



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
BIFLAVONOIDES CONTENIDOS EN ***SELAGINELLA***
LEPIDOPHYLLA (HOOK & GREV.) Spring

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
ITZEL ABIGAIL MEJIA ORTEGA



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Se puede adquirir información absolutamente esencial, que puede salvar la vida, a partir exclusivamente de la medicina popular. Deberíamos hacer mucho más de lo que hacemos para extraer los tesoros de este conocimiento mundial popular.

Carl Sagan, 1997

Dentro de nosotros existe algo que no tiene nombre y eso es lo que realmente somos.

José Saramago.

DEDICATORIAS

A mi familia: Catalina Ortega, Patty Mejía, Adolfo OrdaZ, Adolfo OrdaZ Mejía, Edgar OrdaZ Mejía y Alan OrdaZ Mejía, por ser el pilar fundamental en todo este largo camino y por haberme apoyado para realizar la más grande de mis metas. A ustedes les dedico este gran esfuerzo. ¡Los quiero mucho!

A mis amigos(as) de la universidad, que después de compartir muchas jornadas de estudio y de diversión, logramos unir lazos de hermandad inmesurables. Por nombrar algunos: Ricardo Cruz, Jesús Rodríguez, Fabiola Alcántar, Luz Adriana Martínez, Karina Ramírez, Mar Sánchez, Nancy Castillo, Silvia Armenta, Belegui Bazán, JC Verjan, Sofía León, Oscar Illescas, Irys Pacheco, César Menchaca, Agustín Morales, Adriana López, Nestor Gaytán, Román Ibarra, Luis García, Guillermo, Hugo Martínez. Y a todos aquellos compañeros de la universidad que compartimos momentos agradables, todos poseen un lugar importante en mi formación profesional, los momentos que viví con ustedes estarán siempre presentes y serán inolvidables. Muchas Gracias.

A mis amigas Tania Belmont y Karla Corzas, que estimo con gran empatía y que han sido testigas de los esfuerzos hechos por mí y por mi familia para lograr llegar a esta meta. Crecer parte de nuestras vidas juntas, sin duda las hace partícipes de este importante proceso.

A mis amigos Jesús Villanueva y Alejandro Espinosa, quienes en todo momento me apoyaron, me dieron ánimos para seguir adelante y creyeron en mí. Muchas Gracias.

A Ricardo Trejo: has sido fundamental e importante para mí en todo este tiempo, desde inicios de la carrera hasta la fecha, eres mi mejor amigo, compañero y novio. Gracias por el apoyo, cariño y amor que me has dado, por esta razón y muchas más que tu sabes, te dedico este trabajo, T.Q.M.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que es la máxima casa de estudios y a la Facultad de Química, por haber pertenecido a ellas y por haberme permitido culminar una de mis metas más importantes: Mi formación como una gran profesionista del área de la Química.

A la DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM) por el apoyo económico otorgado a través de una beca (Proyecto IN211807).

A la Dra. Rachel Mata Essayag por la acertada sugerencia para el estudio de la planta medicinal *Selaginella Lepidophylla* y por sus acertadas observaciones de este trabajo.

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM, por la identificación botánica del material vegetal.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por la asesoría técnica para el desarrollo experimental de este trabajo.

Al personal académico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI): M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, Q.F.B. Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta y M. en C. Yolanda González Quezada, por el registro de los espectros para los análisis espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos de referencia utilizados en este trabajo.

A los Dres. Eugene Bratoeff, María Isabel Aguilar Laurents y Elena G. Ramírez, por la posibilidad que me brindaron al realizar esta práctica en su laboratorio. El paso por este lugar me permitió conocer gente muy Valiosa, y esas son las cosas que verdaderamente perduran con el tiempo.

Muy especialmente a la Dra. María Isabel Aguilar Laurents, quien con su gran calidad humana, así como al entregarme sus conocimientos y experiencia, su amistad, sus consejos, su paciencia, y sobre todo por su gran apoyo moral, fue posible culminarla. Por esto y más, le reitero mis más sinceros agradecimientos.



ÍNDICE

	Pág
Lista de Abreviaturas.....	IV
Lista de Tablas.....	VI
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Gráficas.....	IX
Esquemas.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 GÉNERO <i>SELAGINELLA</i>	2
2.1.1 <i>Selaginella lepidophylla</i> (Hook & Grev.) Spring.....	5
2.1.1a Nombres comunes.....	5
2.1.1b Clasificación taxonómica.....	5
2.1.1c Características botánicas.....	6
2.1.1d Distribución.....	7
2.1.1e Usos medicinales.....	8
2.1.1f Antecedentes fitoquímicos.....	8
2.1.2 Compuestos marcadores en plantas.....	9
2.2 FLAVONOIDES.....	10
2.2.1 Definición.....	10
2.2.2 Distribución y estado natural.....	11
2.2.3 Aspectos químicos.....	11
2.2.4 Determinación de estructura.....	15
2.2.5 Obtención e identificación.....	17
2.2.5a Extracción de flavonoides.....	17
2.2.5b Aislamiento y purificación.....	18
2.2.5c Identificación por cromatografía en capa fina (CCF).....	18
2.2.5d Separación por cromatografía en columna (CC).....	19
2.2.5e Separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).....	19
2.3 BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES.....	20
2.4 BIFLAVONOIDES.....	22
2.5 IMPORTANCIA DE LOS FLAVONOIDES.....	25
2.5.1 Flavonoides en las plantas.....	25
2.5.2 Flavonoides en la humanidad.....	25
2.5.3 Fuentes dietarias más comunes.....	26
2.6 VALIDACIÓN Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	26
2.6.1 Generalidades de validación de métodos.....	26
2.6.2 Generalidades de la cromatografía.....	29
2.6.2a Definición.....	29
2.6.2b Tipos de cromatografía.....	30



2.6.2c Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	32
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	36
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	39
4.2 EQUIPO.....	39
4.3 INSTRUMENTAL DE LABORATORIO.....	40
4.4 DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	41
4.5 SUSTANCIAS DE REFERENCIA.....	41
4.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA POR CLAR.....	42
4.7 DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS BIFLAVONOIDES POR CLAR.....	44
4.7.1 Preparación de las soluciones estándar.....	44
4.7.2 Preparación de la solución de trabajo (extracto metanólico de <i>S.</i> <i>lepidophylla</i>).....	44
4.7.3 Purificación de la referencia (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	45
4.7.4 Determinación de la concentración en las soluciones de los compuestos por cuantificar (robustaflavona y (2S)-2,3- dihidrorobustaflavona), que representen el 100% de respuesta cromatográfica con respecto a la solución de trabajo (punto 4.7.2).....	47
4.8 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EN LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA.....	47
4.8.1 Sensibilidad.....	48
4.8.2 Linealidad del sistema.....	48
4.8.3 Limite de Detección y Cuantificación.....	49
4.8.4 Precisión del sistema.....	50
4.8.5 Adecuabilidad del sistema.....	50
4.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALITICO POR CLAR.....	50
4.9.1 Linealidad y exactitud del Método.....	51
4.9.2 Precisión del método.....	52
4.9.2a Repetibilidad.....	52
4.9.2b Precisión intermedia.....	53
4.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	53
4.11 CUANTIFICACIÓN DE ROBUSTAFLAVONA Y (2S)-2,3- DIHIDROROBUSTAFLAVONA EN LA PLANTA MEDICINAL <i>S.</i> <i>LEPIDOPHYLLA</i>	54
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
5.1 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS BIFLAVONOIDES MEDIANTE CLAR.....	55



5.2 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA ÓPTIMA SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO DE <i>S. lepidophylla</i> POR CLAR.....	55
5.3 PUREZA CROMATOGRÁFICA DE LOS COMPUESTOS ROBUSTAFLAVONA (6d3) Y (2S)-2,3-DIHIDROROBUSTAFLAVONA (5e).....	61
5.4 OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL COMPUESTO POR CUANTIFICAR QUE REPRESENTA EL 100% DE RESPUESTA CROMATOGRÁFICA CON RESPECTO A LA SOLUCIÓN DE TRABAJO.....	64
5.5 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA.....	64
5.5.1 Linealidad del Sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	64
5.5.2 Límite de Detección y Cuantificación para robustaflavona y (2S)- 2,3-dihidrorobustaflavona.....	68
5.5.3 Precisión del sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	69
5.5.4 Adecuabilidad del sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	71
5.6 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	73
5.6.1 Linealidad y Exactitud del método para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	73
5.6.2 Precisión del método para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.....	78
5.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.....	81
5.8 CUANTIFICACIÓN DE ROBUSTAFLAVONA Y (2S)-2,3-DIHIDROROBUSTAFLAVONA MEDIANTE CLAR.....	83
6. CONCLUSIONES.....	89
7. PERSPECTIVAS.....	91
8. BIBLIOGRAFÍA.....	92
9. GLOSARIO.....	99
10. ANEXOS.....	102
A-1 Fórmulas empleadas para cálculos.....	102
A-2 Análisis de Regresión lineal para 6d3 y 5e	105
A-3 Valores estadísticos de la distribución t de student.....	108
A-4 Valores estadísticos de la distribución F de Fisher.....	109
A-5 Espectros de biflavonoides.....	110
A-6 Cromatogramas obtenidos como resultado de la purificación de 5e	119



LISTA DE ABREVIATURAS

5e	(2S)-2,3-Dihidrorobustaflavona
AcOEt	Acetato de etilo
AcCN	Acetonitrilo
H ₂ O	Agua
ANADEVA	Análisis de varianza
ABC	Área bajo la curva
y	Área en mV/seg
AFM	Asociación Farmáutica Mexicana, A.C
CANIFARMA	Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica.
Cant.	Cantidad
R ²	Coeficiente de determinación
C.V	Coeficiente de variación
CV _{y/x}	Coeficiente de variación de la regresión
CNQFB	Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos
COSUFAR	Comité Mexicano de Sustancias Farmacéuticas de Referencia.
Conc.	Concentración
x	Concentración (µg/mL)
ICH	Conferencia Internacional de Harmonización
CL	Cromatografía de líquidos
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CCF	Cromatografía en capa fina
S	desv. Estd
desv. estd.	Desviación Estándar
d	Días
di	Diferencia absoluta de las medias
≠	Diferente de
Ftab	Estadístico F de tablas
Fexp	Estadístico F experimental
std	Estándar
K'	Factor de capacidad
T	Factor de coleo
Fdil.	Factor de dilución
Fresp	Factor de respuesta
F	Fracción
°C	Grados Celsius
g	Gramo
HPLC	High performance liquid chromatography
h	Horas
=	Igual a
ICH	International Conference of Harmonisation
IC(µ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
IC(β ₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen



$IC(\beta_1)$	Intervalo de confianza para la pendiente
LQ	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
λ	Longitud de onda
\pm	Más / menos
\geq	Mayor o igual que
\leq	Menor o igual que
$>$	Mayor que
\bar{y}_i	Media aritmética de cada condición de almacenaje
\bar{y}_0	Media aritmética del análisis inicial
$<$	Menor que
MeOH	Metanol
μm	Micrometros
μg	Microgramo
μL	Microlitros
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mV	Milivoltios
min	Minuto
nm	Nanómetros
n	Número de muestras
N	Número de platos teóricos
b_0	Ordenada al origen
OMS	Organización Mundial de la Salud
b_1	Pendiente
%	Porcentaje (Porciento)
PQF	Producción Químico Farmacéutica
\bar{y}	Promedio aritmético
R	Resolución
r.p.m	Revoluciones por minuto
6d3	Robustaflavona
seg.	Segundo
SQM	Sociedad Química de México
Temp	Temperatura
t	Tiempo
t_R	Tiempo de retención
t_0	Tiempo muerto
UV	Ultravioleta
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
g.l.	Grados de libertad
Sb_0	Desviación Estándar de la ordenada al origen
Sb_1	Desviación estándar de la pendiente
$t_{0.975, g.l}$	Valor de la distribución t-Student asociado a una confianza del 95% y a n-1 grados de libertad establecidos



LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Metabolitos secundarios y actividades biológicas de diferentes especies del género <i>Selaginella</i>	3
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>S. lepidophylla</i>	5
Tabla 3. Ejemplos de flavonoides y patrones de sustitución.....	14
Tabla 4. Máximos de absorción característicos de los distintos esqueletos flavonoides.....	16
Tabla 5. Variación en la absorción UV-VIS de los diferentes esqueletos flavonoides.....	16
Tabla 6. Elementos requeridos para la validación de métodos analíticos...	27
Tabla 7. Clasificación de los diferentes tipos de cromatografía.....	31
Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la purificación de 5e	45
Tabla 9. Fraccionamiento de la muestra (5e).....	46
Tabla 10. Diluciones para obtener las concentraciones de prueba de 6d3 y 5e	47
Tabla 11. Concentraciones de los compuestos 6d3 y 5e para evaluar la linealidad del sistema.....	48
Tabla 12. Intervalos de concentración para evaluar LD y LQ para 6d3 y 5e	49
Tabla 13. Parámetros de desempeño para evaluar la adecuabilidad del sistema.....	50
Tabla 14. Concentraciones de trabajo para las sustancias de referencia en estudio en la determinación de la exactitud del método.....	52
Tabla 15. Condiciones establecidas para la óptima separación de los componentes de <i>S. lepidophylla</i>	57
Tabla 16. Rendimiento obtenido en la purificación del compuesto 5e	62
Tabla 17. Áreas obtenidas, C.V, factor de respuesta para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema de 6d3	65
Tabla 18. Áreas obtenidas, C.V, factor de respuesta para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema de 5e	66
Tabla 19. Resumen del análisis de regresión lineal simple de linealidad del sistema para los compuestos 6d3 y 5e	67
Tabla 20. Valores de pendiente y ordenada al origen para cada curva en 6d3 , así como el LD y LQ obtenidos experimentalmente.....	68
Tabla 21. Valores de pendiente y ordenada al origen para cada curva en 5e , así como el LD y LQ obtenidos experimentalmente.....	69
Tabla 22. Resultados obtenidos para precisión del sistema para 6d3 con las seis muestras analizadas.....	70
Tabla 23. Resultados obtenidos para precisión del sistema para 5e con las seis muestras analizadas.....	70
Tabla 24. Parámetros de desempeño para 6d3	71
Tabla 25. Parámetros de desempeño para 5e	72
Tabla 26. Resultados experimentales para establecer la linealidad del método para 6d3	74



Tabla 27.	Resultados experimentales para establecer la linealidad del método para 5e	74
Tabla 28.	Resumen de la regresión lineal simple para evaluar linealidad del método en 6d3 y 5e	74
Tabla 29.	Datos experimentales de la exactitud del método para 6d3	76
Tabla 30.	Datos experimentales de la exactitud del método para 5e	77
Tabla 31.	Resumen de la regresión lineal simple para evaluar exactitud del método en 6d3 y 5e	78
Tabla 32.	Concentración adicionada y recuperada, % de recobro para 6d3	79
Tabla 33.	Concentración adicionada y recuperada, % de recobro para 5e ...	79
Tabla 34.	Resultados de la prueba de precisión intermedia para 6d3	80
Tabla 35.	Resultados de la prueba de precisión intermedia para 5e	80
Tabla 36.	Resumen de la regresión lineal simple para evaluar precisión intermedia del método en 6d3 y 5e	81
Tabla 37.	Datos de estabilidad a diferentes tiempos y distintas condiciones para 6d3	82
Tabla 38.	Datos de estabilidad a diferentes tiempos y distintas condiciones para 5e	82
Tabla 39.	Resultados de la prueba estadística F, para verificar homocedasticidad para 5e	86
Tabla 40.	Resultados de la prueba estadística F, para verificar homocedasticidad para 5e	86
Tabla 41.	Resultados de la cuantificación de 6d3 en S. lepidophylla ensayados por triplicado.....	87
Tabla 42.	Resultado promedio de la cuantificación de 6d3 en S. lepidophylla	87
Tabla 43.	Resultados de la cuantificación de 5e en S. lepidophylla ensayados por triplicado.....	88
Tabla 44.	Resultado promedio de la cuantificación de 5e en S. lepidophylla	88



LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. <i>Selaginella lepidophylla</i>	6
Figura 2. Planta deshidratada <i>S. lepidophylla</i>	7
Figura 3. Mapa de distribución geográfica de <i>S. lepidophylla</i> en México.....	7
Figura 4. Estructura base del esqueleto flavonoide.....	12
Figura 5. Sitios de hidroxilación y metilación del esqueleto flavonoide.....	12
Figura 6. Sitios de O-glicosilación y C-glicosilación del esqueleto flavonoide.....	13
Figura 7. Estructura de diversos grupos estructurales de flavonoides.....	13
Figura 8. Grupos cromóforos de la estructura base del esqueleto flavonoide.....	15
Figura 9. Espectro de absorción de flavonoides al UV.....	15
Figura 10. Ruta biosintética de flavonoides.....	21
Figura 11. Enlaces C-C más comunes en biflavonoides.....	23
Figura 12. Enlaces tipo éter (-O-) en biflavonoides.....	23
Figura 13. Ruta biosintética de los biflavonoides.....	24
Figura 14. Separación de clorofilas mediante cromatografía en papel.	30
Figura 15. Partes elementales de un cromatógrafo de líquidos.....	33
Figura 16. Plantas de <i>Selaginella lepidophylla</i> colectadas.....	39
Figura 17. Equipo CLAR de trabajo.....	40
Figura 18. Cromatoplaqueta de extractos obtenidos con distintos disolventes. Sistema de elución: CHCl ₃ :MeOH (80:20).....	56
Figura 19. Cromatograma del extracto metanólico de <i>S. lepidophylla</i>	58
Figura 20. Efecto de la co-inyección de la sustancia de referencia 6d3 en el CLAR.....	59
Figura 21. Efecto de la co-inyección de la sustancia de referencia 5e en el CLAR.....	59
Figura 22. Estructuras de los compuestos 6d3 , 5e y 6b2c aislados de <i>S. lepidophylla</i>	60
Figura 23. Cromatograma obtenido para evaluar pureza del compuesto 6d3 por CLAR.....	62
Figura 24. Cromatogramas de líquidos del compuesto 5e antes y después de su purificación.....	63



LISTA DE GRÁFICAS

	Pág
Gráfica 1. Curva experimental para determinar la linealidad del sistema para 6d3	65
Gráfica 2. Curva experimental para determinar la linealidad del sistema para 5e	66
Gráfica 3. Curva obtenida para la determinación de linealidad del método de 6d3	75
Gráfica 4. Curva obtenida para la determinación de linealidad del método de 5e	75
Gráfica 5. Curva obtenida para la determinación de exactitud del método para 6d3	76
Gráfica 6. Curva obtenida para la determinación de exactitud del método de 5e	77
Gráfica 7. Curva obtenida a partir de los datos de linealidad del método para la cuantificación de 6d3	84
Gráfica 8. Curva obtenida a partir de los datos de linealidad del método para la cuantificación de 5e	85



ESQUEMAS

	Pág
Esquema 1. Diagrama propuesto para realizar la validación de la técnica analítica por CLAR para determinar la cantidad de biflavonoides presentes en la planta medicinal de <i>S. lepidophylla</i>	41



1. INTRODUCCIÓN

En México se tiene estimado que existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto significa el 10% del total de la riqueza florística del país.

Existen informes que reportan que de manera cotidiana se comercializan con fines medicinales alrededor de 250 especies de plantas frescas y deshidratadas provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país, sin embargo, ninguna de las grandes empresas mayoristas del país maneja el total de estas especies, algunas incluso se dedican principalmente a comercializar plantas nacionales y otras tienen preferencia por las especies extranjeras.

Hoy en día, gran número de individuos de diversas comunidades utilizan materias primas vegetales como una alternativa terapéutica, para tratar sus enfermedades y en muchos casos sus usos se transmiten de generación en generación, como es el caso de la mayoría de especies medicinales empleadas en la medicina tradicional mexicana. Un estudio sistemático de las plantas medicinales que englobe análisis químicos, farmacológicos, botánicos y analíticos, entre otros, es muy conveniente, para la comprobación eventual de sus propiedades terapéuticas. En este trabajo se describe una metodología conveniente para determinar cuantitativamente algunos metabolitos secundarios contenidos en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* para así desarrollar una prueba de control de calidad para la planta mencionada.



2. ANTECEDENTES

2.1 GÉNERO *SELAGINELLA*

La familia *Selaginellaceae* consiste de un solo género, *Selaginella*. Se encuentra en el grupo de plantas criptógamas vasculares y se les conoce como “licopodios pequeños” debido a la similitud morfológica con las plantas *Lycopodiales*. Esta familia es el único miembro dentro del orden *Selaginelalles*; que junto con las plantas *Lycopodiales*, *Lipodendrales* y las *Isoetales* conforman la clase *Lycopodiopsida*.¹

Dentro de la familia, unas especies poseen tallos postrados y otras los tienen erguidos y delgados. El sistema vascular de los tallos se constituye por una o varias ramificaciones con bifurcaciones desiguales y sin crecimiento en el espesor. El tallo se encuentra recubierto por hojas pequeñas en cuatro hileras longitudinales, que pueden estar dispuestas en forma helicoidal o con frecuencia se encuentran decusadas. Las hojas se caracterizan por la presencia de una pequeña lígula a la base del haz y es de consistencia membranosa; éste órgano se encarga de captar el agua y facilita la rápida absorción de las gotas de lluvia.²

Las selaginelas son plantas heteroscópicas, es decir, que son capaces de producir dos tipos de esporas; además, tienen protalos (gametofitos) extraordinariamente pequeños. Los órganos que contienen las esporas, denominados esporofilos, se encuentran en la extremidad de las ramas en forma de flores apicales. Cada esporofilo lleva sólo un microsporangio o un macrosporangio que nace del tallo por encima de la base de la hoja, y aunque están separados, se encuentran en la misma planta; cada protalo femenino forma cuatro esporas grandes (macrosporas) y el masculino origina muchas esporas pequeñas (microsporas).



Las plantas herbáceas del género *Selaginella* varían de tamaño pequeño a moderado, son más de 700 especies las que conforman el género y están ampliamente distribuidas en el mundo, pero abundan en las zonas tropicales y unas cuantas se extienden en las altas latitudes del norte y del sur. Algunas especies están adaptadas a soportar ciertos periodos de sequía, por lo que pueden crecer sin ningún problema, en lugares relativamente secos.²

Algunas especies se cultivan en invernaderos como plantas ornamentales, pero la principal utilidad está en la medicina tradicional. Se ha reportado su uso en el tratamiento de diversas enfermedades como: diabetes, gastritis, cáncer, problemas cardiovasculares, hepatitis, enfermedades de piel, infecciones del tracto urinario y se han utilizado como antiinflamatorias. En su composición química, estas plantas tienen compuestos tales como glucósidos, alcaloides, lignanos y son ricos en flavonoides.³ Estos últimos frecuentemente se encuentran bajo la forma de glicósidos.

Tabla 1. Metabolitos secundarios y actividades biológicas de diferentes especies del género *Selaginella*.⁴

Especie	Lugar de origen	Compuestos químicos	Actividades	Referencias
			Biológicas	
<i>S. bryopteris</i>	India	Amentoflavona, hinoquiflavona, bilobetina, sequiaflavona, heveaflavona, neocriptomerina, derivados de dihidrohinokiflavona y de dihidroamentoflavona	Regeneración de energía y vitalidad	⁵ Swamy, et al., 2006.
<i>S. crysocolos</i>	India	Amentoflavona, 3',3'-binaringenina, 5'',7''-dihidroxi-2''-fenoxi-cromonil-(3''',4')-naringenina, naringeninil-(4'''-O-3)-kamferol, 8''-metilnaringeninil-(4'''-O-3)-kamferol.	Regeneración de energía y vitalidad	⁵ Swamy, et al., 2006


ANTECEDENTES

S. delicatula	Taiwan	Robustaflavona, amentoflavona, ácidos cafeoilquínicos, derivados metoxilados de robustaflavona y de 2",3"-dihidro-robustaflavona.	Citotóxica	⁶ Lin, et al., 2000
S. denticulada	España	Robustaflavona, amentoflavona e hinokiflavona	Epilepsia, narcótico, antihelmíntico, antiespasmódico	⁸ López-Saez, et al., 1995
S. doederleinii	China	Acido siquímico, fenil-propanonas, alcaloides glicosídicos de tipo hordenina; lignanos: (-)-lirioresinol A, (-)-lirioresinol B, (+)-wikstromol, (-)-nortraquelósido, (+)-matairesinol A, amentoflavona, heveaflavona y derivados metoxilados de amentoflavona.	Enfermedades cardiovasculares, bactericida, fuerte actividad citotóxica <i>in vitro</i> . Antimutagénico (<i>Salmonella tiphymurium</i>), antitumoral en ratones	⁷ Lin, et al., 1987, <i>ibid</i> , 1993. ⁹ Sun, et al., 1997.
S. lepidophylla	México	Robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, trimetil éter de hinoquiflavona, 5',5"-dihidroxi-7,7",4',4"-tetrametoxi-amentoflavona.	Enfermedades urinarias, diarrea, malestares hepáticos	¹⁰ Qasim, et al., 1985.
S. moellendorffii	China	Amentoflavona, ginkgetina, podocarpus-flavona A, kayaflavona, 7,4',7",4"-tetrametoxi-amentoflavona, beta-sitosterol, isopimpinlina.	Gonorrea, hemorragias, hepatitis agudas, citotoxicidad vs. adenocarcinoma ovárico.	⁹ Sun, et al., 1997; ¹¹ Evans y Raffauf, 1990.
S. selaginoides	Islandia	Robustaflavona, amentoflavona, hinokiflavona	Antiepiléptico y antiespasmódico	⁸ López Saez, et al., 1995
S. tamariscina	Japón	Amentoflavona, sotetsuflavona, isocriptomerina, hinoquiflavona	Promueve la circulación, emenagogo, antineoplásico.	⁵ Swamy, et al., 2006, ⁹ Sun, et al., 1997.



	Isocriptomerina, tetraacetilisocriptomerina, robustaflavona, bilobetina, 2",3"- unido dihidroisocriptomerina, 4',7"-di-O- metilamentoflavona, 7"-O- metilrobustaflavona	Citotóxico vs células de colon (Col2).	¹² Silva et al., 1995.
--	--	---	--------------------------------------

2.1.1 *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring

2.1.1.a Nombres Comunes

Sus nombres comunes son: Planta de la Resurrección, Rosa de Jericó, Siempre Viva, Flor de Piedra, Doradilla, Flor del rock, Flor de piedra. En las distintas lenguas: Magóra (tarahumara), yamanquitexóchitl (náhuatl), tequequetzal (Morelos), texochitl (Guerrero), much-k'ok (Michoacán y Yucatán), jodt'nborra y te'tesawam (Sonora), donido (Hidalgo), ndoto kuu (Oaxaca).¹³

2.1.1.b Clasificación taxonómica

En la siguiente tabla se muestra la clasificación taxonómica más reciente de la especie *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *S. lepidophylla*.

	Adolf Engler	ITIS*
Reino	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Embryophyta asiphonogama</i>	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Pteridophyta</i>	<i>Lycopodiophyta</i>
Clase	<i>Lycopodiopsida</i>	<i>Lycopodiopsida</i>
Orden	<i>Selaginellales</i>	<i>Selaginellales</i>
Familia	<i>Selaginellaceae</i>	<i>Selaginellaceae</i>
Género	<i>Selaginella</i>	<i>Selaginella Beauv.</i>
Especie	<i>Selaginella lepidophylla</i>	<i>Selaginella lepidophylla</i>

*Base de datos: ITIS (Integrated Taxonomic Information System) <http://www.itis.gov>⁶⁴



2.1.1.c Características Botánicas

Selaginella lepidophylla, es una planta herbácea de tamaño pequeño, de raíz fibrosa y pese a que en apariencia no tiene tallo, los presenta en manojos duros, por lo regular, miden de 10 a 12 cm de largo y de 0.5 a 1 cm de ancho. Tiene frondas verdes muy divididas y dispuestas en rosetas. Los tallos están cubiertos por dos hileras de hojas grandes y dos de hojas pequeñas, son fuertes, densamente imbricadas, escariosas en sus márgenes y son de color verde claro por el revés. (**Fig. 1**)



Figura 1. *Selaginella lepidophylla*

Esta planta, presenta propiedades poiquilohídricas, es decir, que se encuentra en equilibrio con la humedad atmosférica; cuando se deshidrata (**Fig. 2**), en los períodos de sequía, los tallos se cierran y enrollan para formar una roseta de alrededor de 10 cm de diámetro, con apariencia dorada (de ahí el nombre de Doradilla), y cuando nuevamente tiene contacto con la humedad, las ramas reverdecen y se vuelven a extender. Por esta razón, puede permanecer varios años en estado latente por desecación extrema y al disponer de agua, además de recobrar su apariencia herbácea, también reanuda sus funciones normales.¹⁴



Figura 2. Planta deshidratada *S. lepidophylla*

2.1.1.d Distribución

La planta habita donde hay climas cálido, semicálido, seco, semiseco y templado, desde los 600 y hasta 2800 m sobre el nivel del mar. Crece en lugares pedregosos, sobre las peñas y en las oquedades que quedan entre las rocas, está asociada a bosques tropicales, a matorral xerófilo, a bosques de encino, de pino y mixtos. La especie se localiza en gran parte del territorio nacional (**Fig. 3**). La distribución conocida para esta planta es: Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas y más recientemente en el estado de Tlaxcala.¹⁵ Se le ha encontrado en la mayor parte del territorio de Texas.¹³



Figura 3. Mapa de distribución geográfica de *S. lepidophylla* en México.

Presencia geográfica



2.1.1.e Usos medicinales

La Doradilla, se utiliza para el tratamiento de varios males populares: En Baja California para el “mal de orín”, en Oaxaca, para la “enfermedad del anual”, en la cual el enfermo presenta dolor del cuerpo, cansancio y dolor de cabeza. En Veracruz, se usa para la “quemazón”, referida como enfermedad en los niños, que se caracteriza por diarreas que duran aproximadamente un mes y en la cual aparecen manchas moradas.¹³

Sus usos principales son como, antirrenopático y diurético en caso de riñones inflamados, cistitis, cálculos renales, dolor de cintura, de espalda, cuando hay obstrucción de orina e irritación de los riñones. Entre los usos para aliviar trastornos digestivos figuran, inflamación de estómago, úlcera, dispepsia, irritación del hígado, corajes, espanto, cálculos biliares. También se indica para la tos, bronquitis, tosferina, para expulsar placenta, reumas, corazón, purificar la sangre, contra parasitosis y tiricia negra.¹³ Sin embargo, la Sociedad Farmacéutica de México indica el uso de la planta como deterativo, eupéptico, diurético, en padecimientos hepáticos y en caso de dolor en riñones.^{13, 16,17}

La forma de uso de la planta es por decocción de 1 a 4 plantas en un litro de agua (durante 5 a 10 min), su frecuencia de uso es como de agua de tiempo hasta que desaparezca el malestar, por lo que la vía de administración es oral.¹⁵

2.1.1.f Antecedentes fitoquímicos

Los estudios que se refieren a la composición química de *S. lepidophylla* son escasos. Luis de Escurdia menciona en su composición: aceite fijo, ácido orgánico, clorofila, glucosa, goma, albúmina, materia colorante, ácido carbónico, ácido salicílico, sulfúrico, clorhídrico y fosfórico, sosa, potasa, cal, magnesia y fierro.³



Entre otros metabolitos secundarios se han aislado: sacáridos, tetrahidrofurano. Sin embargo, Qasim y colaboradores (1985) aislaron de esta planta los biflavonoides robustaflavona, amentoflavona, hinoquiflavona, isocriptomerina, heveaflavona, éter trimetilico de hinoquiflavona y 5',5"-dihidroxi-7,7",4',4"-tetrametoxi-amentoflavona.¹⁰ Dentro de la investigación farmacológica de *S. lepidophylla* se ha podido comprobar que tiene poca actividad inhibidora de la respuesta contráctil de útero, íleon y duodeno de rata.

2.1.2 Compuestos marcadores en las plantas^{17a}

Los constituyentes de las plantas y de sus extractos pueden clasificarse en tres categorías:

- a) **Compuestos con actividad terapéutica conocida.** Corresponden a compuestos químicamente definidos o grupos de sustancias que generalmente son aceptadas por contribuir sustancialmente a la actividad terapéutica de una materia prima vegetal, estos constituyentes aisladamente ejercen el mismo (o similar) efecto terapéutico que el extracto total.^{17a}
- b) **Compuestos que contribuyen a la eficacia terapéutica.** No ejercen el mismo (o similar) efecto terapéutico como el extracto total, sin embargo, de acuerdo al conocimiento científico, éstos contribuyen a la actividad terapéutica.^{17a}
- c) **Sustancias marcadoras o grupos de sustancias marcadoras.** Consisten en compuestos o grupos de constituyentes químicamente definidos que se encuentran en ciertas plantas medicinales o en sus preparados. De acuerdo al conocimiento científico, éstos no contribuyen a la actividad terapéutica y sólo sirven para propósitos analíticos.



Estos constituyentes deberán ser característicos de la planta medicinal y fácilmente detectables por métodos analíticos. Del mismo modo que en las dos primeras categorías mencionadas, éstas últimas pueden participar dentro de un control completo desde la materia prima vegetal hasta de un preparado vegetal medicinal.^{17a}

2.2 FLAVONOIDES

Por sus supuestos beneficios de salud, los flavonoides son el grupo más grande de compuestos químicos que la comunidad científica está actualmente estudiando. Además de efectos antioxidantes, se ha reportado que ciertos flavonoides tienen efectos antimicrobianos, posiblemente anticarcinogénicos y cardioprotectores.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares.¹⁸

Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.¹⁸

2.2.1 Definición

Flavonoide (del latín *flavus*, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas.¹⁹ Los flavonoides, que se encuentran tanto en estado libre como glicosidado, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales.²⁰ Son sustancias de origen vegetal y le dan los colores (rojos, azules, amarillo) a las flores y a las hojas de otoño.



Son abundantes en las familias *Poligonaceae*, *Rutaceae*, *Leguminoseae*, *Umbelliferae* y *Compositae*, por tan solo mencionar algunas.

2.2.2 Distribución y estado natural

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente en las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las aéreas (hojas y botones florales), en tejidos superficiales, y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros.²¹ Están disueltos como glicósidos en el jugo vacuolar, cloroplastos y membranas.

Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como *O*-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como *C*-glicósidos. De todas estas formas naturales, los *O*-glicósidos son los más comunes de encontrar.²²

Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul.²³

2.2.3 Aspectos Químicos

La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A, derivado de la cadena policetídica, un anillo B, derivado del ácido siquímico, tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano y por eso se los conoce como compuestos C₆-C₃-C₆ (**Fig. 4**).



La estructura puede conformar un heterociclo (γ -pironas) que es la forma más abundante, o una cadena abierta, las chalconas. Las polimerizaciones son frecuentes, y ocurren principalmente por uniones C-C.²⁴

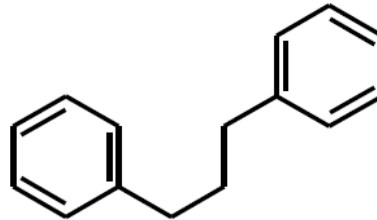


Figura 4. Estructura base del esqueleto flavonoide.

La estructura base puede presentar hidroxilos, metoxilos, estar O-glicosidada o C-glicosidada. En general el anillo A presenta hidroxilos, y no metoxilos, los cuales se ubican mayormente en 5 y 7. El anillo B en cambio presenta 1, 2 o 3 hidroxilos o metoxilos, los cuales se ubican de la siguiente manera (**Fig. 5**):

- R_4 y R_5 - hidroxilo se ubica en la posición 7 y 5.
- R_2 - Si hay un solo hidroxilo/metoxilo su ubica en la posición 4'.
- R_1 y R_3 - Si hay dos hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3' y 5'.
- R_1 , R_2 y R_3 - Si hay tres hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3', 4' y 5'.

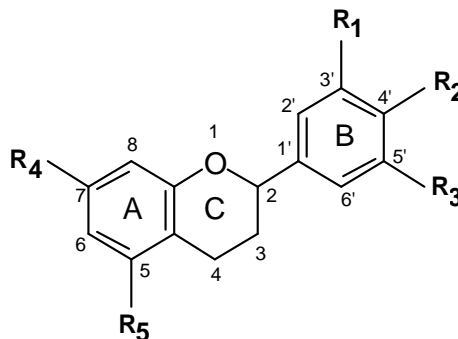


Figura 5. Sitios de hidroxilación y metilación del esqueleto flavonoide.



Todos los flavonoides se numeran en sentido horario, simplemente números en el anillo A y C, y números con “prima” en el anillo B. La excepción son las auronas, donde la numeración se invierte.²⁴ Los azúcares forman O-glicósidos en las posiciones 3, 7, 3' y 4', siendo los más comunes diglicósidos en 3 y 7 o en 7 y 4'. La C-glicosidación se presenta sobre C₆ y C₈. (**Fig. 6**)

- R₁, R₂, R₃, R₅ – azúcares O-glicósidos
- R₂, R₃, R₅ – azúcares diglicósidos
- R₄ y R₆ – azúcares C-glicósidos

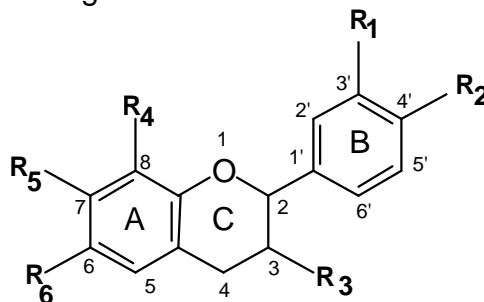
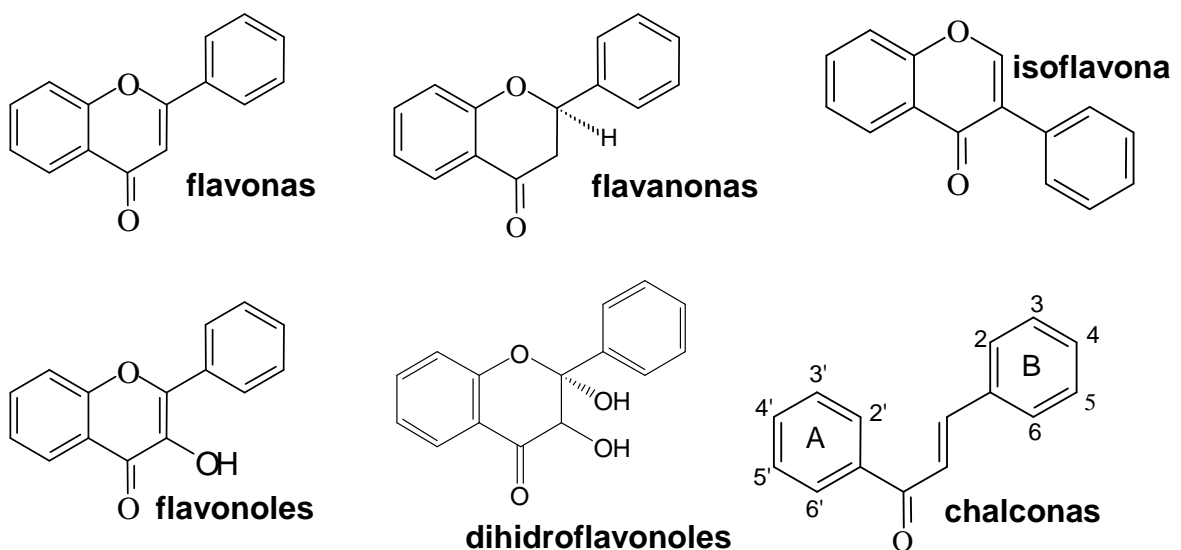


Figura 6. Sitios de O-glicosilación y C-glicosilación del esqueleto flavonoide.

El estado de oxidación del anillo central determina varios grupos estructurales, como se ve a continuación en las siguientes estructuras (**Fig. 7**).²⁴



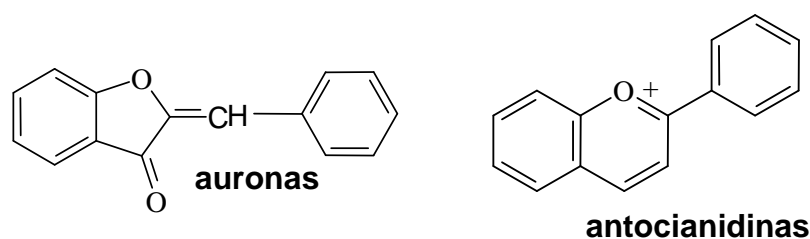


Figura 7. Estructura de diversos grupos estructurales de flavonoides.

En la **Tabla 3** se muestran ejemplos de algunos tipos de flavonoides, su estructura y patrón de sustitución.²³

Tabla 3. Ejemplos de flavonoides y patrones de sustitución.²³

FLAVONOIDE	ESTRUCTURA ANILLO C	PARTE DE SUSTITUCIÓN
FLAVANONA	Naringinina	5,4'-OH ; 7-O-Neo
	Hesperidina	5,3'-OH ; 4'-OMe
	Eriodictiol	5,7,3',4'-OH
	Tangeritina	5,6,7,8,4'-OMe
FLAVONA	Luteolina	5,7,7',4'-OH
	Apigenina	5,7,4'-OH
FLAVONOL	Kaemferol	5,7,3,4'-OH
	Quercetina	5,7,3,3',4'-OH
	Rutina	5,7,3',4'-OH; 3-O-Rut*
ISOFLAVONOIDES	Genisteina	5,7,4'-OH
	Daidzeína	7,4'-OH
	Orobol	5,7,3',4'-OH
ANTOCIANIDINAS	Apigenidina	5,7,4'-OH
	Luteolinidina	5,7,3,4'-OH
AURONAS	Cianidina	3,5,7,3',4'-OH
	Sulfuretina	6,3',4'-OH
	Leptosidina	6,3',4'-OH ; 7-OMe

*Neo: neohesperidosa, Rut: rutinosa



2.2.4 Determinación de la estructura

La Espectrofotometría UV es ampliamente usada para la detección de flavonoides por requerir solo pequeñas cantidades del compuesto puro, el cual no se destruye, al igual que en la técnica por RMN.²⁴ El espectro UV de un flavonoide se relaciona con su estructura de la siguiente manera (**Figs. 8 y 9**):

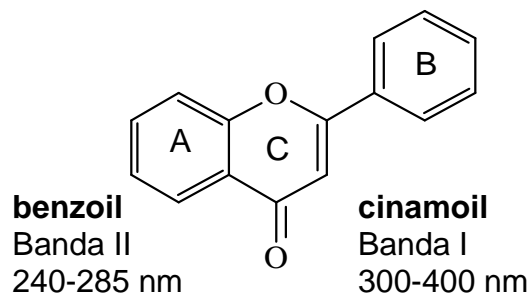


Figura 8. Grupos cromóforos de la estructura base del esqueleto flavonoide.

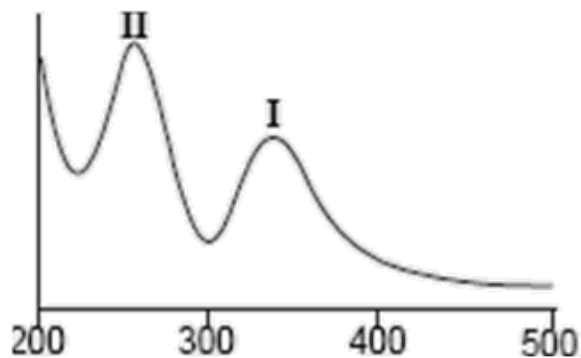


Figura 9. Espectro de absorción de flavonoides al UV.

El espectro en metanol de los flavonoides provee información sobre el tipo de flavonoide y el estado de oxidación. El máximo de absorción de los flavonoides varía de acuerdo al estado de oxidación del anillo central y según el número y posición de los grupos OR, como resultado de los diferentes sistemas conjugados.¹⁹



Tabla 4. Máximos de absorción característicos de los distintos esqueletos flavonoides.

ESQUELETO	BANDA II (nm)	BANDA I (nm)
Flavonas	240-280	Intensa 305-330
Flavanonas	Intensa 270-295	Hombro
Isoflavonas	Intensa 245-270	---
Flavonoles	240-280	Intensa 350-385
Dihidroflavonoles	Intensa 270-295	Baja intensidad
Chalconas	Pequeña	Intensa 340-390
Auronas	Intensidad 220-270	Intensa 370-430
Antocianinas	Pequeña intensidad 270-280	Intensa 480-550

El empleo de reactivos de desplazamiento como etóxido de sodio, cloruro férrico, acetato de sodio y ácido bórico producen corrimientos de los máximos de absorción de acuerdo a la localización y naturaleza de las funciones oxigenadas.¹⁹ Podemos resumir el uso de reactivos de desplazamiento en la **Tabla 5.**

Tabla 5. Variación en la absorción UV-VIS de los diferentes esqueletos flavonoides.

ESQUELETO	MeOH (nm)	NaOH (nm)	NaOAc (nm)	AlCl₃ (nm)
Flavonas	315-350	40-60	---	25-40
Flavanonas	275-295	30-40	30-40	20-30
Isoflavonas	250-270	10-15	5-15	10-20
Flavonoles	350-385	40-60	---	40-60
Chalconas	370-395	40-60	---	50-65
Auronas	385-415	40-60	---	50-65
antocianinas	475-545	*Inest.	*Inest.	15-50

**Inest. = inestable*



2.2.5 Obtención e identificación

2.2.5.a Extracción de flavonoides

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material vegetal fresco, aunque ésta también puede realizarse con el material vegetal seco siempre y cuando el proceso de secado no altere la composición de los flavonoides. El material vegetal debe molerse finamente para de esta forma facilitar la extracción de los flavonoides, los cuales pueden presentar diferente solubilidad en distintos disolventes orgánicos.²⁵

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilo libres o azúcares son considerados compuestos polares, por lo que son moderadamente solubles en disolventes polares como: etanol, metanol, butanol, acetona, DMSO, agua. Por otro lado, los que son menos polares como isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en disolventes tales como éteres y cloroformo.²⁶⁻²⁷ La extracción de la mayoría de los flavonoides se puede realizar con metanol al 85 % en agua, con posterior filtración. El filtrado se concentra y el metanol es eliminado; la capa acuosa es sucesivamente extraída por partición con una serie de disolventes orgánicos como: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo.²⁸

Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad, los cuales están presentes en la superficie de las plantas.^{25 y 29}

El extracto hexánico generalmente contiene clorofilas y gomas y los extractos clorofórmico y de acetato de etilo son ricos en flavonoides.



2.2.5.b Aislamiento y purificación

Esta etapa es muy importante en la separación e identificación de los flavonoides presentes en un extracto. Con este objetivo se pueden utilizar diferentes técnicas cromatográficas; para la determinación de flavonoides en extractos crudos de plantas o en fracciones, son especialmente utilizadas la cromatografía en papel (CP) y la cromatografía en capa fina (CCF). Por otro lado, son indispensables para la separación de flavonoides la CP preparativa, la CCF, la cromatografía en columna (CC) y especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).³⁰

2.2.5.c Identificación por Cromatografía en Capa Fina (CCF).

La cromatografía de capa fina es un método de análisis rápido, el cual requiere de muy pequeñas cantidades de muestra; se pueden utilizar como soporte celulosa, sílica gel y poliamida, entre otros.³⁰

El revelado de la cromatoplaqueta se realiza a la luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm, donde aparecen muchos flavonoides como puntos coloreados; estos se intensifican o cambian de color cuando se someten a vapores de amoníaco, pudiéndose estimar de esta forma el tipo de flavonoide presente en el extracto.²³

Con el uso de reactivos asperjados se aumenta grandemente la sensibilidad del cromatograma en la detección de flavonoides, sobre todo cuando los flavonoides son invisibles a la luz ultravioleta o se encuentran como constituyentes menores; los cuatro reactivos más utilizados con este objetivo son AlCl_3 , complejo difenil-ácido bórico-etanoamina (Naturstoffreogenz A), ácido sulfanílico diazoado (DSA) y borohidruro de sodio/HCl.²³



2.2.5.d Separación por Cromatografía en Columna (CC).

Esta técnica básicamente consiste en la aplicación de una mezcla de flavonoides a la columna, la cual cuenta con un poderoso adsorbente y la subsecuente elución secuencial de los compuestos individuales con disolventes apropiados. Se emplea para la separación de flavonoides a nivel preparativo y los adsorbentes más comúnmente utilizados en esta técnica son sílica gel, poliamida, celulosa y sephadex.³¹

2.2.5.e Separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Esta técnica (HPLC) puede ser usada para la separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides. Muestra niveles de resolución y sensibilidad mucho mayores que la cromatografía de papel o de capa fina, por lo que es usada para verificar la homogeneidad de las muestras aisladas por otras técnicas. La cromatografía de fase inversa es comúnmente utilizada y con esta técnica los compuestos más polares eluyen primero.³⁰ Las columnas de C₁₈ son muy empleadas aunque las de C₈ y otros empaquetamientos pueden ser también utilizados. Se usan sucesivamente disolventes como H₂O/MeOH, H₂O/MeOH/HOAc y H₂O/acetonitrilo en variadas proporciones para la cromatografía de flavonas, flavonoles, dihidroflavonoides, catequinas, antocianidinas y glicósidos de flavonoides, utilizando sistemas de elución isocráticos o por gradientes. Los flavonoides eluidos por HPLC son normalmente captados por medio de un detector UV a 280 nm, debido a que muchos de ellos presentan un máximo de absorción UV entre 270 y 290 nm.³⁰



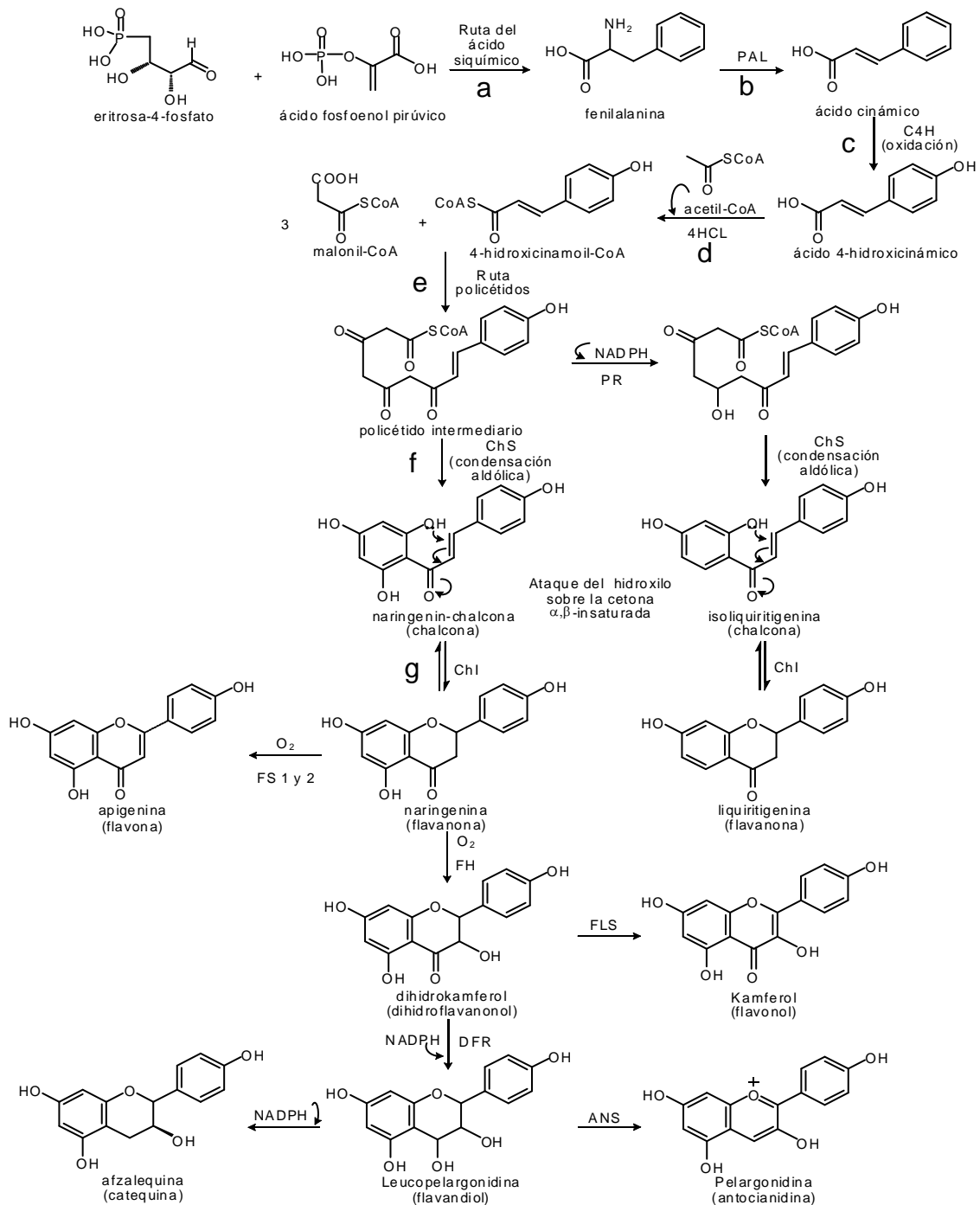
2.3 BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES ^{32, 33}

Los flavonoides se originan en la naturaleza por biogénesis mixta: el anillo A proviene de la ruta de los policétidos, el anillo B y la cadena C₃ se originan de la ruta del ácido siquímico. En la **Figura 10** se esquematizan los siguientes pasos:

- a) La biosíntesis inicia con la ruta del ácido siquímico, por condensación de los metabolitos primarios, eritrosa 4-fosfato y el fosfoenol piruvato (PEP), por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico; a partir del cual se forma el precursor de aminoácidos aromáticos, el ácido corísmico, y conduce a la formación del aminoácido fenilalanina.
- b) El siguiente paso es la eliminación del amonio de la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) para dar origen al ácido cinámico.
- c) El ácido cinámico es transformado en ácido 4-hidroxicinámico (o ácido *p*-cumárico) por acción de la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H), que se encarga de incorporar un grupo hidroxilo a nivel de anillo aromático
- d) Posteriormente, con la incorporación de una unidad de acetyl-CoA, la enzima 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa (4HCL) da origen al precursor 4-hidroxicinamoil-CoA.
- e) Por la ruta de los policétidos, se forma un policétido intermediario con la unión de 4-hidroxicinamoil-CoA, (unidad iniciadora), y 3 unidades de malonil-CoA, (unidad extendedora).
- f) Con la acción de la chalcona sintetasa, el policétido se cicliza por condensación aldólica, para dar origen al anillo A y formar una chalcona.



- g) Las flavanonas se forman con un ataque nucleofílico tipo Michael del hidroxilo sobre la cetona α, β -insaturada.



PAL: fenilalanina amonioliasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, 4HCL: 4-hidroxicinamato-CoA-ligasa, PR: policétido reductasa, ChS: chalcona sintetasa, ChI: chalcona isomerasa, FS 1 y 2: flavona sintetasa 1 y 2, FH: flavanona 3-hidroxilasa, FLS: flavonol sintetasa, DFR: dihidroflavonol 4-reductasa, ANS: antocianidina sintetasa

Figura 10. Ruta biosintética de flavonoides.⁷



2.4 BIFLAVONOIDES

Aunque existe una gran variedad de flavonoides, para efectos de este estudio nos enfocaremos en los biflavonoides, compuestos centrales en esta tesis que se utilizaron y analizaron para desarrollar y validar un método analítico.

Los biflavonoides, son dímeros de flavonoides, que raramente encontrados como glicósidos, tienen una distribución botánica muy restringida y aparecen predominantemente en las gimnospermas. De forma general, los monómeros flavonoides implicados en el biflavonoide suelen ser flavonas y flavanonas con un patrón de oxigenación muy simple: 5, 7, 4' y ocasionalmente 5, 7, 3', 4'. La formación de los biflavonoides se debe al acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y a la modificación del carbono central C₃³¹ (**Fig. 13**).²⁴ La unión de ambas unidades suele estar constituida por un enlace carbono-carbono, aunque ocasionalmente se dan los enlaces tipo éter.³⁴ Dentro de los tipos más comunes para los enlaces C-C (**Fig. 11**)²⁴ se incluyen:

- enlace 6, 8'' apigenina- apigenina (grupo de la agatisflavona)
- enlace 8, 8'' apigenina- apigenina (grupo de la cupresoflavona)
- enlace 3', 8'' apigenina-apigenina (tipo amentoflavona)
- enlace 3', 6'' apigenina-apigenina (tipo robustaflavona)
- enlace 3', 8'' entre diversas flavonas y flavanonas.

Los enlaces tipo éter (**Fig. 12**),²⁴ incluyen básicamente los tipos hinokiflavona (enlace interflavonoídico en 4', 6'') y ochnaflavona (enlace 4', 3''').

Algunas propiedades físicas y químicas de los biflavonoides se asemejan a las de sus monómeros, por lo que algunas veces son difíciles de reconocer. Los monómeros y dímeros se pueden distinguir claramente mediante cromatografía en sílica gel y esto se puede corroborar con el uso de la fusión alcalina o por medio de la espectrometría de masas.



En su mayoría, los biflavonoides aislados en musgos son mucho más polares que los de otras plantas. Esta polaridad es más notable respecto a los biflavonoides de *gimnospermas*, y ésto podría estar relacionado con sus zonas de acumulación: en las zonas hidrofílicas de las paredes celulares, caso de los biflavonoides más polares de musgos y, en la cutina, en el caso de los biflavonoides más lipofílicos de *gimnospermas*.³⁴

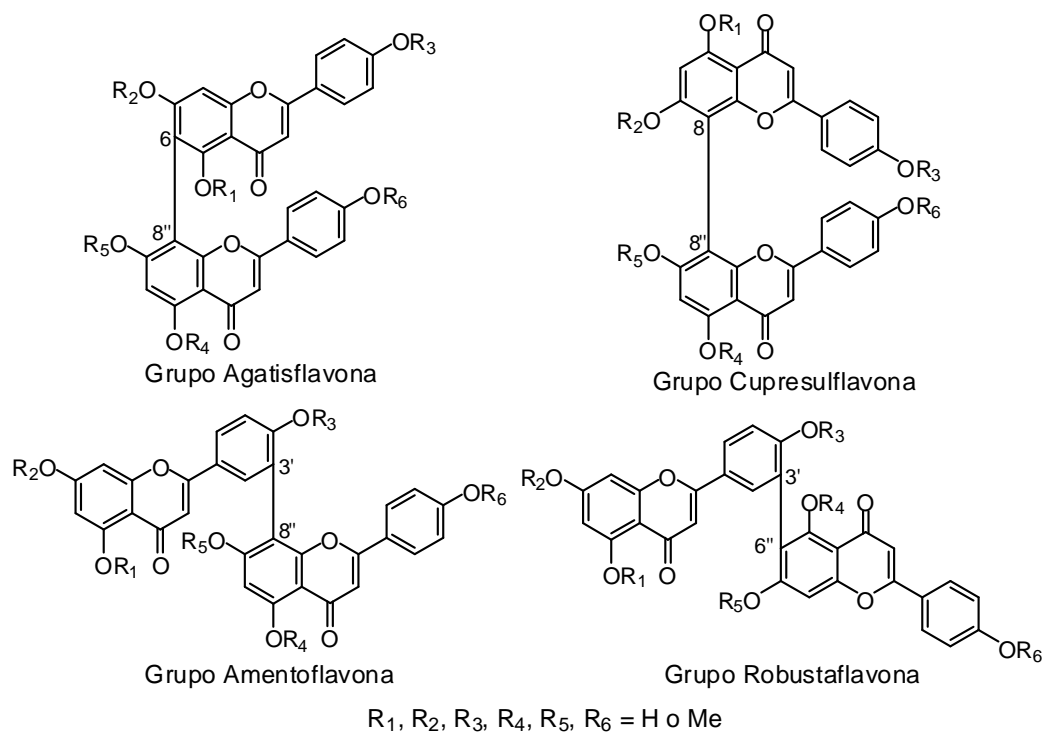


Figura 11. Enlaces C-C más comunes en biflavonoides.

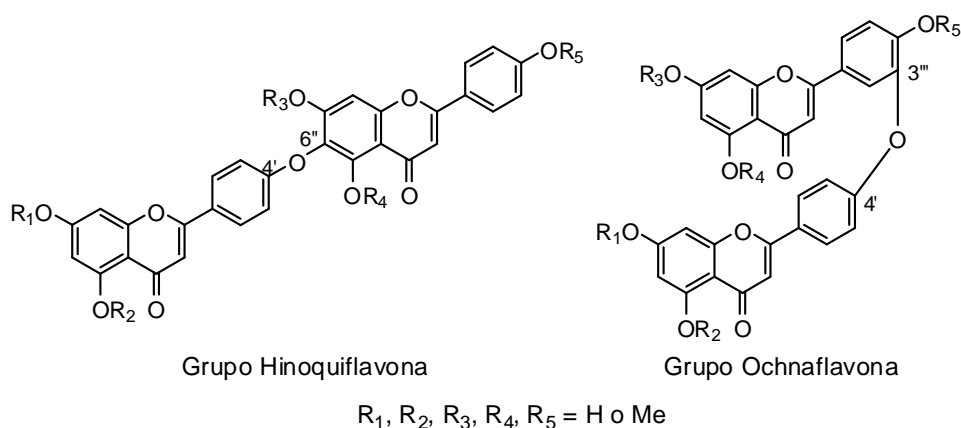


Figura 12. Enlaces tipo éter (-O-) en biflavonoides.



A continuación, se describe la ruta biosintética para los diferentes tipos de biflavonoides.

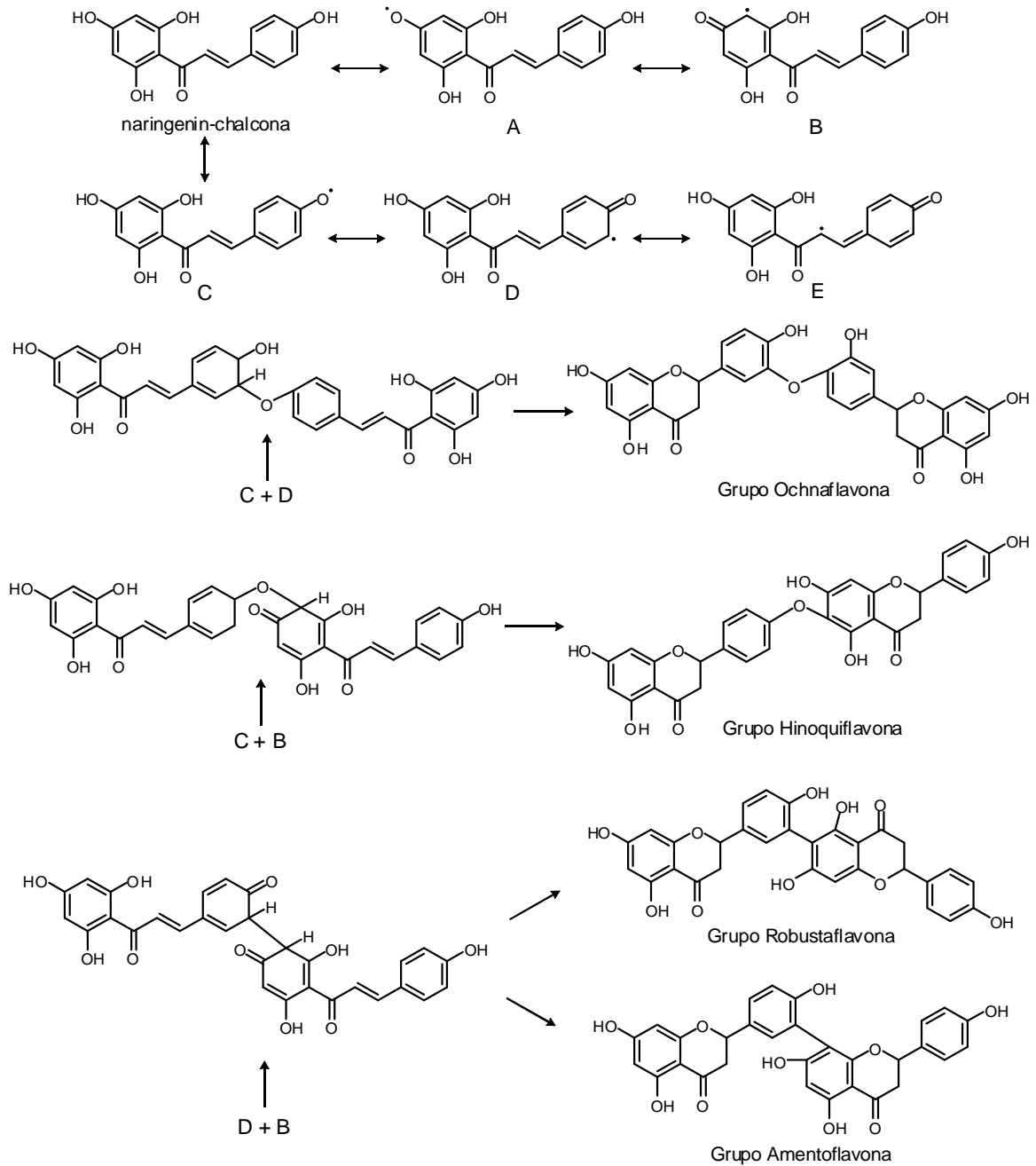


Figura 13. Ruta biosintética de los biflavonoides.



2.5 IMPORTANCIA DE LOS FLAVONOIDES

2.5.1 Flavonoides en las plantas

Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas; estos se encuentran localizados en la membrana tilacoide de los cloroplastos.³⁵ Las funciones de los flavonoides en las plantas se enlistan a continuación:

- Protección ante la luz UV
- Defensa ante el herbivorismo
- Regulación del transporte de la hormona auxina
- Atracción de animales polinizadores
- Atracción de presas (plantas carnívoras como la Drosera y la Dionea)
- Atracción de animales dispersores de semillas y frutos
- Inducción de la nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno
- Protección contra los hongos

2.5.2 Flavonoides en la humanidad

La humanidad ha consumido casi a diario esta clase de sustancias.³⁵ Algunas de sus utilidades en el organismo humano, son las siguientes.^{32,33-39}

- Hepatoprotectores
- Evita la arterioesclerosis
- Regulan permeabilidad capilar
- Acción antiinflamatoria
- Acción relajante del músculo liso cardiovascular
- Acción antioxidante
- Mediadores de los procesos inflamatorios



2.5.3 Fuentes dietarias más comunes

Los flavonoides se encuentran en la pulpa comestible de frutos como los cítricos, cerezas, uvas, albaricoques, grosellas negras, etc. La pimienta verde, el brócoli, las cebollas y los tomates son buenas fuentes vegetales, como también el trigo sarraceno. El té verde y el vino tinto también contienen varios flavonoides. Muchas plantas aromáticas también contienen flavonoides, y en ellas éstos contribuyen a sus efectos terapéuticos. Entre otras se incluyen el ginkgo, espino, cardo mariano.^{35, 40, 41}

2.6 VALIDACIÓN Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

2.6.1 Generalidades de Validación de métodos

Por definición, la validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos. El manejo y análisis de los datos deben ser a través de un tratamiento estadístico, permitiendo de esta manera una correcta evaluación del método.⁴²

La validación de un método se lleva a cabo mediante la evaluación de ciertos parámetros como especificidad y/o selectividad, linealidad, exactitud, precisión evaluada como repetibilidad y precisión intermedia, límite de detección y cuantificación. Los parámetros requeridos para la validación de un método analítico dependen de la aplicación del mismo, por lo que es importante conocer la clasificación según la **USP 2008** de los métodos analíticos de acuerdo a su aplicación.⁴³



Los métodos analíticos se dividen en cuatro categorías:

- **Categoría I.** Métodos empleados para la cuantificación de principios activos y materias primas incluyendo conservadores en productos farmacéuticos terminados.
- **Categoría II.** Métodos para la determinación de impurezas en materias primas o producto terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos y cualitativos.
- **Categoría III.** Métodos para la determinación de características del comportamiento del producto como disolución o liberación del activo.
- **Categoría IV.** Pruebas de identificación.⁴⁴

En la **Tabla 6** se indican los elementos requeridos para la validación de cada tipo de método.

Tabla 6. Elementos requeridos para la validación de métodos analíticos.⁴⁴

Parámetro	Categoría	Categoría		Categoría	Categoría
	I	II	III	IV	
	Contenido/ potencia/ Valoración	Contenido/ valoración	Pruebas límite	Contenido	identificación
Exactitud	√	√	*	*	No
Precisión	√	√	No	√	No
Especificidad	√	√	√	*	√
Tolerancia	√	√	√	*	No
Límite de detección	No	√	√	*	No
Límite de cuantificación	No	√	No	*	No
Linealidad	√	√	No	*	No
Rango	√	√	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.



Un método debe ser validado, cuando sea necesario verificar que los parámetros de desempeño son adecuados para su uso en un problema analítico en particular por ejemplo:

- √ Desarrollando sólo el método.
- √ Revisando un método o estableciendo otro nuevo, adaptado a un problema nuevo.
- √ Cuando se realiza una inspección en control de calidad de un método establecido, y éste es necesario cambiarlo a tiempo.
- √ Cuando un método establecido es usado en diferentes laboratorios, con diferentes analistas o diferentes equipos.
- √ Demostrando la equivalencia de dos métodos; p. ej.: un nuevo método y nuevo estándar.⁴⁵

El hecho de contar con los procesos validados no sólo significa para una industria farmacéutica o laboratorio, tener productos de calidad que le permitan garantizar su efectividad para entrar y mantenerse en el exigente mercado farmacéutico, sino que también significa un valioso ahorro en tiempo y dinero, ya que se minimizan los riesgos de perder lotes de producción por errores generados durante el transcurso de la fabricación.⁴⁵ Según una visión cronológica, podemos clasificar las validaciones de procesos en 4 tipos:

- **Validación Prospectiva:** este tipo de validación se efectúa en la etapa de desarrollo del producto, es decir, antes de su fabricación a gran escala y de su comercialización.
- **Validación Concurrente:** Es aquella que se realiza durante la fabricación de rutina. Su aplicación es útil en productos existentes pero que no tienen un gran historial y en productos nuevos en sus primeros lotes de fabricación.



- **Validación Retrospectiva:** Es aquella en donde se trabaja con los antecedentes históricos del producto, obtenidos a partir de los registros de producción y control de calidad. Se aplica para productos que ya se encuentran en el mercado y que no han sido validados anteriormente. Para la Validación Retrospectiva de Procesos se aplica el mismo criterio, y ha tomado gran fuerza en los últimos años, ya que es de fácil realización y de gran conveniencia para los propósitos de la industria.
- **Revalidación:** Este tipo de estudio se utiliza cuando se ha introducido alguna variable en algún procedimiento o metodología de un producto ya validado anteriormente, por lo que se alteran las características del producto final.⁴⁵

Es por esto, que la calidad de un producto farmacéutico debe estar completamente probada, esto para cumplir con las exigencias de las autoridades sanitarias y sobre todo por brindar un producto verdaderamente eficaz a la población; por ello, la industria farmacéutica se ha preocupado de implementar metodologías que intenten garantizarla. Por lo que el tipo de validación desarrollada en esta tesis es del tipo prospectiva.

2.6.2 Generalidades de la Cromatografía

2.6.2.a Definición

La cromatografía, es una técnica desarrollada a principios de siglo, el nombre de cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se separaron como bandas coloridas. El botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919) empleó por primera vez en 1906 el término "cromatografía" (que proviene del griego "*cromos*" y "*grafía*" que significan a su vez respectivamente "color" y "escribir").



Mikhail, usó columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (clorofilas). En la **Figura 14** se esquematiza un tipo de separación de clorofilas.

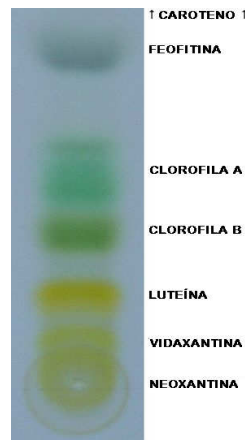


Figura 14. Separación de clorofilas mediante cromatografía en papel.

Tomada de www.wikipedia.org

La cromatografía en general, es un procedimiento por el cual, un soluto es separado por un proceso de migración diferencial en un sistema que consiste de dos o más fases, una de las cuales se mueve en una dirección dada y en las cuales las sustancias exhiben individualmente diferentes movilidades por razones en diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular y densidad de carga iónica. Las sustancias individuales por lo tanto pueden ser identificadas o determinadas por métodos analíticos.⁴⁶⁻⁴⁷

2.6.2.b Tipos de cromatografía

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según como esté dispuesta la **fase estacionaria** en:

- **Cromatografía plana.** La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel.
- **Cromatografía en columna.** La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna, según el fluido empleado como fase móvil.⁴⁷



La **Tabla 7** muestra los tipos de cromatografía de líquidos, según el tipo de fase.

Tabla 7. Clasificación de los diferentes tipos de cromatografía.

Tomada de www.wikipedia.org

TIPOS	FASE MÓVIL	FASE ESTACIONARIA
Cromatografía en papel	Líquido	Sólido
Cromatografía en capa fina	Líquido	Sólido
Cromatografía de gases	Gas	Sólido o líquido
Cromatografía líquida en fase inversa	Líquido (polar)	Sólido o líquido (menos polar)
Cromatografía líquida en fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido o líquido (polar)
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Líquido (polar, ácido o básico)	Sólido
Cromatografía líquida de exclusión	Líquido	Sólido
Cromatografía líquida de adsorción	Líquido	Sólido
Cromatografía de fluidos supercríticos	Gas	Sólido

Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, y es de la que se hablará en el siguiente apartado, dada su gran importancia en el estudio de esta tesis.



2.6.2.c Cromatografía de Líquidos de Alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), o mejor conocida como High Performance Liquid Chromatography (por sus siglas en inglés HPLC) es una técnica cromatográfica de reparto en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria que puede ser sólida o líquida.⁴⁸ Utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.⁴⁹ Debido a estas presiones el equipo para HPLC es elaborado y costoso.⁴⁶

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) comenzó a desarrollarse en los años sesenta, aumentando su importancia en las décadas siguientes, hasta convertirse en la técnica cromatográfica actualmente más empleada, de todos los tipos de cromatografía de elución, cuyos resultados, en términos de selectividad y de resolución han mejorado mucho por la miniaturización y la utilización de fases estacionarias muy elaboradas.⁴⁸

El fundamento básico de la cromatografía de líquidos de alta resolución es: que el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro de acero empacado con las partículas del adsorbente con ciertas características de actividad química) mediante el bombeo de un líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.⁴⁹

Un equipo básico de cromatografía de líquidos consta de las siguientes partes: suministro de fase móvil, bombas, inyectores (automatizado o manual), precolumnas, columna, tubos conectores, filtros, termostatos de columna, detectores, registrador de señales.



A continuación se presenta en la **Figura 15** las partes elementales de un cromatógrafo de líquidos.

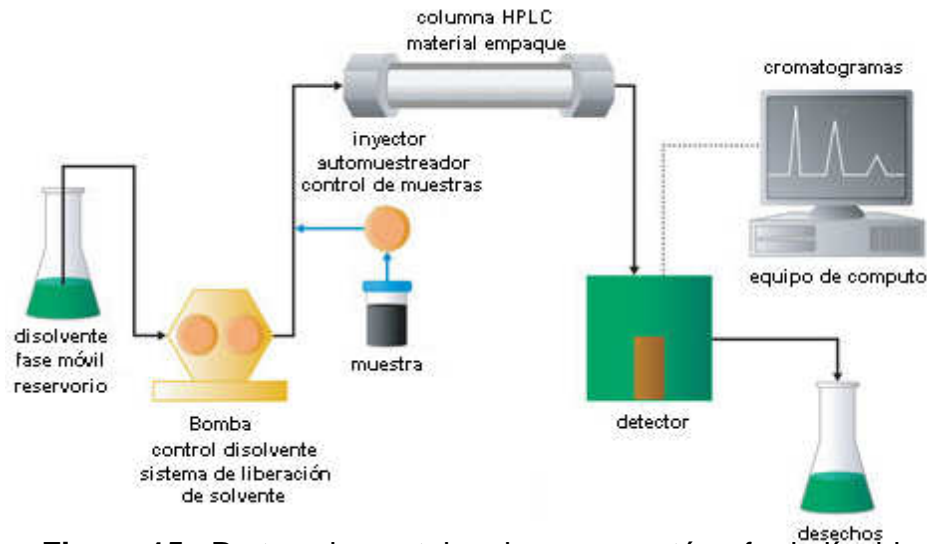


Figura 15. Partes elementales de un cromatógrafo de líquidos.

Tomada de www.waters.com

Los tipos de elución en HPLC son: **elución isocrática** que emplea un solo disolvente o mezcla de varios de composición constante y **elución con gradiente** que consiste en un cambio gradual de la composición de la fase móvil durante la separación. Se mezclan proporciones cada vez mayores de un segundo o tercer disolvente con mayor fuerza de elución; los disolventes tienen una polaridad significativamente diferente y la variación de los disolventes está programada.⁵⁰

Los tipos de cromatografía que existen son las siguientes:

Cromatografía de fase normal: Se caracteriza por separar los compuestos en base a la polaridad de sus grupos funcionales. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil relativamente poco polar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar.



El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria (gel de sílice SiOH). La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención. Fases móviles utilizadas: hexano, isooctano, metanol, cloroformo, acetonitrilo.

Cromatografía de fase reversa: La fase móvil es más polar que la fase estacionaria. La fase móvil comúnmente es agua con un componente menos polar. Las fases móviles pueden ser agua/metanol o agua/AcCN, por ejemplo. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza poco polar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. Esta modalidad se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente poco polar, y una fase estacionaria poco polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente poco polar a la fase móvil.⁵⁰

La cromatografía ha llegado a ser el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí. Además, se puede emplear para la identificación cualitativa y para la determinación cuantitativa de las especies separadas. La CL tiene dos importantes campos de aplicación: Por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto en determinadas condiciones (sistema de disolventes, temperatura y flujo), o el volumen de retención.



En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.⁴⁶



3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El alivio de las enfermedades en el marco de la medicina tradicional con el uso de las plantas medicinales, es una práctica que se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales y actualmente la protección de la salud está asumiendo un alto valor económico en el mundo. Más del 80% de la población mundial depende de las plantas silvestres para la atención de las enfermedades y se estima que 1,500 millones de seres humanos recurren a medicamentos y prácticas tradicionales, por lo que el Programa de Medicina Tradicional de la Organización Mundial de la Salud (OMS), otorga suma importancia a la medicina herbolaria en países desarrollados y no desarrollados⁵¹ reconociéndose el valor clínico de vegetales empleados en prácticas de medicina alternativa.

Los actuales problemas de salud, así como la difícil obtención de medicamentos alopáticos, ha llevado nuevamente a la investigación de plantas útiles por su uso y manejo⁵² y por otra parte, el empleo de productos herbolarios significa frecuentemente para la población evitar el riesgo de reacciones secundarias adversas, frecuentes en medicamentos de patente y además, representa una alternativa terapéutica para tratar enfermedades crónicas.⁵³

Con relación al expendio de productos herbolarios, existe una gran problemática ya que actualmente muchos de ellos se prescriben sin ningún control y registro por la Secretaría de Salud, así se pueden encontrar productos en diferentes presentaciones, con diferente calidad y en estos existe la posibilidad de encontrar especies adulterantes que representan un riesgo en su consumo, por lo que es necesario efectuar estudios que justifiquen la seguridad, eficacia y calidad de las plantas medicinales.



Estos estudios son de carácter multidisciplinario y abarcan diferentes áreas: biológica, farmacológica, química y analítica, entre otras.

La información generada en estos estudios para una sola materia prima vegetal, podrá insertarse en textos bien documentados tales como monografías que serán en un futuro de utilidad para integrarse dentro de una farmacopea herbolaria.

Dentro de los estudios indispensables para conformar una monografía están los analíticos, mediante los cuales se podrá evaluar la composición química de una droga. Estos estudios pueden ser de diversos tipos y adecuados a la naturaleza química de los metabolitos secundarios presentes en las plantas.

El objetivo del presente trabajo es desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de los biflavonoides presentes en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev) Spring. La información generada será de gran utilidad para emplearse dentro de las pruebas de composición de *Selaginella lepidophylla* como materia prima medicinal.

Para lograr el objetivo principal se plantean los siguientes **objetivos particulares**:

1. Obtención por CLAR de los metabolitos secundarios mayoritarios (biflavonoides) de la planta completa de *Selaginella lepidophylla* a partir de fracciones cromatográficas del extracto de acetato de etilo (AcOEt).
2. Comprobación estructural de los biflavonoides mediante técnicas espectroscópicas.



3. Establecer un plan de trabajo para determinar las condiciones experimentales óptimas para la separación de los biflavonoides contenidos en el extracto de AcOEt de la planta en estudio por medio de CLAR.

4. Determinación de los parámetros requeridos para la validación del método analítico por CLAR, de acuerdo a las guías de validación de métodos analíticos (CNQFB, 2002) y la guía internacional ICH Q2 (R1) 2005.

5. Determinación de la cantidad de los biflavonoides presentes en un lote comercial de *S. lepidophylla* (Hook & Grev) Spring.



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

La planta completa de *S. lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring como materia prima vegetal utilizada en el presente estudio (**Fig. 16**) se adquirió en el mercado sonora en el año 2005, ésta fue identificada botánicamente por el Dr. R. Bye del Instituto de Biología de la UNAM. Para su limpieza, fue necesario eliminar el polvo contenido en la planta y posteriormente se fragmentó haciendo uso de un mortero con pistilo.



Figura 16. Plantas de *Selaginella lepidophylla* colectadas.

4.2 EQUIPO

Para las extracciones del material vegetal se utilizó un sonicador marca SONICOR modelo SC200TH y para la separación de los sobrenadantes de los extractos de la materia prima, una centrífuga marca LABNET modelo 2200 A.



La cuantificación de biflavonoides en la materia prima se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., Milford MA, USA) modelo 515, con 2 bombas marca Waters modelo 515 y 510 respectivamente, un inyector automatizado marca JASCO modelo AS-2055 plus, un controlador automático de gradiente marca WATERS modelo 680, un controlador de temperatura marca Waters, un detector UV/VIS marca Waters modelo 2487 con 2 canales y un equipo de cómputo que contiene el software Waters Millenium 32 (**Fig. 17**). La evaporación de disolventes se efectuó mediante el uso de un rotaevaporador marca Büchi B480 y otro R324. Las pesadas de reactivos y materia prima utilizaron balanzas analítica marca Ohaus y granataria marca Ohaus Scout-pro.



Figura 17. Equipo CLAR de trabajo.

4.3 INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

- Pipetas volumétricas y aforadas de 1, 2 y 5 mL marca KIMAX
- Mortero con pistilo de porcelana
- Tubos para centrifuga de plástico marca NEPTUNE de 15 mL
- Malla metálica con tamaño de poro de 2 mm



- Columna analítica kromasil 100 C₁₈ 3 µm, 150 x 4.6 mm
- Columna preparativa PHALANX C₁₈ 5 µm, 250 x 10 mm
- Prefiltros para HPLC (acrodiscos) marca Pall corporation 13 mm diámetro, tamaño de poro 0.45 µm
- Equipo milipore de vidrio con juntas esmeriladas de dos piezas, con membrana marca Pall Corporation, 47 mm de diámetro, tamaño de poro 0.45 µm.
- Viales de vidrio para HPLC tipo ampollita de capacidad para 500 µL.
- Pipetas Pasteur
- Jeringas de plástico tipo insulina

4.4 DISOLVENTES Y REACTIVOS

➤ *Disolventes*

- Acetona grado analítico
- Acetonitrilo grado analítico
- Agua grado analítico
- Metanol grado analítico

➤ *Reactivos*

- Ácido acético glacial 0.1%
- Solución de sulfato cérico amoniacal
- Solución de cloruro de cobalto

4.5 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

- Robustaflavona (**6d3**)
- (2S)-2,3-Dihidrorobustaflavona (**5e**)



4.6 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA POR CLAR.

Previo al desarrollo de la metodología para ejecutar el plan de trabajo en la validación de biflavonoides se realizaron ensayos preliminares. Para la elección del disolvente idóneo en la extracción de los componentes biflavonoides de *Selaginella lepidophylla* Spring, se realizó la siguiente metodología:

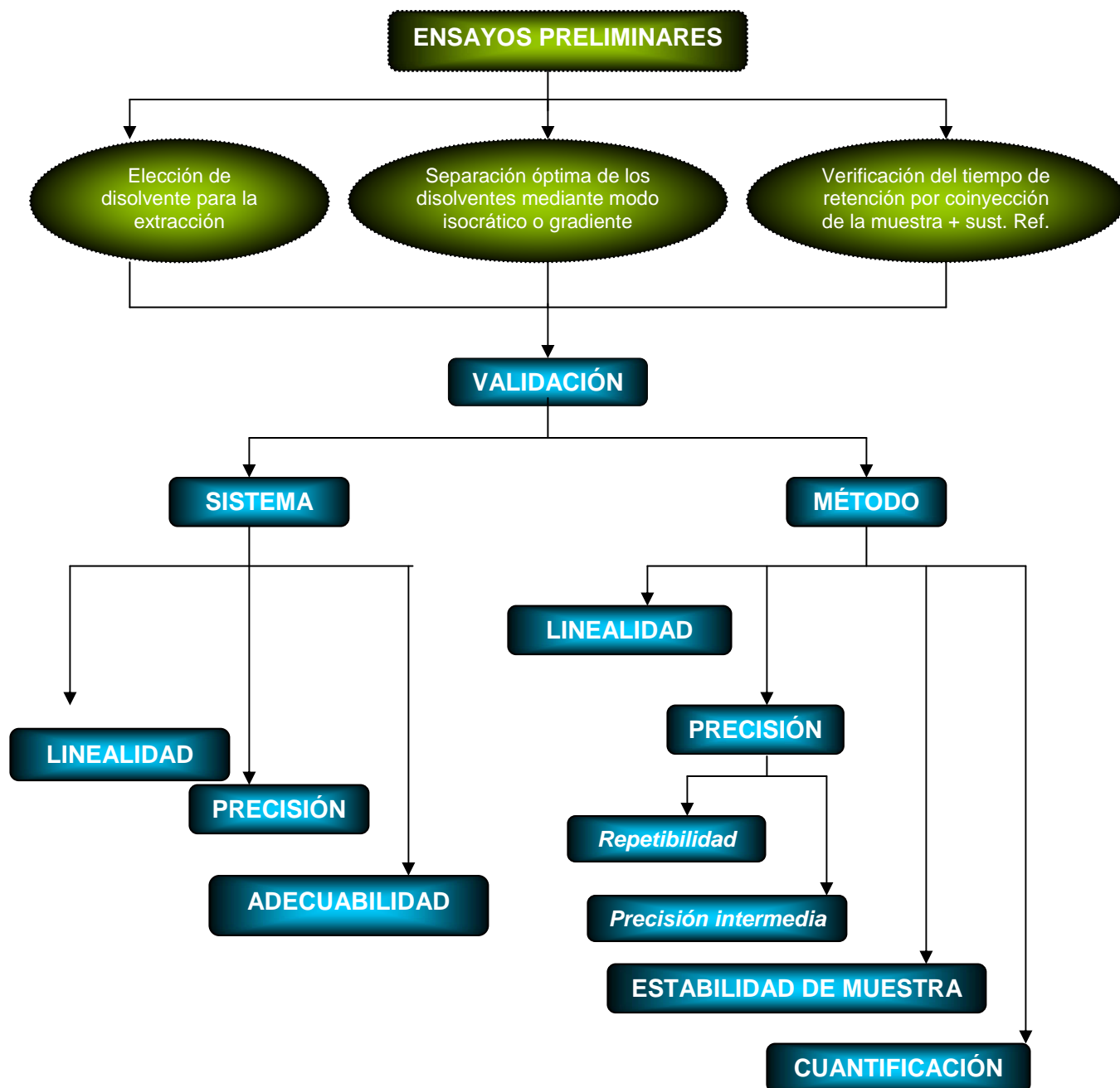
- Se pesaron 0.2 g de material vegetal en tres tubos de centrífuga y por separado.
- A cada tubo se añadieron respectivamente 2 mL de MeOH (100%), AcCN (100%) y AcCN:MeOH (50:50) y se sonicaron durante 15 min. a 3500 r.p.m., esta operación se repitió dos veces más.
- Se colectaron los sobrenadantes de manera independiente para cada disolvente en un matraz bola, se evaporaron y se aplicaron en dos cromatoplasas asperjadas en un caso con solución de sulfato cérico amoniacal y en otro con solución de cloruro de cobalto; posteriormente se observaron al U.V a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Para la separación óptima de los componentes contenidos en *S. lepidophylla*, se inyectaron al cromatógrafo de líquidos (CL) muestras tanto del extracto, del disolvente y de los compuestos que se utilizarían como referencia, así mismo se probaron dos diferentes modos de operación: isocrático y gradiente.

Por otro lado, con el objetivo de verificar el tiempo de retención para cada uno de los componentes dentro del extracto metanólico, una alícuota de 0.5 mL a una concentración de 300 µg/mL de cada uno de los compuestos de referencia: **6d3** y **5e** fueron coinyectados por separado, con la solución de trabajo (0.5 mL) al CL.



El volumen de inyección para cada determinación fue de 10 μL . El **Esquema 1** muestra el plan de trabajo para realizar la validación de la técnica analítica por CLAR.



Esquema 1. Diagrama propuesto para realizar la validación de la técnica analítica por CLAR para determinar la cantidad de biflavonoides presentes en la planta medicinal de *S. lepidophylla*.



4.7 DESARROLLO DE LA METODOLOGIA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS BIFLAVONOIDES POR CLAR.

4.7.1 Preparación de las soluciones estándar

Los compuestos seleccionados como referencias robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona fueron utilizados para la preparación de las soluciones estándar fueron obtenidos mediante la metodología empleada por **Guevara**.⁴ Su confirmación estructural se basó en la comparación de sus espectros en el UV, de RMN-¹H y de ¹³C, con los reportados en la literatura.^{53a} (**Espectros 1-6**)

A) robustaflavona (6d3)

Se preparó una solución *stock* de robustaflavona conteniendo 3 mg en 10 mL de metanol (300 µg/mL). Esta solución se almacenó en refrigeración hasta su uso.

B) (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona (5e)

Se preparó una solución *stock* de (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona conteniendo 3 mg en 10 mL de metanol (300 µg/mL). Esta solución se almacenó en refrigeración hasta su uso.

4.7.2 Preparación de la solución de trabajo (extracto metanólico de *S. lepidophylla*)

El procedimiento para la preparación de la solución de trabajo fue el siguiente: La planta completa (matriz) fue sometida al proceso de molienda, mediante el uso de un mortero de porcelana con pistilo, el pulverizado obtenido se tamizó en una malla de 2 mm. Se pesaron 200 mg de ese material en un tubo de centrífuga de 15 mL, se adicionaron 2 mL de MeOH grado HPLC y se sonicó



por 15 min.; transcurrido ese tiempo se centrifugó por 10 min. a 3500 r.p.m. La metodología se realizó por triplicado con un mismo material vegetal, colectándose aproximadamente 6 mL del extracto en un matraz volumétrico de 10 mL y llevándose al aforo con metanol grado HPLC.

Previo a su inyección en el cromatógrafo de líquidos, la muestra fue filtrada a través de prefiltros de 0.45 μm .

4.7.3 Purificación del compuesto (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.

El compuesto **5e** fue purificado por CLAR, y las condiciones cromatográficas inherentes al proceso de purificación se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la purificación de **5e**.

CONDICIONES DE TIPO PREPARATIVO	CONDICIONES DE TIPO ANALÍTICO
<ul style="list-style-type: none">• Columna preparativa PHALANX C₁₈ 5μm, 250 x 10 mm• Inyector manual marca Waters• Jeringa analítica Halston de distintas capacidades: 25, 100, 500 μL• Modo de elución: Gradiente• 0-10 min. (80%A: 20%B), 10-40 min. (60%A:40%B), 40-45 min. (80%A: 20%B)• A = acetonitrilo (grado analítico)• B = agua (grado analítico) + Ac. acético al 0.1%• $\lambda = 367 \text{ nm}$• Temp = 25°C \pm 5	<ul style="list-style-type: none">• Columna analítica kromasil 100 C₁₈ 3μm, 150 x 4.6 mm• Inyector automatizado JASCO• Modo de elución: Gradiente• 0-5 min. (80%A: 20%B), 5-19 min. (60%A: 40%B), 19-21 min. (80%A: 20%B)• A = acetonitrilo (grado analítico)• B = agua (grado analítico) + Ac. Acético al 0.1%• $\lambda = 367 \text{ nm}$• Temp = 25°C \pm 5



14.8 mg de (5e) se disolvieron en 2 mL de MeOH grado HPLC y se filtró en un vial con capacidad para 4 mL de muestra. 5 μ L de la solución anterior se inyectaron en el CL, colectándose el eluato correspondiente al pico mayoritario en el cromatograma en el intervalo de 20.8 min. \pm 10 seg.

Posteriormente se inyectaron también al CL 10, 20, 50, 100 y 200 μ L, verificando siempre, que la respuesta del pico de interés no fuera mayor que la escala del cromatograma. Las fracciones fueron colectadas por separado en viales de vidrio de 10 mL de capacidad, evaporadas en rotaevaporador, con ayuda de una bomba de alto vacío (por el contenido de 60% de H₂O y 40% AcCN grado HPLC). El residuo obtenido en cada una de las fracciones, fue disuelto en MeOH grado HPLC y transferido a viales de 4 mL de capacidad y su contenido químico verificado en el cromatógrafo de líquidos con las condiciones analíticas establecidas para el compuesto 5e, considerando siempre que el tiempo de retención para cada una de las fracciones fuera cercano al tiempo de retención esperado **Tabla 9**.

Las fracciones con tiempos de retención idénticos, fueron colectadas y evaporadas como se describió anteriormente y el residuo final obtenido se pesó para calcular el rendimiento del proceso de purificación.

Tabla 9. Fraccionamiento de la muestra (5e).

VIAL	Cant. (μ L)	t _R (min.)	VIAL	Cant. (μ L)	t _R (min.)	VIAL	Cant. (μ L)	t _R (min.)
F1-2	5	20.023	F8-1	100	20.099	F13 (1-2)	200	20.046
F3	10	20.038	F8-2	100	20.093	F14 (1-2)	200	19.932
F4	20	20.144	F9	100	20.129	F15	50	19.985
F5	50	20.165	F10	100	20.082			
F6	100	20.164	F11 (1-2)	200	20.095			
F7	100	20.099	F12 (1-2)	200	20.052			



4.7.4 Determinación de la concentración en las soluciones de los compuestos por cuantificar (robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona), que representen el 100% de respuesta cromatográfica con respecto a la solución de trabajo (punto 4.7.2).

A partir de las soluciones *stock* de cada uno de los compuestos de referencia **6d3** y **5e**, se realizaron una serie de diluciones como se muestra en la **Tabla 10**, obteniéndose las concentraciones de prueba de 60, 48, 24, 12, 6, 3 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ para **6d3** y 30, 24, 12, 6, 3, 2.4 y 1.5 $\mu\text{g/mL}$ para **5e**, cada una se inyectó en el cromatógrafo de líquidos verificando sus respuestas.

Tabla 10. Diluciones para obtener las concentraciones de prueba de **6d3** y **5e**.

COMPUESTO	DILUCIONES (mL)	CONCS. PRUEBA ($\mu\text{g/mL}$)
robustaflavona	1:5 (1x), 2:5 (1x) 1:2 (5x)	60, 48, 24, 12, 6, 3 y 1.5.
(2S)-2,3-dihidrorobustaflavona	1:2, 2:5, 1:2 (5x)	30, 24, 12, 6, 3, 2.4, y 1.5.

4.8 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EN LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

A continuación se presentarán los parámetros analíticos empleados para determinar la validación del sistema por CLAR, misma que se realizó con base en los criterios establecidos por las Guías de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB, 2002) y la Guía Internacional referente a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2 (R1) 2005).



4.8.1 Sensibilidad

Esta determinación se evaluó mediante la obtención de los parámetros: Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LQ) obtenidos en el cromatógrafo de líquidos de trabajo, con ello se lograron obtener los valores correspondientes para cada parámetro y a las condiciones que resultaron ser las más adecuadas para el ensayo.

4.8.2 Linealidad del sistema

A partir de una solución *stock* de referencia de concentración de 300 µg/mL para cada compuesto por separado, se realizaron diluciones pertinentes para obtener distintas concentraciones para cada uno, utilizando matraces volumétricos de 10, 5 y 2 mL de capacidad, para obtener los intervalos de concentraciones que se muestran en la **Tabla 11**:

Tabla 11. Concentraciones de los compuestos **6d3** y **5e** para evaluar la linealidad del sistema.

COMPUESTOS REF.	INTERVALO DE CONCENTRACIÓN (µg/mL)					
robustaflavona	12	6	4.8	3*	1.5	0.75
(2S)-2,3-dihidrorobustaflavona	6	4.8	3.6	2.4*	1.2	0.6

*Concentración representativa del 100% de cada compuesto en el extracto.

Se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos, mediante un análisis de regresión simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R^2 \geq 0.98$ así como el intervalo de confianza para la pendiente $[IC(\beta_1)]$ a partir del ABC para cada compuesto. Los límites establecidos son un C.V $\leq 2\%$, el $IC(\beta_1)$ no debe incluir el cero y un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.98$.



4.8.3 Límite de Detección y Cuantificación

Se obtuvieron con base en una curva de calibración, preparada a partir de seis concentraciones por triplicado por dilución de la solución *stock* de referencia. Los intervalos de concentración para cada compuesto de referencia se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Intervalos de concentración para evaluar LD y LQ para **6d3** y **5e**.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	
robustaflavona	(2S)-2,3-dihidrorobustaflavona
12	6
6	4.8
4.8	3.6
3	2.4
1.5	1.2
0.75	0.6

Se calculó el valor de las pendientes (b_1), la ordenada al origen (b_0), para posteriormente obtener los límites (LD y LQ) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3.3 \frac{desv.std(b_0)}{pendiente(b_1)} \qquad LQ = 10 \frac{desv.std(b_0)}{pendiente(b_1)}$$

Se obtuvo también el coeficiente de determinación R^2 el cual debe ser ≥ 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente $[IC(\beta_1)]$, el cual no debe incluir al cero.



4.8.4 Precisión del sistema

Se preparó por sextuplicado soluciones para cada compuesto de referencia a las concentraciones de **2.4 ($\mu\text{g/mL}$)** para robustaflavona y de **1.92 ($\mu\text{g/mL}$)** para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona, a partir de las correspondientes soluciones *stock*. El límite establecido para esta determinación es un C.V \leq 2%.

4.8.5 Adecuabilidad del sistema

Se inyectó por quintuplicado una solución al 80% de la concentración considerada como el 100% en la linealidad del sistema para ambos compuestos (**6d3** y **5e**). Se determinó el C.V cuyo límite establecido es \leq 2% y por otra parte, en la **Tabla 13** se muestran algunos parámetros y límites que deben ser tomados en cuenta en este apartado.

Tabla 13. Parámetros de desempeño para evaluar la adecuabilidad del sistema.

PARÁMETRO	LÍMITE
Tiempo de retención (min.)	–
Tiempo muerto (min.)	–
Factor de capacidad (K')	>2
Factor de coleo (T)	<2
Número de platos teóricos (N)	>2000
Repetibilidad de inyección	$n \geq 5$; C.V ≤ 2

4.9 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR

Una vez realizada la validación del sistema, se procedió a validar el método. A continuación se presentarán los parámetros analíticos que se evaluaron.



4.9.1 Linealidad y Exactitud del Método

Se llevó a cabo mediante la cuantificación del recobro en 3 muestras independientes y por triplicado de la solución de trabajo, añadiéndoles uno de tres niveles de concentración al 50, 100 y 150 % respectivamente, preparados a partir de las soluciones *stock* de concentración conocida, de las sustancias de referencia de interés (**6d3** y **5e**).

Se construyó una curva de calibración graficando las áreas obtenidas (mV/seg) vs concentración ($\mu\text{g/mL}$); para la linealidad del método se calculó la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación R^2 , el intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$], el intervalo de confianza para la ordenada al origen [$IC(\beta_0)$] y el coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$).

Los criterios de aceptación son los siguientes: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R^2 \geq 0.98$, $IC(\beta_1)$ incluye la unidad, $IC(\beta_0)$ debe incluir el cero y el $CV_{y/x} \leq 2\%$.

La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desv. estd (S), coeficiente de variación (C.V) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro el cual debe ser 98-102%.

Los datos para esta determinación se muestran en la **Tabla 14**.



Tabla 14. Concentraciones de trabajo para las sustancias de referencia en estudio en la determinación de la exactitud del método.

COMPUESTO	CONC. ($\mu\text{g/mL}$)	NIVEL DE CONC. (%)
Robustaflavona	4.5	150
	3.0	100
	1.5	50
(2S)-2,3-Dihidrorobustaflavona	3.6	150
	2.4	100
	1.2	50

4.9.2 Precisión del Método

Este apartado se divide en dos determinaciones: ***Repetibilidad y Precisión intermedia.***

4.9.2a Repetibilidad

Esta determinación se realizó con un lote de *S. lepidophylla*, mediante el recobro de muestras independientes a tres diferentes niveles de concentración (50, 100 y 150 %) de la solución *stock* de cada sustancia de referencia (**6d3** y **5e**) añadidas al material vegetal tal como se describió en “linealidad del método”, ensayándose por triplicado para construir una curva de calibración.

Se determinaron los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desv. estd (S), coeficiente de variación (C.V) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro. Los criterios de aceptación son: un C.V para cada nivel de concentración $\leq 2\%$ y un recobro entre 98 y 102 %.



Las concentraciones de trabajo para cada una de las sustancias de referencia en estudio para los tres niveles de concentración, son las mostradas en la **Tabla 14**.

4.9.2b Precisión intermedia

Esta prueba se realizó analizando por triplicado una muestra homogénea de *S. lepidophylla* obtenida conforme el procedimiento para la preparación de la solución de trabajo (con un nivel cercano al 100%) en DOS DIAS distintos y por DOS ANALISTAS diferentes. Para esta determinación se obtuvo el ABC, promedio aritmético (\bar{y}), desv. estd (S) y se calculó el C.V cuyo límite es $\leq 2\%$.

4.10 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

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

- ✓ **Temperatura ambiente con luz**
- ✓ **Temperatura ambiente sin luz**
- ✓ **4°C con luz**
- ✓ **4°C sin luz**
- ✓ **37°C sin luz**

La estabilidad de las muestras, se analizó mediante la repuesta analítica en el cromatógrafo de líquidos, por triplicado para cada una, a diferentes tiempos: **t= 0, 24, 72 h y 8 d**.



Se calculó la media aritmética del análisis inicial (\bar{y}_0) y de cada condición de almacenaje (\bar{y}_i), así como la diferencia absoluta ($|di|$) de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial.

Los límites para este ensayo son: un C.V $\leq 2\%$ y $|di| \leq 2\%$.

4.11 CUANTIFICACIÓN DE ROBUSTAFLAVONA Y DE (2S)-2,3-DIHIDROROBUSTAFLAVONA EN LA PLANTA MEDICINAL S. *LEPIDOPHYLLA*

Para realizar la cuantificación de los compuestos marcadores de la planta, fue necesario pesar **200 mg** de material vegetal, independientemente y por triplicado; con este material se utilizó la metodología previamente establecida para “**preparación de la solución de trabajo**” y las soluciones resultantes se inyectaron cada una al CL (10 μ L).

Se obtuvo el **ABC** para cada muestra y se interpoló en la curva de calibración diseñada a partir de los datos de linealidad del método.

Finalmente se calcularon los mg de biflavonoide por g de planta, para cada compuesto en particular mediante la interpolación en las ecuaciones de las rectas, obtenidas de las curvas de calibración previamente diseñadas.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS BIFLAVONOIDES MEDIANTE CLAR.

La validación de métodos es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de garantía de calidad en la química analítica. Así mismo, emplea un conjunto de pruebas que comprueban todas las hipótesis en las que se basa el método analítico, y establecen y documentan las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular. Las características de rendimiento de los métodos analíticos son: la calibración, el intervalo de concentraciones, los límite de cuantificación y detección, la precisión, los parámetros de desempeño (adecuabilidad del sistema) así como la recuperación (% de recobro) y cuantificación.

Los siguientes, son los resultados del trabajo del desarrollo de una metodología para cuantificar los biflavonoides contenidos en la planta medicinal *Selaginella lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring y la validación de la misma.

5.2 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA ÓPTIMA SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO DE *S. lepidophylla* POR CLAR

En este primer apartado, fue necesario hacer ensayos previos para determinar en primera instancia, el disolvente idóneo para realizar la extracción del material vegetal, para ello tal y como se describe en la “metodología”, se evaluaron tres matrices vegetales independientes, añadiéndoles diferentes composiciones de disolvente: MeOH, AcCN y AcCN:MeOH (1:1) en una proporción de 2 mL de cada uno.



La placa cromatográfica revelada, demostró cualitativamente, a una longitud de onda de 365 nm, que el disolvente idóneo para realizar la extracción del material vegetal era MeOH al 100%, ya que la cromatoplaqa de este extracto mostraba bandas más intensas correspondientes a los flavonoides ($R.f = 0.7$) en comparación con las otras dos mezclas de disolvente ensayadas.

Además, de acuerdo a la literatura,²³ la extracción de la mayoría de los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilo libres o azúcares, se puede realizar con MeOH al 85% en agua. En la **Figura 18** se muestra la cromatoplaqa obtenida.

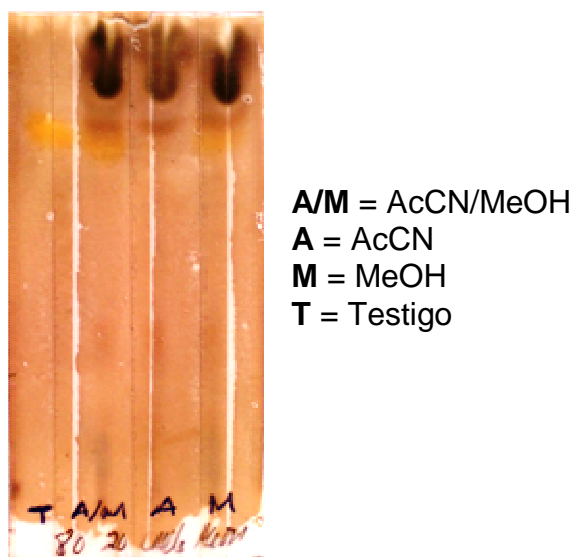


Figura 18. Cromatoplaqa de extractos obtenidos de la matriz vegetal con distintos disolventes. Sistema de elución: CHCl_3 :MeOH (80:20).

En segunda instancia, para lograr la óptima separación de los metabolitos contenidos en la planta en estudio, fue establecer las condiciones cromatográficas, tanto en modo isocrático, así como en gradiente. Se ensayaron sistemas de elución que iban desde 80:20 H_2O :AcCN – 20:80 H_2O :AcCN en ambos modos de operación, basándose en literatura consultada referente al estudio de flavonoides.^{23,54-57}



Además, se encontró que la eficiencia de la fase móvil era dependiente del pH, pues fue necesaria la adición de ácido acético al 1% para mejorar el proceso de separación (resolución) y forma de picos.

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el modo gradiente, ya que los cromatogramas obtenidos en modo isocrático mostraban deformidad en la simetría de los picos y esta situación interfería con una buena resolución de los mismos. La fase móvil de elección estuvo constituida por 60% de agua con ácido acético al 1% y 40 % de acetonitrilo, y un gradiente programado como se muestra en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Condiciones establecidas para la óptima separación de los componentes de *S. lepidophylla*.

CONDICIONES DE TIPO ANALÍTICO
<ul style="list-style-type: none">• Columna analítica kromasil 100 C18 3μm, 150 x 4.6 mm• Inyector automatizado JASCO• Modo de elución: Gradiente <p>0-5 min. (80%A: 20%B), 5-19 min. (60%A: 40%B), 19-21 min. (80%A: 20%B)</p> <ul style="list-style-type: none">• A = agua + ácido acético al 0.1% (grado reactivo analítico)• B = acetonitrilo (grado reactivo analítico)• $\lambda = 367$ nm• T = 25°C \pm 5

Con estas condiciones, se logró separar los metabolitos secundarios, observándose tres picos mayoritarios con los siguientes tiempos de retención **$t_{R1} = 17.07$ min., $t_{R2} = 18.82$ min., $t_{R3} = 20.58$ min.**, los cuales se muestran en la **Figura 19**.

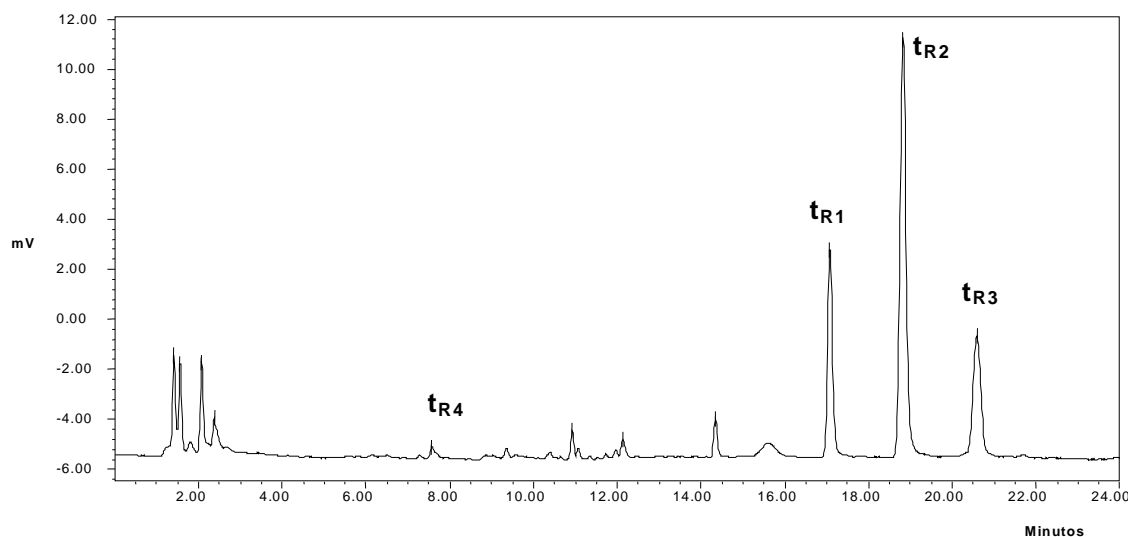


Figura 19. Cromatograma del extracto metanólico de *S. lepidophylla*.

En el trabajo de Guevara,⁴ se identificó un tercer biflavonoide (**6b2c**), el cual fue minoritario en el extracto metanólico y dada esta circunstancia, no fue posible su cuantificación en el extracto.

Cabe mencionar, que en el cromatograma de líquidos del extracto metanólico, se aprecia un pico mayoritario con un $t_{R2} = 18.82 \text{ min.}$, que se logró separar en muy pequeña cantidad con las condiciones establecidas para los otros dos compuestos, el cual se encuentra en vías de identificación estructural.

Por otra parte, se seleccionaron como compuestos de referencia a dos biflavonoides mayoritarios (**6d3** y **5e**) aislados previamente del extracto de acetato de etilo de *S. lepidophylla*,⁴ por cromatografía en columna abierta de Sephadex, cuya pureza se evaluó, mediante el análisis por cromatografía en capa fina, detectando mediante luz U.V a las longitudes de onda larga y corta (365 y 254 nm) algún tipo de impureza y posteriormente por cromatografía de líquidos. Adicionalmente, se realizó la co-inyección de ambos compuestos en el extracto metanólico y el resultado observado fue un incremento en la intensidad de la respuesta cromatográfica al tiempo de retención esperado



para cada uno de los compuestos siendo estos de **17.07 y 20.58 min.** respectivamente para **6d3** y **5e** (**Fig. 20**).

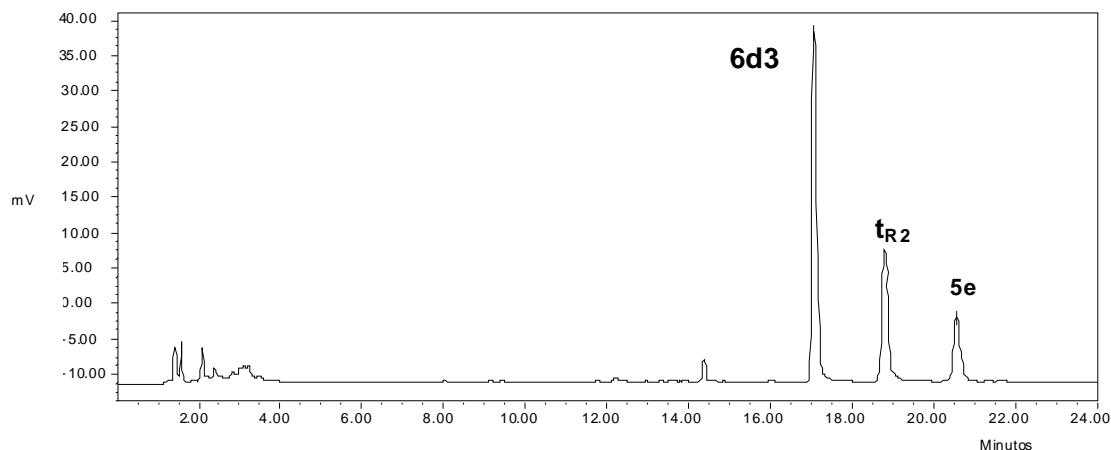


Figura 20. Efecto de la co-inyección de la sustancia de referencia **6d3** en el CLAR.

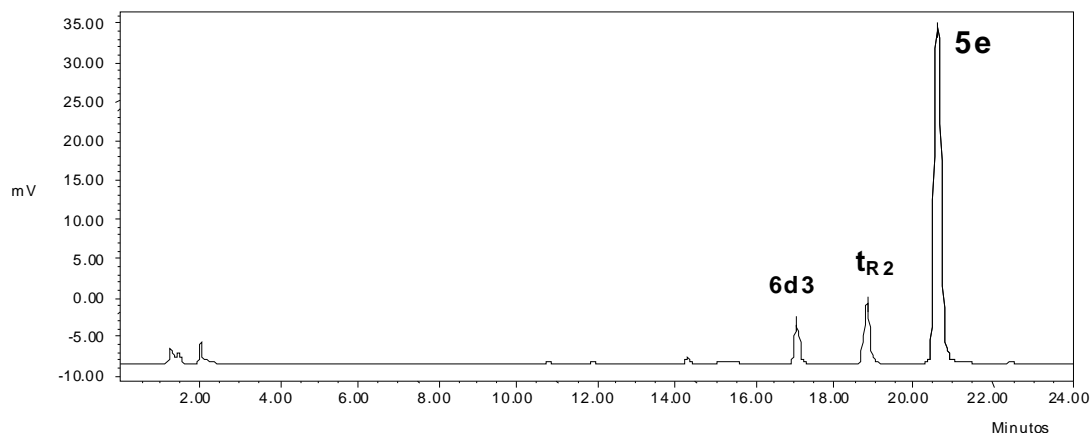


Figura 21. Efecto de la co-inyección de la sustancia de referencia **5e** en el CLAR.

En la **Figura 22** se muestran las estructuras de los compuestos **6d3**, **5e** y **6b2c**. Los dos primeros mencionados, se lograron separar e identificar mediante CL y métodos espectroscópicos, en las condiciones establecidas y mencionadas anteriormente.

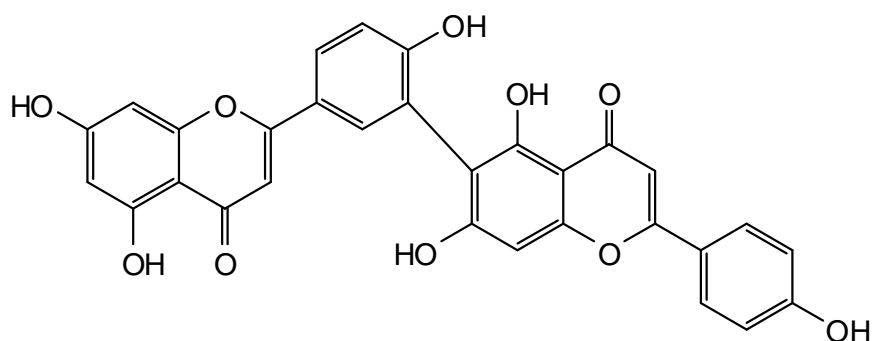
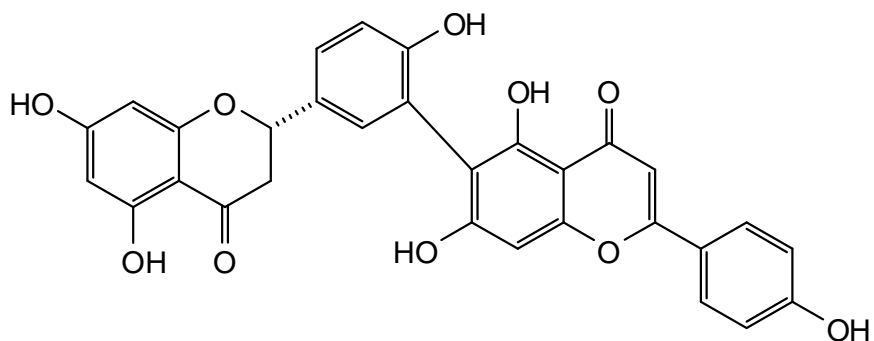
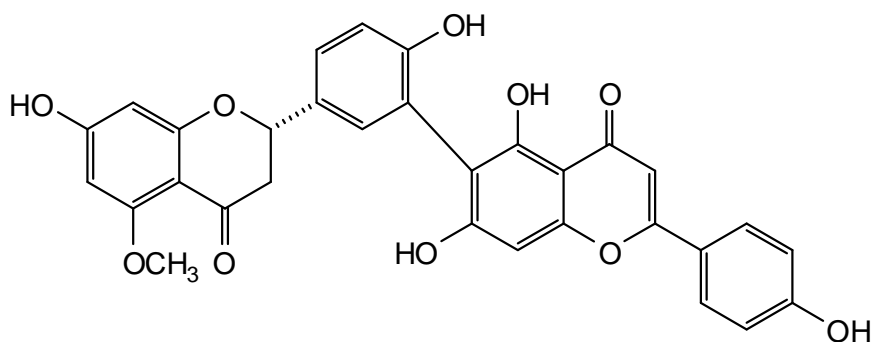
Robustaflavona (**6d3**)(2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (**5e**)5-metoxi-(2S)-2,3-dihidro-robustaflavona (**6b2c**)

Figura 22. Estructuras de los compuestos **6d3**, **5e** y **6b2c** aislados de *S. lepidophylla* ⁴.



Como primer criterio para poder realizar el desarrollo y la validación del método fueron requisitos indispensables: 1) la utilización de sustancias de referencia, ya que éstas constituyen componentes necesarios en el método y una herramienta en la evaluación de los parámetros de desempeño, lo que permite establecer la confiabilidad de la metodología y 2) la verificación de su pureza para lo cual las sustancias de referencia deben cumplir con los siguientes criterios:⁴²

- Poseer un grado de pureza adecuado para el empleo al que se reserva.
- No deben degradarse durante su uso (no ser higroscópicas).
- Deben ser químicamente estables.
- Almacenarse, manejarse y utilizarse de acuerdo a las especificaciones correspondientes.

Bajo estas premisas, fue necesario verificar la pureza de las sustancias de referencia, la cual se describe en el siguiente apartado.

5.3 PUREZA CROMATOGRÁFICA DE LOS COMPUESTOS ROBUSTAFLAVONA (6d3) Y (2S)-2,3-DIHIDROROBUSTAFLAVONA (5e)

Los resultados de la purificación de los compuestos **6d3** y **5e**, se muestran en las **Figuras 22 y 23** respectivamente, en los cuales se demuestra mediante un análisis cromatográfico por CLAR, que para el caso del biflavonoide robustaflavona (**6d3**), el perfil cromatográfico obtenido fue impecable, con una pureza de pico del 100% (dato obtenido a partir del software **Millenium 32**), cumpliendo satisfactoriamente con el grado de pureza de 100 % ± 2%, recomendada por la **COSUFAR**⁶⁷ que establece las generalidades que debe cumplir una sustancia de referencia, ya que es el organismo encargado de la fabricación de estándares de referencia dependiente del gobierno federal y promovido por las 4 principales asociaciones profesionales de la rama farmacéutica: **AFM**,⁶⁸ **CNQFB**,⁴² **PQF**,⁶⁹ **SQM**,⁷⁰ y patrocinado por **CANIFARMA**.⁷¹

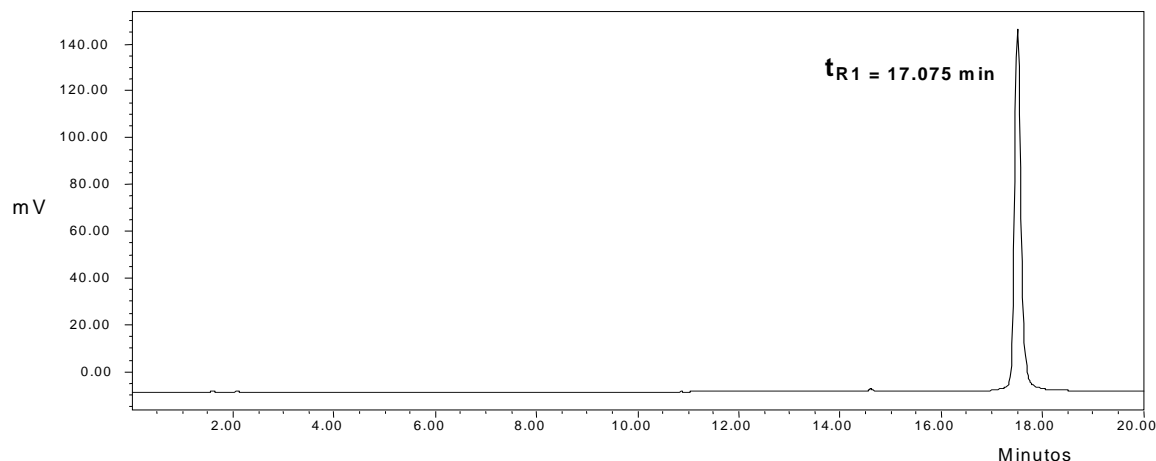


Figura 23. Cromatograma obtenido para evaluar pureza del compuesto **6d3** por CLAR.

Contrario al caso anterior, para la (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona (**5e**) fue necesaria una purificación adicional, pues este compuesto presentó dos picos adyacentes a menor y mayor tiempo de retención con respecto al pico mayoritario de interés que reducían su pureza de pico hasta un 85% (dato obtenido a partir del software *Millenium 32*), lo cual no cumplía con los estándares de calidad para una sustancia de referencia; la purificación de este compuesto se realizó mediante la inyección de alícuotas de la solución de (**5e**) en forma ascendente de volumen (10, 20, 50, 100 y 200 μ L) con la finalidad de evitar emplear un volumen en que se pudiera cuadrar el pico.

El resultado final para la purificación de (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona mediante CLAR se reporta en la **Tabla 16** y los cromatogramas tanto del compuesto de partida como del purificado en la **Figura 23**.

Tabla 16. Rendimiento obtenido en la purificación del compuesto **5e**.

Cantidad inicial	Cantidad purificada	RENDIMIENTO
14.8 mg	9.1 mg	65%

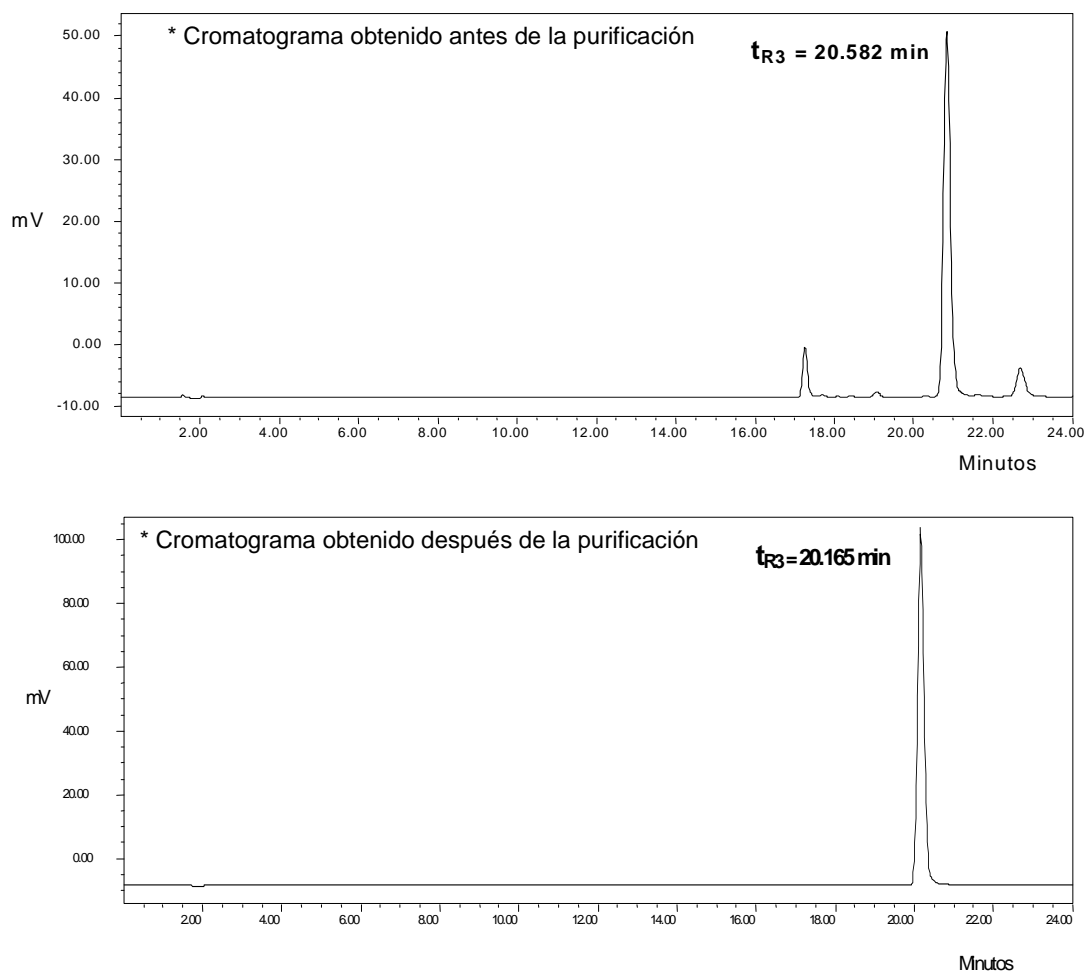


Figura 24. Cromatogramas de líquidos del compuesto **5e** antes y después de su purificación.

De acuerdo a los resultados anteriores, se hace mención que del total de muestra inicial inyectada, se logró recuperar más del 50%; con esto se hace evidente que la técnica por cromatografía de líquidos, es adecuada para la purificación de compuestos con cierto grado de impureza y que aún con cantidades muy pequeñas (mg de compuesto), el rendimiento obtenido es satisfactorio. El cromatograma obtenido después de la purificación demuestra el grado de pureza obtenido mediante CLAR, ya que los picos adyacentes no aparecen en el perfil cromatográfico. El resto de los cromatogramas de las fracciones obtenidas se pueden ver en el **Anexo A-6**.



5.4 OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL COMPUESTO POR CUANTIFICAR QUE REPRESENTA EL 100% DE RESPUESTA CROMATOGRÁFICA CON RESPECTO A LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

Se probó la respuesta en el CL de diferentes diluciones de la solución stock de los compuestos **6d3** y **5e** con la finalidad de encontrar la concentración a la cual la respuesta de cada uno, es similar a las respuestas encontradas en el extracto metanólico, extrapolarlo cualitativamente los valores de respuesta de los picos mayoritarios y con esto, determinar la concentración de los mismos al 100%. Para robustaflavona la concentración al 100% fue de **3µg/mL** y de **2.4 µg/mL** para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.

5.5 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA

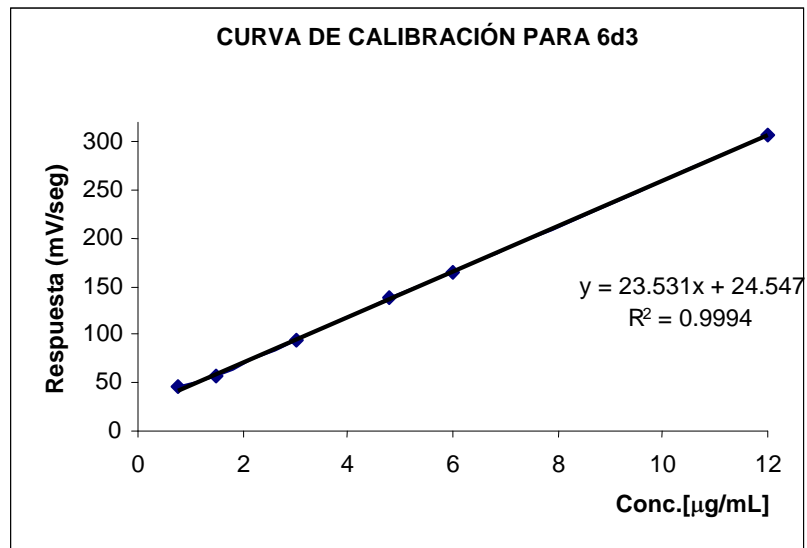
5.5.1 Linealidad del Sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona

La linealidad de un método, es la relación entre la respuesta del instrumento y las concentraciones conocidas de un determinado analito.⁵⁸ La curva de calibración para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona se construyó midiendo las áreas versus las concentraciones de analito. Se realizó el análisis de regresión lineal para determinar la linealidad del sistema y generar la ecuación de la curva de calibración: $y = b_1x + b_0$, donde y es el área (mV/seg), x la concentración (µg/mL), b_1 la pendiente y b_0 el intercepto, así como el cálculo de los parámetros estadísticos con los siguientes criterios: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R^2 \geq 0.98$ además del cálculo del intervalo de confianza para la pendiente (IC(β_1)). El análisis estadístico y procesamiento de datos para realizar los cálculos fue realizado utilizando el programa **Microsoft office Excel 2003**. Los resultados obtenidos son los que se muestran a continuación:



Tabla 17. Áreas obtenidas, C.V, factor de respuesta para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema de **6d3**.

Nivel %	Ref 6d3 [$\mu\text{g/mL}$]	ABC (mV/seg)	F_{resp}	prom	desv std	C.V
400	12	307.489	0.0390	309.202	2.117	0.68
400	12	308.548	0.0389			
400	12	311.570	0.0385			
200	6	164.307	0.0365	166.493	2.930	1.76
200	6	165.349	0.0363			
200	6	169.823	0.0353			
150	4.5	138.847	0.0346	138.827	0.664	0.48
150	4.5	139.481	0.0344			
150	4.5	138.153	0.0347			
100	3	94.209	0.0318	93.983	0.614	0.65
100	3	93.288	0.0322			
100	3	94.452	0.0318			
50	1.5	56.769	0.0264	56.047	0.738	1.32
50	1.5	55.294	0.0271			
50	1.5	56.080	0.0267			
25	0.75	45.706	0.0164	45.706	0.317	0.69
25	0.75	46.023	0.0163			
25	0.75	45.839	0.0164			

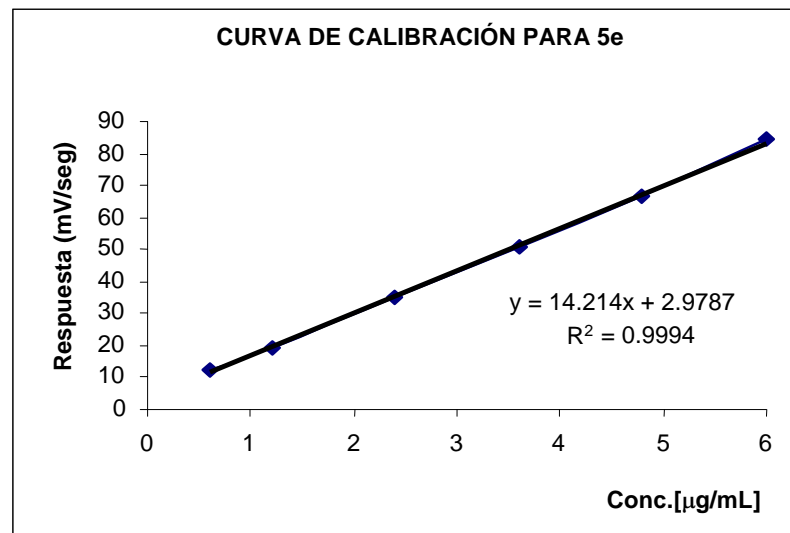


Gráfica 1. Curva experimental para determinar la linealidad del sistema para **6d3**.



Tabla 18. Áreas obtenidas, C.V, factor de respuesta para cada punto de las tres curvas para la linealidad del sistema de **5e**.

Nivel %	Ref 5e[$\mu\text{g/mL}$]	ABC (mV/seg)	F_{resp}	prom	desv std	C.V
250	6	84.359	0.0711	84.534	0.177	0.21
250	6	84.713	0.0708			
250	6	84.530	0.0710			
200	4.8	66.777	0.0719	67.174	0.438	0.65
200	4.8	67.102	0.0715			
200	4.8	67.643	0.0710			
150	3.6	50.799	0.0709	50.684	0.610	1.20
150	3.6	51.228	0.0703			
150	3.6	50.024	0.0720			
100	2.4	34.839	0.0689	34.997	0.315	0.89
100	2.4	34.792	0.0690			
100	2.4	35.359	0.0679			
50	1.2	19.433	0.0618	19.327	0.223	1.16
50	1.2	19.070	0.0629			
50	1.2	19.477	0.0616			
25	0.6	12.095	0.0496	12.154	0.063	0.52
25	0.6	12.220	0.0491			
25	0.6	12.147	0.0494			



Gráfica 2. Curva experimental para determinar la linealidad del sistema para **5e**



De acuerdo a los resultados anteriores, las **Tablas 17 y 18** que corresponden a las sustancias de referencia en estudio (**6d3 y 5e**), demuestran que los datos obtenidos son confiables, ya que se obtuvieron factores de respuesta similares para cada concentración siendo un indicativo de que el equipo utilizado (CLAR) se encuentra calibrado y un C.V para cada nivel de concentración menor al 2%.

Adicionalmente, se puede observar que las curvas de linealidad del sistema, para los dos compuestos cumplen con los parámetros establecidos en la Guía de validación de métodos analíticos de Químicos Farmacéuticos Biólogos (2002) e ICH Q2 (R1)(2005), ya que en ambos casos, el análisis de la regresión lineal simple para $n=18$ y un grado de confianza de $\alpha = 0.05 \%$, y ambas con $t_{0.975,16} = 2.120$ cumplen con los siguientes criterios estadísticos: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R^2 \geq 0.98$ y el intervalo de confianza para la pendiente $[IC(\beta_1)]$ no incluye el cero. Con lo anterior se concluye que el modelo estadístico establecido mediante el análisis de regresión lineal es adecuado.

Finalmente, con esto se comprueba que el intervalo de concentraciones elegido para evaluar el sistema, tiene el nivel adecuado de exactitud y linealidad. Los resultados se resumen en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Resumen del análisis de regresión lineal simple de linealidad del sistema para los compuestos **6d3 y 5e**.

	Estadístico	Resultado		Estadístico	Resultado
6d3	b₁	23.747	5e	b₁	13.382
	b₀	24.024		b₀	3.324
	R²	0.9992		R²	0.9992
	IC(β₁)	23.838-23.655		IC(β₁)	13.431-13.333



5.5.2 Límite de Detección y Cuantificación para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona

El límite de detección (LD), es la cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. El límite de cuantificación (LQ) es la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable.

Esta última determinación es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para descartar la presencia de impurezas y productos de degradación.

Tanto el LD como el LQ se expresan como concentración del analito.⁵⁸⁻⁵⁹ Los valores de límite de detección y cuantificación se obtuvieron mediante las mismas curvas de calibración empleadas en la determinación de la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos para estas determinaciones se muestran en las **Tablas 20 y 21**.

Tabla 20. Valores de pendiente y ordenada al origen para cada curva en **6d3**, así como el LD y LQ obtenidos experimentalmente.

Intercepto (b)		Pendiente (m)			
b_{01}	24.547	b_{11}	23.531	LD	0.064 $\mu\text{g/mL}$
b_{02}	23.864	b_{12}	23.701	LQ	0.195 $\mu\text{g/mL}$
b_{03}	23.662	b_{13}	24.010		
desv estd	0.463	prom	23.747		
		desv estd	0.242		
		C.V	1.02		



Tabla 21. Valores de pendiente y ordenada al origen para cada curva en **5e**, así como el LD y LQ obtenidos experimentalmente.

Intercepto (b)		Pendiente (m)			
b_{01}	3.3817	b_{11}	13.334	LD	0.025 $\mu\text{g/mL}$
b_{02}	3.2069	b_{12}	13.435	LQ	0.076 $\mu\text{g/mL}$
b_{03}	3.3860	b_{13}	13.380		
desv estd	0.102	prom	13.383		
		desv estd	0.051		
		C.V	0.38		

De acuerdo a los resultados presentados, se puede observar que para ambos compuestos (**6d3** y **5e**), el valor de C.V es menor al 2%, con lo que cumple consistentemente con el límite establecido.

Los resultados de los parámetros estadísticos para este apartado, son los mismos que los empleados en linealidad del sistema, por lo tanto el modelo estadístico establecido es adecuado, ver **Tabla 19**.

5.5.3 Precisión del sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona

Este parámetro, que expresa el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas,⁶⁰ se estableció mediante una solución de la sustancia de referencia correspondiente a la concentración de **2.4 $\mu\text{g/mL}$** para **6d3** y **1.92 $\mu\text{g/mL}$** para **5e**.

Para esta determinación, los límites establecidos por la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos biólogos⁴² y por la Guía internacional ICH Q2 (R1),⁶⁰ son: un número de muestras $n \geq 6$ y un C.V $\leq 2\%$.



Los resultados para este apartado son los que se muestran en las **Tablas 22 y 23**.

Tabla 22. Resultados obtenidos para precisión del sistema para **6d3** con las seis muestras analizadas.

Ref 6d3 [$\mu\text{g/mL}$]	ABC (mV/seg)	F _{resp}
2.4	72.178	0.0333
2.4	72.737	0.0330
2.4	73.280	0.0328
2.4	72.015	0.0333
2.4	72.215	0.0332
2.4	72.812	0.0330
prom	72.539	
desv estd	0.484	
C.V	0.67	

Tabla 23. Resultados obtenidos para precisión del sistema para **5e** con las seis muestras analizadas.

Ref 5e [$\mu\text{g/mL}$]	ABC (mV/seg)	F _{resp}
1.92	20.952	0.0916
1.92	20.993	0.0915
1.92	20.991	0.0915
1.92	20.938	0.0917
1.92	20.755	0.0925
1.92	20.999	0.0914
prom	20.938	
desv estd	0.092	
C.V	0.44	

Los resultados, demuestran que cumplen consistentemente con el criterio establecido según las Guías mencionadas.

Para ambos compuestos el C.V es menor al 2% y el factor de respuesta es constante en las seis mediciones para cada compuesto.



5.5.4 Adecuabilidad del sistema para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona

Como una parte integral de muchos procedimientos analíticos, este ensayo, está basado en el concepto de que el equipo, electrónicos, operaciones analíticas, y muestras por ser analizadas constituyen un sistema que puede ser evaluado como tal. Los parámetros de adecuabilidad del sistema a considerar dentro de un procedimiento en particular, dependen del tipo de procedimiento analítico que se evalúa.

Se calcularon todos los parámetros requeridos en este apartado, los cuales se observan en las **Tablas 24** y **25**, que fueron calculados con base en los cromatogramas obtenidos (considerando tiempos de retención). Las concentraciones de la soluciones de adecuabilidad fueron las mismas que para precisión del sistema (**Ver punto 5.5.3**).

La evaluación de la adecuabilidad del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición, funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales.⁴²

Tabla 24. Parámetros de desempeño para **6d3**

PARÁMETRO	VALOR OBTENIDO	LÍMITE
Tiempo de retención (min.)	17.2	–
Tiempo muerto (min.)	2.1	–
Factor de capacidad (K')	7.1	>2
Factor de coeio (T)	1.4	<2
Número de platos teóricos (N)	28011.7	>2000
Repetibilidad de inyección	n≥5; C.V=0.72	n≥5; C.V ≤ 2



Tabla 25. Parámetros de desempeño para 5e.

PARÁMETRO	VALOR OBTENIDO	LÍMITE
Tiempo de retención (min.)	20.8	–
Tiempo muerto (min.)	2.1	–
Factor de capacidad (K')	8.8	>2
Factor de coleo (T)	1.5	<2
Número de platos teóricos (N)	16340.05	>2000
Repetibilidad de inyección	$n \geq 5$; C.V = 0.44	$n \geq 5$; C.V ≤ 2

Los parámetros de desempeño evaluados:

El **tiempo de retención (min.)**, que es aquel en que el soluto permanece en la columna, el cual se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo de absorción del pico y es característico del soluto para condiciones de operación constante, así como auxiliar en la identificación del o los solutos.

El **tiempo muerto (min.)**, que es aquel requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria o cualquier soluto que permanece en fase móvil, asimismo representa el espacio vacío de la columna.

El **factor de capacidad (K')** que se define como la razón de la cantidad de soluto en fase estacionaria entre la cantidad en fase móvil al equilibrio y es igual a la relación del tiempo en que el soluto permanece en fase estacionaria respecto al tiempo en fase móvil.

El **factor de coleo (T)**, que es una medida de la simetría del pico y es la unidad para los picos perfectamente simétricos, su valor aumenta a medida que la simetría es más pronunciada.



El **número de platos teóricos (N)**, en el cuál cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases, asimismo el número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna, por lo que una buena columna tiene un número alto de platos teóricos y finalmente la **repetibilidad de inyección** que se usa para determinar si se reúnen los requisitos de precisión, cumplen con los límites especificados (**Ver Tablas 25 y 26**) en la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos⁴² y la Guía internacional ICH Q2 (R1),⁶⁰ por lo que se demuestra consistentemente que el sistema es adecuado para la validación del método.

5.6 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

5.6.1 Linealidad y Exactitud del método para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona

La **linealidad** de un método analítico es la capacidad de asegurar que los resultados analíticos (cantidad recuperada) pueden ser obtenidos directa o indirectamente por transformaciones matemáticas lineales; y son proporcionales a la concentración del analito de interés dentro de un intervalo determinado.⁶⁰

Para esta prueba se construyeron curvas de calibración para ambos biflavonoides con niveles de concentración al 50, 100 y 150%.

El análisis estadístico se realizó con base en los criterios establecidos en la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos biólogos,⁴² y la Guía internacional ICH Q2 (R1),⁶⁰ utilizando el programa **Microsoft Excel Office 2003** para realizar los cálculos. Los resultados obtenidos mediante experimentación se muestran en las **Tablas 26 y 27**.



Tabla 26. Resultados experimentales para establecer la linealidad del método para **6d3**.

Nivel %	Conc. [$\mu\text{g/mL}$]			prom	desv estd	C.V	
	6d3	ABC ₁	ABC ₂				ABC ₃
150	4.5	44.815	44.878	44.92	44.8710	0.0528	0.1178
100	3	37.576	37.512	37.547	37.5450	0.0320	0.0854
50	1.5	31.933	31.839	31.831	31.8677	0.0567	0.1780

Tabla 27. Resultados experimentales para establecer la linealidad del método para **5e**.

Nivel %	Conc. [$\mu\text{g/mL}$]			prom	desv estd	C.V	
	5e	ABC ₁	ABC ₂				ABC ₃
150	3.6	34.145	34.041	34.448	34.2113	0.2115	0.6181
100	2.4	27.407	27.449	27.482	27.4460	0.0376	0.1370
50	1.2	20.115	20.211	20.176	20.1673	0.0486	0.2409

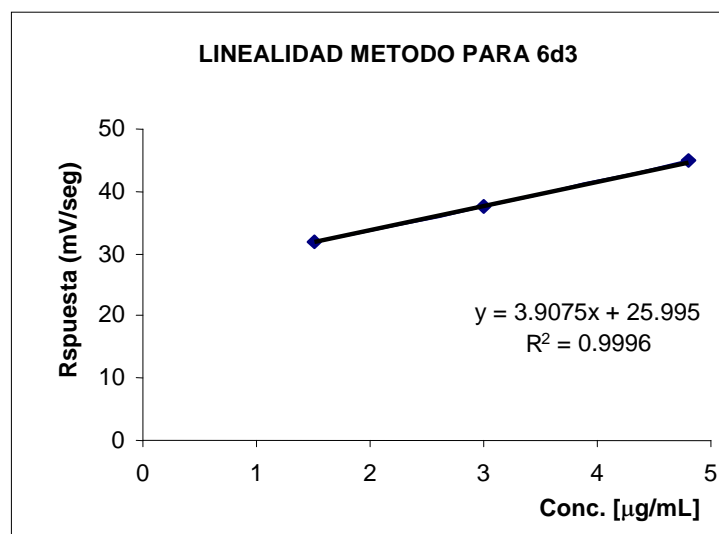
Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del método fueron: pendiente de la recta (b_1), ordenada al origen (b_0), coeficiente de determinación (R^2), intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$] e intervalo de confianza para la ordenada al origen [$IC(\beta_0)$], $n=9$ y $\alpha = 0.05$ % ambas con $t_{0.975,7} = 2.365$ y el coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x}$).

Tabla 28. Resumen de la regresión lineal simple para evaluar linealidad del método en **6d3** y **5e**.

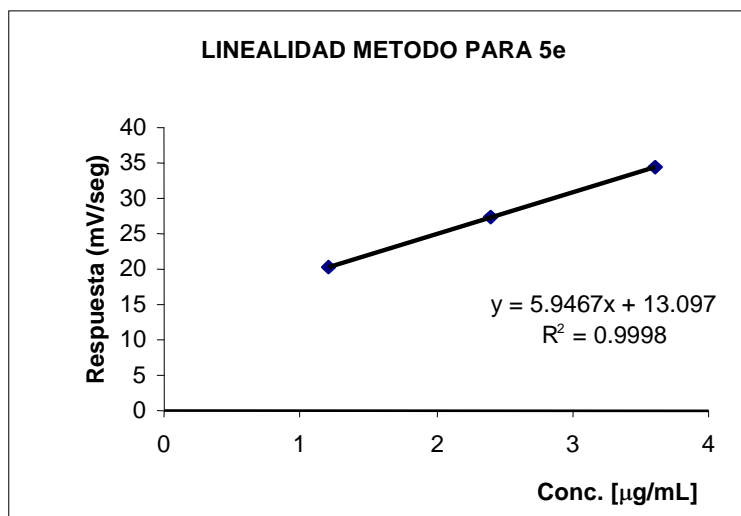
	Estadístico	Resultado		Estadístico	Resultado
6d3	b_1	1.0085	5e	b_1	1.0010
	b_0	-0.0287		b_0	0.0066
	R^2	0.9994		R^2	0.9992
	$IC(\beta_1)$	1.0003 - 1.0166		$IC(\beta_1)$	0.9916 - 1.0104
	$IC(\beta_0)$	-0.0012 - 0.0562		$IC(\beta_0)$	-0.0177 - 0.0310
	$CV_{y/x}$	0.45 %		$CV_{y/x}$	0.49 %



De acuerdo a los resultados que se indican en la **Tabla 29**, se observa que el método desarrollado para ambos biflavonoides es lineal, ya que éstos cumplen consistentemente con los criterios de aceptación ($b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$), establecidos en la guía internacional ICH Q2 (R1) (2005). El comportamiento lineal de los datos se puede apreciar en las gráficas **3 y 4**.



Gráfica 3. Curva obtenida para la determinación de linealidad del método de **6d3**.



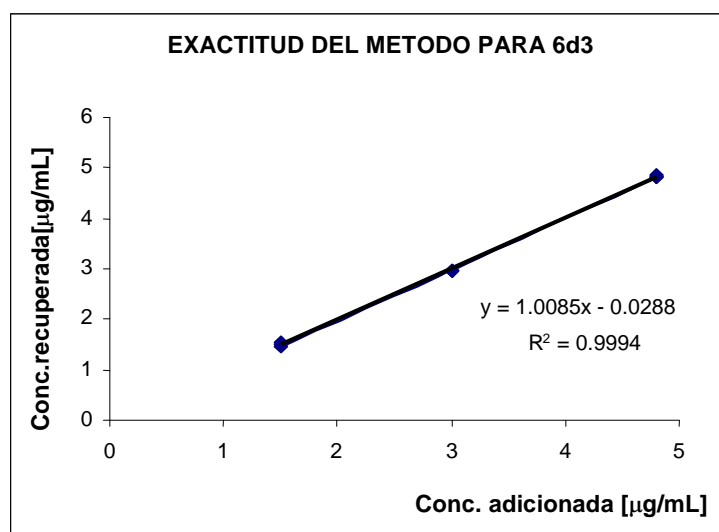
Gráfica 4. Curva obtenida para la determinación de linealidad del método de **5e**.



La **exactitud** de un método analítico, se define como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.⁶⁰ En esta prueba, la exactitud fue evaluada a partir de la cantidad recuperada, con respecto a la cantidad adicionada de las sustancias de referencia (**6d3** y **5e**) para cada nivel y por triplicado y con base en los criterios de las Guías de validación de métodos (2002) e ICH Q2(R1) (2005). En la **Tabla 29** y **Gráfica 5** se muestran los resultados para el compuesto **6d3**.

Tabla 29. Datos experimentales de la exactitud del método para **6d3**.

Nivel %	Cant.recuperada [µg] 6d3	%recobro
50	1.51	101.3
50	1.52	101.6
50	1.47	98.4
100	2.96	98.8
100	2.94	98.2
100	2.95	98.5
150	4.81	100.3
150	4.83	100.7
150	4.84	100.9



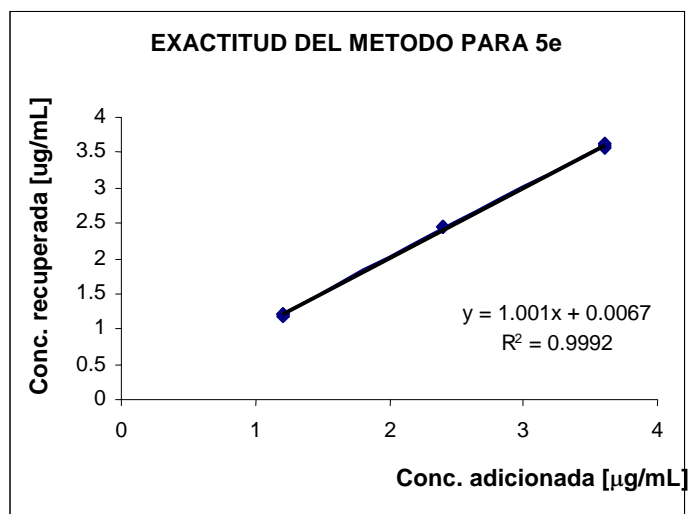
Gráfica 5. Curva obtenida para la determinación de exactitud del método para **6d3**.



A continuación se describen los resultados obtenidos de la exactitud del método para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona. La **Tabla 30** y **Gráfica 6** muestran los resultados experimentales para evaluar la exactitud del método para **5e**.

Tabla 30. Datos experimentales de la exactitud del método para **5e**.

Nivel %	Conc.recuperada [ug/mL]	%recobro
50	1.18	98.7
50	1.20	100.1
50	1.19	99.6
100	2.43	101.3
100	2.43	101.6
100	2.44	101.9
150	3.58	99.6
150	3.56	99.1
150	3.63	101.0



Gráfica 6. Curva obtenida para la determinación de exactitud del método de **5e**.



Tabla 31. Resumen de la regresión lineal simple para evaluar exactitud del método en **6d3** y **5e**.

	Estadístico	Resultado		Estadístico	Resultado
6d3	\bar{y}	99.9 %	5e	\bar{y}	100.3 %
	S	1.358		S	1.169
	C.V	1.34 %		C.V	1.17 %
	IC(μ)	98.8 -100.9 %		IC(μ)	99.4 -101.2 %

Los resultados que se aprecian en la **Tabla 32**, indican que el promedio del % de recobro (**99.9 %** para **6d3** y **100.3 %** para **5e**), se encuentra dentro del rango establecido para un método cromatográfico (98-102%) y el intervalo de confianza calculado (**98.8 – 100.9 %** para **6d3**) y (**99.4 – 101.2 %** para **5e**) incluye el 100%. Por lo tanto, el método analítico es exacto en el rango de concentraciones ensayadas.

5.6.2 Precisión del método para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona

Este apartado se realizó en dos niveles: calculando **repetibilidad** y **precisión intermedia**.

La **repetibilidad** es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.⁶⁰ Experimentalmente, se evaluó mediante el recobro de tres muestras independientes en tres niveles de concentración y por triplicado. Los datos experimentales obtenidos de la prueba de repetibilidad para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona se muestran en las **Tablas 32 y 33**.

**Tabla 32.** Concentración adicionada y recuperada, % de recobro para **6d3**.

Nivel %	Conc.Adicionada [$\mu\text{g/mL}$] 6d3	Conc.recuperada [$\mu\text{g/mL}$]	%recobro	RESULTADOS	
50	1.5	1.51	101.3	prom	100.4
50	1.5	1.52	101.6	desv. estd	1.778
50	1.5	1.47	98.4	C.V	1.77
100	3	2.96	98.8	prom	98.5
100	3	2.94	98.2	desv. estd	0.273
100	3	2.95	98.5	C.V	0.28
150	4.8	4.81	100.3	prom	100.6
150	4.8	4.83	100.7	desv. estd	0.282
150	4.8	4.84	100.9	C.V	0.27

Tabla 33. Concentración adicionada y recuperada, % de recobro para **5e**.

Nivel %	Conc.adicionada [$\mu\text{g/mL}$]	Conc.recuperada [$\mu\text{g/mL}$]	%recobro	RESULTADOS	
50	1.2	1.18	98.7	prom	99.4
50	1.2	1.20	100.1	desv. estd	0.693
50	1.2	1.19	99.6	C.V	0.70
100	2.4	2.43	101.3	Prom	101.6
100	2.4	2.44	101.6	desv. estd	0.268
100	2.4	2.44	101.9	C.V	0.26
150	3.6	3.58	99.6	Prom	99.9
150	3.6	3.57	99.1	desv. estd	1.005
150	3.6	3.64	101.0	C.V	1.01

De los resultados obtenidos, se puede apreciar que para ambos casos, el porcentaje de recuperación de los analitos en estudio a partir del material vegetal, es satisfactoria ya que para cada nivel de concentración el porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo 98-102 % y un $C.V \leq 2\%$. Los valores de recobro cercanos al 100%, indicaron una repetibilidad satisfactoria en el método propuesto.

Los resultados de los parámetros estadísticos son los mismos que los obtenidos en **exactitud del método**, por lo que esta prueba cumple satisfactoriamente (Ver **Tabla 31**).



La **precisión intermedia**, es la precisión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos en días distintos con la misma muestra homogénea.⁶⁰ Experimentalmente se evaluó mediante el análisis de seis muestras independientes que representaban el 100% de la muestra, en dos días diferentes y por dos analistas distintos. Las **Tablas 35 y 36** presentan los resultados de la prueba para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.

En la precisión intermedia, este modelo permite investigar el efecto del analista y del día, así como estimar la variabilidad entre analistas (reproducibilidad interanalistas), la variabilidad entre días (reproducibilidad interdías) y la variabilidad del método analítico (repetibilidad).

Este análisis es de utilidad cuando se tiene interés en determinar el grado de tolerancia del método a estas fuentes de variación.⁴²

Tabla 34. Resultados de la prueba de precisión intermedia para **6d3**.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	Area (mV/seg)	Area (mV/seg)
DIA 1	72.283	74.152
	74.731	73.835
	73.272	72.859
DIA 2	73.868	72.043
	71.120	73.884
	75.585	74.698

Tabla 35. Resultados de la prueba de precisión intermedia para **5e**.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	Area (mV/seg)	Area (mV/seg)
DIA 1	37.038	37.657
	37.126	38.026
	38.633	39.321
DIA 2	37.175	37.345
	38.122	38.105
	38.269	37.638



Los resultados de la **Tabla 36** demuestran que no hay diferencia significativa en el análisis de la muestra, aún cuando éste se realiza en dos días por dos analistas diferentes, esto se demuestra al observar que el C.V para ambos compuestos (**1.7 %** para **6d3** y **1.8 %** para **5e**) es menor al 2%, esto permite concluir que el método es preciso.

Tabla 36. Resumen de la regresión lineal simple para evaluar precisión intermedia del método en **6d3** y **5e**.

	Estadístico	Resultado		Estadístico	Resultado
6d3	\bar{y}	73.527	5e	\bar{y}	37.871
	S	1.273		S	0.680
	C.V	1.7 %		C.V	1.8 %

5.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

La estabilidad por definición de acuerdo a la NOM 073,⁶¹ “Es la capacidad de un fármaco o de un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil”. El objetivo de los estudios de estabilidad, es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o un medicamento varía con el tiempo, bajo la influencia de factores ambientales como: temperatura, humedad o luz. Los estudios permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de re-análisis y vida útil.⁶¹

La estabilidad de las muestras de análisis de *S. lepidophylla* se evaluó bajo las condiciones mostradas en las **Tablas 37 y 38** respectivamente para robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.



Tabla 37. Datos de estabilidad a diferentes tiempos y distintas condiciones para **6d3**.

TIEMPO	t=0h	t=24	t=72h	8d
CONDICIÓN				
ALMACENAJE	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)
T.amb con luz	94.570	94.481	94.466	90.780
T.amb con luz	97.55	97.429	94.880	89.676
T.amb con luz	93.430	93.504	96.561	87.735
T.amb sin luz	96.068	96.711	96.798	85.878
T.amb sin luz	97.115	96.796	96.841	87.650
T.amb sin luz	98.511	99.982	95.381	89.798
4°C con luz	98.184	99.343	95.940	89.400
4°C con luz	99.241	98.839	94.920	90.456
4°C con luz	97.276	96.895	95.522	89.220
4°C sin luz	98.839	98.972	96.531	92.100
4°C sin luz	97.758	97.324	96.135	93.453
4°C sin luz	99.310	98.125	96.451	95.425
37°C sin luz	97.452	97.564	94.931	78.356
37°C sin luz	98.321	97.245	93.458	73.189
37°C sin luz	99.101	99.286	93.919	74.782
prom	97.515	97.499	95.516	87.193
desv. estd	1.697	1.768	1.868	6.584
C.V	1.74	1.81	1.91	7.55
suma	1462.726	1462.496	1432.734	1307.898
% di	0	0.02	1.99	10.32

Tabla 38. Datos de estabilidad a diferentes tiempos y distintas condiciones para **5e**.

TIEMPO	t=0h	t=24	t=72h	8d
CONDICIÓN				
ALMACENAJE	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)	ABC (mV/seg)
T.amb con luz	52.486	53.513	52.288	49.294
T.amb con luz	52.574	52.141	51.236	50.294
T.amb con luz	53.012	52.102	52.904	48.240
T.amb sin luz	54.179	54.112	52.714	47.795
T.amb sin luz	53.113	52.110	52.760	47.884
T.amb sin luz	52.892	54.315	53.935	45.968
4°C con luz	55.026	53.712	52.688	46.305
4°C con luz	54.770	54.444	51.596	45.236
4°C con luz	54.412	54.896	52.410	42.714
4°C sin luz	54.826	53.463	53.292	46.881
4°C sin luz	54.347	53.853	51.364	50.823
4°C sin luz	54.624	52.378	50.942	45.059



37°C sin luz	54.852	51.823	50.224	30.298
37°C sin luz	54.126	55.059	51.032	35.059
37°C sin luz	52.121	53.621	52.330	36.351
prom	53.824	53.436	51.114	44.547
desv. estd	1.006	1.077	1.011	6.007
C.V	1.87	1.92	1.94	13.48
suma	807.36	801.542	781.715	668.201
% di	0	0.39	1.71	9.28

Los resultados presentados con anterioridad, son expresados como la diferencia absoluta de la media aritmética para cada condición de almacenaje, respecto a la media aritmética del análisis inicial (|di|), estos se analizaron en cuatro periodos de 0, 24, 72 h y 8 días. Una muestra se considera estable cuando el |di| en cada condición de almacenaje es $\leq 2\%$, por lo que al observar las **Tablas 37 y 38**, se puede apreciar que a partir de los 8 días, los compuestos marcadores de *S. lepidophylla* presentan descomposición o degradación química para todas las condiciones de almacenaje observándose un %|di| = 10.32 para **6d3** y %|di| = 9.28 para **5e**. Es importante resaltar que la planta *per se* es utilizada en decocción (1 - 4 plantas en 1L de agua) durante 5-10 min., administrada por vía oral y su frecuencia de uso es como agua de tiempo hasta que desaparezca el malestar, por lo tanto, de acuerdo al estudio de estabilidad presentado, se recomienda utilizarla antes de los 8 días.

5.8 CUANTIFICACIÓN DE ROBUSTAFLAVONA Y (2S)-2,3-DIHIDROROBUSTAFLAVONA MEDIANTE CLAR.

La cuantificación de metabolitos en una planta, es de suma importancia para la evaluación en el control de calidad de plantas medicinales.

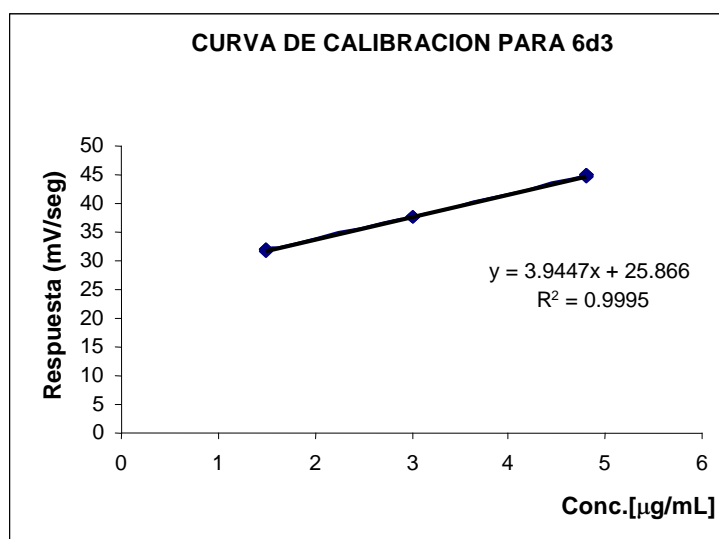
La calidad de una planta medicinal está determinada por su composición química, las propiedades fisicoquímicas, las características aromáticas olfativas y el grado de pureza o cantidad de residuos contaminantes.⁶²



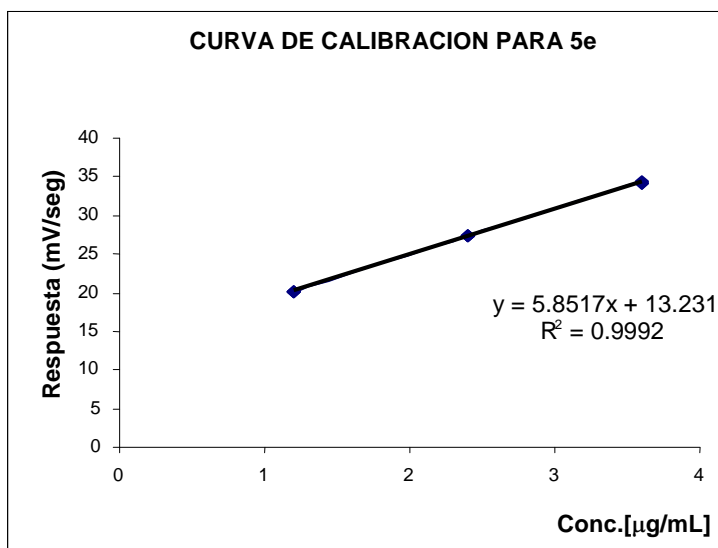
Entre los factores internos que pueden influir en la composición y calidad de una planta están: las variedades o especies de plantas, la etapa de desarrollo de la planta, la edad de la planta y la parte que se utilice; por esta razón, es necesario que se apliquen las exigencias establecidas por las Farmacopeas y Monografías oficiales existentes, con el objetivo de verificar entre otras características, la identificación y valoración del o los principios activos que contienen.⁶²

Los compuestos marcadores de la planta *S. lepidophylla*, que se fueron validando a lo largo de este trabajo fueron robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona, los cuales fueron cuantificados pesando **200 mg** de material vegetal, independientemente y por triplicado; utilizándose la metodología previamente establecida para “**preparación de la solución de trabajo**” y se inyectó cada una al CL, para obtener las ABC correspondientes.

Una vez desarrollado y validado el método, se diseñaron curvas de calibración para cada compuesto a partir de los datos de linealidad del método, las cuales se muestran en las **Gráficas 7 y 8**.



Gráfica 7. Curva obtenida a partir de los datos de linealidad del método para la cuantificación de **6d3**.



Gráfica 8. Curva obtenida a partir de los datos de linealidad del método para la cuantificación de **5e**.

Para poder cuantificarlos, fue necesario realizar un estudio de homocedasticidad (homogeneidad de las varianzas), esto con la finalidad de saber si era necesario utilizar el ajuste del método por corrección de pesada (Almeida y colaboradores, 2002).⁶³ Este artículo menciona que la condición de igualdad de varianzas, en términos de homocedasticidad, no es muy frecuente en datos analíticos, ya que, cuando el rango de concentraciones es de más de un orden de magnitud, se espera que la varianza de cada punto sea diferente, por lo que grandes desviaciones presentes en concentraciones más grandes tienden a influir al peso y en la línea de regresión en las desviaciones más pequeñas, asociadas con concentraciones más pequeñas y, por lo tanto, la exactitud en una curva de calibración no es adecuada.⁶³

Una manera de contrarrestar esa situación es haciendo uso de la regresión lineal por mínimos cuadrados por corrección de pesada.



Para ello, se verificó si era necesario hacer la corrección a las ecuaciones de regresión lineal obtenidas, mediante la prueba estadística F (Ver **Tablas 39 y 40**). La condición es que si $F_{exp} < F_{tab}$, la varianza es constante en todo el intervalo de calibración, por lo que los residuales caerán más o menos aleatoriamente alrededor del eje X y por lo tanto no procederá el ajuste por corrección de pesada.

Tabla 39. Resultados de la prueba estadística F, para verificar homocedasticidad para **6d3**.

MAS ALTA		MAS BAJA	
Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	ABC(mV/seg)	Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	ABC(mV/seg)
4.8	44.815	1.5	31.933
4.8	44.878	1.5	31.839
4.8	44.920	1.5	31.831
VARIANZA	0.00186	VARIANZA	0.00214
g.l num, denom (n-1)		2	
F_{exp}		0.87	
F_{tab}		99	

Tabla 40. Resultados de la prueba estadística F, para verificar homocedasticidad para **5e**.

MAS ALTA		MAS BAJA	
Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	ABC(mV/seg)	Conc. [$\mu\text{g/mL}$]	ABC(mV/seg)
3.6	34.145	1.2	20.115
3.6	34.041	1.2	20.211
3.6	34.448	1.2	20.176
VARIANZA	0.02981	VARIANZA	0.00157
g.l num, denom (n-1)		2	
F_{exp}		18.94	
F_{tab}		99	

Los resultados anteriores, demuestran que no fue necesario hacer el ajuste de la ecuación de regresión lineal obtenida, por el método por corrección de pesada, ya que para ambos compuestos (**6d3** y **5e**) la F_{exp} resultó ser menor a la F_{tab} , con un nivel de confianza $\alpha = 0.01$.



De este modo, se realizó la cuantificación de las muestras mediante la sustitución de las ABC (mV/seg) obtenidas del CL, en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración diseñada para cada compuesto. Los resultados obtenidos de la cuantificación para robustaflavona ensayados por triplicado son los indicados en la **Tabla 41**.

Tabla 41. Resultados de la cuantificación de **6d3** en ***S. lepidophylla*** ensayados por triplicado.

# muestra	ABC (mV/seg)	$\mu\text{g/mL}$ 6d3	Fdil.	μg 6d3	mg/g planta
1	93.43	17.12	10	171.28	0.86
2	94.75	17.46	10	174.62	0.87
3	97.55	18.17	10	181.72	0.90

Estos datos fueron obtenidos a partir de la ecuación de la recta para robustaflavona la cual se muestra a continuación:

$$[\text{mg} / \text{g planta para } 6d3] = \left(\frac{\text{ABC} (\text{mV} / \text{seg}) - 25.866 (b_0)}{3.9497 (b_1)} \right) \times \left(\frac{\text{Fdil.}}{\text{g (planta)}} \right) \times \left(\frac{1}{1000} \right)$$

En la **Tabla 42** se muestran los mg/g (promedio) extraídos de planta para robustaflavona.

Tabla 42. Resultado promedio de la cuantificación de **6d3** en ***S. lepidophylla***.

Cantidad total de 6d3 por gramo de planta	
mg/g	%
0.88	0.44

Los siguientes son los resultados de la cuantificación para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.



Tabla 43. Resultados de la cuantificación de **5e** en ***S. lepidophylla*** ensayados por triplicado.

# muestra	ABC (mV/seg)	$\mu\text{g/mL}$ 5e	Fdil.	μg 5e	mg/g planta
1	58.01	7.65	10	76.53	0.38
2	51.49	6.53	10	65.37	0.33
3	52.57	6.72	10	67.23	0.34

La siguiente es la ecuación de la recta obtenida para cuantificar (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.

$$[\text{mg} / \text{g planta para } 5e] = \left(\frac{\text{ABC (mV / seg)} - 13.231 (b_0)}{5.8517 (b_1)} \right) \times \left(\frac{\text{Fdil.}}{\text{g (planta)}} \right) \times \left(\frac{1}{1000} \right)$$

En la **Tabla 44** se muestran los mg/g (promedio) extraídos de planta para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona.

Tabla 44. Resultado promedio de la cuantificación de **5e** en ***S. lepidophylla***.

Cantidad total de 5e por gramo de planta	
mg/g	%
0.35	0.18

De los resultados anteriores se desprende que aún analizando muestras independientes de un mismo lote de *S. lepidophylla*, sí existen pequeñas variaciones en la cantidad de metabolitos secundarios debido a variaciones en el método de cuantificación, por otra parte, se recomendaría como muy necesario evaluar lotes de diferentes colectas de *S. lepidophylla*, para lograr hacer una comparación entre ellos y de esta manera poder llevar a cabo, un adecuado control de calidad en esta planta medicinal.



6. CONCLUSIONES

En relación a los resultados anteriores se puede concluir lo siguiente:

- Mediante el plan de trabajo establecido, fue posible desarrollar y validar un método analítico para cuantificar el contenido de biflavonoides, en la planta medicinal *S. lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring. El método desarrollado demostró ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones analizadas.
- La técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) fue muy útil para realizar la purificación del compuesto (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona, obteniéndose éste con un grado de pureza cercano al 100% y un buen rendimiento en el proceso de purificación.
- Los estudios de estabilidad realizados para los compuestos **6d3** y **5e** contenidos en *S. lepidophylla* (Hook & Grev.) Spring, permitieron establecer el tiempo en el que los metabolitos sufren descomposición o alguna alteración en las muestras analizadas para un mismo lote.
- Se logró cuantificar los metabolitos secundarios mayoritarios en el extracto metanólico, obteniéndose 0.88 mg/g para robustaflavona y 0.35 mg/g para (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona, evaluados para un solo lote de *S. lepidophylla* recolectado en el Mercado Sonora de México
- De acuerdo a la estructura química particular de los biflavonoides robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona presentes en *S. lepidophylla*, y a su presencia no ubíquita en los vegetales y restringida a un grupo de especies, éstos reúnen las características para ser considerados compuestos de referencia en la especie.



- Los resultados de cuantificación de robustaflavona y (2S)-2,3-dihidrorobustaflavona pueden ser utilizados como base para determinar el contenido de estos metabolitos en otras colectas de diferentes épocas del año y de diferentes lugares geográficos.
- El establecimiento de los biflavonoides encontrados en la especie *S. lepidophylla* como compuestos de referencia, podrá evitar la presencia de especies adulterantes en colectas de *S. lepidophylla*.



7. PERSPECTIVAS

- Se requiere estudiar diferentes colectas de *S. lepidophylla*, para hacer una ponderación de las diferencias en concentración de los biflavonoides de acuerdo a diferencias climatológicas de los mismos, empleando el método analítico desarrollado y para llevar a cabo un control de calidad de la planta.
- Concluir la identificación del compuesto mayoritario en el extracto metanólico de *S. lepidophylla* con tiempo de retención $t_{R2} = 18.820$ min., para su posterior cuantificación.
- Los resultados obtenidos en este trabajo, podrían integrarse a otras pruebas de control de calidad de *S. lepidophylla* para conformar una monografía de esta planta medicinal y eventualmente pueda ser considerada dentro de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Asimismo los resultados serán de utilidad para ser publicados en un artículo de divulgación científica.



8. BIBLIOGRAFIA

1. Nason, A. (1980). "Biología". 18^{ava}. Reimpresión, 1965, 1^a. Edición. Trillas, México, D. F.
2. Rost, T. L., Barbour, M. G., Thornton, R. M., Weier, T.E. & Stocking, C.R. (1985). "Botánica: Introducción a la Biología Vegetal". Limusa, México, D. F.
3. Martínez, M. (1979). "Las Plantas Medicinales de México". 6^a. Edición. Ediciones Botas, México. p.124-125.
4. Guevara, M. (2008). "Caracterización Química y Biológica de Biflavonoides de *Selaginella lepidophylla* Spring". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. p.5
5. Swamy, R.C., Kunert, O., Schühly, W., Bucar, F., Ferreira, D., Rani, V.S., Kumar, B.R., Narasimha Appa Rao, A.V. (2006). "Structurally unique biflavonoids from *Selaginella chrysocaulos* and *Selaginella bryopteris*". *Chemistry and Biodiversity*, **3**: p. 405-413.
6. Lin, L.C., Kuo, Y.C. & Chou, C.J. (2000). "Citotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*". *Journal of Natural Products*, **63**:627-630.
7. Lin, L.R., Seguin, E., Tillequin, F. & Koch, M. (1987). "New glycosides from *Selaginella doederleinii*". *Journal of Natural Products*, **60**: p.422-427.
8. López-Saez, J.A., Pérez-Alonso, M.J. & Velasco-Negueruela, A. (1995). "Flavonoids of *Selaginella denticulate* and *S. selaginoides*". *Fitoterapia*, **66**: p.188-189.
9. Sun, C.M., Syu, W. Jr., Huang, Y.T., Chen, C.C. & Ou J.C. (1997). "Selective citotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*". *Journal of Natural Products*, **60**: p.382-384.



10. Qasim, M.A., Roy, S.K., Kamil, M. & Ilyas, M. (1985). "Phenolic constituents of *Selaginellaceae*". *Indian Journal of Chemistry*, **24** B: p.220.
11. Evans R. & Raffauf, R.F. (1990). "The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of Northwest Amazonia". Oregon: Dioscorides Press. p. 415.
12. Silva, G.L., Chai, H., Gupta, M.P., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Beecher, W.W. & Kinghorn, A.D. (1995). "Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*". *Phytochemistry*, **40**: p.129-134.
13. Argueta, A., Cano, L. M., Rodarte, E. (1994). "Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana". Instituto Nacional Indigenista, México. p. 575-576.
14. Sánchez Sánchez, O. (1958). "Las *Excursiones Botánicas en el Distrito Federal*". Tesis, Escuela Normal Superior, Secretaría de Educación Pública. México. p. 66.
15. Vázquez, M. A., Meléndez, M. E. & Arreguín, M. L. (2005). "Polibotánica *Selaginella*". IPN, México, D. F., p. 105-115.
16. Márquez, A., Lara, F., Esquivel, B. & Mata, R. (1999). "Plantas Medicinales de México II. Composición, Usos y Actividad Biológica", UNAM, México.
17. Martínez, M. (1979). "Las Plantas Medicinales de México". 6ª. Edición. Ediciones Botas, México. p.124-125.
- 17a. Gaedcke, F., & Steinhoff, B. (2000). "Herbal Medicinal Products". CRC Press, New York.
18. Singleton VL. "Flavonoids". En: Mrak EM, Stewart GF (editores). *Advances in Food Research*. Academic Press, Nueva York. p.149-242.



19. Trease y Evans (1989) "Farmacognosia", 13ª edición, Interamericana-McGraw Hill. p.448-453
20. Bruneton, J. (2002). Farmacognosia "Plantas medicinales" 2ª edición, Ed. Acribe. Zaragoza, España. p. 306-341
21. Torrensen, R. (1997). "Flavonoid and phenolic acids in selected berries". *Cancer Lett.* vol. 114, no. 1-2, p. 191-192.
22. Li, Y. Q.; Yi, Y. H. & Xia, K. Q. (1996). "Studies on the structure of isoostelbin". *Pharmaceutica Sínica*, vol. 31, no. 10, p. 761-63.
23. O. Cartaya, & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica; "Flavonoides: Características Químicas y aplicaciones". *Cultivos tropicales*, vol. 22, no. 2, p. 5-14.
24. Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (1975). "The Flavonoids" (2 part), Academic Press, New York. p.693-696, 159-161.
25. Baran, R. (1997). "Changes in phenolic compounds and colour in pole cherry wines subjected to fining treatment". *Zlebinin Unterss Forsch A-Foo*, vol. 205, no. 6, p. 474-478.
26. Swiader, K. & Lamer-Zarawska, E. (1996). "Flavonoids of rose Artemisia species and their antifungal properties". *Fitoterapia*, vol. 57, no. 1.
27. Widyastuti, S. M.; Nonaka, F. & Watanabe, K. (1996). "Isolation and characterisation of two Aucuporimrelated phytoalexins from *Phatina glabra*". *Maxim. Ann. Phytopath. Soc. Japan*, vol. 58, p. 228-233.
28. Dixon, S. A. & Paiva, N. L. (1995). "Stress induced phenylpropanoid metabolism". *Plant Cell*, vol. 7, p. 1085-1087.
29. Harborne, J. B., (1982). "Introduction to ecological biochemistry", Academic Press, London.
30. Harborne, J. B. & Grayer, R. J. (1998). Flavonoids and Insects. "The flavonoids: advances in research since 1986". Chapman and Hall, London. p. 589-618.
31. Swiader, K. & Lamer-Zarawska, E. (1996). "Flavonoids of rose Artemisia species and their antifungal properties". *Fitoterapia*, vol. 57, no. 1.



32. Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products, "A Biosynthetic Approach "(2a Ed.) England: John Wiley & Sons Ltd. p.121-152.
33. Winkel-Shirley, B. (2001). "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology". *Plant Physiology* 126: p. 485-493.
34. Pérez-Alonso, M.J. y Velasco-Negueruela, A. (1996). "Consideraciones filogenéticas sobre la presencia de biflavonoides y triflavonoides en musgos". *Ars Pharmaceutica*, vol. 37, no. 1, p. 83-95.
35. Martínez, F.S (2002). "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes", Revisión Nutrición Hospitalaria, Universidad de León, Departamento Fisiología, España. p.271-278
36. Benavente-García, O. (1997). "Uses and properties of citrus flavonoids". *J. Agric. and Food Chem.* vol. 45, No. 12, p. 4506-4515.
37. Hertog, M.G.L., Van Poppel, G.P. & Verhoeven, D. (1997). "Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables". *Phytochemistry of Fruit and Vegetables*. Oxford. Clarendon Press, p. 319-329.
38. Frankel, E. N.; Waterhouse, A. L. & Terssedre, P. (1995). "Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoprotein". *Journal Agricultural. Food Chem.*, vol. 43, p. 890-894.
39. Oamah, B. D. & Mazza, G. (1996). "Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 7, p. 1746-1750.
40. Havsteen B, (1983). "Flavonoids: A class of natural products of high pharmacological potency". *Biochem Pharmacol*, 32: p.1141-1148.
41. Formica JV & Regelson W. (1995). "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids". *Food Chem Toxicol*, 33: p.1061-1080.
42. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos biólogos. A.C. (2002). "Guía de Validación de métodos analíticos". Comisión de Validación de métodos analíticos. p. 4, 21, 31, 40-43.



43. Anal.Chem. (1996). News & Features. "Guide to analytical method validation". May 1,305A/309A.
44. USP/NF/31 (2008). "The oficial compendia of standards", General information/<1225> Validation of Compendial Procedures. vol.1, Rockville, MD 20852, p. 683-687.
45. González, C. D., (2005). "Validación retrospectiva y control estadístico de procesos en la Industria Farmacéutica". Tesis, Santiago, Chile.
46. Skoog D., Holler F. J & Nieman T. A. (2001) "Principios de Análisis Instrumental" 5ª edición, McGraw-Hill, España. p. 730-828
47. Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F. J., (1996). "Fundamentos de Química Analítica" Tomo II, 4ª edición, Reverté S.A, Barcelona, p. 664-730
48. Bermejo F., (1991). "Química Analítica General Cuantitativa e Instrumental". Paraninfo. Madrid.
49. Harris D., (2001). Análisis Químico Cuantitativo, 2ª edición, Reverté S.A, Barcelona, España p.693-720
50. Rubinson, K. A. & Rubinson J. F. (2001). "Análisis Instrumental" 1ª edición, Prentice Hall, Madrid, Cap 13, pp. 584-633 y Cap 15, p. 680-715.
51. González M., (2004). "Plantas Medicinales del estado de Durango y zonas aledañas", CIIDIR Durango, IPN, México. p.11-13.
52. Lozoya, X. (1993). "Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI". En: La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaría de Salud, México, p.255-270.
53. Mitscher, L.A., Pillai, S. & Shankel, D. (2000). "Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products". *Journal of Food and Drug Analysis*, 8, p.229-234.
- 53a. Aguilar, M.I., Romero, M.G., Chávez, M.I., King -Díaz B. & Lotina-Hennsen, B. (2008). Biflavonoids Isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit Photosynthesis in Spinach Chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, p. 6994-7000.



54. Wang, Y. & Yang, Y. (2007). "Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC". *Journal of Chromatography B*; 850, p. 392-399.
55. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. (2004). "Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C₁₈ column". *Analytical Chimica Acta*, 512, p.271-280
56. Chen, L., Yin, Y., Yi, H. & Xu, Q. (2007). "Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by high-performance liquid chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, p.1715-1720.
57. Bala, S. & Uniyal, G.C. (2002). "High performance Liquid Chromatographic Analysis of Genistein and Other Isoflavonoids from Heartwood of *Ougeinia dalbergioides*". *Phytochemical analysis*, 13, p.211-214.
58. Daneshtalab, N., Lewanczuk, R.Z. & Jamali F. (2002). High performance liquid chromatographic analysis of angiotensin II receptor antagonist valsartan using a liquid extraction method. *J Chromatogr B*; 766: p. 345-349.
59. ISO 11843-1. *Capability of detection. Part 1: Terms and definitions*. ISO, Genève, 1997.
60. ICH-FDA (2005). ICH Guidelines Q2 (R1). Guideline for industry: Text on Validation of analytical procedures.
61. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-073-SSA1-2005. Estabilidad de Medicamentos. Secretaría de Salud. Estados Unidos Mexicanos. *Definiciones*.
62. Boletín plantas medicinales y aromáticas (2003), boletín trimestral ISSN 0718-0357, no.8 correspondiente a junio, p.1-2
63. Almeida, A.M., Castel-Branco, M. M. & Falcão, A.C. (2002). "Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods". Portugal, España. p.215-222.

**CONSULTAS ELECTRÓNICAS:**

- 64. Integrated Taxonomic Information System**, Base de datos para clasificación de *S. lepidophylla*. En red: <http://www.itis.gov>, junio 2008.
- 65. Secretaría de Salud**, Norma oficial mexicana NOM-073-SSA1-2005. En red: <http://www.salud.gob.mx>, junio 2008.
- 66. International Conference of Harmonisation**, Guías de validación de métodos, En red: <http://www.ich.org>, junio 2008.
- 67. Comité Mexicano de Sustancias Farmacéuticas de Referencia**, Requerimientos de una sustancia de referencia, En red: <http://www.cosufar.org>, junio 2008.
- 68. Asociación Farmáutica Mexicana, A.C**, Consulta con referencia a estándares. En red: <http://www.afmac.org.mx>, junio 2008.
- 69. Producción Químico Farmacéutica**, Consulta con referencia a estándares. En red: <http://www.pqf.org.mx>, junio 2008.
- 70. Sociedad Química de México**, Consulta con referencia a estándares. En red: <http://www.sqm.org.mx>, junio 2008.
- 71. Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica**, Consulta con referencia a estándares. En red: <http://www.canifarma.org.mx>, junio 2008.



9. GLOSARIO

Adecuabilidad del sistema. Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

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.

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

Especificaciones. Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.

Especificidad/Selectividad. Cuando un método es selectivo, 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.

Estabilidad analítica de la muestra. Propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.



Factor de respuesta. Respuesta analítica del compuesto en estudio por unidad de peso o concentración.

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

Linealidad. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática lineal, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado.

Metabolito. Cualquier sustancia producida o utilizada durante el metabolismo.

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.

Muestra. Porción del material a evaluar.

Muestra adicionada. Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito.

Parámetros de desempeño. Parámetros específicos a evaluar en un protocolo de validación.

Protocolo de validación. Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.



Recobro. Cantidad de analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico.

Sustancia de referencia. Sustancia de uniformidad conocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

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



10. ANEXOS

A-1. Fórmulas empleadas para cálculos.

PARÁMETRO ESTADÍSTICO	FÓRMULA
Coeficiente de determinación	$R^2 = \sqrt{\frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$
Coeficiente de variación	$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$
Coeficiente de variación de la regresión	$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \times 100$
Desviación estándar	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada al origen.	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{\left(\bar{x}\right)^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right)}$
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	$ di = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
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	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} Sb_1$
LC con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen	$LC = 10 x \frac{Sb_0}{Sb_1}$
LD con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen	$LD = 3.3 x \frac{Sb_0}{Sb_1}$
Media aritmética	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}; \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n};$
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	$\% = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$
Tiempo de retención (t_R)	Tiempo de la sustancia en la fase estacionaria
Tiempo muerto (t_0)	Tiempo de la sustancia en fase móvil
Factor de capacidad	$k' = \frac{t_R}{t_0} - 1$
Factor de coleo	$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$ <p>Donde: $W_{0.05}$ = ancho del pico al 5% de altura f = distancia entre el máximo del pico y el borde inicial del pico; la distancia se mide en un punto ubicado al 5% de altura del pico desde la línea base.</p>
Número de platos teóricos	$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2$ <p>Donde: t = es el tiempo de retención del soluto que permanece en la columna. W = porción de la línea base intersectada por las tangentes al pico (ancho de pico).</p>



A-2. Análisis de Regresión lineal para 6d3 y 5e.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LINEALIDAD SISTEMA COMPUESTO 6d3					
#	Conc. [$\mu\text{g/mL}$] (x)	Area mV/seg (y)	xy	x^2	y^2
1	12	307.489	3689.868	144	94549.4851
2	12	308.548	3702.576	144	95201.8683
3	12	311.570	3738.84	144	97075.8649
4	6	164.307	985.842	36	26996.7902
5	6	165.349	992.094	36	27340.2918
6	6	169.823	1018.938	36	28839.8513
7	4.8	138.847	666.4656	23.04	19278.4894
8	4.8	139.481	669.5088	23.04	19454.9494
9	4.8	138.153	663.1344	23.04	19086.2514
10	3	94.209	282.627	9	8875.33568
11	3	93.288	279.864	9	8702.65094
12	3	94.452	283.356	9	8921.1803
13	1.5	56.769	85.1535	2.25	3222.71936
14	1.5	55.294	82.941	2.25	3057.42644
15	1.5	56.080	84.12	2.25	3144.9664
16	0.75	45.706	34.2795	0.5625	2089.03844
17	0.75	46.023	34.51725	0.5625	2118.11653
18	0.75	45.389	34.04175	0.5625	2060.16132
SUMA	84.15	2430.777	17328.1668	644.5575	470015.437

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

suma x	84.15	N	18
suma y	2430.777	n-2	16
suma xy	17328.1668	b_1	23.7473
suma x^2	644.5575	b_0	24.0245
suma y^2	470015.4373	R^2	0.9991
suma $(x)^2$	7081.2225	$S_{y/x}$	0.6844
suma $(y)^2$	5908676.824	Sb_1	0.0431
		$t_{0.975, 16}$ (tablas)	2.120
		Límite superior	23.8388
		Límite inferior	23.6557



**ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LINEALIDAD SISTEMA
COMPUESTO 5e**

#	conc. [$\mu\text{g/mL}$] (x)	Area mV/seg (y)	xy	x^2	y^2
1	6	84.359	506.154	36	7116.44088
2	6	84.713	508.278	36	7176.29237
3	6	84.530	507.18	36	7145.3209
4	4.8	66.777	320.5296	23.04	4459.16773
5	4.8	67.102	322.0896	23.04	4502.6784
6	4.8	67.643	324.6864	23.04	4575.57545
7	3.6	50.799	182.8764	12.96	2580.5384
8	3.6	51.228	184.4208	12.96	2624.30798
9	3.6	50.024	180.0864	12.96	2502.40058
10	2.4	34.839	83.6136	5.76	1213.75592
11	2.4	34.792	83.5008	5.76	1210.48326
12	2.4	35.359	84.8616	5.76	1250.25888
13	1.2	19.433	23.3196	1.44	377.641489
14	1.2	19.070	22.884	1.44	363.6649
15	1.2	19.477	23.3724	1.44	379.353529
16	0.6	12.095	7.257	0.36	146.289025
17	0.6	12.220	7.332	0.36	149.3284
18	0.6	12.147	7.2882	0.36	147.549609
SUMA	55.8	806.607	3379.7304	238.68	47921.0477

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

suma x	55.8	n	18
suma y	806.607	n-2	16
suma xy	3379.7304	b_1	13.3827
suma x^2	238.68	b_0	3.3248
suma y^2	47921.0477	R^2	0.9992
suma $(x)^2$	3113.64	$S_{v/x}$	0.1873
suma $(y)^2$	650614.852	Sb_1	0.0231
		$t_{0.975, 16}$	2.120
		Límite superior	13.4317
		Límite inferior	13.3337

**ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LINEALIDAD MÉTODO
COMPUESTO 6d3**

#	Conc.adicionada [$\mu\text{g/mL}$] (x)	Conc.recuperada [$\mu\text{g/mL}$] (y)	xy	x^2	y^2
1	1.5	1.520	2.2794	2.25	2.3093
2	1.5	1.524	2.2856	2.25	2.3217
3	1.5	1.476	2.2134	2.25	2.1774
4	3	2.964	8.8913	9	8.7840
5	3	2.947	8.8422	9	8.6872
6	3	2.956	8.8690	9	8.7400
7	4.8	4.816	23.1186	23.04	23.1975
8	4.8	4.833	23.1960	23.04	23.3530
9	4.8	4.843	23.2476	23.04	23.4570
SUMA	27.9	27.879	102.9434	102.87	103.0275



PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

suma x	27.9	n	9	Límite superior	1.0166
suma y	27.87869482	n-2	7	Límite inferior	1.0003
suma xy	102.9434165	b ₁	1.0085	x _{prom}	3.1
suma x ²	102.87	b ₀	-0.0287	x _{prom} ²	9.61
suma y ²	103.0275527	R ²	0.9994	Sb ₀	0.01162023
suma (x) ²	778.41	S _{y/x}	0.0139	Límite superior	-0.0013
suma (y) ²	777.2216247	Sb ₁	0.0034	Límite inferior	-0.0562
		t _{0.975, 7}	2.365	y _{prom}	3.098
				CV _{y/x}	0.4490

ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL PARA LINEALIDAD METODO COMPUESTO 5e

#	Conc.adicionada [µg/mL] (x)	Conc.recuperada [µg/mL] (y)	xy	x ²	Y ²
1	1.2	1.184	1.4211	1.44	1.4024
2	1.2	1.201	1.4408	1.44	1.4416
3	1.2	1.195	1.4336	1.44	1.4273
4	2.4	2.432	5.8359	5.76	5.9129
5	2.4	2.439	5.8532	5.76	5.9479
6	2.4	2.444	5.8667	5.76	5.9755
7	3.6	3.584	12.9034	12.96	12.8470
8	3.6	3.566	12.8393	12.96	12.7198
9	3.6	3.636	13.0900	12.96	13.2213
SUMA	21.6	21.682	60.6843	60.48	60.8962

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS

suma x	21.6	n	9	Límite superior	1.0104
suma y	21.6815491	n-2	7	Límite inferior	0.9916
suma xy	60.6843888	b ₁	1.0010	x _{prom}	2.4
suma x ²	60.48	b ₀	0.0066	x _{prom} ²	5.76
suma y ²	60.8962183	R ²	0.9992	Sb ₀	0.0103
suma (x) ²	466.56	S _{y/x}	0.0116	Límite superior	0.0310
suma (y) ²	470.089573	Sb ₁	0.0039	Límite inferior	-0.0177
		t _{0.975, 7}	2.365	y _{prom}	2.409
				CV _{y/x}	0.4851



A-3. Valores estadísticos de la distribución t de student.

grados de libertad	$t_{0.975}$	grados de libertad	$t_{0.975}$	grados de libertad	$t_{0.975}$
1	12.706	26	2.056	51	2.008
2	4.303	27	2.052	52	2.007
3	3.182	28	2.048	53	2.006
4	2.776	29	2.045	54	2.005
5	2.571	30	2.042	55	2.004
6	2.447	31	2.040	56	2.003
7	2.365	32	2.037	57	2.002
8	2.306	33	2.035	58	2.002
9	2.262	34	2.032	59	2.001
10	2.228	35	2.030	60	2.000
11	2.201	36	2.028	61	2.000
12	2.179	37	2.026	62	1.999
13	2.160	38	2.024	63	1.998
14	2.145	39	2.023	64	1.998
15	2.131	40	2.021	65	1.997
16	2.120	41	2.020	66	1.997
17	2.110	42	2.018	67	1.996
18	2.101	43	2.017	68	1.995
19	2.093	44	2.015	69	1.995
20	2.086	45	2.014	70	1.994
21	2.080	46	2.013	71	1.994
22	2.074	47	2.012	72	1.993
23	2.069	48	2.011	73	1.993
24	2.064	49	2.010	74	1.993

Los grados de libertad (g.l) se fijan con base a la fórmula indicada en el subíndice del símbolo de la t de student.



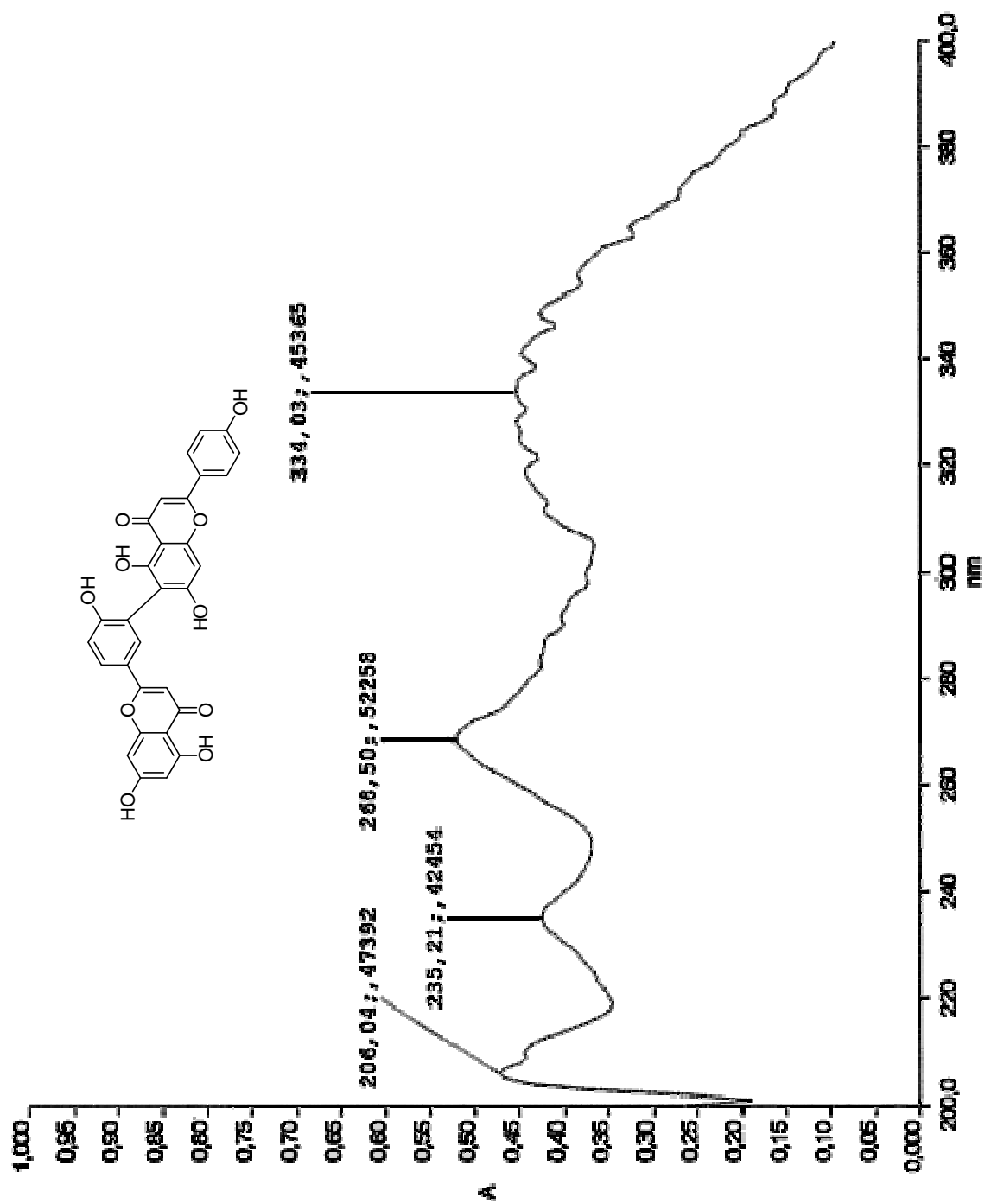
A-4. Valores estadísticos de la distribución F de Fisher.

g. l numerador = 2

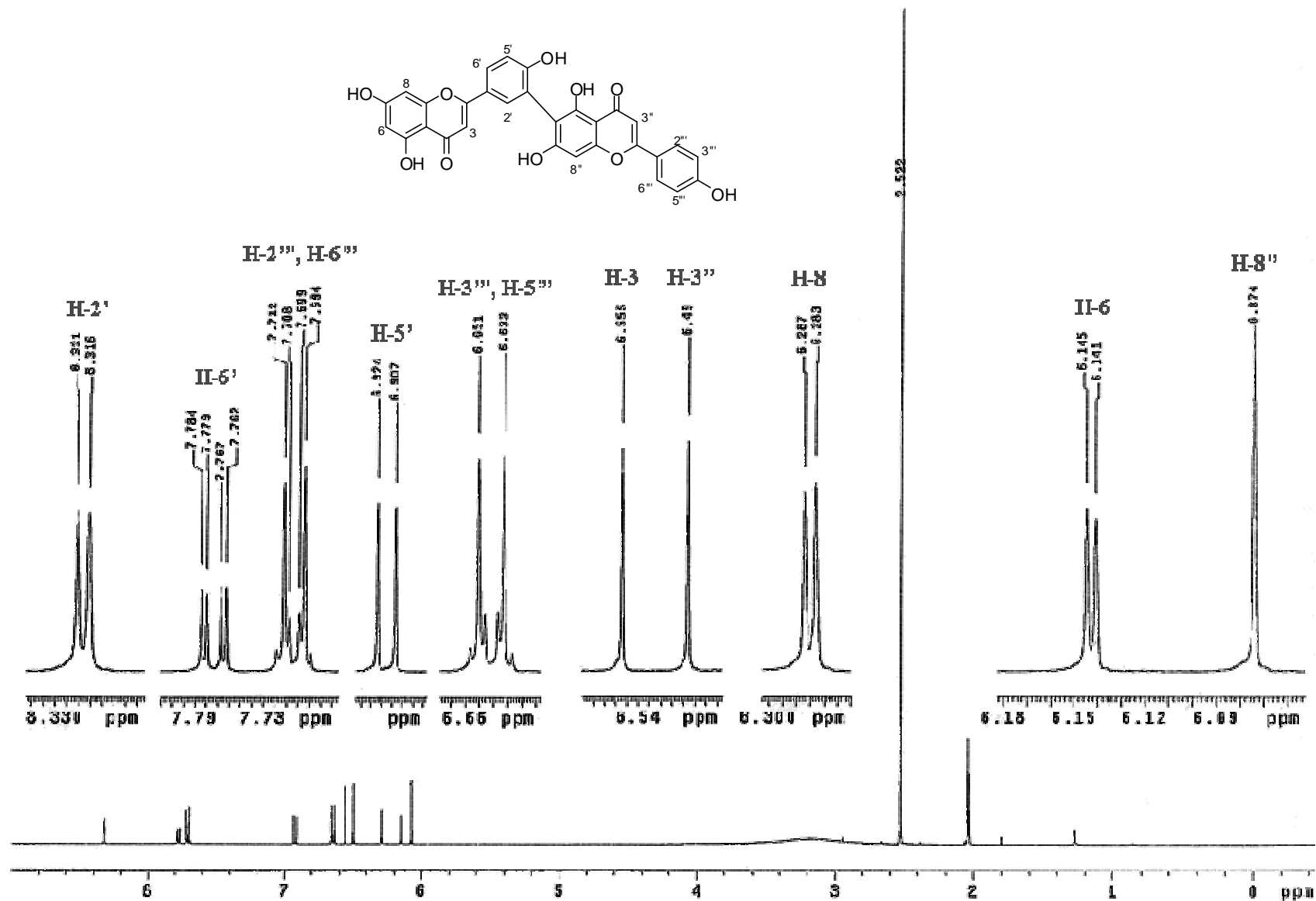
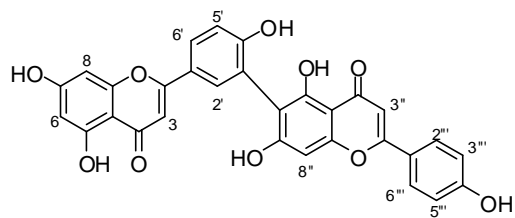
g.l denom.	Probabilidad de la cola						
	0.20	0.10	0.05	0.025	0.01	0.001	0.0001
1	12.00	49.50	199.50	799.50	4999.50	499999.50	50000000
2	4.00	9.00	19.00	39.00	99.00	999.00	9999
3	2.89	5.46	9.55	16.04	30.82	148.50	694.74
4	2.47	4.32	6.94	10.65	18.00	61.25	198.00
5	2.26	3.78	5.79	8.43	13.27	37.12	97.03
6	2.13	3.46	5.14	7.26	10.92	27.00	61.63
7	2.04	3.26	4.74	6.54	9.55	21.69	45.13
8	1.98	3.11	4.46	6.06	8.65	18.49	36.00
9	1.93	3.01	4.26	5.71	8.02	16.39	30.34
10	1.90	2.92	4.10	5.46	7.56	14.91	26.55
11	1.87	2.86	3.98	5.26	7.21	13.81	23.85
12	1.85	2.81	3.89	5.10	6.93	12.97	21.85
13	1.83	2.76	3.81	4.97	6.70	12.31	20.31
14	1.81	2.73	3.74	4.86	6.51	11.78	19.09
15	1.80	2.70	3.68	4.77	6.36	11.34	18.11
16	1.78	2.67	3.63	4.69	6.23	10.97	17.30
17	1.77	2.64	3.59	4.62	6.11	10.66	16.62
18	1.76	2.62	3.55	4.56	6.01	10.39	16.04
19	1.75	2.61	3.52	4.51	5.93	10.16	15.55
20	1.75	2.59	3.49	4.46	5.85	9.95	15.12
21	1.74	2.57	3.47	4.42	5.78	9.77	14.74
22	1.73	2.56	3.44	4.38	5.72	9.61	14.41
23	1.73	2.55	3.42	4.35	5.66	9.47	14.12
24	1.72	2.54	3.40	4.32	5.61	9.34	13.85
25	1.72	2.53	3.39	4.29	5.57	9.22	13.62
26	1.71	2.52	3.37	4.27	5.53	9.12	13.40
27	1.71	2.51	3.35	4.24	5.49	9.02	13.21
28	1.71	2.50	3.34	4.22	5.45	8.93	13.03
29	1.70	2.50	3.33	4.20	5.42	8.85	12.87
30	1.70	2.49	3.32	4.18	5.39	8.77	12.72
40	1.68	2.44	3.23	4.05	5.18	8.25	11.70
60	1.65	2.39	3.15	3.93	4.98	7.77	10.78
80	1.64	2.37	3.11	3.86	4.88	7.54	10.36
100	1.64	2.36	3.09	3.83	4.82	7.41	10.11
120	1.63	2.35	3.07	3.80	4.79	7.32	9.95
140	1.63	2.34	3.06	3.79	4.76	7.26	9.84
∞	1.61	2.30	3.00	3.69	4.61	6.91	9.21



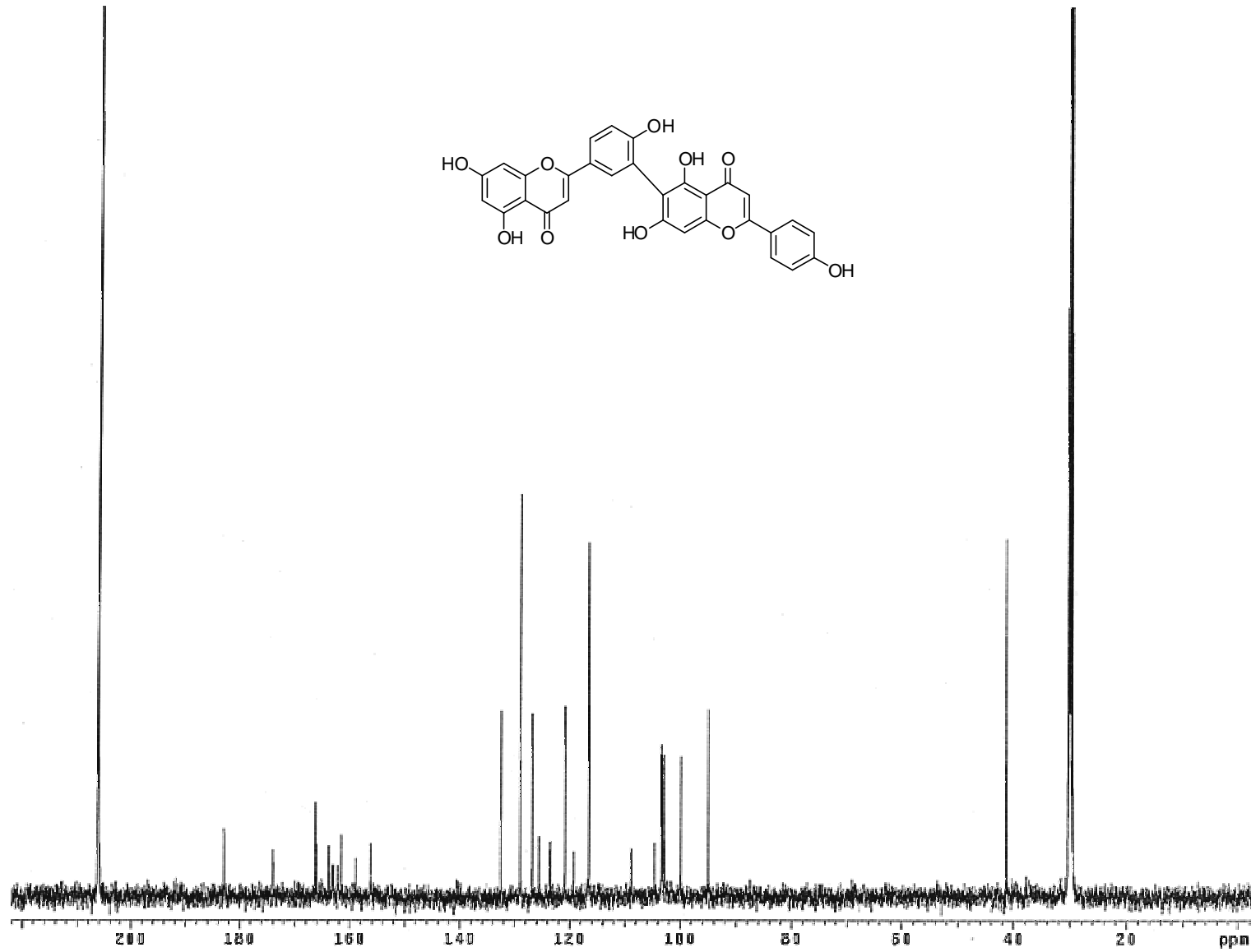
A-5. Espectros de biflavonoides



Espectro 1. Espectro en el UV de robustaflavona

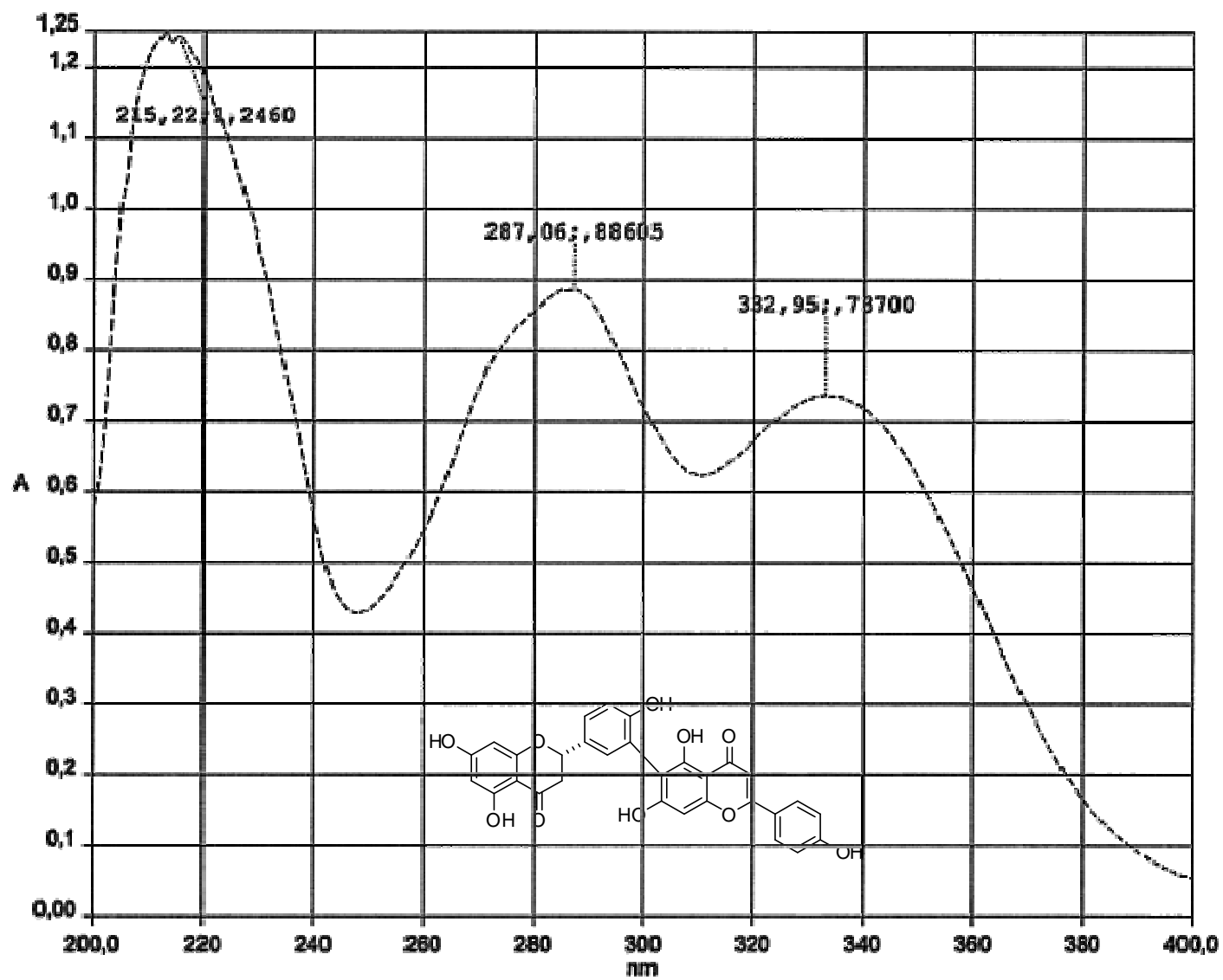


Espectro 2. Espectro de RMN ¹H de robustaflavona



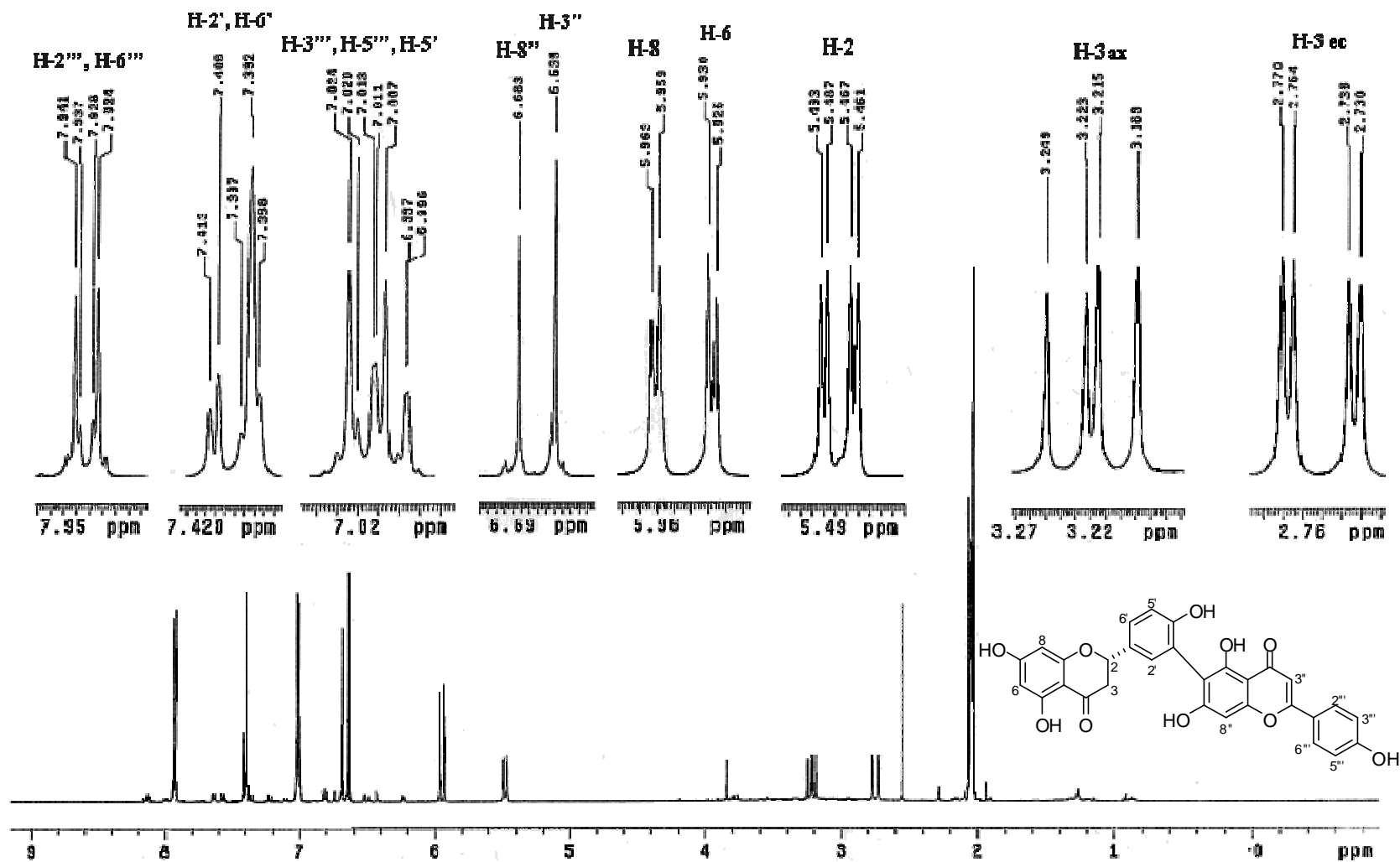
Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C de robustaflavona





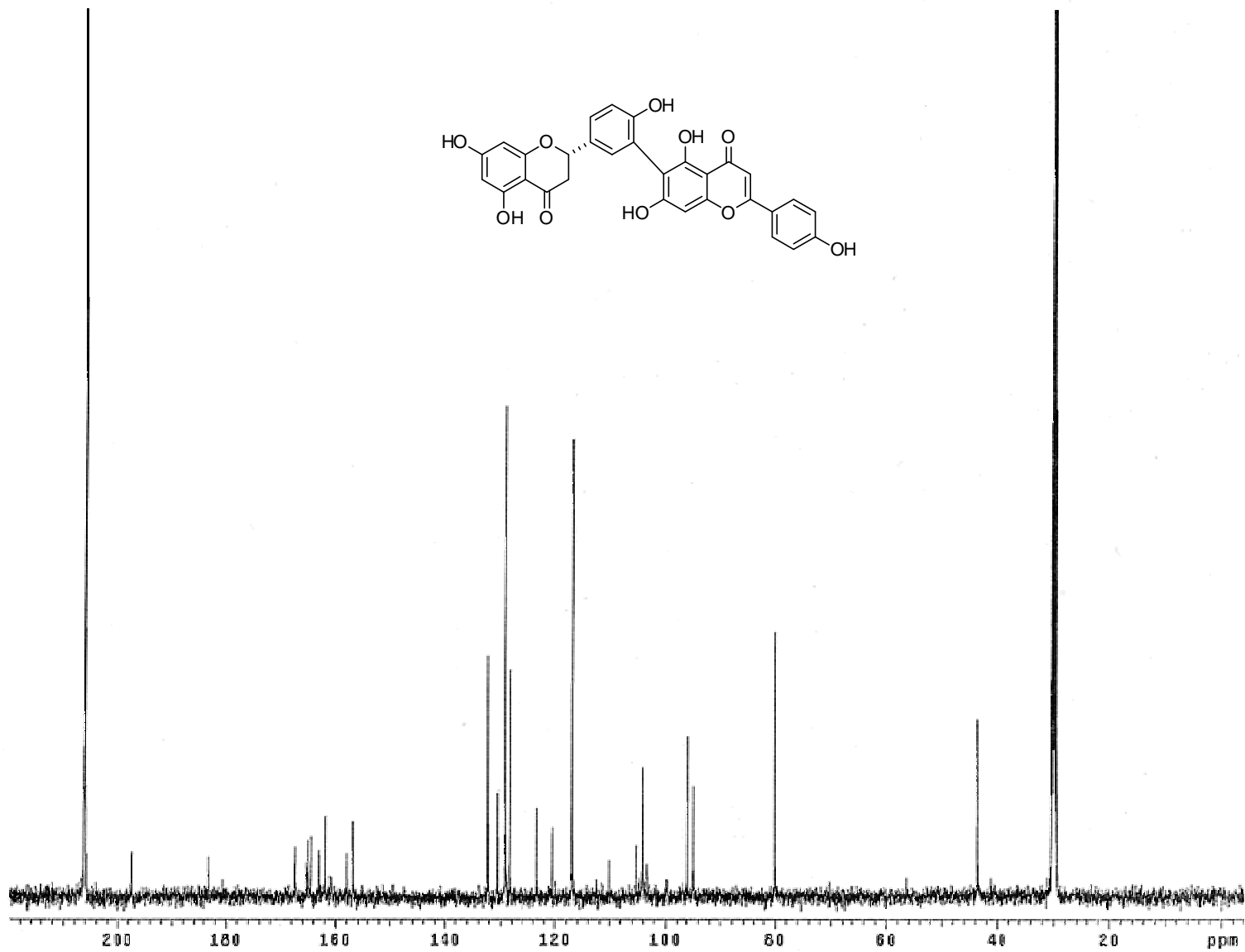
Espectro 4. Espectro en el UV de (2S)-2,3-dihidro-robusflavona



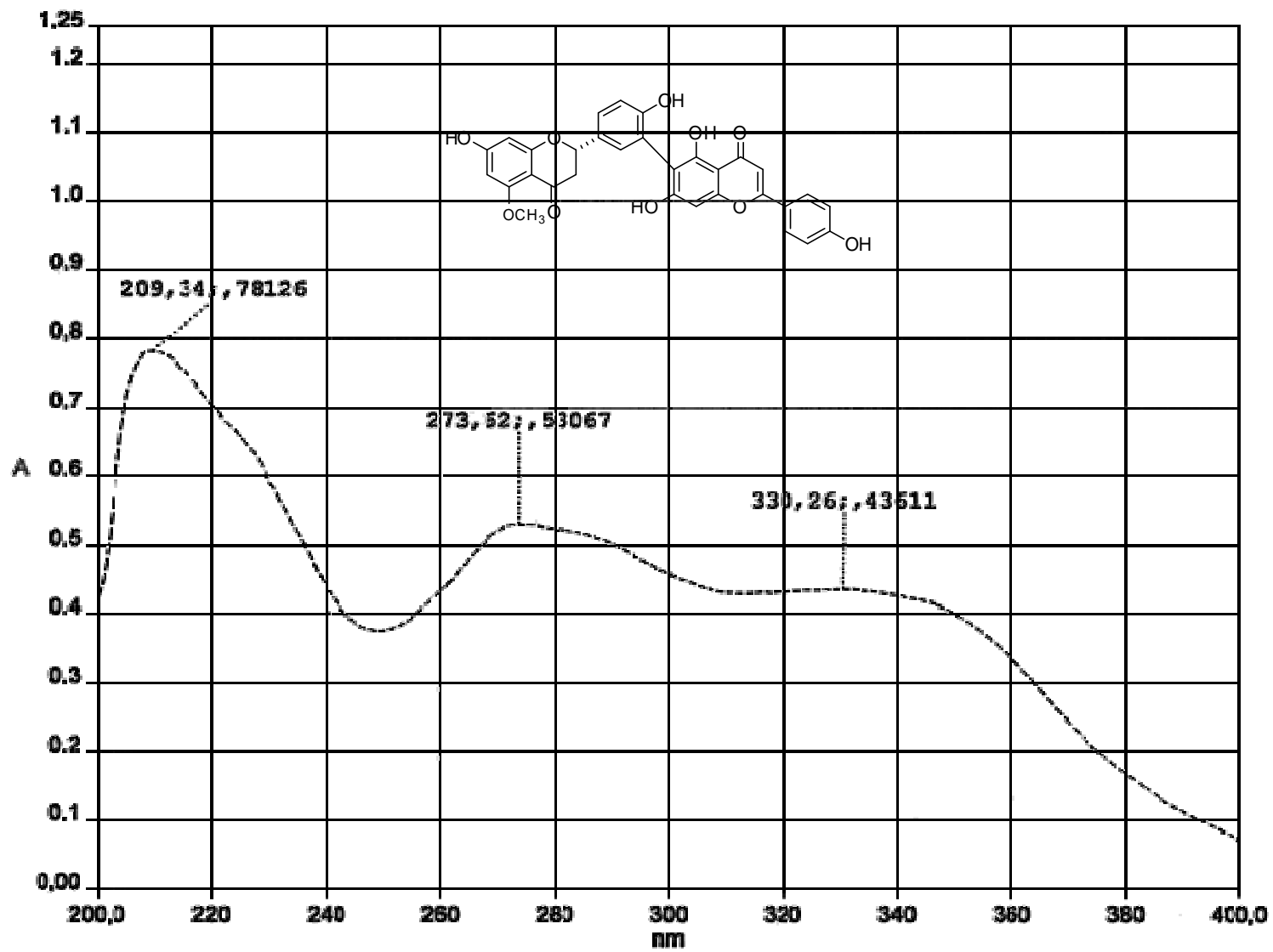


Espectro 5. Espectro de RMN ^1H de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona



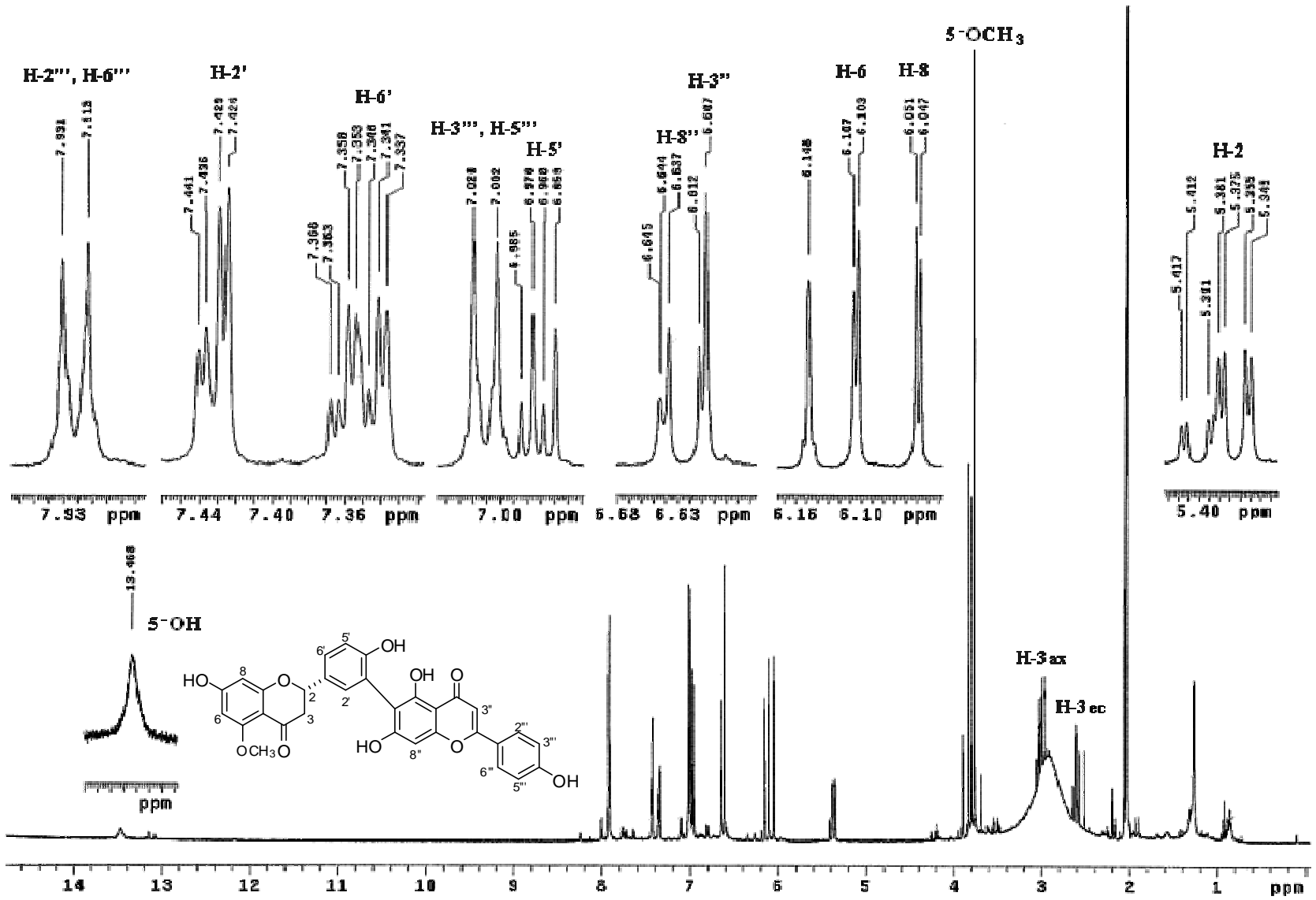


Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C de (2S)-2,3-dihidro-robustaflavona

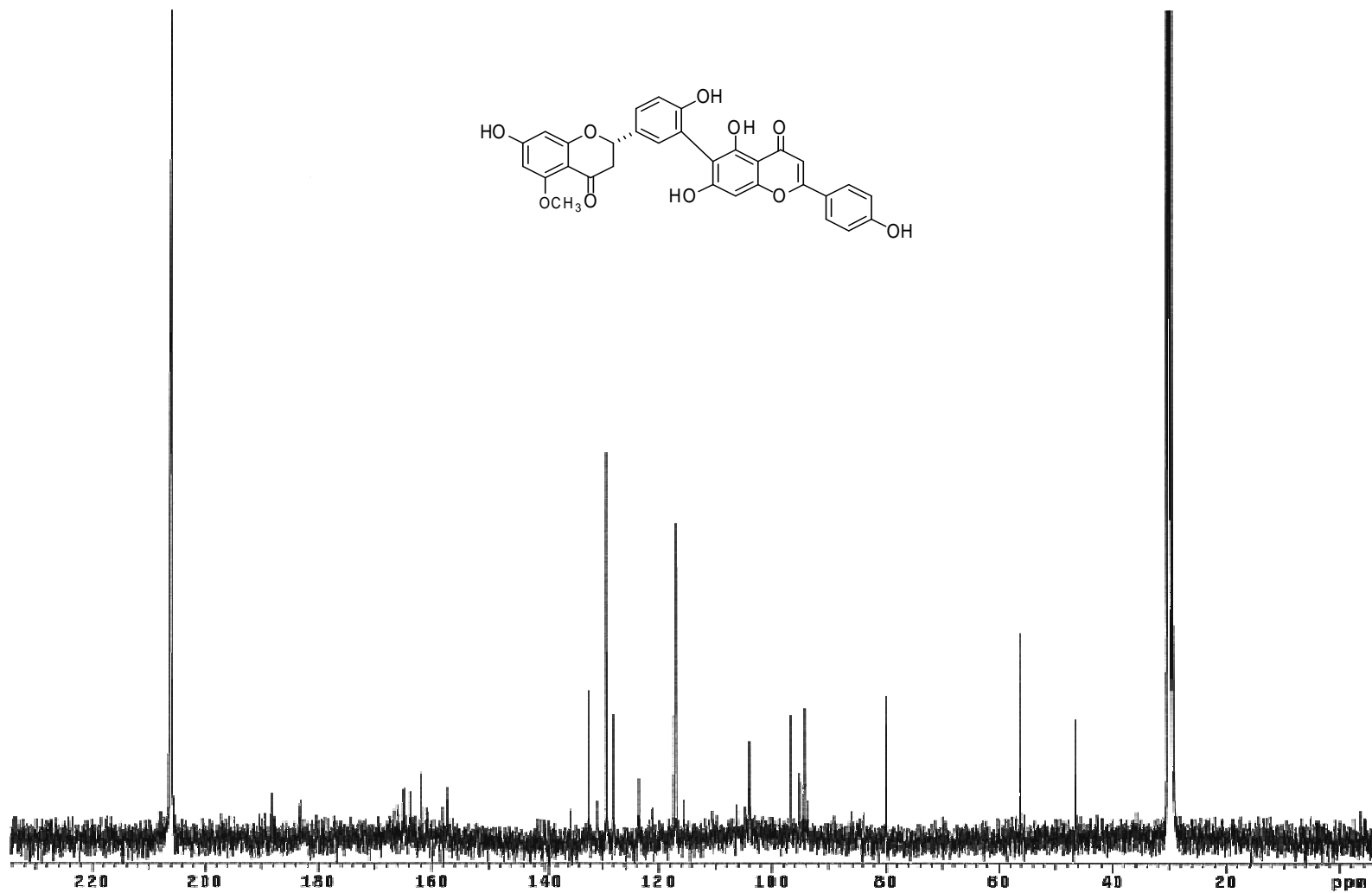


Espectro 7. Espectro en el UV de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robusflavona





Espectro 8. Espectro de RMN ¹H de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robusflavona

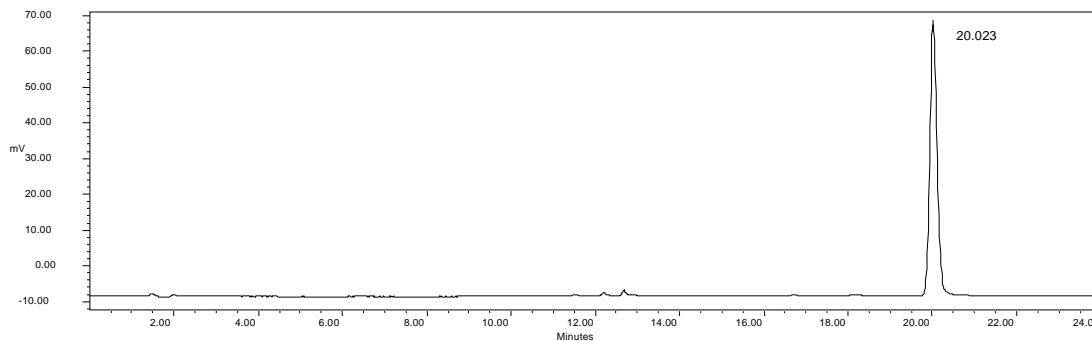


Espectro 9. Espectro de RMN ¹³C de (2S)-2,3-dihidro-5-metoxi-robustaflavona

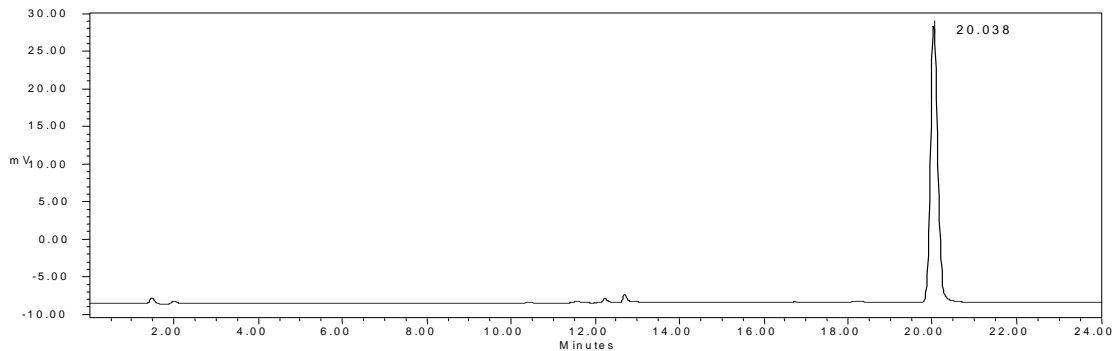


A-6. Cromatogramas obtenidos como resultado de la purificación de 5e

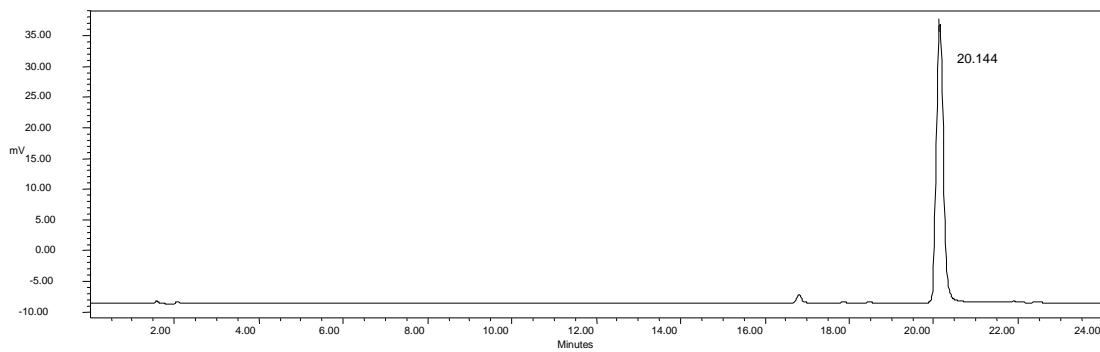
F1-2-P-5e



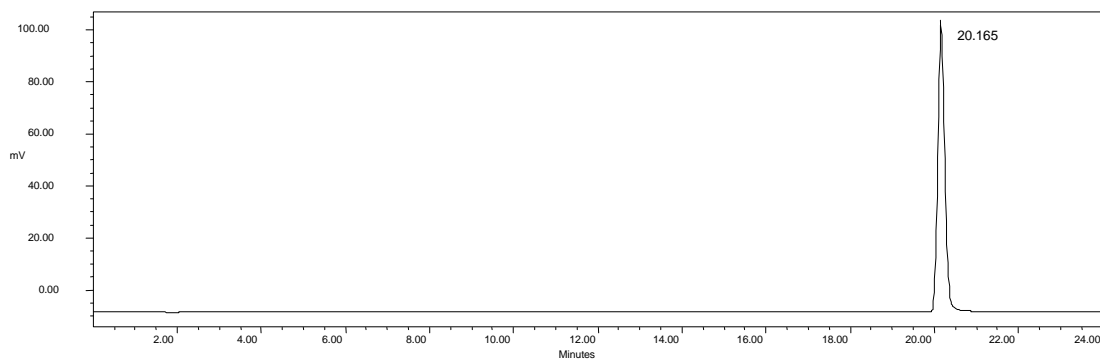
F3-P-5e



F4-2P-5e

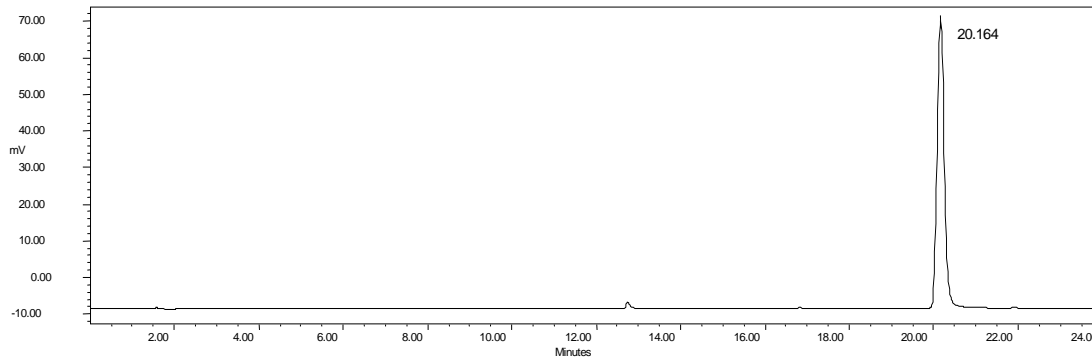


F5-P-5e

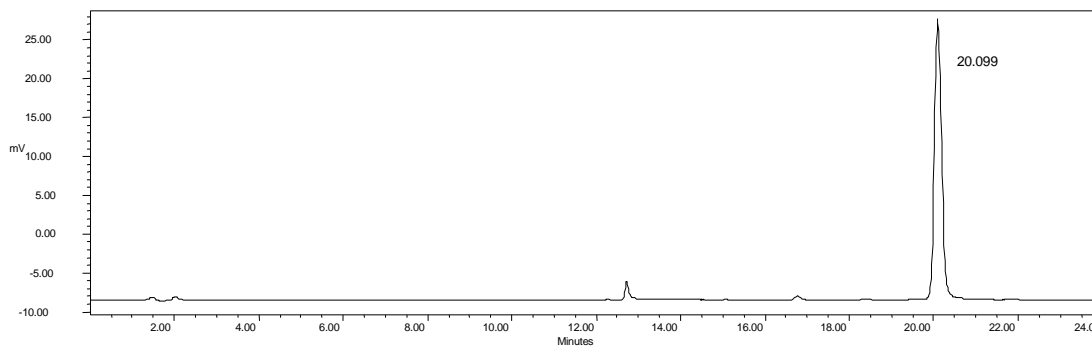




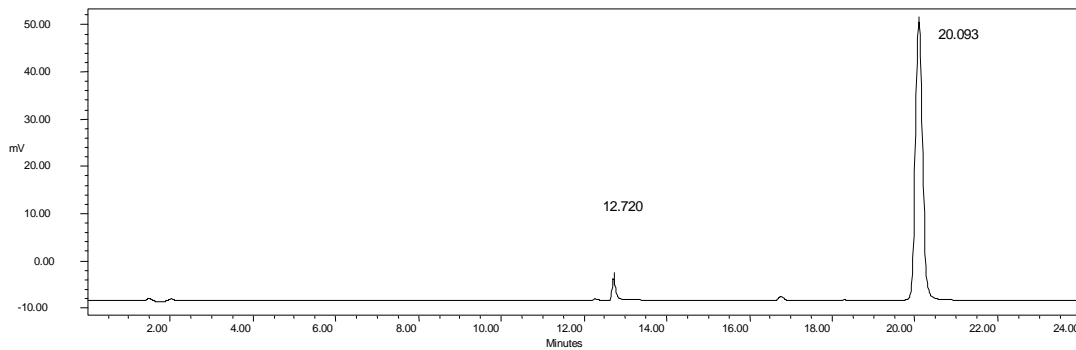
F7-P-5e



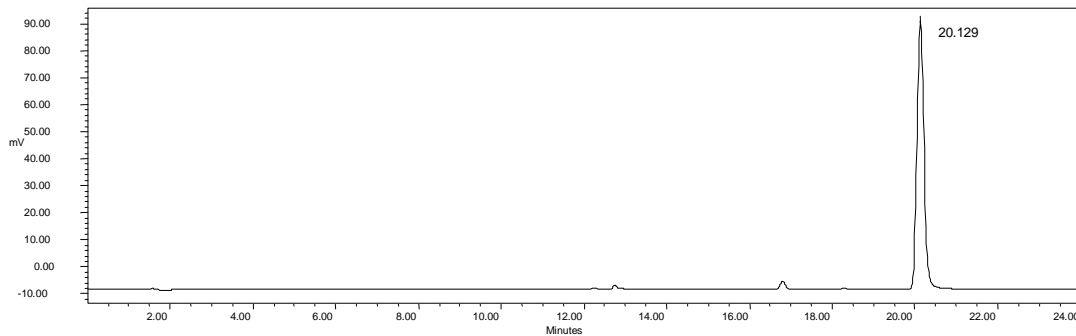
F8-1P-5e



F8-2P-5e

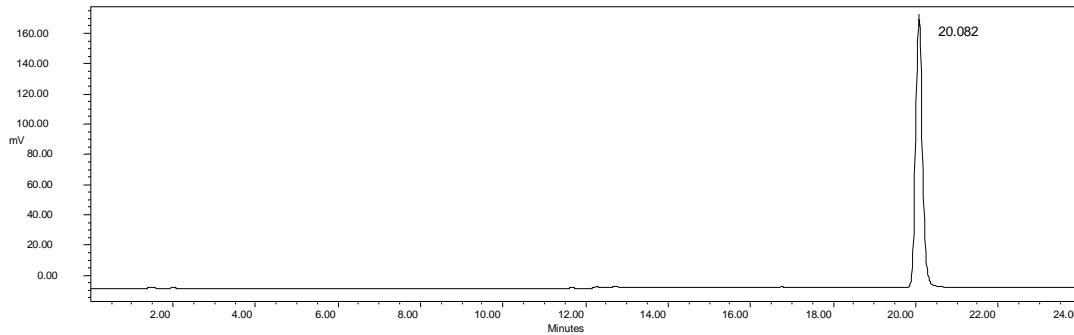


F9-P-5e

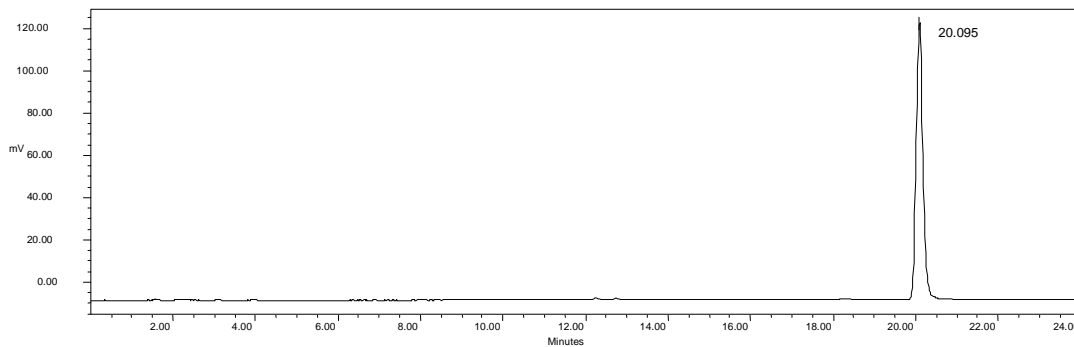




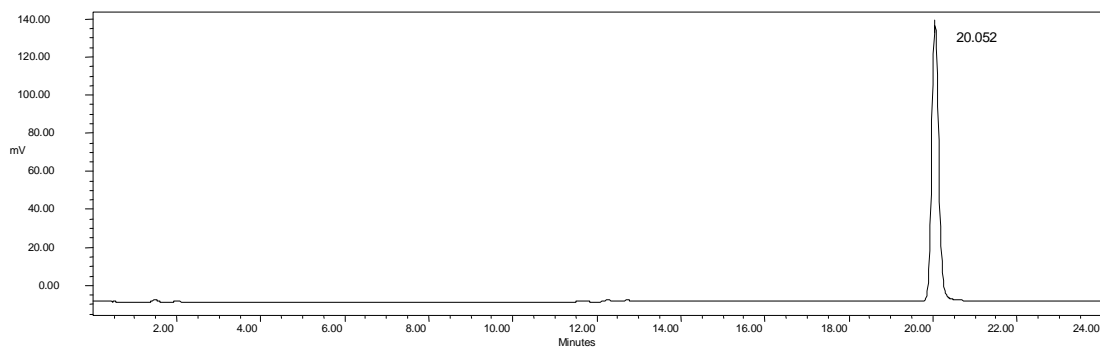
F10-P-5e



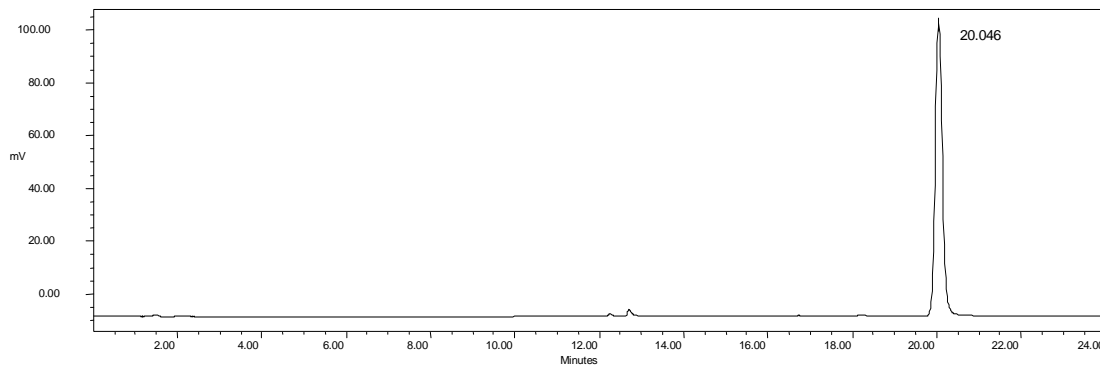
F11-1.2-P-5e



F12-1.2-P-5e

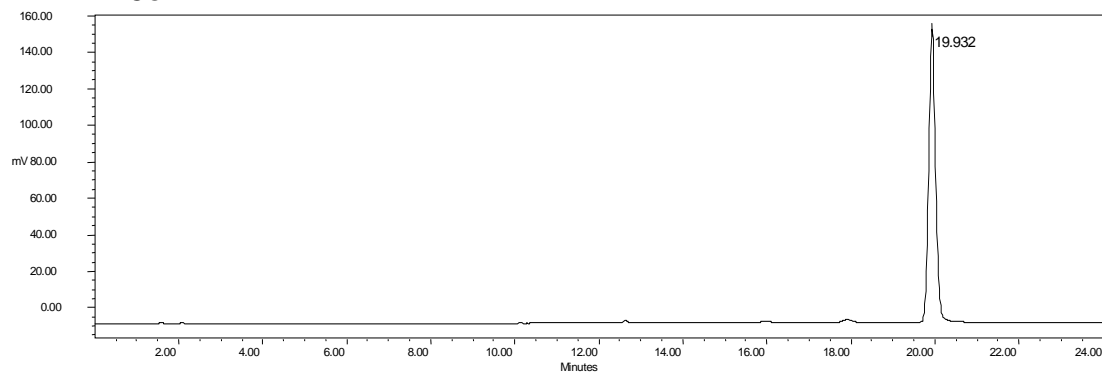


F13-P-5e





F14-1.2-P-5e



F15-P-5e

