	1.4142	0.0543	2.8284	0.0042	0.0768	1.0000	0.0384	2.0000	0.0029	0.0384	0.5000	0.0192	1.0000	0.0015			
0.1106	1.4142	0.0553	2.8284	0.0043	0.0782	1.0000	0.0391	2.0000	0.0031	0.0391	0.5000	0.0195	1.0000	0.0015			
0.1105	1.4142	0.0553	2.8284	0.0043	0.0782	1.0000	0.0391	2.0000	0.0031	0.0391	0.5000	0.0195	1.0000	0.0015			
0.3306	2.2361	0.0661	11.1803	0.0098	0.1479	1.0000	0.0296	5.0000	0.0044	0.0296	0.2000	0.0059	1.0000	0.0009			
0.3314	2.2361	0.0663	11.1803	0.0098	0.1482	1.0000	0.0296	5.0000	0.0044	0.0296	0.2000	0.0059	1.0000	0.0009			
0.3312	2.2361	0.0662	11.1803	0.0098	0.1481	1.0000	0.0296	5.0000	0.0044	0.0296	0.2000	0.0059	1.0000	0.0009			
0.7577	3.1623	0.0758	31.6228	0.0182	0.2396	1.0000	0.0240	10.0000	0.0057	0.0240	0.1000	0.0024	1.0000	0.0006			
0.7509	3.1623	0.0751	31.6228	0.0178	0.2374	1.0000	0.0237	10.0000	0.0056	0.0237	0.1000	0.0024	1.0000	0.0006			
0.7360	3.1623	0.0736	31.6228	0.0171	0.2328	1.0000	0.0233	10.0000	0.0054	0.0233	0.1000	0.0023	1.0000	0.0005			
2.9621	5.0000	0.1185	125.0000	0.0702	0.5924	1.0000	0.0237	25.0000	0.0140	0.0237	0.0400	0.0009	1.0000	0.0006			
2.9532	5.0000	0.1181	125.0000	0.0698	0.5906	1.0000	0.0236	25.0000	0.0140	0.0236	0.0400	0.0009	1.0000	0.0006			
3.0090	5.0000	0.1204	125.0000	0.0724	0.6018	1.0000	0.0241	25.0000	0.0145	0.0241	0.0400	0.0010	1.0000	0.0006			
7.4158	7.0711	0.1483	353.5534	0.1555	1.0487	1.0000	0.0210	50.0000	0.0220	0.0210	0.0200	0.0004	1.0000	0.0004			
7.3975	7.0711	0.1480	353.5534	0.1548	1.0462	1.0000	0.0209	50.0000	0.0219	0.0209	0.0200	0.0004	1.0000	0.0004			
7.3420	7.0711	0.1468	353.5534	0.1525	1.0383	1.0000	0.0208	50.0000	0.0216	0.0208	0.0200	0.0004	1.0000	0.0004			
13.9795	8.6603	0.1864	649.5191	0.3009	1.6142	1.0000	0.0215	75.0000	0.0347	0.0215	0.0133	0.0003	1.0000	0.0005			
13.8794	8.6603	0.1851	649.5191	0.2966	1.6027	1.0000	0.0214	75.0000	0.0342	0.0214	0.0133	0.0003	1.0000	0.0005			
13.8145	8.6603	0.1842	649.5191	0.2938	1.5952	1.0000	0.0213	75.0000	0.0339	0.0213	0.0133	0.0003	1.0000	0.0005			
20.6928	10.0000	0.2069	1000.000	0.4282	2.0693	1.0000	0.0207	100.000	0.0428	0.0207	0.0100	0.0002	1.0000	0.0004			
20.5276	10.0000	0.2053	1000.000	0.4214	2.0528	1.0000	0.0205	100.000	0.0421	0.0205	0.0100	0.0002	1.0000	0.0004			
20.5551	10.0000	0.2056	1000.000	0.4225	2.0555	1.0000	0.0206	100.000	0.0423	0.0206	0.0100	0.0002	1.0000	0.0004			
138.096	112.631	2.5614	6521.112	2.9339	Sumatoria	17.2948	21.0000	0.5364	801.000	0.3771	Sumatoria	0.5364	2.6500	0.0887	21.0000	0.0145	Sumatoria

Wi= 1/y ^{1/2}				
WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²
0.5542	7.2181	0.2771	14.4362	0.0213
0.5592	7.1530	0.2796	14.3060	0.0219
0.5591	7.1542	0.2796	14.3083	0.0218
1.9226	13.0032	0.3845	65.0158	0.0569
1.9249	12.9877	0.3850	64.9385	0.0571
1.9244	12.9914	0.3849	64.9570	0.0570
4.8949	20.4292	0.4895	204.2923	0.1173
4.8728	20.5219	0.4873	205.2193	0.1157
4.8244	20.7278	0.4824	207.2784	0.1123
19.2423	32.4806	0.7697	812.0147	0.4560
19.2132	32.5298	0.7685	813.2443	0.4539
19.3939	32.2266	0.7758	805.6652	0.4668
51.2042	48.8241	1.0241	2441.207	1.0740
51.1412	48.8842	1.0228	2444.211	1.0700
50.9490	49.0687	1.0190	2453.434	1.0580
95.2889	59.0310	1.2705	4427.328	2.0509
94.9471	59.2435	1.2660	4443.261	2.0289
94.7247	59.3826	1.2630	4453.695	2.0147
143.850	69.5168	1.4385	6951.682	2.9767
143.274	69.7960	1.4327	6979.603	2.9411
143.370	69.7494	1.4337	6974.941	2.9470
948.636	752.920	16.934	44855.04	20.1192

Sumatoria

Wi = 1/y				
WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²
2.0000	26.0506	1.0000	52.1012	0.0768
2.0000	25.5828	1.0000	51.1657	0.0782
2.0000	25.5910	1.0000	51.1820	0.0782
5.0000	33.8164	1.0000	169.082	0.1479
5.0000	33.7361	1.0000	168.680	0.1482
5.0000	33.7553	1.0000	168.776	0.1481
10.0000	41.7353	1.0000	417.353	0.2396
10.0000	42.1150	1.0000	421.149	0.2374
10.0000	42.9643	1.0000	429.643	0.2328
25.0000	42.1995	1.0000	1054.98	0.5924
25.0000	42.3274	1.0000	1058.18	0.5906
25.0000	41.5422	1.0000	1038.55	0.6018
50.0000	47.6759	1.0000	2383.79	1.0487
50.0000	47.7934	1.0000	2389.66	1.0462
50.0000	48.1547	1.0000	2407.73	1.0383
75.0000	46.4622	1.0000	3484.66	1.6142
75.0000	46.7972	1.0000	3509.79	1.6027
75.0000	47.0172	1.0000	3526.29	1.5952
100.000	48.3259	1.0000	4832.58	2.0693
100.000	48.7149	1.0000	4871.48	2.0528
100.000	48.6498	1.0000	4864.98	2.0555
801.000	861.007	21.0000	37351.8	17.2948

Sumatoria

Wi = 1/y ²				
WiXiYi	WiXi	WiYi	WiXi ²	WiYi ²
26.0506	339.316	13.0253	678.633	1.0000
25.5828	327.240	12.7914	654.481	1.0000
25.5910	327.449	12.7955	654.898	1.0000
33.8164	228.710	6.7633	1143.55	1.0000
33.7361	227.624	6.7472	1138.12	1.0000
33.7553	227.883	6.7511	1139.41	1.0000
41.7353	174.183	4.1735	1741.83	1.0000
42.1150	177.367	4.2115	1773.67	1.0000
42.9643	184.593	4.2964	1845.93	1.0000
42.1995	71.2321	1.6880	1780.80	1.0000
42.3274	71.6645	1.6931	1791.61	1.0000
41.5422	69.0301	1.6617	1725.75	1.0000
47.6759	45.4599	0.9535	2272.99	1.0000
47.7934	45.6841	0.9559	2284.20	1.0000
48.1547	46.3776	0.9631	2318.87	1.0000
46.4622	28.7831	0.6195	215.734	1.0000
46.7972	29.1997	0.6240	2189.97	1.0000
47.0172	29.4750	0.6269	2210.62	1.0000
48.3259	23.3539	0.4833	2335.39	1.0000
48.7149	23.7314	0.4871	2373.13	1.0000
48.6498	23.6680	0.4865	2366.80	1.0000
861.007	2722.02	82.7977	36579.4	21.0000

Sumatoria

Parametros	$W_i = 1/x^{1/2}$	$W_i = 1/X$	$W_i = 1/X^2$	$W_i = 1/y^{1/2}$	$W_i = 1/y$	$W_i = 1/y^2$	$W_i = 1$
b	0.020440957	0.020555696	0.02090305	0.020423106	0.020516093	0.02073978	0.0203
a	0.04260163	0.039507752	0.036755133	0.043240649	0.040284856	0.037603281	0.049
r	0.999471587	0.910543356	0.998403231	0.999469841	0.999356326	0.99868687	0.999
Suma %RE	-28.32184794	-1.3511E-05	1.70918E-05	-34.80268783	-3.89602782	2.744989948	-0.97462286

concentración	(a xan/a std)1	$W_i = 1/x^{1/2}$		$W_i = 1/X$		$W_i = 1/X^2$		$W_i = 1/y^{1/2}$		$W_i = 1/y$		$W_i = 1/y^2$		$W_i = 1$	
		C found	%RE	C found	%RE	C found	%RE	C found	%RE	C found	%RE	C found	%RE	C found	%RE
2	0.0768	1.6717	-16.4128	1.8129	-9.3538	1.9145	-4.2758	1.6419	-17.9042	1.8081	-9.5937	1.8936	-5.3223	1.3682	-0.3159
2	0.0782	1.7404	-12.9792	1.8812	-5.9393	1.9816	-0.9181	1.7106	-14.4676	1.8763	-6.1848	1.9611	-1.9472	1.4373	-0.2813
2	0.0782	1.7392	-13.0401	1.8800	-5.9999	1.9804	-0.9776	1.7094	-14.5285	1.8751	-6.2452	1.9599	-2.0070	1.4361	-0.2820
5	0.1479	5.1492	2.9849	5.2710	5.4203	5.3151	6.3022	5.1225	2.4492	5.2606	5.2123	5.3119	6.2377	4.8698	-0.0260
5	0.1482	5.1665	3.3295	5.2881	5.7630	5.3320	6.6392	5.1397	2.7940	5.2777	5.5544	5.3288	6.5764	4.8872	-0.0226
5	0.1481	5.1623	3.2470	5.2840	5.6809	5.3279	6.5584	5.1356	2.7114	5.2736	5.4724	5.3248	6.4953	4.8830	-0.0234
10	0.2396	9.6377	-3.6232	9.7344	-2.6560	9.7043	-2.9568	9.6148	-3.8518	9.7168	-2.8324	9.7239	-2.7605	9.3894	-0.0611
10	0.2374	9.5320	-4.6798	9.6293	-3.7067	9.6010	-3.9900	9.5091	-4.9094	9.6119	-3.8814	9.6201	-3.7992	9.2830	-0.0717
10	0.2328	9.3024	-6.9762	9.4010	-5.9903	9.3764	-6.2357	9.2792	-7.2078	9.3839	-6.1613	9.3944	-6.0565	9.0518	-0.0948
25	0.5924	26.898	7.5922	26.8984	7.5937	26.5831	6.3325	26.8903	7.5611	26.8530	7.4119	26.6906	6.7625	26.7696	0.0708
25	0.5906	26.810	7.2419	26.8113	7.2453	26.4975	5.9899	26.8026	7.2105	26.7660	7.0641	26.6045	6.4181	26.6814	0.0673
25	0.6018	27.356	9.4267	27.3545	9.4179	27.0316	8.1264	27.3493	9.3972	27.3083	9.2332	27.1414	8.5658	27.2314	0.0893
50	1.0487	49.222	-1.5559	49.0978	-1.8044	48.4136	-3.1728	49.2338	-1.5325	49.0164	-1.9672	48.6347	-2.7305	49.2486	-0.0150
50	1.0462	49.096	-1.8081	48.9724	-2.0551	48.2903	-3.4194	49.1076	-1.7848	48.8912	-2.2176	48.5108	-2.9783	49.1217	-0.0176
50	1.0383	48.711	-2.5762	48.5905	-2.8190	47.9147	-4.1705	48.7232	-2.5536	48.5099	-2.9802	48.1333	-3.7334	48.7349	-0.0253
75	1.6142	76.885	2.5141	76.6069	2.1425	75.4656	0.6208	76.9215	2.5620	76.4809	1.9746	75.8276	1.1034	77.1042	0.0281
75	1.6027	76.320	1.7603	76.0447	1.3929	74.9127	-0.1164	76.3556	1.8075	75.9196	1.2262	75.2718	0.3624	76.5349	0.0205
75	1.5952	75.953	1.2710	75.6798	0.9064	74.5539	-0.5948	75.9884	1.3178	75.5553	0.7404	74.9111	-0.1185	76.1655	0.0155
100	2.0693	99.148	-0.8519	98.7452	-1.2548	97.2360	-2.7640	99.2035	-0.7965	98.5833	-1.4167	97.7113	-2.2887	99.5214	-0.0048
100	2.0528	98.339	-1.6602	97.9414	-2.0586	96.4456	-3.5544	98.3945	-1.6055	97.7808	-2.2192	96.9168	-3.0832	98.7075	-0.0129
100	2.0555	98.474	-1.5259	98.0750	-1.9250	96.5769	-3.4231	98.5289	-1.4711	97.9142	-2.0858	97.0488	-2.9512	98.8427	-0.0116
Sumatoria			-28.3218		0.0000		0.0000		-34.8027		-3.8960		2.7450		-0.9746

