

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA  
EFICIENCIA (CLAE) PARA CUANTIFICAR  
XANTOCILINA EN *Matricaria recutita* Y  
ESTABLECER LOS PERFILES DE DISOLUCIÓN DE  
CÁPSULAS DURAS DE UN EXTRACTO ACUOSO  
DE *Hintonia standleyana*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :  
MITZI ROCÍO DÍAZ HUERTA



MÉXICO, D.F.

2007

pdfMachine

A pdf writer that produces quality PDF files with ease!

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!



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.

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Inés Fuentes Noriega  
Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
Secretario: Dra. Rachel Mata Essayag  
Primer suplente: Dr. José Fausto Rivero Cruz  
Segundo suplente: M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 124, Departamento de Farmacia,  
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesora

---

Dra. Rachel Mata Essayag

Supervisora técnica

---

M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sustentante

---

Mitzi Rocío Díaz Huerta

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

## AGRADECIMIENTOS

Con gran admiración y respeto a la Dra. Rachel Mata Essayag, por la oportunidad de trabajar en su equipo, por la confianza, la paciencia y el apoyo brindado durante mi estancia en su laboratorio. Y por todos aquellos consejos que me ayudaron a seguir adelante con mi desarrollo profesional y personal.

Con gran cariño a la M. en C. Isabel del C. Rivero Cruz, por su apoyo técnico para el desarrollo de este proyecto. Isa muchas gracias por todo tu apoyo emocional, por tus consejos, tu compañía y sobre todo por tu amistad. Gracias por que de tí, siempre recibí una sonrisa.

A la M. en C. Laura A. Acevedo Arteaga, por el apoyo técnico brindado al inicio de este proyecto. Gracias, porque un inicio siempre cuesta trabajo, y tú, nunca me dejaste sola. Gracias por tu amistad.

Con cariño al I.Q. Ramiro E. Domínguez Danache, por creer en mí y darme la oportunidad de conocerlo. Gracias, por que desde el comienzo de mi carrera fue un soporte muy importante dentro de la facultad, tanto en el aspecto académico como en el personal.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz, por su apoyo técnico para la realización de este proyecto. Y a todos mis compañeros del laboratorio 124, por su apoyo dentro del laboratorio: Araceli, Paquito, Lupita, Fer, Magda, Sol, Toño, Sergio, Viridiana, Abraham y Mario.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SNI) y a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA-IN208907), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

A todos mis profesores y directores, que desde el inicio de mis estudios formaron parte elemental de mi formación académica.

A la Facultad de Química, por que en ella maduré como persona y profesionista. Y viví grandes momentos que me permitieron conocer a excelentes personas y amig@s.

Y por último agradezco a la UNAM, por ofrecer una gran oportunidad para impulsar el desarrollo de sus estudiantes en el ámbito académico, social y cultural.

iMÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!

"iGooya! iGooya!

iCachún cachún ra ra! iCachún cachún ra ra!

iGooya!

iUNIVERSIDAD!

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

## DEDICATORIAS

A mí madre, por hacer de mí una persona con aspiraciones y grandeza en alma y pensamiento. Te dedico esta tesis, que representa el fin de una vida de estudio y dedicación con el objetivo de obtener un título profesional, y el inicio de una exitosa carrera laboral y nuevos proyectos de vida. Tu amor y bendiciones estarán siempre presentes en mí vida. GRACIAS.

A mí padre, que a pesar de todas las adversidades, no dejó de preocuparse por darme un sustento día a día. Papá, te dedico esta tesis por el gran esfuerzo que has hecho para sacarnos adelante a mí hermano y a mí. Te quiero mucho, GRACIAS.

A mí hermano. Beto, con todo mi corazón, deseo que este momento de mi vida te inspire a ser una persona de bien, responsable de tus pensamientos y actos. ¡¡¡Sigue adelante, nunca te rindas!!! Gracias por que has sabido apoyarme cuando lo he necesitado. Te quiero mucho y cuentas conmigo.

A mis abuelos Raúl y Ma. Elena, muchas gracias por todo su amor, cuidados y oraciones. Disfuten mi éxito como el suyo propio. Gracias por formar parte de mi vida, los quiero mucho y que Dios los bendiga.

A mis tíos, por ser un apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. En especial a mi Tía Pita, a mi Tío Charly y mi Tía Raquel, a mi Tía Ceci, a mi Tía Rafa y a mi Tía Lulú. Por sus consejos e interés de compartir conmigo momentos de felicidad, tristeza e incertidumbre. Con el corazón, les agradezco cada esfuerzo que han realizado sólo por el hecho de estar cerca de mí y ayudarme con el más mínimo detalle. MUCHAS GRACIAS, los quiero mucho.

A mis primos por brindarme su cariño y ayuda. En especial a Rod, Jime y Alex, por dejarme entrar en sus vidas y ser parte de la mía. Esta tesis espero que sea una motivación para seguir adelante con sus estudios y planes futuros. Los quiero mucho.

A Aarón, por que "contigo aprendí, a conocer un mundo nuevo de ilusiones". Por que "con dulzura entiendes mis palabras y amas mi locura". Por que "entregas todo, sin pedirme nada, sólo que te ame". Gracias, por que una mirada tuya, es una inspiración para seguir adelante. TE AMO.

pdfMachine

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

A mis amigos, que desde la primaria hasta la universidad fueron una compañía invaluable:

- A Claudia, Ma. Elena, Mónica, Kasha, Héctor, Miguel y Augusto (qepd).
- A Marisol, Marleny, Andrea, Marce, Gina, Itzel, Eleane, Elisa, Clarita, Jaír, Rolando, Charly, Tomás y Aleckz.
- A Sofy, Lilián, Kro, Priscilla, Faby, Paula, Laura, Ángela, Jessica, Gaby, Yaz, Angy, Pive, Oliver, Kurí, Rodrigo, César, J. C., Oscar y Pepe Toño.

Y a muchos otros más.....

A Dios por otorgarme las habilidades y la fortaleza para seguir adelante.

"Nada te turbe,  
nada te espante.  
Todo se pasa,  
Dios no se muda,  
La paciencia todo lo alcanza.  
Quien a Dios tiene,  
nada le falta.  
Sólo Dios basta."

Sta. Teresita del Niño Jesús.

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

*Los químicos son  
una extraña clase de mortales motivados  
por un impulso cercano a la locura para buscar  
placer entre humo y vapor, hollín y  
fuego, venenos y pobreza, pero en  
todos esos males encuentro tal felicidad  
que moriría si cambiara mi lugar  
con el Rey de Persia.*

*Johann Joachim Becker, 1669.*

**pdfMachine**

**A pdf writer that produces quality PDF files with ease!**

Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.

Get yours now!

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	IV
<b>LISTA DE CUADROS</b>	VI
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VIII
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	IX
<b>I. ANTECEDENTES</b>	
1.1. Antecedentes de la especie <i>Matricaria recutita</i> L. Rauschert (Asteraceae).	1
1.2. Antecedentes de la especie <i>Hintonia standleyana</i> Bullock (Rubiaceae).	5
1.3. Importancia de las Monografías de tipo OMS en el control de calidad de los fitomedicamentos.	7
1.4. Importancia de las pruebas de disolución en el desarrollo de una forma de dosificación apropiada para la realización de un estudio clínico.	11
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	14
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1. Material vegetal.	17
3.2. Optimización y validación del método analítico para la cuantificación de la xantocilina (1) en la especie <i>M. recutita</i> por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).	17
3.3. Preparación del aceite esencial de <i>M. recutita</i> .	17
3.4. Aislamiento de la xantocilina (1) a partir de la esencia.	18
3.5. Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.	
3.5.1. Especificidad.	19
3.5.2. Linealidad del sistema.	19
3.5.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).	20
3.5.4. Linealidad del método y exactitud.	20
3.5.5. Precisión del método.	21
3.5.6. Estabilidad.	21



	Página
<b>3.6. Cuantificación del compuesto mayoritario presente en la esencia.</b>	22
<b>3.7. Validación del método analítico para establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (3) presente en las cápsulas preparadas a partir del extracto acuoso de la corteza de la especie <i>Hintonia standleyana</i> por CLAE.</b>	22
<b>3.7.1. Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico de disolución.</b>	
3.7.1.1. Linealidad y precisión del sistema.	22
3.7.1.2. Linealidad y precisión del método.	23
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>4.1. Optimización y validación de un método analítico para cuantificar la xantocilina por CLAE en el aceite esencial de manzanilla.</b>	24
<b>4.1.1. Obtención de los aceites esenciales de <i>M. recutita</i>.</b>	25
<b>4.1.2. Análisis y optimización de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) de utilidad para el control de calidad del aceite esencial de <i>Matricaria recutita</i> (Asteraceae).</b>	26
<b>4.1.3. Validación del método analítico para la cuantificación de xantocilina (1) por CLAE.</b>	27
4.1.3.1. Selectividad.	28
4.1.3.2. Linealidad del sistema.	30
4.1.3.3. Límite de detección y límite de cuantificación.	33
4.1.3.4. Linealidad del método y exactitud.	35
4.1.3.5. Precisión del método.	37
4.1.3.6. Estabilidad.	39
<b>4.1.4. Cuantificación del compuesto mayoritario presente en las esencias de <i>M. recutita</i>.</b>	40

	Página
4.2. Validación del método analítico para establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (3) de las cápsulas obtenidas a partir del extracto acuoso de la corteza de <i>Hintonia standleyana</i> por CLAE.	41
4.2.1. Linealidad y precisión del sistema.	42
4.2.2. Linealidad y precisión del método.	44
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	46
VI. PERSPECTIVAS	47
VII. BIBLIOGRAFIA	48
VIII. GLOSARIO	54
IX. ANEXOS	
ANEXO A.	57
ANEXO B.	59
ANEXO C.	60
ANEXO D.	62
ANEXO E.	62

ACN	Acetonitrilo.
TFA	Ácido trifluoroacético.
$b_1$	Pendiente.
$b_0$	Ordenada al origen.
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano.
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.
CV	Coeficiente de variación (desviación estándar relativa).
$\text{CV}_{\text{FR}}$	Coeficiente de variación del factor de respuesta.
$\text{CV}_{y/x}$	Coeficiente de variación de la regresión.
$ d_i $	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial.
$F_{0.05,gl}$	Valor crítico de la distribución de F-Fischer asociado a una confianza del 5% y a n-2 grados de libertad (gl) establecidos.
$F_0$	Valor calculado de la distribución de F-Fischer asociado a una confianza del 5% y a n-2 grados de libertad (gl) establecidos.
FDA	Food and Drug Administration.
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
FR	Factor de respuesta.
g	Gramos.
gl	Grados de libertad.
$\text{H}_2\text{O}$	Agua.
IC ( $\mu$ )	Intervalo de confianza para la media poblacional.
IC ( $\beta_0$ )	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional.
IC ( $\beta_1$ )	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional.
$\lambda$	Longitud de onda.

LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
$\mu\text{g}$	Microgramo.
mg	Miligramo.
min	Minuto.
$\mu\text{L}$	Microlitro.
mL	Mililitro.
mm	Milímetro.
$n; n_o; n_i$	Número de mediciones o recobros o blancos o muestras o determinaciones.
nm	Nanometro.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
R	Coeficiente de correlación.
$R^2$	Coeficiente de determinación.
S	Desviación estándar.
$S_{bo}$	Desviación estándar de la ordenada al origen.
$S_{b1}$	Desviación estándar de la pendiente.
$S^2$	Varianza.
sec	Segundo.
$S_{y/x}$	Desviación estándar de la regresión.
$t_{0.975,gl}$	Valor de la distribución $t$ -Student asociado a una confianza del 95% y a $n-1$ grados de libertad (gl) establecidos.
$t_R$	Tiempo de retención.
$\bar{x}; \bar{y}$	Media aritmética.
%	Porcentaje o por ciento.

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Productos herbolarios que contiene manzanilla.	2
<b>Cuadro 2.</b> Rendimientos de los aceites esenciales obtenidos a partir de los Lotes I - VIII de <i>M. recutita</i> .	25
<b>Cuadro 3.</b> Resultados experimentales para construir la curva de calibración de la xantocilina (1) para establecer la linealidad del sistema.	31
<b>Cuadro 4.</b> Resumen del análisis de regresión lineal simple de la linealidad del sistema.	32
<b>Cuadro 5.</b> Resultados experimentales para construir la curva de calibración de xantocilina (1) para establecer el LC y LD.	33
<b>Cuadro 6.</b> Resumen de la regresión lineal simple de la curva para establecer los límites de cuantificación y detección de xantocilina (1).	34
<b>Cuadro 7.</b> Resultados experimentales para establecer la linealidad del método.	35
<b>Cuadro 8.</b> Resumen de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método.	36
<b>Cuadro 9.</b> Resultados experimentales para la evaluación de la repetibilidad del método.	38
<b>Cuadro 10.</b> Datos experimentales para la evaluación de la precisión intermedia.	39
<b>Cuadro 11.</b> Resultados de la evaluación de estabilidad representados por $ d_i $ (%).	39
<b>Cuadro 12.</b> Cuantificación de la xantocilina (1) en los Lotes I – VIII de material vegetal.	40
<b>Cuadro 13.</b> Resultados experimentales para la evaluación de la linealidad y precisión del sistema.	42

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 14.</b> Resumen de la regresión lineal simple de la linealidad del sistema.	43
<b>Cuadro 15.</b> Resultados experimentales y calculados para la evaluación de la linealidad y precisión del método.	44

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Matricaria recutita</i> L. (Asteraceae).	1
<b>Figura 2.</b> <i>Hintonia standleyana</i> Bullock (Rubeaceae).	6
<b>Figura 3.</b> Primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001.	12
<b>Figura 4.</b> Aparato de hidrodestilación utilizado para la obtención de las esencias.	18
<b>Figura 5.</b> Cromatograma del estándar de xantocilina ( <b>1</b> ) (125 µg/mL)	18
<b>Figura 6.</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido a partir del Lote III de <i>M. recutita</i> por CLAE.	19
<b>Figura 7.</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido a partir del Lote III de <i>M. recutita</i> .	27
<b>Figura 8.</b> Barrido al UV de la solución de estándar de <b>1</b> (10 mg/mL).	28
<b>Figura 9.</b> Barrido al UV de la matriz de trabajo (1 mg/mL).	29
<b>Figura 10.</b> Barrido al UV de la matriz de trabajo enriquecida con un estándar de xantocilina ( <b>1</b> ) (1 mg/mL).	29
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del preparado fitofarmacéutico elaborado a partir de <i>H. standleyana</i> .	42

## LISTA DE GRÁFICAS

	<b>Página</b>
<b>Gráfica 1.</b> Rendimiento (%) de los aceites esenciales obtenidos a partir de los Lotes I – VIII de <i>M. recutita</i> .	26
<b>Gráfica 2.</b> Linealidad del sistema analítico para cuantificar xantocilina (1) en el aceite esencial de manzanilla.	31
<b>Gráfica 3.</b> Límite de detección y cuantificación de xantocilina (1) en el aceite esencial de <i>M. recutita</i> .	34
<b>Gráfica 4.</b> Exactitud y linealidad del método analítico para cuantificar xantocilina (1) en el aceite esencial de manzanilla.	36
<b>Gráfica 5.</b> Linealidad del sistema analítico para cuantificar AG-4-fenilcumarina (3) en el extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del fitomedicamento.	43
<b>Gráfica 6.</b> Linealidad del método analítico para cuantificar AG-4-fenilcumarina (3) en el extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del fitomedicamento.	45



## I. ANTECEDENTES

### 1.1. Antecedentes de la especie *Matricaria recutita* L. (Asteraceae).

*Matricaria recutita* L. (Asteraceae) (**Figura 1**) es una planta anual herbácea cuya altura oscila entre 20 a 50 cm. Sus tallos son cilíndricos, erguidos, ramosos y con hojas alternas divididas en finos segmentos lineales. Sus ramas presentan en su extremo un botón floral amarillo dorado y lígulas blancas. Sus flores son ligeramente amargas y de olor característico, miden de 10 a 20 mm y presentan un receptáculo cónico y hueco. La especie es nativa de Europa (zona de los Balcanes), Norte de África y la zona templada de Asia occidental; se ha naturalizado bastante bien en algunas regiones de América y Australia (WHO, 1999; Bruneton, 2002).



**Figura 1.** *Matricaria recutita* L. (Asteraceae).

En México, se conoce popularmente con el nombre de “manzanilla” (manzanilla alemana, dulce o cimarrona) y es una de las especies más ampliamente comercializada con fines terapéuticos, principalmente para el tratamiento de trastornos gastrointestinales tales como dolor de estómago y cólicos agudos. También se usa como agente antiinflamatorio, antibacteriano, antiparasitario y antigotoso, entre otras aplicaciones (Pinto *et al.*, 2006).

La manzanilla se consume sola o en mezcla con otras hierbas medicinales y en el **Cuadro 1** se indican ejemplos selectos de algunos de los preparados de plantas medicinales que contienen manzanilla.

**pdfMachine - is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!  
Get yours now!**

“Thank you very much! I can use Acrobat Distiller or the Acrobat PDFWriter but I consider your product a lot easier to use and much preferable to Adobe's” A.Sarras - USA


**Cuadro 1.** Productos herbolarios que contienen manzanilla.

Producto	Composición	Aplicación
 <p><b>MANZANILLA SOPHIA colirio</b></p>	<p>Extracto seco de manzanilla.</p>	<p>Alivio de ojos cansados e irritados</p>
 <p><b>GALLEXIER Comprimidos</b></p>	<p>Extracto seco (43%): raíz de curcuma, hojas de alcachofa, frutos de cardo mariano, diente de león, flores de manzanilla, hojas de <i>Menta piperita</i>. excipientes almidón de arroz, celulosa, preparación de goma laca.</p>	<p>Digestivo y aperitivo</p>
 <p><b>FLORAVITAL Elixir</b></p>	<p>Extracto acuoso (70%): hibisco, flores de manzanilla, hinojo, espinaca. Concentrado de frutas (29%): uva rosada, pera, grosella negra, cereza, zarzamora, zanahoria, gluconato ferroso, extracto de escaramujo (4% de vitamina C), vitaminas (C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>).</p>	<p>Suplemento alimenticio que ayuda al bienestar.</p>
 <p><b>FER RICCO Tablettes</b></p>	<p>Manzanilla, hinojo, diente de león, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B, vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico, vitamina C, hierro (fumarato ferroso).</p>	<p>Complejo vitamínico</p>

**Cuadro 1.** Productos herbolarios que contienen manzanilla (continuación).

Producto	Composición	Aplicación
 <p><b>POLIXIR 02 ESTOMACAL-DIGESTIVO</b></p>	<p>Granada, <i>Aloe vera</i>, patata, col, lactobacilos, rutina, papaya, anís, manzanilla, hinojo, regaliz, azahar, menta.</p>	<p>Digestivo</p>
 <p><b>SALUDYNAM Jarabe</b></p>	<p>Extracto acuoso (50%): flores de hibisco, flores de manzanilla, hinojo, espinaca, fructosa. Concentrado de frutas (12%): mango y naranja. gluconato de magnesio, gluconato de calcio, citrato de magnesio, lactato de calcio, aroma natural de maracuyá, semillas de algarroba en polvo, citrato de zinc, vitamina D.</p>	<p>Suplemento alimenticio que fortifica los huesos</p>
 <p><b>SEATONE COMPLEJO</b></p>	<p>Mejillón de labio verde, L-fenilalanina, vitamina B<sub>6</sub>, manzanilla y anís.</p>	<p>Complemento alimenticio recomendado en inflamaciones (artritis, artrosis y reumatismo).</p>
 <p><b>SEDAPLAN 60 Cápsulas</b></p>	<p>Tila, valeriana, naranjo amargo, melisa, manzanilla, y menta.</p>	<p>Tranquilizante.</p>

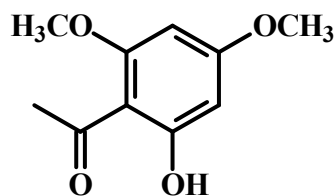
**Cuadro 1.** Productos herbolarios que contienen manzanilla (continuación).

Producto	Composición	Aplicación
 <p><b>OSITO SANITO Fortachón</b></p>	Levadura de cerveza, manzanilla dulce, escaramujo, espinacas, ortigas, hierro, calcio, magnesio, vitaminas C, B1, B2, B6, B12, A, E y D3, en una base de fresa, manzana y miel.	Anemia y anorexia infantil, deficiencia de vitaminas.

La especie *M. recutita* ha sido objeto de numerosas investigaciones desde el punto de vista químico. Los metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen a las categorías de los sesquiterpenoides, los monoterpenoides, los acetilenos, los flavonoides, las cumarinas y los alcaloides (Morón *et al.*, 1996; Medic-Saruc *et al.*, 1997; Repcak *et al.*, 1999 a y b; Maurice, 1999; WHO, 1999; Bruneton, 2002; Hernández-Ceruelos *et al.*, 2002; Orav *et al.*, 2001; May, 2003; Raal *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2004; Svehlikova *et al.*, 2004; Szoke *et al.*, 2004 a y b; Atoui *et al.*, 2005; Wichtl, 2006, *inter alia*). También se ha descrito la presencia de compuestos aromáticos de tipo C<sub>6</sub>C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> (Atoui *et al.*, 2005).

Recientemente, un estudio fitoquímico de una muestra de manzanilla cultivada en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, permitió el aislamiento de la xantocilina (**1**). El extracto íntegro, la infusión y el aceite esencial, preparados a partir de la parte aérea de esa misma muestra, presentaron propiedades antiespasmódicas y analgésicas significativas. El principio mayoritario responsable de esas propiedades fue la xantocilina (**1**). Por último, se estableció que este último compuesto se puede utilizar como marcador de la planta que crece en México, ya que los aceites esenciales de varias muestras comerciales lo contenían invariablemente (Álvarez y Munguía, 2006).

Por otra parte, los estudios químicos realizados sobre las esencias de la planta, recolectada en las más diversas regiones del mundo, han permitido establecer que sus principales constituyentes son de naturaleza sesquiterpenoides, acetilenos, cumarinas, ácida y fenólica, entre otros (Repcak *et al.*, 1999 b; Schulz *et al.*, 2004).



(1)

Por último, otros estudios farmacológicos sobre esta hierba han permitido comprobar sus efectos como agente gastroprotector, antiséptico, bactericida, antiespasmódico, antiinflamatorio y ansiolítico, por mencionar los más relevantes (Viola *et al.*, 1994; Morón *et al.*, 1996; WHO, 1999; Kuklinski, 2000; Hernández-Ceruleos *et al.*, 2002; May, 2003).

## 1.2. Antecedentes de la especie *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae).

*Hintonia standleyana* Bullock (**Figura 2**) conocida popularmente con los nombres de copalchi, quina amarilla, falsa quina, cocostic quina y tlachichitze, entre otros, se utiliza para el tratamiento de la diabetes y fiebres asociadas al paludismo (Hersch-Martínez, 1996; González-Chávez *et al.*, 1996; 2000).

Esta especie pertenece a la familia Rubiaceae, es endémica de México y se encuentra localizada principalmente en las zonas central y sur del país (Martínez, 1989).

Las plantas de esta especie miden hasta 15 m de altura, tienen hojas pubescentes con vellosidades a lo largo de las venas y miden de 3 cm de ancho por unos 12 cm de largo; los tallos son grisáceos y sus flores son blancas con forma de campana y de olor característico.

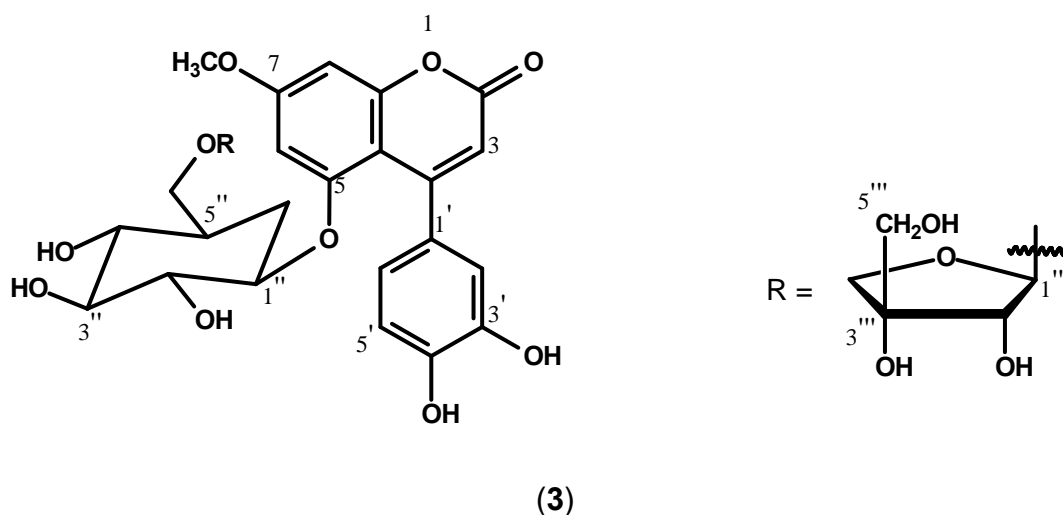


**Figura 2.** *Hintonia standleyana* Bullock (Rubiaceae).

La corteza de *H. standleyana*, junto con las de otras especies pertenecientes al “complejo copalchi”, son ampliamente comercializadas con fines terapéuticos, principalmente para el tratamiento de la diabetes. La amplia comercialización de la planta y la alta incidencia de diabetes mellitus en México hacen de esta planta un candidato idóneo para la realización de estudios químicos, farmacológicos y clínicos enfocados a sentar las bases para el desarrollo de los procedimientos para su control de calidad y establecimiento de su eficacia.

En este contexto, en un estudio que precede al presente trabajo, Guerrero-Analco y colaboradores (2005, 2006 y 2007) comprobaron que un extracto íntegro preparado a partir de la corteza de *H. standleyana* ocasiona un decremento significativo de la concentración de glucosa en sangre en ratas normales y diabéticas. El fraccionamiento biodirigido del extracto antihiperглиcémico permitió el aislamiento y la caracterización de dos fenilcumarinas [5-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**2**) y 5-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**3**) (AG-4-fenilcumarina), dos cucurbitacinas 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**4**) y 25-acetil-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (**5**)] y el alcaloide ácido desoxicordifolínico (**6**).

La fenilcumarina (**3**) fue identificada como el principio activo responsable de la actividad antihiper glucémica del extracto íntegro de la corteza de *H. standleyana*.



De manera adicional, los estudios de toxicidad aguda y potencial mutagénico realizados sobre el extracto orgánico de la corteza permitieron establecer su inocuidad. Finalmente, otros estudios farmacológicos realizados sobre el mismo extracto permitieron establecer su potencial analgésico y evidenciar al compuesto **4** como el metabolito secundario responsable de la actividad farmacológica demostrada por el extracto íntegro (Déciga-Campos *et al.*, 2006).

### 1.3. Importancia de las Monografías de tipo OMS en el control de calidad de los fitomedicamentos.

En la actualidad, la herbolaria medicinal es mundialmente considerada un área muy importante dentro de los sistemas de salud de muchos países del mundo. De tal forma que el mercado global de estos productos es cercano a los \$60 billones de dólares anuales y se estima que continuará creciendo en los próximos años (WHO, 2003) en virtud del renovado interés por el consumo de fitofármacos por parte de amplios sectores de la población, principalmente en los países desarrollados, incluyendo Estados Unidos de Norte América (EE.UU.), Canadá, Australia, Japón y la Comunidad Europea (Eisenberg *et al.*, 1993 y 1998; MacLennan *et al.*, 1996; Millar, 1997).

En referencia a EE.UU., se estima que al menos un 42% de la población ha utilizado la medicina complementaria o alternativa al menos una vez en su vida (WHO, 2002). En este país en el año de 1988 la venta anual de productos herbolarios se aproximaba a los \$200 millones de dólares y para 1998, las ventas al por menor de estos productos fue estimada en \$5.1 billones de dólares por año.

En el mercado Europeo los países con mayores ventas de productos herbolarios son Alemania (45%), Francia (30%), Italia (11%), Gran Bretaña (5%) y España (5%). En Asia las ventas se estimaron en \$4.4 billones de dólares siendo Japón el contribuyente del 50% de esta cifra. Algunos de los productos más comercializados en Europa son los preparados medicinales a base de *Ginko biloba*, *Ginseng*, *Allium sativum*, *Echinacea*, *Hypericum perforatum* e incluso *Oenothera biennis* (Willis *et al.*, 2000). De acuerdo a la OMS, el auge en el consumo de productos herbolarios en estos países se debe a la creencia que los productos naturales son inocuos y libres de los efectos secundarios y reacciones adversas que provocan muchos medicamentos alopáticos.

La situación en los países en vía de desarrollo es diferente, ya que en estos la medicina tradicional siempre se ha utilizado para cubrir las necesidades primarias de salud; esto debido principalmente a la falta de acceso a la medicina alopática, principalmente por los altos costos de las terapias. La OMS estima que 1,500 millones de seres humanos recurren a medicinas y terapias tradicionales para la atención primaria de la salud (Mahady, 1998).

A consecuencia del incremento significativo en el consumo de plantas medicinales se ha dado paso a un nuevo mercado de medicamentos elaborados con plantas completas o con sus extractos. Este mercado se encuentra en plena expansión en todo el mundo, reconociéndose así el valor clínico de las plantas utilizadas en las prácticas médicas alternativas.

Ante el continuo aumento en la comercialización de los productos herbolarios existe un creciente interés por regular su manufactura, venta y calidad a nivel global. En varias partes de Europa y en Australia los productos herbolarios son regulados como agentes terapéuticos convencionales y deben ser fabricados bajo el código farmacéutico de las buenas prácticas de fabricación. En EE.UU. Estos productos se elaboran siguiendo las buenas prácticas de fabricación para alimentos, de ahí el



nombre de suplementos dietéticos para catalogar a muchos de estos productos (Willis *et al.*, 2000).

En los países en vía de desarrollo, como México, a pesar de la gran tradición en el uso de plantas con fines curativos, no hay normas oficiales claras que regulen su uso como medicamentos (WHO, 1998). Sin embargo, ante la desmedida comercialización de las plantas medicinales y sus derivados, las autoridades han visto la necesidad de modificar las leyes actuales que regulan el registro, control de calidad y consumo de los productos herbolarios. Para ello sería deseable que nuestras autoridades tomaran en cuenta de manera más eficiente los lineamientos propuestos por la OMS en cuanto a la investigación científica relacionada con la eficacia, inocuidad y calidad de las plantas medicinales y sus preparados de mayor uso en las prácticas médicas alternativas.

En 1979 la OMS planteó la necesidad de redactar monografías específicas para cada droga vegetal con métodos generales de control de calidad además de la recopilación de datos botánicos, químicos, biológicos y de tipo farmacognósticos con la finalidad de auxiliar a las autoridades sanitarias de sus países miembros en las tareas de regulación y consumo de productos herbolarios. Veinte años más tarde, en 1999, los esfuerzos de la OMS por promover la regulación global de los productos fitoterapéuticos conllevaron a la publicación de un primer tomo con 28 monografías de plantas medicinales de amplio uso en el mundo. Estas monografías servirían de modelo para que los países miembros elaborasen las monografías de sus plantas autóctonas. Posteriormente, en el año 2001 se publicó un segundo tomo con 32 monografías adicionales (WHO, 1999; 2002b).

Las monografías de la OMS constan de dos partes, la primera se refiere a la identificación y aseguramiento de calidad (aspectos botánicos, distribución geográfica, ensayos de identidad, requerimientos de pureza, análisis químicos y principales constituyentes) de las plantas. La segunda parte está basada en una extensa revisión de trabajos científicos, e incluye los usos tradicionales no demostrados experimentalmente, así como los datos sobre experimentación farmacológica y clínica, posibles contradicciones, precauciones, efectos secundarios y posología de cada planta (WHO, 1999; 2002b).

En algunos países como China, las monografías de los medicamentos tradicionales se encuentran junto con las monografías de los medicamentos de

patente y ambos son regulados por la Ley de Administración de Medicamentos. Las monografías describen la fuente o las sustancias usadas, las prescripciones, los métodos de preparación, la identificación, la extracción, los efectos y las indicaciones, así como métodos principales de uso, dosificación y precauciones (WHO, 2002a).

Otros países, con base en las monografías tipo OMS, han recopilado información de las plantas y preparados medicinales más comercializados en su nación, creando con ello sus propios acervos. Así por ejemplo, en Europa en 1989 se fundó la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP) con el objetivo de establecer criterios armonizados para la evaluación de las fitomedicinas. A la fecha ESCOP ha publicado 6 fascículos con 10 monografías cada uno. Estas monografías constan de los siguientes apartados: denominación latina e inglesa de la droga, definición de las partes utilizadas, constituyentes principales, indicaciones terapéuticas, posología y forma de administración, precauciones, posibles interacciones, efectos sobre el embarazo y la lactancia, efectos secundarios indeseables, sobredosificación, propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas, ensayos clínicos y datos preclínicos de seguridad (Barnes, 2003 a y b).

En Estados Unidos de América del Norte la mayoría de los productos naturales están regulados como alimentos o suplementos dietéticos, por lo que para su comercialización no es necesaria la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Sin embargo, la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP) ha publicado folletos, textos y monografías de especies medicinales de amplio uso en los Estados Unidos con la misión de promover el uso responsable de los medicamentos herbolarios. Las monografías contienen información crítica y detallada sobre los usos populares de las plantas, estudios toxicológicos, farmacológicos y clínicos, que sustentan la eficacia y seguridad de esas plantas; así como sus principios activos y pruebas de pureza, composición e identidad. Otro de los objetivos de la AHP es generar estándares de referencia de utilidad para los ensayos de control de calidad. En 2003 la FDA publicó las guías de buenas prácticas de manufactura para productos herbolarios. Este documento fomenta la investigación conducente al establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, pureza, calidad y potencia de las drogas crudas y sus

productos fitofarmacéuticos. (Flaster y Lassiter, 2004; Sharpless *et al.*, 2004; Reif *et al.*, 2004; Bone, 2001; WHO, 2002a).

En México, siguiendo los lineamientos de la OMS, la Secretaría de Salud publicó en el año 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) (**Figura 3**). Este escrito contiene 41 monografías de plantas medicinales y 22 de aceites esenciales de mayor consumo en México. Así mismo contiene procedimientos generales de análisis. Este esfuerzo aunque importante, resulta insuficiente si se considera que en el México actual se utilizan más de 3,500 especies vegetales con fines curativos.

Las monografías tipo OMS además de constituir herramientas científicas valiosas para el sector salud en la regulación, adecuación e incorporación de los remedios tradicionales a los sistemas de salud oficial alrededor del mundo; también son de gran importancia para normar el creciente comercio de drogas vegetales en el globo y para el público en general. Cabe mencionar que la falta de regulación de los productos herbolarios ocasiona que a menudo los productos más comercializados sean adulterados, sustituidos (con otras plantas o fármacos), o se encuentran contaminados con otras plantas, microorganismos, plaguicidas, metales tóxicos, por tan solo mencionar algunos (Wichtl, 2006). Por ende, la variación en la composición de los ingredientes activos de las plantas medicinales es muy frecuente.

#### **1.4. Importancia de las pruebas de disolución en el desarrollo de una forma de dosificación apropiada para la realización de un estudio clínico.**

De manera general, el desarrollo de un medicamento, independientemente de su naturaleza, consta de dos etapas: la preclínica y la clínica.

El desarrollo preclínico de un producto desde su descubrimiento hasta que se convierta en Nueva Aplicación del Fármaco (NDA), involucra a su vez varias fases. Las más relevantes son: el tamizaje biológico que permitió su descubrimiento, estudios farmacológicos y toxicológicos tanto *In vitro* como *In vivo*; el análisis de sus propiedades fisicoquímicas; la optimización de la actividad farmacológica por medio de modificaciones a la molécula; la optimización del proceso de síntesis (en caso de

productos sintéticos) o extracción y desarrollo de la forma de dosificación apropiada (Gadamasetti *et al.*, 1999; Avendaño, 2001).



**Figura 3.** Primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001.

Durante el desarrollo de la formulación, uno de los aspectos que se consideran en el presente trabajo, es fundamental establecer el perfil de disolución del fármaco en la forma de dosificación seleccionada. Esta etapa es importante, pues la absorción de un fármaco tras la administración oral, depende de su liberación del producto medicinal, su disolución en condiciones fisiológicas y su permeabilidad a través del sistema gastrointestinal. Debido a la naturaleza crítica de los primeros dos pasos, la disolución *In vitro* puede ser relevante para la predicción del comportamiento *In vivo*.

En general, las pruebas de disolución *In vitro* se utilizan para las formas de dosificación oral tanto sólidas (comprimidos y cápsulas) como líquidas. Estas pruebas son de utilidad para el desarrollo de nuevas formulaciones, la evaluación de la calidad de un producto medicinal lote a lote, el aseguramiento de la calidad y el comportamiento del producto después de ciertos cambios en la formulación o en el

proceso de fabricación, la evaluación de la estabilidad del producto y por último para determinar a priori la biodisponibilidad del fármaco *In vivo* (Lachman *et al.*, 1986; Sworbrick y Boylan, 2002).

Cuando se ha finalizado satisfactoriamente la Investigación de la Aplicación del Nuevo Fármaco (IND), se realizan los estudios clínicos en humanos. El estudio consta de cuatro fases que se implementan con base en protocolos bien establecidos. Al final de los estudios se contará con la siguiente información del producto: farmacocinética, farmacodinámica, tolerancia de dosis, inocuidad, dosis efectiva y efectos adversos. Posteriormente se lleva a cabo el registro, la salida del medicamento al mercado y su seguimiento (farmacovigilancia) (Nwaka y Ridley, 2003).

Todas las investigaciones desde el descubrimiento hasta la salida al mercado del medicamento y la farmacovigilancia, deben estar regulados por normas y protocolos de Buenas Prácticas de Fabricación, Clínicas y de Laboratorio, además de las guías propuestas por organizaciones mundiales y nacionales como la OMS, la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Asociación Médica Mundial, la Agencia Europea de Medicinas (EMA), la Agencia de Dispositivos Farmacéuticos y Médicos de Japón (PMDA), Farmacopea de los Estados Unidos (USP), entre otros. En el caso de México la regulación está a cargo de la Secretaría de Salud a través de las normas (NOMS) 073 (estabilidad, 2005), 059 (buenas prácticas de fabricación en la industria farmacéutica, 1993), 164 (buenas prácticas de fabricación para fármacos, 1998), 177 (estudios de bioequivalencia, 1998), 072 (etiquetado de medicamentos, 1993), 220 (farmacovigilancia, 2002), por mencionar algunas.

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

México es un país de amplia tradición en el uso de plantas con fines curativos. Desde épocas prehispánicas el arte de los médicos yerberos (curanderos) ha sido el reconocimiento del beneficio de las plantas a través de un proceso de prueba y error sobre condiciones específicas en humanos (Willis *et al.*, 2000). Muchos de esos remedios tradicionales se utilizan hoy día, de tal manera que de acuerdo a un inventario llevado a cabo por el Instituto Nacional Indigenista (INI) existen más de tres mil quinientas especies vegetales utilizadas por un gran sector de la población para tratar las enfermedades que más aquejan a la población (Argueta *et al.*, 1994). Sin embargo, el porcentaje de especies nativas o introducidas que han sido investigadas para establecer su nula o poca toxicidad, eficacia y calidad es extremadamente pequeño. Así mismo, al igual que en otras regiones del mundo, muchas de estas especies se explotan y comercializan de manera irracional y sin control alguno, por lo tanto su calidad suele ser deficiente. De ahí la necesidad de establecer los parámetros de calidad de las drogas crudas de mayor comercialización en México.

Consciente de esta situación, la Secretaría de Salud publicó en el año 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Este escrito contiene 41 monografías de plantas medicinales y 22 de aceites esenciales de mayor consumo en México. Estas describen sus características de identidad, pureza y composición. Sin embargo, la mayoría de las monografías son de plantas introducidas y son fiel copia de las publicadas en las farmacopeas española y europea. La utilidad de estas monografías para el control de calidad de las plantas introducidas, pero de gran consumo en el México actual, puede ser cuestionada ya que las plantas que se cultivan en distintas regiones del mundo varían en composición, eficacia y toxicidad; estas variaciones deben de considerarse para establecer las pruebas de utilidad para el control de calidad de esas plantas.

Por otro lado, las monografías de plantas autóctonas son prácticamente inexistentes en esta primera edición de la Farmacopea Herbolaria. La razón es muy sencilla: No se dispone de la información científica necesaria para integrarlas. En consecuencia, es una necesidad urgente establecer los procedimientos para determinar los parámetros de calidad de aquellas especies medicinales autóctonas e introducidas de mayor uso en México con la finalidad de integrarlas a sus

monografías, bien sean de tipo OMS o farmacopeicas. Indudablemente, la generación de monografías oficiales de plantas medicinales permitirá uniformar los criterios de calidad, eficacia y pureza de los productos medicinales vegetales de mayor uso en México.

Con base en lo antes expuesto y como parte de un proyecto de carácter multidisciplinario que pretende generar los parámetros de calidad, eficacia e inocuidad de las plantas medicinales de mayor uso en México, la primera parte de la tesis tiene como objetivo principal optimizar los procedimientos analíticos para valorar el contenido del compuesto marcador de la esencia de la especie *Matricaria recutita* (Asteraceae). De esta manera se contará con las pruebas de composición adecuadas de utilidad para el control de calidad de la droga cruda de esta importante planta.

Para el cumplimiento de este objetivo se contemplaron los siguientes objetivos particulares:

- Preparar el aceite esencial a partir de la droga cruda, adquirida en mercados populares o en tiendas de autoservicio, mediante un proceso de hidrodestilación.
- Optimizar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para cuantificar la acetofenona (xantocilina) en la esencia de *M. recutita*.
- Validar el método analítico optimizado evaluando los parámetros de selectividad, linealidad, precisión y exactitud.
- Cuantificar el contenido de xantocilina en los aceites esenciales preparados a partir de distintas materias primas mediante el método validado.

Muchas de las plantas medicinales de gran consumo en México se utilizan para elaborar los denominados fitofármacos o medicamentos herbolarios. Generalmente estos productos se desarrollan de manera empírica sin cumplir las buenas normas de investigación, desarrollo y fabricación. Esto ha dado lugar al comercio de un gran número de productos potencialmente dañinos para la salud de los consumidores. Por ello, y como parte del proceso del desarrollo de un medicamento herbolario de utilidad para el tratamiento de la diabetes mellitus,

primera causa de morbilidad y mortalidad en México, la segunda parte del presente trabajo de tesis tiene por objetivo primordial iniciar los estudios de disolución por CLAE de las cápsulas elaboradas a partir de un extracto acuoso antihiperlipémico de la corteza de la planta *Hintonia standleyana* (Rubiaceae) de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.

Los objetivos particulares contemplados son:

- Determinar si el método analítico previamente desarrollado y validado por Méndez (2005), para cuantificar 5 - O - [  $\beta$  - D - apiofuranosil- (1 $\rightarrow$  6)-  $\beta$  - D - glucopiranosil ] -7- metoxi- 3',4'-dihidroxi - 4 - fenilcumarina en la droga cruda de *H. standleyana*, se puede aplicar para establecer el perfil de disolución en medio acuoso.
- Revalidar el método analítico desarrollado por Méndez (2005) evaluando únicamente los parámetros de linealidad y precisión con la finalidad de establecer el perfil de disolución en medio acuoso.



### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Material vegetal.

Las muestras de material utilizados en el presente estudio se adquirieron en el mercado de Sonora (Lote I), en el mercado de Coyoacán (Lote II) y en el mercado de la Merced (Lote III), todos localizados en la Ciudad de México en el mes de abril del 2007. De manera adicional, se adquirieron cinco marcas comerciales de material vegetal desecado (Lotes IV – VIII).

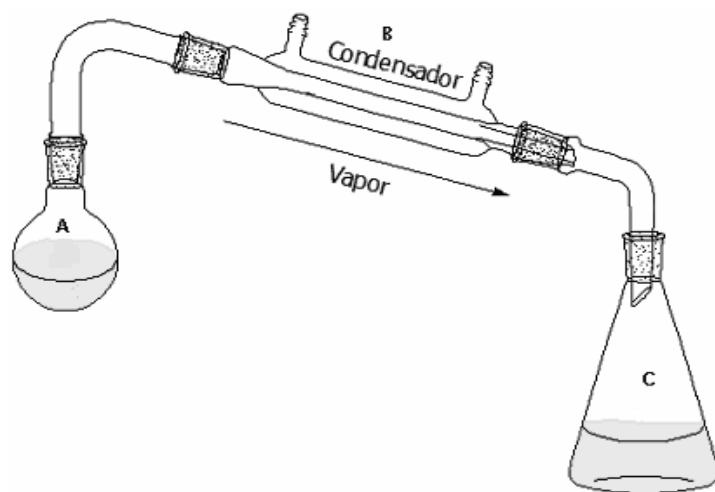
#### 3.2. Optimización y validación del método analítico para la cuantificación de la xantocilina (1) en la especie *M. recutita* por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de la Marca Waters, equipado con un inyector de tipo manual (Rheodyne 77251), una bomba modelo 600E con un sistema de entrega de disolventes múltiple y un detector de UV DUAL (2487). El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Empower 2.0 (Waters). La separación de la xantocilina (1), así como, el desarrollo del método analítico se realizó utilizando una columna empacada con gel de sílice Symmetry® C-18 Marca Waters con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , de 3.9 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud. Utilizando un sistema de elución isocrático binario constituido por una mezcla de ACN-H<sub>2</sub>O (1:1). La velocidad del flujo fue de 0.7 mL/min. La longitud de onda ( $\lambda$ ) utilizada para la detección de la xantocilina (1) fue de 275 nm y se trabajó a temperatura ambiente. El tiempo de retención ( $t_R$ ) de (1) bajo estas condiciones, fue de 17.7 min.

#### 3.3. Preparación del aceite esencial de *M. recutita*.

Para la preparación de las esencias analizadas en el presente estudio se utilizaron todos los lotes de material vegetal (I – VIII). En todos los casos, la esencia se preparó a partir de material vegetal seco y molido de la especie *M. recutita* y agua destilada mediante un procedimiento de hidrodestilación empleando un sistema de destilación simple (**Figura 4**) de acuerdo a las especificaciones de la FHEUM (2001) y la OMS. Posteriormente, la esencia fue extraída del hidrodestilado mediante una

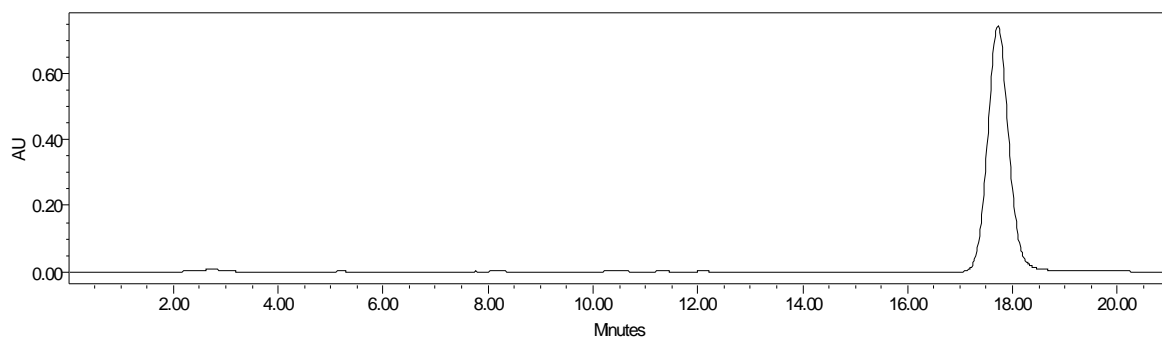
partición con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 1000 mL). Las fases orgánicas resultantes se concentraron a presión reducida, obteniéndose un residuo ámbar. El constituyente mayoritario presente en la esencia se identificó por CLAE y por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de una muestra adquirida comercialmente.



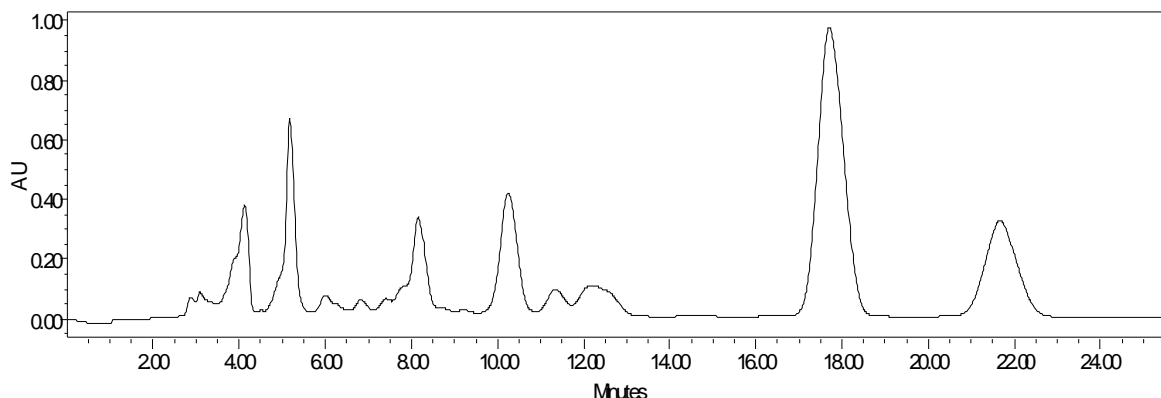
**Figura 4.** Aparato de hidroddestilación utilizado para la obtención de las esencias.

### 3.4. Aislamiento de la xantocilina (1) a partir de la esencia.

La purificación por CLAE (**Figura 5**) de la xantocilina (1) a partir de una de las esencias de *M. recutita* se realizó en una columna de gel de sílice (fase reversa) utilizando un flujo de 16 mL/min y ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) como fase móvil. Estas condiciones cromatográficas permitieron la purificación de 1 como un sólido blanco con p. f. 80-82 °C y un  $t_R$  de 17.7 min.



**Figura 5.** Cromatograma del estándar de xantocilina (1) (125  $\mu\text{g/mL}$ ). Fase móvil: ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18;  $\lambda$  275 nm.  $t_R$  = 17.8 min.



**Figura 6.** Cromatograma del aceite esencial obtenido a partir del Lote III de *M. recutita* por CLAE. Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18;  $\lambda$  275 nm (Xantocilina:  $t_R$  = 17.7 min).

La presencia de xantocilina en la esencia de *M. recutita* se corroboró por una co-inyección de una muestra de la matriz de trabajo y solución estándar de xantocilina. Observándose un aumento en el área del pico correspondiente a la xantocilina ( $t_R$  = 17.7 min).

### 3.5. Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.

#### 3.5.1. Especificidad.

La especificidad del método analítico se realizó mediante el registro de los espectros de absorción, en el rango de longitudes de onda ( $\lambda$ ) del ultravioleta (UV), de cuatro muestras diferentes: Una correspondiente al estándar a dos diferentes concentraciones (10 y 1 mg/mL); otra a la matriz de trabajo (10 mg/mL), y la última, a la matriz de trabajo enriquecida con el estándar de xantocilina (1). Ésta última muestra se preparó mezclando 50  $\mu$ L de matriz de trabajo y 50  $\mu$ L de la solución estándar de xantocilina (1) a la concentración de 1 mg/mL.

#### 3.5.2. Linealidad del sistema.

Para evaluar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración de acuerdo al siguiente procedimiento: 10 mg de xantocilina (1) se disolvieron en 1 mL de ACN (10 mg/mL). A partir de la solución anterior, se prepararon las disoluciones que contenían entre 25 y 500  $\mu$ g/mL del estándar a cuantificar.

El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico del estándar de seis réplicas, se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución.

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se comparan con los siguientes criterios:  $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $R \geq 0.99$ ,  $R^2 \geq 0.98$ .

### 3.5.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Para evaluar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se preparó una curva de calibración con una serie de disoluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Las diluciones contenían entre 0.5 y 7.5  $\mu\text{g/mL}$  del estándar a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área del pico (ABC) que corresponde al estándar de cada réplica se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), coeficiente de correlación ( $R$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se utilizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

\*Para el cálculo de  $b_1$  y  $S_{y/x}$  ver ANEXO A.

### 3.5.4. Linealidad del método y exactitud.

La linealidad del método y su exactitud se determinó construyendo una curva de calibración de la matriz de trabajo enriquecida con tres diferentes concentraciones del estándar de xantocilina (1) (125, 250 y 375  $\mu\text{g/mL}$ ). Se evaluaron tres réplicas por cada concentración para así tener los valores del ABC. Estos valores se interpolaron en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs. concentración recuperada) fueron analizados mediante un análisis de regresión

lineal simple para determinar sus parámetros estadísticos ( $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $R \geq 0.99$ ,  $R^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 2\%$ ). La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional ( $IC(\mu)$ ) del % de recobro.

### 3.5.5. Precisión del método.

La repetibilidad se evaluó midiendo la respuesta analítica de seis réplicas de estándar de xantoxilina (**1**) a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$  aproximadamente.

La precisión intermedia se realizó mediante un análisis de seis réplicas de la matriz de trabajo enriquecida con estándar de xantocilina (**1**) (250  $\mu\text{g/mL}$ ), este análisis lo efectuaron dos analistas en dos días distintos.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

### 3.5.6. Estabilidad.

La estabilidad de la muestra se evaluó midiendo el % de xantocilina (**1**) contenida en una solución preparada de estándar de **1** con una concentración aproximada de 300  $\mu\text{g/mL}$  y otra solución de aceite esencial del lote II de manzanilla con una concentración aproximada de 30  $\mu\text{g/mL}$ .

Las condiciones de almacenaje fueron las temperaturas: 37°C, temperatura ambiente y - 4°C. En cada una de las condiciones se analizaron tres muestras cada una por duplicado. El primer día se obtuvieron los resultados del análisis inicial. A los siete días se realizó un análisis de las muestras a - 4°C (primera descongelación). Por último a los quince días se analizaron todas las muestras almacenadas en las tres condiciones de temperatura.

Los resultados se expresan en términos de diferencias absolutas de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto a la media aritmética del análisis inicial ( $|d_i|$ ).

### 3.6. Cuantificación del compuesto mayoritario presente en la esencia.

10 mg de esencia a analizar y 10 mg de estándar interno (ácido 4-hidroxibenzoico) se disolvieron en 1 mL de ACN. El constituyente mayoritario presente en la esencia se cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en el inciso **3.2**.

Para determinar el área bajo la curva (ABC) se utilizó el software del equipo. La cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de una curva de calibración previamente diseñada.

### 3.7. Validación del método analítico para establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (**3**) presente en las cápsulas preparadas a partir del extracto acuoso de la corteza de la especie *Hintonia standleyana* por CLAE.

La validación del método analítico desarrollado para establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (**3**) presente en las cápsulas del preparado antidiabético a base de *H. standleyana* se realizó empleando el sistema cromatográfico descrito en el inciso **3.2**. Utilizando para ello una columna cromatográfica empacada con gel de sílice Symmetry® C-8 Marca Waters con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , de 3.9 mm de diámetro interno y 150 mm de longitud. La fase móvil esta constituida por ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) (19:81). La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/min. La longitud de onda ( $\lambda$ ) utilizada para la detección fue de 327 nm y se trabajó a temperatura ambiente.

#### 3.7.1 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico de disolución.

##### 3.7.1.1. Linealidad y precisión del sistema.

La linealidad y precisión del sistema se evaluaron construyendo una curva de calibración utilizando una solución estándar de AG-4-fenilcumarina (**3**) (49.2  $\mu\text{g/mL}$ ). A partir de la solución anterior se realizaron diferentes diluciones de tal manera que

10 mL de las mismas contenían entre 2.5 y 49.2  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto **3**. Este análisis se realizó por duplicado. De cada una de las respuestas analíticas se construye una gráfica de área bajo la curva (ABC) vs. concentración y se realiza un análisis de regresión lineal simple. La precisión del sistema se expresa en términos del CV.

#### 3.7.1.2. Linealidad y precisión del método.

Para evaluar la linealidad y precisión del método se seleccionaron 10 cápsulas provenientes de tres lotes diferentes. El contenido de cada lote de cápsulas seleccionadas se vació y se mezcló con la finalidad de construir una curva de calibración utilizando la metodología descrita en el inciso anterior.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Optimización y validación de un método analítico para cuantificar la xantocilina (1) por CLAE en el aceite esencial de manzanilla.

La especie *Matricaria recutita* es una de las plantas más comercializadas en México con fines curativos. En la Farmacopea herbolaria vigente (FHEUM, 2001) se recomienda como prueba de valoración determinar el rendimiento del aceite esencial azul obtenido por la hidrodestilación de la droga cruda. La coloración azul del aceite de la manzanilla europea se debe a la presencia de camazuleno (Dewick, 1997), compuesto que se forma *In situ* a partir de la lactona sesquiterpénica matricina durante la destilación.

Los distintos estudios realizados sobre varias muestras de manzanilla nacional, tanto comerciales como cultivadas, indicaron que sus aceites esenciales carecen de camazuleno (Álvarez y Munguía, 2006) por lo tanto, los métodos de control de calidad que se proponen en la monografía de la Farmacopea Herbolaria no son los adecuados para la manzanilla que crece en México.

Recientemente en el trabajo que precede a esta investigación se determinó que la xantocilina (1) es uno de los constituyentes activos de la manzanilla de México, y además, su compuesto marcador (Álvarez y Munguía, 2006). Sin embargo, a la fecha no se dispone de un método analítico oficial para cuantificar los principios activos y/o marcadores de la planta. Esta información en conjunto con otras pruebas de calidad y varios parámetros de eficacia y seguridad ya establecidos permitirá la integración de las monografías tipo OMS y farmacopeica de esta importante planta medicinal.

Para desarrollar el método analítico se utilizó la siguiente estrategia: En primer lugar se realizó la preparación de varias esencias a partir de ocho muestras de manzanilla de diferente procedencia utilizando un método de hidrodestilación. Posteriormente se optimizaron las condiciones de análisis por CLAE desarrolladas por Álvarez y Munguía (2006) y se validó el método analítico. Por último, se aplicó el método para cuantificar la cantidad de xantocilina (1) en las ocho esencias preparadas.



En los siguientes párrafos se discutirá en detalle el desarrollo, validación y aplicación del método analítico que se propone para el control de calidad de la droga cruda de la manzanilla nacional.

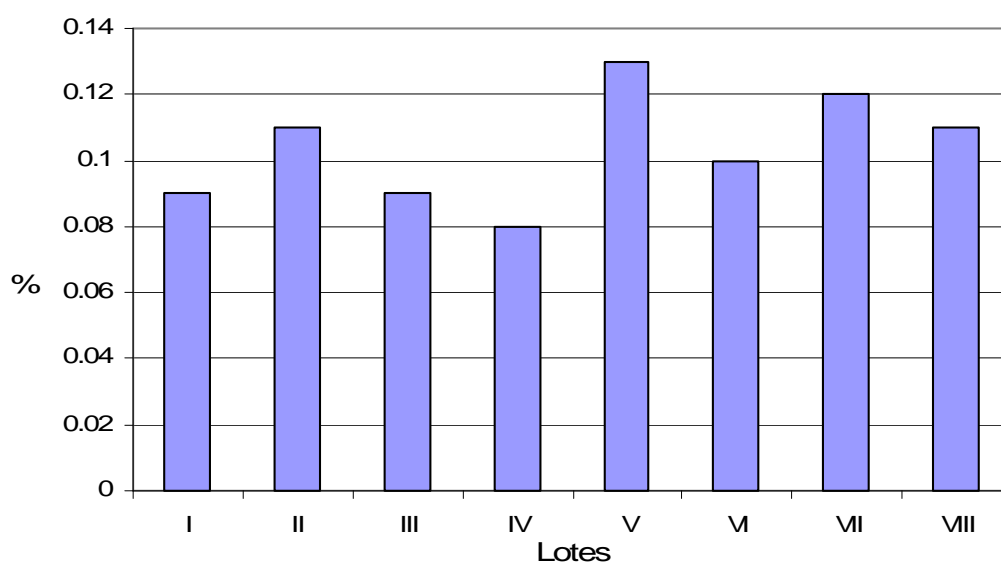
#### 4.1.1. Obtención de los aceites esenciales de *M. recutita*.

La preparación de los aceites esenciales a partir del material vegetal (Lotes I - VIII) se realizó de acuerdo a la metodología que se describe en la parte experimental inciso 3.3. Los rendimientos por gramo de vegetal seco y los porcentuales se resumen en el **Cuadro 2** y en **Gráfica 1**, respectivamente.

**Cuadro 2.** Rendimientos de los aceites esenciales obtenidos a partir de los Lotes I - VIII de *M. recutita*.

Muestra	Peso del Material Vegetal Seco (g)	Peso del aceite (mg)	Rendimiento (mg/g de planta seca)
Lote I	501.0	463.9	0.93
Lote II	250.5	267.8	1.07
Lote III	252.0	220.2	0.87
Lote IV	100.4	83.4	0.83
Lote V	99.5	126.9	1.28
Lote VI	97.1	98.5	1.01
Lote VII	100.4	122.5	1.22
Lote VIII	75.4	81.5	1.08

De los resultados obtenidos, y a pesar del diseño precario del equipo de hidrodestilación, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre los rendimientos calculados para cada uno de los lotes analizados.



**Gráfica 1.** Rendimiento (%) de los aceites esenciales obtenidos a partir de los Lotes I – VIII de *M. recutita*.

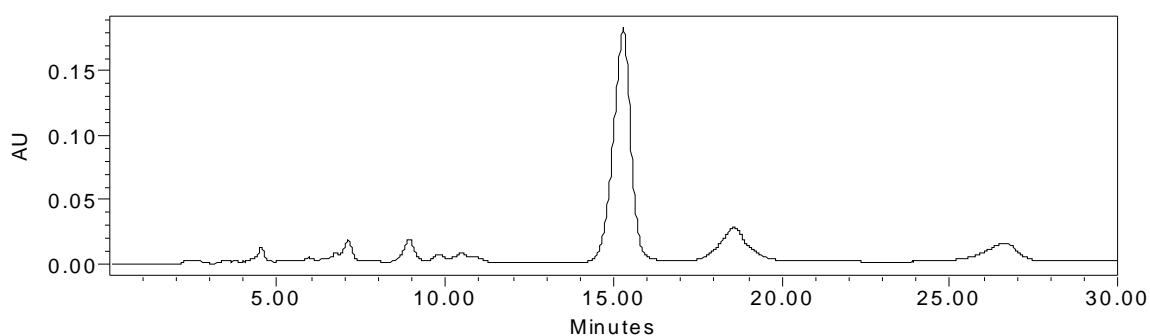
#### 4.1.2. Análisis y optimización de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) de utilidad para el control de calidad del aceite esencial de *Matricaria recutita* (Asteraceae).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) es una de las técnicas analíticas más utilizadas para el desarrollo y validación de métodos analíticos, así como, para la obtención de perfiles cromatográficos de utilidad para el aseguramiento de la calidad durante los procesos de estandarización y/o normalización de drogas crudas o preparados fitofarmacéuticos (Schulz y Albroscheit, 1998; Hubert *et al.*, 1999; Repcak *et al.*, 1999b; Wood, 1999; Willis *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2004; Stevigny *et al.*, 2004).

Para el desarrollo del método analítico por CLAE se optimizó el método desarrollado por Álvarez y Munguía (2006). Para ello, la concentración del aceite (matriz de trabajo) se ajustó de 0.8 mg/mL a 0.05 mg en 1 mL de ACN para obtener una respuesta del detector menor a 0.1 unidad de absorbancia. A la fase móvil inicial constituida por ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) (1:1) se le retiró el ácido trifluoracético de la fase acuosa de tal forma que la fase móvil quedo constituida por ACN- H<sub>2</sub>O (1:1). Esta modificación se realizó porque la resolución de los picos era indistinta con o sin

el ácido en la fase móvil. Inicialmente se incluyó el ácido para evitar el ensanchamiento del pico correspondiente a la xantocilina (**1**). Por último, la velocidad de flujo se aumentó de 0.35 a 0.7 mL/min; con ello se redujo el tiempo de retención del producto de interés y por lo tanto el tiempo de la corrida analítica.

Los cromatogramas de las esencias de los distintos lotes de planta analizados bajo las condiciones optimizadas revelan que la xantocilina (**1**) es el compuesto mayoritario. En la **Figura 7**, a manera de ejemplo, se presenta el cromatograma del Lote III obtenido del mercado popular de la Merced.



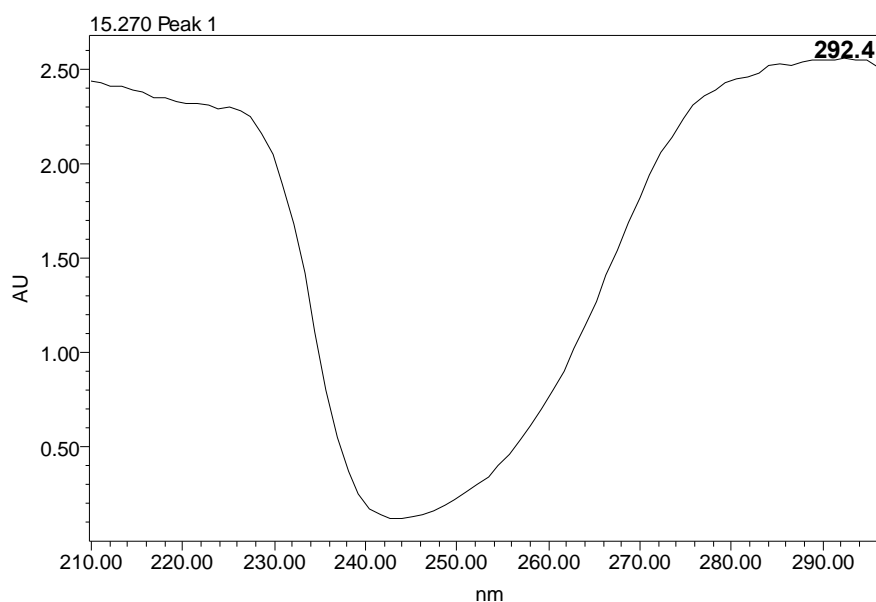
**Figura 7.** Cromatograma del aceite esencial obtenido a partir del Lote III de *M. recutita*. Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18,  $\lambda$  270 nm (xantocilina:  $t_R = 15.3$  min).

#### 4.1.3. Validación del método analítico para la cuantificación de xantocilina (**1**) por CLAE.

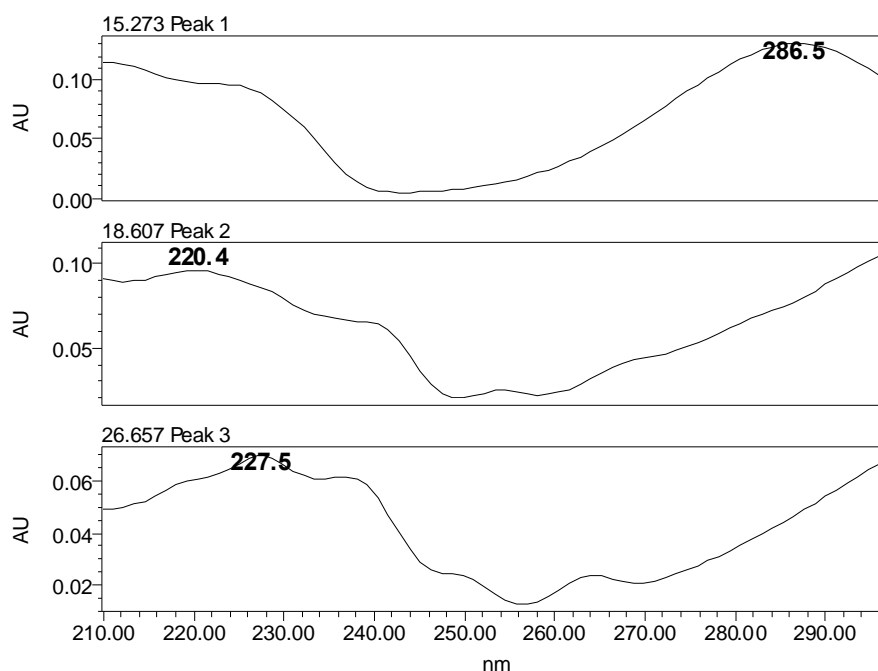
Una vez desarrollado el método analítico conducente a realizar la cuantificación de los ingredientes activos y/o compuestos marcadores una parte importante es la validación de éste. En el presente estudio, los parámetros de calidad evaluados para validar el método analítico desarrollado incluyen: Selectividad, linealidad, precisión y exactitud, de acuerdo a las Guías de Validación publicadas por la FDA (ICH Q2 (R1), 2005). Los resultados obtenidos para cada parámetro de calidad evaluado se resumen a continuación:

## 4.1.3.1. Selectividad.

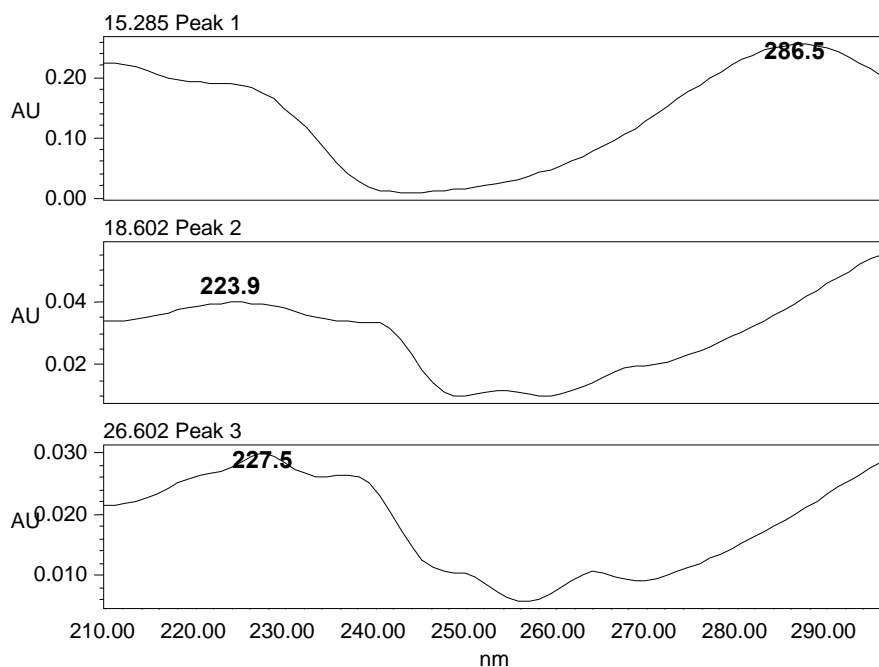
Un método es selectivo cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se relaciona únicamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en una muestra de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2(R1), 2005; WHO, 2007). La selectividad se determinó comparando los cromatogramas obtenidos al UV en un barrido comprendido entre 210 a 300 nm (**Figuras 8-10**) de cuatro muestras correspondientes al estándar a dos diferentes concentraciones (10 y 1 mg/mL), a la matriz de trabajo y a la matriz de trabajo enriquecida con el estándar a la concentración de 1 mg/mL. Como se puede observar en las **Figuras 8-10** no existen diferencias en las respuestas analíticas obtenidas. Estos resultados indican que la respuesta es debida sólo a la presencia de la xantocilina (**1**).



**Figura 8.** Barrido al UV de la solución de estándar de **1** (10 mg/mL). Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18.



**Figura 9.** Barrido al UV de la matriz de trabajo (1 mg/mL). Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18.



**Figura 10.** Barrido al UV de la matriz de trabajo enriquecida con un estándar de xantocilina (**1**) (1 mg/mL). Fase móvil: ACN-H<sub>2</sub>O (1:1), velocidad de flujo 0.7 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-18.

## 4.1.3.2. Linealidad del sistema.

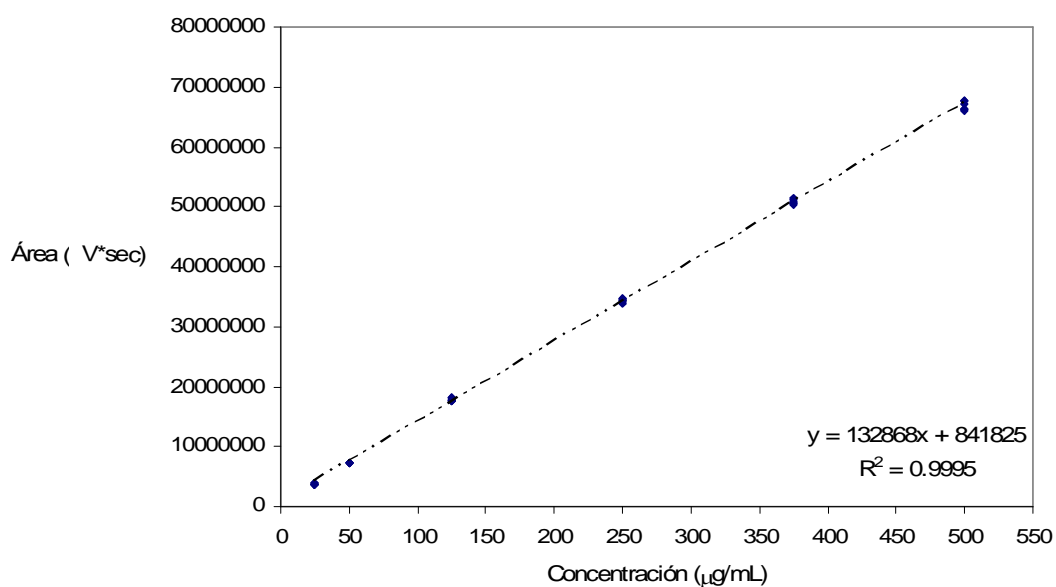
Se dice que el sistema es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2(R1), 2005; WHO, 2007). La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con seis diferentes niveles de concentración a partir de una solución estándar de xantocilina (1). Los resultados se resumen en el **Cuadro 3** y en la **Gráfica 2**. Las concentraciones analizadas están comprendidas entre el intervalo de 10 al 200% de la concentración estimada como el 100%, mediante la realización de ensayos preliminares realizadas en diferentes muestras de esencias.

**Cuadro 3.** Resultados experimentales para construir la curva de calibración de la xantocilina (1) para establecer la linealidad del sistema.

Solución	Nivel	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	200	500	67796690
2	200	500	67828416
3	200	500	67025500
4	200	500	66234676
5	200	500	66028599
6	200	500	66290618
7	150	375	50361788
8	150	375	50877021
9	150	375	50764063
10	150	375	51604652
11	150	375	51179629
12	150	375	50714616
13	100	250	34408816
14	100	250	34102786
15	100	250	34622944
16	100	250	34495332
17	100	250	34797422
18	100	250	33824877

**Cuadro 3.** Resultados experimentales para construir la curva de calibración de la xantocilina (1) para establecer la linealidad del sistema (continuación).

Solución	Nivel	Concentración (µg/mL)	Área (µV*sec)
19	50	125	17667471
20	50	125	17607587
21	50	125	18169070
22	50	125	18159555
23	50	125	17830045
24	50	125	17600252
25	20	50	7380996
26	20	50	7322227
27	20	50	7323751
28	20	50	7326346
29	20	50	7316164
30	20	50	7366560
31	10	25	3766124
32	10	25	3745394
33	10	25	3783219
34	10	25	3775704
35	10	25	3709294
36	10	25	3794836



**Gráfica 2.** Linealidad del sistema analítico para cuantificar xantocilina (1) en el aceite esencial de manzanilla.

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (**Cuadro 4**). Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema a partir de este análisis fueron: pendiente de la recta ( $b_1$ ), ordenada al origen ( $b_0$ ), coeficiente de correlación ( $R$ ), coeficiente de determinación ( $R^2$ ) e intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ) con  $t_{0.975,34} = 2.032$  (ver ANEXO A y B) .

**Cuadro 4.** Resumen del análisis de regresión lineal simple de la linealidad del sistema.

Estadístico	Resultado
$b_1$	132867.6
$b_0$	841825.3
$R$	0.9997
$R^2$	0.9995
$IC(\beta_1)$	131852.2 - 133883.0

El método analítico desarrollado es lineal en el rango de concentraciones analizadas ya que cumple con los criterios de aceptación especificados en la guía de validación ICH Q2(R1) (2005). Así, la magnitud del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue mayor de 0.98 y del intervalo de confianza de la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ), no incluyo al cero.

Posteriormente, el análisis de varianza (ANADEVA) de la regresión lineal simple para  $n = 36$  y  $\alpha = 0.05\%$ , muestra un valor para el estadístico F de Fischer ( $F_{0.05,1,34}$ ) de 70694.59 y supera al valor crítico  $F_{0.05,1,34}$  (4.17) de tablas (ver ANEXO C) con lo que se concluye que el modelo estadístico establecido mediante el análisis de regresión lineal es adecuado.

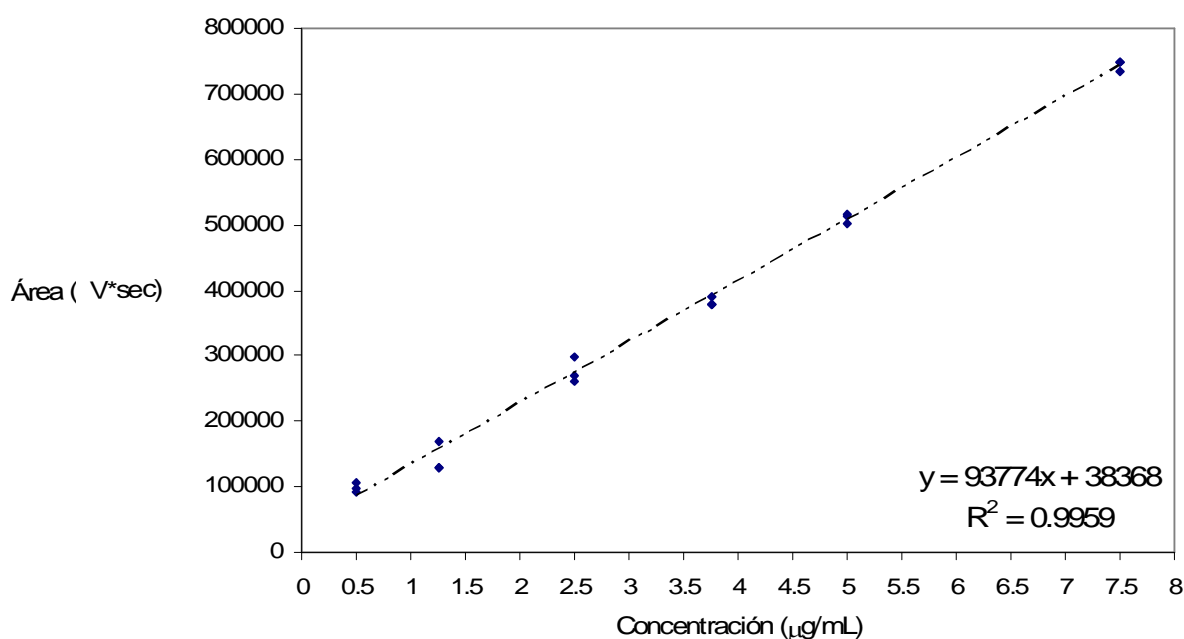


## 4.1.3.3. Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de una curva de calibración con seis niveles de concentraciones comprendidas entre un rango de 0.5 a 7.5  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos se resumen en los **Cuadro 5-6** y en la **Gráfica 3**.

**Cuadro 5.** Resultados experimentales para construir la curva de calibración de xantocilina (1) para establecer el LC y LD.

Solución	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	7.50	749241
2	7.50	748562
3	7.50	734212
4	5.00	501833
5	5.00	512410
6	5.00	516390
7	3.75	377143
8	3.75	379665
9	3.75	388782
10	2.50	297211
11	2.50	270839
12	2.50	260368
13	1.25	128061
14	1.25	128783
15	1.25	170572
16	0.50	90965
17	0.50	96921
18	0.50	105787



**Gráfica 3.** Límite de detección y cuantificación de xantocilina (1) en el aceite esencial de *M. recutita*.

**Cuadro 6.** Resumen de la regresión lineal simple de la curva para establecer los límites de cuantificación y detección de xantocilina (1).

Estadístico	Resultado
$b_1$	93774.3
$b_0$	38368.1
R	0.9979
$R^2$	0.9959
$S_{y/x}$	15041.2
$IC(\beta_1)$	90585.6 – 96963.0

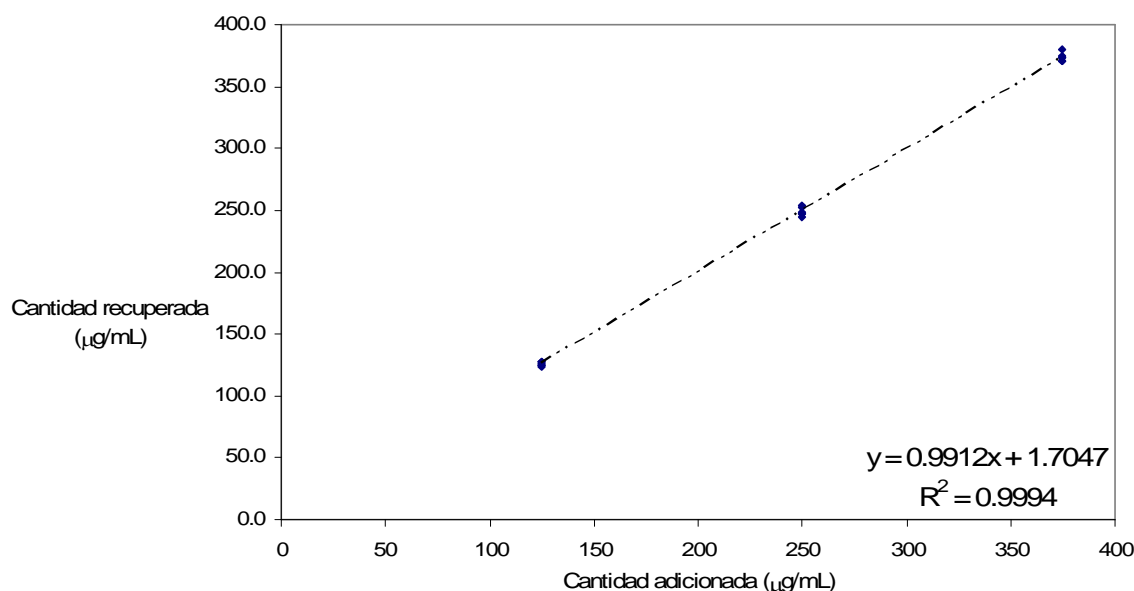
Así, utilizando los parámetros estadísticos resumidos en el **Cuadro 6** y utilizando las fórmulas indicadas en el inciso **3.5.3.** de la sección experimental, los valores de límite de detección y de cuantificación calculados fueron 0.53 y 1.60 µg/mL, respectivamente (ver ANEXO A).

4.1.3.4. Linealidad del método y exactitud.

Se dice que un método es lineal cuando las respuestas analíticas (cantidad recuperada) que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito adicionado en la muestra objeto de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2(R1), 2005, WHO, 2007). La linealidad del método se evaluó a partir de la curva de calibración construida a partir de disoluciones de la matriz de trabajo enriquecidas con una muestra estándar de xantocilina. De acuerdo a las estimaciones iniciales, la esencia contiene alrededor de 250 µg/mL de xantocilina (1). Por lo tanto las cantidades de estándar que se adicionaron a la matriz fueron 125, 250 y 375 µg/mL de xantocilina (1), que representan el 50, 100 y 150% del analito, respectivamente (**Cuadros 7** y **Gráfica 4**).

**Cuadro 7.** Resultados experimentales para establecer la linealidad del método.

Solución	Nivel	Concentración adicionada (µg/mL)	Área (µV*sec)	Concentración recuperada (µg/mL)	% recobro
1	150	375	51252224.5	379.4	101.2
2	150	375	50608943.5	374.6	99.9
3	150	375	50062129.5	370.4	98.8
4	150	375	50486985.5	373.6	99.6
5	150	375	50062129.5	370.4	98.8
6	150	375	50486985.5	373.6	99.6
7	100	250	34343734.5	252.1	100.9
8	100	250	34522629.5	253.5	101.4
9	100	250	33680936.5	247.2	98.9
10	100	250	33764873.5	247.8	99.1
11	100	250	33786897.5	248.0	99.2
12	100	250	33416360.5	245.2	98.1
13	50	125	17721320.5	127.0	101.6
14	50	125	17820464.5	127.8	102.2
15	50	125	17328745.5	124.1	99.3
16	50	125	17552127.5	125.8	100.6
17	50	125	17503397.5	125.4	100.3
18	50	125	17482266.5	125.2	100.2



**Gráfica 4.** Exactitud y linealidad del método analítico para cuantificar xantocilina (1) en el aceite esencial de manzanilla.

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (**Cuadro 8**). Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del método fueron: pendiente de la recta ( $b_1$ ), ordenada al origen ( $b_0$ ), coeficiente de correlación ( $R$ ), coeficiente de determinación ( $R^2$ ), intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ) e intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC(\beta_0)$ ), ambas con  $t_{0.975,16} = 2.12$  y el coeficiente de variación de la regresión ( $CV_{y/x}$ ) (ver ANEXO A y B).

**Cuadro 8.** Resumen de la regresión lineal simple para evaluar la linealidad del método.

Estadístico	Resultado
$b_1$	0.9912
$b_0$	1.7047
$R$	0.9997
$R^2$	0.9994
$IC(\beta_1)$	0.9780 – 1.0044
$IC(\beta_0)$	-0.8677 – 5.2771
$CV_{y/x}$	1.1%

El método desarrollado es lineal pues los resultados de la regresión lineal simple cumplen con los criterios de aceptación ( $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $R \geq 0.99$ ,  $R^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 2\%$ ) establecidos en la norma internacional ICH Q2 (R1) (2005).

El ANADEVIA ( $\alpha = 0.05\%$ ) para el número de repeticiones:  $n = 18$ , muestra que el estadístico F de Fischer calculado [ $F_{0.05,1,16} 25229.97$ ] es superior al valor crítico de tablas [ $F_{0.05,1,16} 4.54$ ] (ver ANEXO C) lo que nos permite concluir que el modelo descrito con este análisis de regresión es adecuado en el rango de concentraciones analizadas.

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia (cantidad utilizada para enriquecer la matriz) (Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007). Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en el **Cuadro 7**. Estos resultados indican que el promedio del porcentaje de recobro (100.0%) se encuentra dentro del rango establecido para un método cromatográfico (98-102 %) y el intervalo de confianza calculado (97.6-102.4%) incluye el 100%. Por lo tanto, el método analítico es exacto en el rango de concentraciones ensayadas.

#### 4.1.3.5. Precisión del método.

La precisión de un sistema o método analítico se refiere a la concordancia entre las respuestas analíticas (en este caso áreas o absorbancias) individuales que resultan de varias estimaciones de la concentración de un analito en una misma solución homogénea bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión se debe calcular considerando la dispersión de los datos individuales con respecto a la media y se expresa como desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

En el presente trabajo, la precisión fue determinada en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Esta última determinación se realizó debido a que no se pudo establecer la reproducibilidad del método.

La repetibilidad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007).

La repetibilidad se evaluó a través de la respuesta analítica de seis soluciones con una concentración aproximada de xantocilina (1) de 250 µg/mL. Este análisis de realizo por duplicado (**Cuadro 9**).

**Cuadro 9.** Resultados experimentales para la evaluación de la repetibilidad.

Solución	Área (µV*sec)
1	32746850.5
2	33397806.5
3	33596957.5
4	33722112.5
5	33374422.0
6	33496513.5

Los parámetros estadísticos evaluados en este análisis fueron: Media aritmética ( $\bar{y}$ : 33389110.4), desviación estándar (S: 340122.2) y coeficiente de variación (CV: 1.0%) (ver ANEXO A).

El coeficiente de variación (CV) calculado para este análisis fue de 1.0 % (criterio de aceptación:  $CV \leq 1.5\%$ ) con lo que se concluye que el método analítico es preciso.

La precisión intermedia (**Cuadro 10**) se evaluó mediante el análisis de seis muestras independientes (250 µg/mL) en dos días y por dos analistas diferentes.

Los resultados estadísticos obtenidos: Media aritmética ( $\bar{y}$ : 252.3), desviación estándar (S: 1.0070) y coeficiente de variación (CV: 0.3%) nos permiten concluir que el método es preciso (criterio de aceptación:  $CV \leq 2\%$ ) (ver ANEXO A).

**Cuadro 10.** Datos experimentales para la evaluación de la precisión intermedia.

		Analista	
		1	2
Día	1	251.4	253.5
		251.0	254.4
		252.7	251.6
	2	252.8	251.9
		253.3	251.5
		251.6	252.1

4.1.3.6. Estabilidad.

La estabilidad de una solución, contenida en un envase, es la propiedad para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso la concentración de un compuesto entre los límites especificados. El objetivo de los estudios de estabilidad, es reportar como la concentración de la muestra varía con el tiempo, bajo influencia de la temperatura de almacenaje (NOM-073-SSA1-2005).

La estabilidad de las muestras de análisis se evaluó bajo condiciones de refrigeración (-4°C) y de almacenaje (temperatura ambiente y 37°C). Los resultados son expresados como la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje, respecto de la media aritmética del análisis inicial ( $|d_i|$ ) (ver ANEXO A). Una muestra se considera estable cuando el valor de  $|d_i| \leq 2\%$ . Estos análisis se realizaron en dos períodos, siete y quince días, y se resumen en el **Cuadro 11**.

**Cuadro 11.** Resultados de la evaluación de estabilidad representados por  $|d_i|$  (%).

	7 días	15 días		
	- 4°C	37°C	Temperatura ambiente	- 4°C
Solución de estándar de xantocilina (1)	0.57	23.53	0.68	1.13
Solución de aceite de manzanilla	0.04	1.15	0.10	0.16

. Los resultados obtenidos en el **Cuadro 11**, así como, el análisis de los cromatogramas de cada una de las muestras analizadas indican que con excepción de la muestra de la solución del estándar a 37°C todas las muestras son estables al no presentar descomposición o degradación química del compuesto marcador.

En resumen, con base en los resultados descritos anteriormente el método analítico para cuantificar xantocilina (**1**) en las esencias de *M. recutita* es lineal, preciso y exacto.

#### **4.1.4. Cuantificación del compuesto mayoritario presente en las esencias de *M. recutita*.**

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar el contenido de xantocilina (**1**) en las esencias de *M. recutita* (Lotes I - VIII). Los resultados se resumen en el **Cuadro 12**.

**Cuadro 12.** Cuantificación de la xantocilina (**1**) en los Lotes I – VIII de material vegetal.

Lote	mg de xantocilina/g de aceite esencial	µg de xantocilina/g de material vegetal
I	59.4	55.0
I	52.4	56.0
II	61.9	54.1
IV	104.9	87.1
V	50.1	63.9
VI	71.9	72.9
VII	85.9	104.8
VII	59.8	64.6

Como se desprende de los resultados obtenidos en el cuadro anterior, los lotes adquiridos en los mercados populares de la Ciudad de México son los que tienen una menor cantidad de xantocilina (**1**) por gramo de material vegetal. El lote comercial VII es el que contiene mayor cantidad del marcador. Resulta difícil emitir



una causa que explique las diferencias en el contenido de xantocilina en las diferentes muestras analizadas ya que en ningún caso fue posible establecer la fecha de recolección de las muestras. Además en el caso de las muestras comerciales no es posible establecer ni la fecha de recolección, ni los procesos utilizados para la preparación de la droga cruda y productos acabados. Ninguno de los envases de los distintos productos analizados presentaba fecha de elaboración, aunque sí de caducidad. En los casos que se analizó preparados empacados en bolsitas de té, el peso de cada bolsa individual no alcanzaba lo declarado en el marbete del preparado.

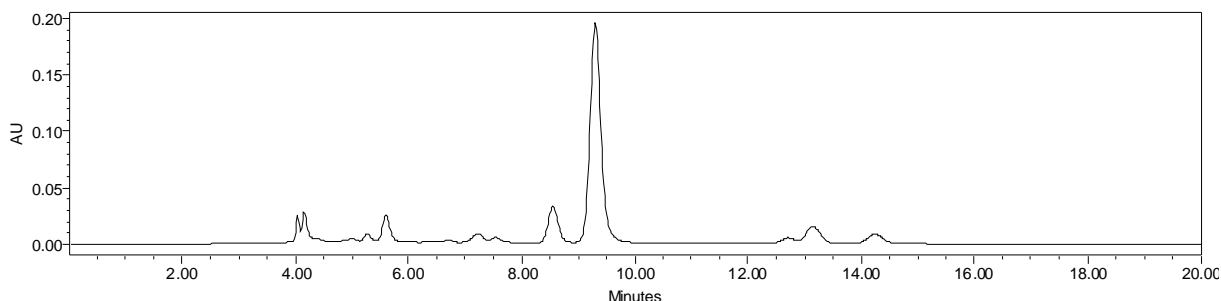
Estos resultados demuestran que no existe un control de calidad adecuado de los productos herbolarios o suplementos alimenticios destinados a procurar, mejorar o prevenir enfermedades.

#### **4.2. Validación del método analítico para establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (3) de las cápsulas obtenidas a partir del extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana* por CLAE.**

Los estudios químicos y farmacológicos realizados en nuestro laboratorio sobre la especie *H. standleyana* (Guerrero *et al.*, 2005; 2006 y 2007) permitieron establecer su excelente potencial como agente un antihiper glucémico. Por tal motivo, con la finalidad de iniciar los estudios clínicos de un preparado fitofarmacéutico desarrollado a partir del extracto acuoso de la corteza de la especie se realizó la revalidación de un método analítico por CLAE para valorar los perfiles de disolución de las cápsulas.

El método analítico utilizado para evaluar el perfil de disolución del preparado fitofarmacéutico de *H. standleyana* fue realizado con base en los criterios establecidos en las normas oficiales (NOM-177-SSA1-1998).

Para el desarrollo del método analítico por CLAE se aplicó la estrategia experimental descrita en el inciso 3.7. de la parte experimental. El cromatograma obtenido (**Figura 11**) presentó a la AG-4-fenilcumarina (3) [ $t_R$  de 9.3 min] como el principio activo mayoritario presente en la muestra analizada.



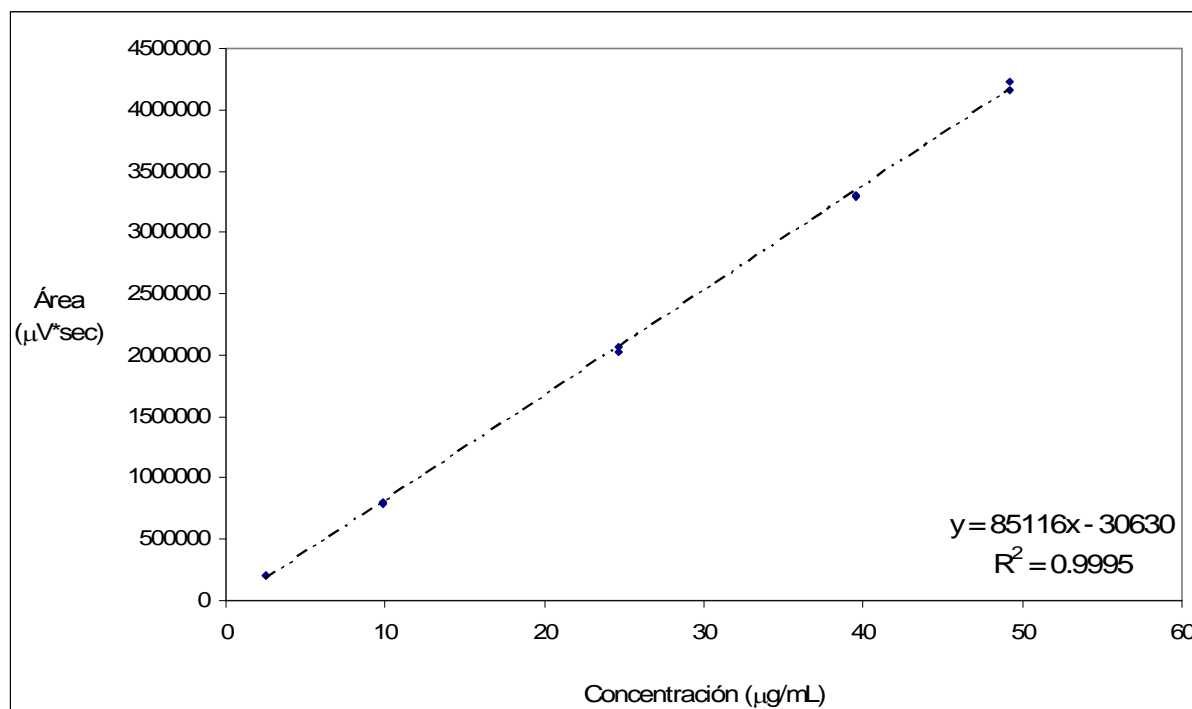
**Figura 11.** Cromatograma del extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del preparado fitofarmacéutico elaborado a partir de *H. standleyana*. AG-4-fenilcumarina (49.2  $\mu\text{g/mL}$ ). Fase móvil: ACN- $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) (19:81), velocidad de flujo 0.4 mL/min. Fase estacionaria: columna Symmetry® C-8;  $\lambda$  327 nm.

#### 4.2.1. Linealidad y precisión del sistema.

La linealidad y precisión del sistema se evaluó construyendo una curva de calibración de cinco niveles como se describe en el inciso **3.7.1.1.** de la parte experimental. Este análisis se realizó por duplicado y los resultados que se resumen en los **Cuadros 13-14** y en la **Gráfica 5** nos permiten concluir que el método de disolución es lineal (Criterio de aceptación:  $R^2 \geq 0.99$  y  $\text{CV}_{y/x} \leq 2\%$ ).

**Cuadro 13.** Resultados experimentales para la evaluación de la linealidad y precisión del sistema.

Solución	Nivel	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area ( $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ )	Factor de respuesta
1	5	2.5	209895	83958.0
2	5	2.5	204507	81802.8
3	20	9.9	807366	81552.1
4	20	9.9	793165	80117.7
5	50	24.6	2072312	84240.3
6	50	24.6	2025622	82342.4
7	80	39.5	3301789	83589.6
8	80	39.5	3287638	83231.3
9	100	49.2	4232571	85853.4
10	100	49.2	4157072	84321.9



**Gráfica 5.** Linealidad del sistema analítico para cuantificar AG-4-fenilcumarina (**3**) en el extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del fitomedicamento.

**Cuadro 14.** Resumen de la regresión lineal simple de la linealidad del sistema.

Estadístico	Resultado
$b_1$	85116.3
$b_0$	- 30629.9
R	0.9997
$R^2$	0.9995
$CV_{y/x}$	1.0%

Por otra parte, analizando los parámetros estadísticos (ver ANEXO A) de la media aritmética ( $\bar{y}$ : 83101), desviación estándar (S: 1663.8) y coeficiente de variación del factor de respuesta ( $CV_{FR}$ : 2.0%) obtenidos se concluye que el método es preciso (Criterio de aceptación:  $CV_{FR} \leq 2\%$ ).

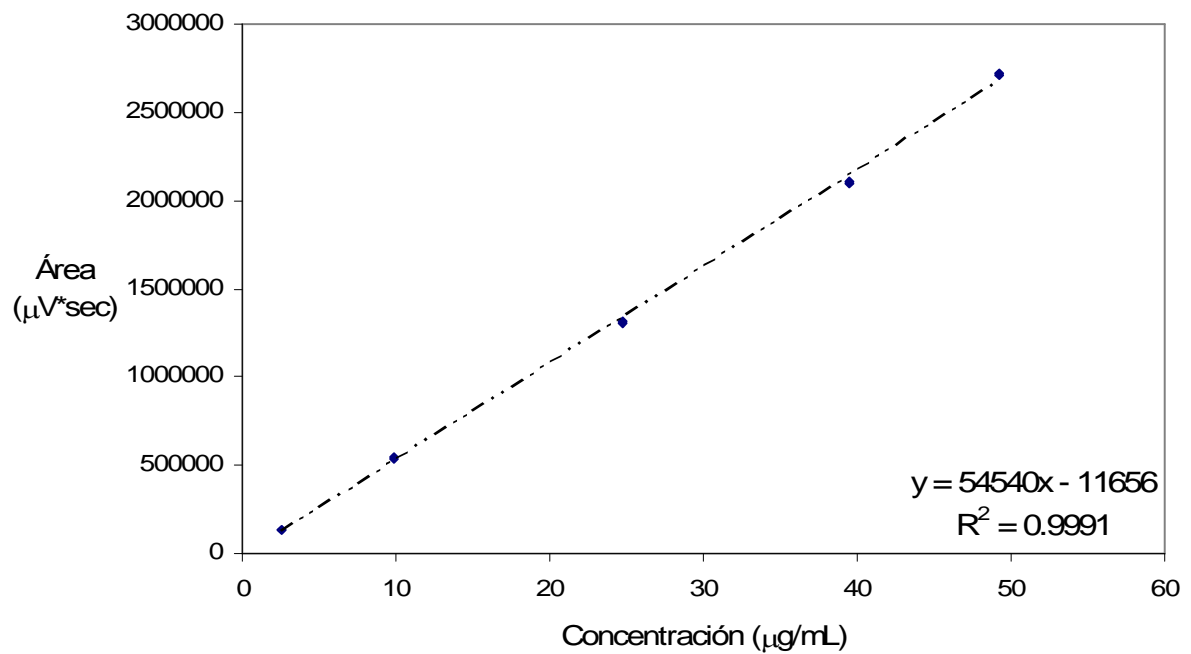
#### 4.2.2. Linealidad y precisión del método.

La linealidad y precisión del sistema se evaluó construyendo una curva de calibración como se describe en el inciso 3.7.1.2. de la parte experimental. Este análisis se realizó por duplicado. Los resultados que se resumen en el **Cuadro 15** y en la **Gráfica 6**. La precisión del método se evaluó calculando el factor de respuesta correspondiente para cada nivel de concentración evaluado.

**Cuadro 15.** Resultados experimentales y calculados para la evaluación de la linealidad y precisión del método.

Solución	Nivel	Concentración (µg/mL)	Área (µV*sec)	Factor de respuesta
1	5	2.5	134799	53919.6
2	5	2.5	131885	52754.0
3	20	9.9	544617	55011.8
4	20	9.9	538898	54434.1
5	50	24.7	1320985	53481.2
6	50	24.7	1306259	52885.0
7	80	39.5	2099077	53141.2
8	80	39.5	2104333	53274.3
9	100	49.2	2716678	55217.0
10	100	49.2	2708198	55044.7

De acuerdo a los resultados obtenidos el método es lineal ( $y = -11655.7x + 54540.1$ ;  $R = 0.9995$ ;  $R^2 = 0.9991$ ) y preciso ( $CV_{FR} 1.8\%$ ) (ver ANEXO A). Criterio de aceptación:  $CV_{FR} \leq 3\%$ .



**Gráfica 6.** Linealidad del método analítico para cuantificar AG-4-fenilcumarina (**3**) en el extracto acuoso seco contenido en las cápsulas del fitomedicamento.

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar el contenido de la xantocilina (1) en el aceite esencial de la especie *M. recutita*. El método es lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones analizado.
- Los estudios de estabilidad realizados con el compuesto marcador (1) presente en la esencia de *M. recutita* durante el desarrollo y la validación del método analítico permitieron establecer que el metabolito no sufre descomposición ni alteración alguna permaneciendo intacta su variabilidad entre los diferentes lotes analizados.
- El método analítico implementado en el presente trabajo de investigación se incorporará en la monografía tipo OMS y farmacopeica de la especie *M. recutita*.
- Finalmente, se llevó a cabo la revalidación de un método analítico por CLAE para evaluar los perfiles de disolución de las cápsulas elaboradas a partir de un extracto acuoso de la corteza del árbol *Hintonia standleyana*, especie endémica de nuestro país. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el método desarrollado es lineal y preciso en el rango de concentraciones analizadas.

## VI. PERSPECTIVAS

- Aplicar el método analítico desarrollado para determinar el contenido de xantocilina (1) en los diversos preparados elaborados con *M. recutita*.
- Completar los perfiles de disolución de las cápsulas del extracto acuoso de *H. standleyana* a tres diferentes niveles de pH para poder establecer sus parámetros de calidad (Q).
- Realizar el estudio de los parámetros de biodisponibilidad de las cápsulas elaboradas a partir del extracto acuoso de la corteza de la especie *H. standleyana* con la finalidad de iniciar el estudio clínico

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez, F. A., Munguía, V. N. Pruebas de identidad y eficacia de la droga cruda de *Matricaria recutita* (Asteraceae): Una contribución para la elaboración de la monografía tipo OMS de la planta cultivada en México. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2006.
- Argueta, A. V., Cano, L. M. y Rodarte, M E. (1994). Peisto o Peistón. En atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Vol. 2, pp. 1135 – 1136.
- Atoui, K. A., Monsuri, A., Boskou, G. y Keofolas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. **89**, 27-36.
- Avendaño, C. Introducción a la Química Farmacéutica, 2ª edición. Ed. Mc Graw Hill. Madrid, España. 2001. pp. 25-27.
- Barnes, J. (2003a) Quality, efficacy and safety of complementary medicines: Fashions, facts and the future. Part I: Regulation and quality. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **55**, 226-233.
- Barnes, J. (2003b) Quality, efficacy and safety of complementary medicines: Fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **55**, 331-340.
- Bone, K. (2001). Standarized extracts: Neither poison nor panacea. *HerbalGram*. **53**, 50-55.
- Bruneton, J. Farmacognosia, Plantas medicinales, 2ª edición. Ed. Acribé. Zaragoza, España. 2002. pp. 514-516.
- Chow, C., Lam, H., Lee. Y. C. y Zhang, X. Analytical method validation and instrument performance verification. Ed. Wiley-Interscience. United States of America. 2004. pp. 27 – 49.
- Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, J. A., Quijano, L., Mata, R. (2006). Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **83**. 342 – 348.
- Dewick, M. P. Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Ed. Wiley. 1997. pp. 164 – 176.



- Eisenberg, D. M., Kessler, R. C., Foster, C., Norlock, F. E., Calkins, D. R., y Delbanco, T. L., (1993). Unconventional medicine in the United States-prevalence, costs and patterns of use. *New England Journal of Medicine*. **328**, 246-252.
- Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Appel, S., Wilkey, S. Van-Rompay, M. y Kessler, R. C. (1998). Trends in alternative medicine used in the United States, 1990-1997. Results of a follow-up national survey. *Journal of American Medicine Association*. **280**, 1569-1575.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México, 2001.
- Flaster, T. y Lassiter, J. (2004). Quality control herbal preparations: Using botanical references standars for proper identification. *HerbalGram*. **63**, 32 – 37.
- Gadamasetti, K. Process Chemistry in the Pharmaceutical Industry. Ed. Marcel Dekker, Inc. United States of America. 1999. pp. 3-5.
- García, M. A., Soberón, E., Cortés M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., Alcántara, A. Métodos analíticos. Guía de validación. Comisión de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. 2002.
- González-Chávez, L., y Hersch-Martínez, P. (1996). Investigación participativa en etnobotánica. Algunos procedimientos coadyuvantes en ella. *Dimensión Antropológica*. **3**, 129 -153.
- González-Chávez, L., y Hersch-Martínez, P., Juárez-Miranda, A., y Pérez-Cardona, A. (2000). Plantas medicinales de Copalillo y Temalac, Guerrero. Serie Patrimonio Vivo 5. Actores sociales de la Flora Medicinal en México. INAH. México D. F. pp. 27 – 28.
- Guerrero-Analco, J. A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A. y Mata, R. (2005). Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica*. **71**. 1099 – 1105.
- Guerrero-Analco, J. A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae familia. *Phytochemistry*. **68**. 2087 – 2095.

- Hernández-Ceruelos, C. A., Madrigal-Bujaidar, B. y de la Cruz C. (2002). Inhibitory effect of chamomile essential oil on the sister chromatid exchanges induced by daunorubicin and methyl methanesulfonate in mouse bone marrow. *Toxicology Letters*. **135**, 103-110.
- Hersch-Martínez, P. (1996). Destino común: Los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México D. F.
- Hubert, Ph. D., Chiap, P., Crommen, J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Mercier, N., Bervoas-Martin, S., Chevalier, P., Grandjean, D., Lagorce, P., Lallier, M., Laparra, M.C., Laurentie, M., Nivet, J.C. (1999). The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: From the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta*. **391**. 135 – 148.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline, ICH Q2(R1). Validation of analytical procedures: Text and methodology. 2005.
- Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. España. 2000. p.p. 134 – 143 y 274 – 276.
- Lachman, L. Ph.D, Lieberman, A. H., Kanig, L. J. The theory and practice of industrial pharmacy. 3º edición. Ed. Lea and Febiger. United States of America. 1986. pp. 189, 197, 226 y 227.
- MacLennan, A. H., Wilson, D. H. y Taylor A. W. (1996). Prevalence and cost of alternative medicine in Australia. *Lancet*. **347**, 569-573.
- Mahady, G. B. (1998). Herbal medicine and pharmacy education. *Journal American Pharmaceutical Association*. **38**, 274.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6º edición. Ed. Botas. México D. F.
- Maurice, M. I. Ph D. Handbook of African Medicinal Plants. CRC. PRESS. London. 1999. pp. 203 - 204.
- May, P. (2003). Chamomile. Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide. **1**. 95 - 100.
- Medic-Saruc, M., Stanic, G., Males, Z. y Saric, S. (1997). Application of numerical methods to thin-layer chromatographic investigation of the main components of chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) essential oil. *Journal of Chromatography*. **776**, 355-360.

- Méndez, D. Desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de 5-O-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en *Hintonia standleyana*. 2005. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. UNAM. (escritura en proceso).
- Millar, W. J. (1997). Use of alternative health care practitioners by Canadians. *Canadian Journal of Public Health*. **88**, 154-158.
- Morón, R. F., Furones, M. J. y Pinedo, G. Z. (1996). Actividad espasmolítica del extracto fluido de *Matricaria recutita* (manzanilla en órganos aislados). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. **1**, 19-24.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-073-SSA-2005. Estabilidad de medicamentos. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. Disponible en la página electrónica de la Secretaría de Salud: <http://bibliotecas.salud.gob.mx>
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. Disponible en la página electrónica de la Secretaría de Salud: <http://bibliotecas.salud.gob.mx>
- Nwaka, S. y Ridley, G. R. (2003). Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public – private partnerships. *Nature Reviews. Drug Discovery*. **2**. 919-928.
- Orav, A., Kailas, T. y Ivask, K. (2001). Volatile constituents of *Matricaria* L. from Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry* **50**, 39-45.
- Organización Mundial de la Salud (1998). Tradicional medicine. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 1-5.
- Organización Mundial de la Salud (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 1. World Health Organization. Geneva, Switzerland. pp. 86-94.
- Organización Mundial de la Salud (2002a). Traditional medicine. Report by the Secretariat. Executive Board, 111<sup>th</sup> Session. World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud (2002b). WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 2. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

- Organización Mundial de la Salud (2003). Traditional medicine. Fact sheet N° 134. World Health Organization.
- Organización Mundial de la Salud (2007). Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. Good manufacturing practices and inspection. 2º edición. World Health Organization. Vol 2. 129 – 133.
- Pinto, G. A., Lourival, D., Pereira, D. y Santos-Fihlo, D. S. (2006). Effects of *Matricaria recutita* L. (German Chamomile) on sheep erythrocyte osmotic fragility. *Pharmacognosy Magazine*. **2**, 48-51.
- Raal, A., Arak, E., Orav, A. y Ivask, K. (2003). Comparación de aceites esenciales de *Matricaria recutita* L. de origen diverso. *Ars Pharmaceutica*. **44**, 159-165.
- Reif, K., Sievers, H. y Steffen, J. P. (2004). The role of chemical reference standars as analytical tools in the quality assessment of botanical materials – A European perspective. *HerbalGram*. **63**, 38-43.
- Repcak, M., Shehlikoa, V., Imirich, J., Pihlaja, K. (1999a). Jaceidein and chrysosplenetin chemotypes of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Biochemical systematics and Ecology*. **27**, 727-732.
- Repcak, M., Imirich, J. y Garcar, J. (1999b). Quantitative evolution of the main sesquiterpenes and polyacetilenes of *Chamomilla recutita* essential oil by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*. **10**, 335-338.
- Schulz, H. y Albroscheit, G. (1988). High-Performance Liquid Chromatographic characterization of some medica plant extracts used in cosmetic formulas. *Journal of Chromatography*. **442**. 353-361.
- Schulz, H., Baranska, M., Belz, H., Rösch, P., Strehle, M. A. y Popp J. (2004). Chemotaxonomic characterization of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vibrational spectroscopy*. **35**, 81-86.
- Sharpless, K., Sander, L., Wise, S., NguyenPho, A., Lyon, R., Ziobro, G., and Betz, J. (2004). Development of standar reference materials for the analysis of dietary supplements. *HerbalGram*. **63**. 44-47.
- Stevigny, C., Wautier, M.C., Habib, J.L., Chiap, P., Hubert, P., Quetin-Leclercq, J. (2004). Development and validation of a High Performance Liquid Chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*. **70**. 764 – 770.

- Svehlikova, V., Bennett, R. N., Mellon, F. N., Needs, P. W. y Pracente, S. (2004). Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from Chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert). *Phytochemistry*. **65**, 2323-2332.
- Sworbrick, J. y Boylan C. J. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 2ª edición. Ed. Marcel Dekker. United States of America. 2002. Volumen I.
- Szoke, E., Maday, E., Tyhak, E., Kuzovkina, N. I. y Lemberkovics, E. (2004a). New terpenoids in cultivated and wild chamomile (*In vivo* and *In vitro*). *Journal of Chromatography B*. **800**, 231-238.
- Szoke, E., Maday, E., Gershenzon, J., Lemberkovics, E. (2004b). Terpenoids in genetically transformed cultures of Chamomile. *Chromatographia*. **60**, S269 – S272.
- Viola, H., Wasowki, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silverio, R., Dajas, F., Medina, J. H., Paladín, A. C. (1994). Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica*. **61**, 213 – 216.
- Wichtl, M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A Handbook for practice on a scientific basis Norman Grainger Bissler., Ed. CRC. PRESS and Meadpharm, German. 2006. pp 323-325.
- Willis, B. H. R., Bone, K. y Morgan, M. (2000). Herbal products: Active constituents, models of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*. **13**, 47-77.
- Wood, R. (1999). How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*. **18**, 624 – 632.

## VIII. GLOSARIO

**Analito:** Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

**Compuesto marcador:** Constituyente(s) o grupos de constituyentes químicamente definidos contenidos en un producto o planta medicinal que son de interés para propósitos de control de calidad, independientemente de su actividad terapéutica. Sirve para calcular la cantidad de droga cruda o preparado herbolario en un producto medicinal herbolario si el marcador fue determinado cuantitativamente en la droga cruda o preparado herbolario.

**Criterio de aceptación:** Límite numérico, rango u otra medida aceptada satisfactoriamente como resultado del procedimiento analítico.

**Exactitud:** Es la concordancia entre un valor determinado experimentalmente y un valor de referencia aceptado.

**Factor de respuesta:** Es la respuesta analítica del compuesto en estudio por unidad de peso o concentración.

**Intervalo:** Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo éstas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.

**Límite de cuantificación:** Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Límite de detección:** Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Linealidad:** Un método es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra

**Matriz adicionada:** Muestra de una matriz analítica a la cual se le adiciona una cantidad conocida del analito.

**Matriz analítica:** Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.

**Método analítico:** Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

**Parámetros de calidad:** Parámetro específico a evaluar en un protocolo de validación.

**Precisión:** Grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales, cuando el método se aplica repetidamente a diferentes proporciones de una muestra homogénea del producto o una referencia.

**Precisión intermedia:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas en distintos días.

**Recobro:** Cantidad del analito determinada en la matriz adicionada, empleando el método analítico.

**Repetibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, en un corto periodo de tiempo, usando los mismos materiales, equipos y método.

**Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

**Selectividad:** Un método es selectivo cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se relaciona únicamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en una muestra de análisis.

**Validación del método analítico:** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que el método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



## IX. ANEXOS

## ANEXO A. Fórmulas para cálculos estadísticos.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	FÓRMULA
Coefficiente de correlación	$R = \sqrt{\frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$
Coefficiente de determinación	$R^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$
Coefficiente de variación	$CV = \frac{S}{y} \times 100$
Coefficiente de variación de la regresión	$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y} \times 100$
Desviación estándar	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada al origen	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left( \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right)}$
Desviación estándar de la pendiente	$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\left( \frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right)}$
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
Diferencia absoluta de medias	$ d_i  =  \bar{y}_i - \bar{y}_o $
Factor de respuesta	$FR = \frac{\text{Respuesta analítica}}{\text{Concentración}}$
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$
Intervalo de confianza para la pendiente poblacional	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	FÓRMULA
Límite de cuantificación con base a la curva de calibración y desviación estándar de la regresión	$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$
Límite de detección con base a la curva de calibración y desviación estándar de la regresión	$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$
Media aritmética (promedio)	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}; \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n}; \quad \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$
Ordenada al origen	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Pendiente	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$
Suma de y	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2 = \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2$
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2 = \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2$
Suma de x por y	$\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por suma de y	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$
% recuperado	$\% = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$

## ANEXO B. Valores estadísticos de la distribución t de Student.

gl	P (de una cola)									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.596
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.215	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.706
27	0.256	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.256	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.256	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.255	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
Infinito	0.253	0.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

**ANEXO C. Valores estadísticos de la distribución F de Fisher,  $u$ : g.l. numerador,  $v$ : g.l. denominador.**

$\alpha$	$v$	$u$							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0'050	1	161'5	199'5	215'7	224'6	230'2	234	236'8	238'9
0'025		647'8	799'5	864'2	899'6	921'8	937'1	948'2	956'6
0'010		4052	4999	5404	5624	5763	5858	5928	5980
0'005		16212	19997	21614	22501	23055	23439	23715	23923
0'050	2	18'51	19'00	19'16	19'25	19'30	19'33	19'35	19'37
0'025		38'51	39'00	39'17	39'25	39'30	39'33	39'36	39'37
0'010		98'50	99'00	99'16	99'25	99'30	99'33	99'36	99'38
0'005		198'5	199'0	199'2	199'2	199'3	199'3	199'4	199'4
0'050	3	10'13	9'55	9'28	9'12	9'01	8'94	8'89	8'85
0'025		17'44	16'04	15'44	15'10	14'88	14'73	14'62	14'54
0'010		34'12	30'82	29'46	28'71	28'24	27'91	27'67	27'49
0'005		55'55	49'80	47'47	46'20	45'39	44'84	44'43	44'13
0'050	4	7'71	6'94	6'59	6'39	6'26	6'16	6'09	6'04
0'025		12'22	10'65	9'98	9'60	9'36	9'20	9'07	8'98
0'010		21'20	18'00	16'69	15'98	15'52	15'21	14'98	14'80
0'005		31'33	26'28	24'26	23'15	22'46	21'98	21'62	21'35
0'050	5	6'61	5'79	5'41	5'19	5'05	4'95	4'88	4'82
0'025		10'01	8'43	7'76	7'39	7'15	6'98	6'85	6'76
0'010		16'26	13'27	12'06	11'39	10'97	10'67	10'46	10'29
0'005		22'78	18'31	16'53	15'56	14'94	14'51	14'20	13'96
0'050	6	5'99	5'14	4'76	4'53	4'39	4'28	4'21	4'15
0'025		8'81	7'26	6'60	6'23	5'99	5'82	5'70	5'60
0'010		13'75	10'92	9'78	9'15	8'75	8'47	8'26	8'10
0'005		18'63	14'54	12'92	12'03	11'46	11'07	10'79	10'57
0'050	7	5'59	4'74	4'35	4'12	3'97	3'87	3'79	3'73
0'025		8'07	6'54	5'89	5'52	5'29	5'12	4'99	4'90
0'010		12'25	9'55	8'45	7'85	7'46	7'19	6'99	6'84
0'005		16'24	12'40	10'88	10'05	9'52	9'16	8'89	8'68
0'050	8	5'32	4'46	4'07	3'84	3'69	3'58	3'50	3'44
0'025		7'57	6'06	5'42	5'05	4'82	4'65	4'53	4'43
0'010		11'26	8'65	7'59	7'01	6'63	6'37	6'18	6'03
0'005		14'69	11'04	9'60	8'81	8'30	7'95	7'69	7'50

$\alpha$	$v$	$u$							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0'050	9	5'12	4'26	3'86	3'63	3'48	3'37	3'29	3'23
0'025		7'21	5'71	5'08	4'72	4'48	4'32	4'20	4'10
0'010		10'56	8'02	6'99	6'42	6'06	5'80	5'61	5'47
0'005		13'61	10'11	8'72	7'96	7'47	7'13	6'88	6'69
0'050	10	4'96	4'10	3'71	3'48	3'33	3'22	3'14	3'07
0'025		6'94	5'46	4'83	4'47	4'24	4'07	3'95	3'85
0'010		10'04	7'56	6'55	5'99	5'64	5'39	5'20	5'06
0'005		12'83	9'43	8'08	7'34	6'87	6'54	6'30	6'12
0'050	15	4'54	3'68	3'29	3'06	2'90	2'79	2'71	2'64
0'025		6'20	4'77	4'15	3'80	3'58	3'41	3'29	3'20
0'010		8'68	6'36	5'42	4'89	4'56	4'32	4'14	4'00
0'005		10'80	7'70	6'48	5'80	5'37	5'07	4'85	4'67
0'050	20	4'35	3'49	3'10	2'87	2'71	2'60	2'51	2'45
0'025		5'87	4'46	3'86	3'51	3'29	3'13	3'01	2'91
0'010		8'10	5'85	4'94	4'43	4'10	3'87	3'70	3'56
0'005		9'94	6'99	5'82	5'17	4'76	4'47	4'26	4'09
0'050	30	4'17	3'32	2'92	2'69	2'53	2'42	2'33	2'27
0'025		5'57	4'18	3'59	3'25	3'03	2'87	2'75	2'65
0'010		7'56	5'39	4'51	4'02	3'70	3'47	3'30	3'17
0'005		9'18	6'35	5'24	4'62	4'23	3'95	3'74	3'58
0'050	60	4'00	3'15	2'76	2'53	2'37	2'25	2'17	2'10
0'025		5'29	3'93	3'34	3'01	2'79	2'63	2'51	2'41
0'010		7'08	4'98	4'13	3'65	3'34	3'12	2'95	2'82
0'005		8'49	5'79	4'73	4'14	3'76	3'49	3'29	3'13
0'050	120	3'92	3'07	2'68	2'45	2'29	2'18	2'09	2'02
0'025		5'15	3'80	3'23	2'89	2'67	2'52	2'39	2'30
0'010		6'85	4'79	3'95	3'48	3'17	2'96	2'79	2'66
0'005		8'18	5'54	4'50	3'92	3'55	3'28	3'09	2'93
0'050	$\infty$	3'84	3'00	2'60	2'37	2'21	2'10	2'01	1'94
0'025		5'02	3'69	3'12	2'79	2'57	2'41	2'29	2'19
0'010		6'63	4'61	3'78	3'32	3'02	2'80	2'64	2'51
0'005		7'88	5'30	4'28	3'72	3'35	3'09	2'90	2'74

### ANEXO D. Análisis de varianza (ANADEVA) del método analítico para cuantificar xantocilina (1) por CLAE.

- ANADEVA de la regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad del sistema ( $n = 36$ ,  $\alpha = 0.05\%$ ,  $F_{0.05,1,34} = 4.17$ ).

Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fo
Regresión	1	18988864371687200.0	18988864371687200.0	70694.59
Error	34	9132543722228.0	268604227124.4	
Total	35	18997996915409400.0		

- ANADEVA de la regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad del método y exactitud ( $n = 18$ ,  $\alpha = 0.05\%$ ,  $F_{0.05,1,16} = 4.54$ ).

Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fo
Regresión	1	184221.1	184221.1	25229.97
Error	16	116.8	7.3	
Total	17	184338.0		

### ANEXO E. Análisis de varianza (ANADEVA) del método analítico establecer los perfiles de disolución de la AG-4-fenilcumarina (3) de las cápsulas obtenidas a partir del extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana* por CLAE.

- ANADEVA de la regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad y precisión del sistema ( $n = 10$ ,  $\alpha = 0.05\%$ ,  $F_{0.05,1,8} = 5.32$ ).

Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fo
Regresión	1	22172108506375.5	22172108506375.5	15237.17
Error	8	11641066700.6	1455133337.6	
Total	9	41955740969163.6		

- ANADEVA de la regresión lineal simple para la evaluación de la linealidad y precisión del método ( $n = 10$ ,  $\alpha = 0.05\%$ ,  $F_{0.05,1,8} = 5.32$ ).

Fuente de variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fo
Regresión	1	9103007358794.4	9103007358794.4	8751.87
Error	8	8320968792.5	1040121099.1	
Total	9	17338699955206.5		