



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR
CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFININA EN LA PLANTA
MEDICINAL *Heliopsis longipes* (Compositae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

NANCY ELIZABETH CASTILLO ORTEGA



MÉXICO, D.F

2009



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente María Isabel Aguilar Laurents

Vocal Rachel Mata Essayag

Secretario José Fausto Rivero Cruz

1er suplente Isabel del Carmen Rivero Cruz

2º suplente Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio de elaboración de la Tesis:

Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de
Química UNAM

ASESOR

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SUSTENTANTE

Nancy Elizabeth Castillo Ortega

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitir mi existencia y brindarme la oportunidad de concluir una etapa más en mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de ella y constituirme como profesionista.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por su paciencia, confianza, apoyo, interés y profesionalismo que ha mostrado durante el desarrollo de este proyecto, por ser una excelente persona en todos los aspectos.

A mis padres Irma y José, quienes sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para convertirme en una persona de provecho y quienes merecen toda mi admiración.

A mis hermanos Luz, Yasmin y José Carlos de quienes en todo momento he recibido apoyo, comprensión y confianza, pero principalmente les estaré agradecida por compartir toda su vida conmigo.

A mis abuelitos María de Jesús y Roberto, y a mis tíos Pedro, Roberto, Mario, Ramón, Luisa, María de Jesús, Silvia, Francisco y Gustavo quienes me han demostrado su cariño a través de sus buenas acciones y consejos, y a quienes les estaré eternamente agradecida por ayudarme a cumplir uno de mis mayores anhelos en la vida.

A mis amigos Karla, Silvia, Mar, Itzel, Ángeles, Carlos, Luis, Ricardo, Ricardo Trejo, Fabiola, Omar, Román y Néstor por ser de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de sí mismo sin recibir nada a cambio, por saber escucharme y brindarme su apoyo, primordialmente por enseñarme el verdadero valor y significado la amistad.

A mis compañeros de la escuela con quienes he compartido los momentos más importantes en mi vida, y por permitirme formar parte de la suya.

A los miembros que integran mi jurado, por el tiempo invertido y las pertinentes observaciones efectuadas.

A la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) en la Facultad de Química de la UNAM.

A las instituciones y personas ajenas a la UNAM, por el apoyo y servicios brindados.

.....GRACIAS

Este trabajo se desarrolló en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma de Morelos.

*La vida no es ningún pasillo recto y fácil
que recorremos libres y sin obstáculos,
sino un laberinto de pasadizos,
en el que tenemos que buscar nuestro camino,
perdidos y confusos, detenidos,
de vez en cuando, por un callejón sin salida.*

*Pero, si tenemos fe, siempre se abre
una puerta ante nosotros;
quizá no sea la que imaginamos,
pero sí será, finalmente,
la que ha de ser buena para nosotros.*

A.J.CRONIN

ABREVIATURAS

Å	Amstrongs
ACN	Acetonitrilo
b_1	Pendiente
b_0	Ordenada al origen
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en Capa Fina
$CDCl_3$	Cloroformo Deuterado
CL	Cromatógrafo de Líquidos
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CV	Coefficiente de variación
$CV_{y/x}$	Coefficiente de variación de regresión
$ d_i $	Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial
Dr	Doctor
<i>et al</i>	Colaboradores
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FD</i>	Factor de dilución
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FR	Factor de Respuesta
g	Gramos
hrs	Horas
Hz	Hertz
IC (μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional
IC (β_0)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC(β_1)	Intervalo de confianza para la pendiente
IR	Infrarrojo
Km	Kilómetros

LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Mili volts
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
N	Normalidad
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
seg	Segundos
r^2	Coeficiente de determinación
RA	Reactivo
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono Trece
s	Desviación estándar
Sb ₁	Desviación estándar de la pendiente
Sb ₀	Desviación estándar de la ordenada
S _{y/x}	Desviación estándar de regresión
UI	Unidades de Insulina
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

USAI	Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
\bar{x}	Media aritmética de x
\bar{y}	Media aritmética de y
\bar{y}_0	Media aritmética del análisis inicial
\bar{y}_i	Media aritmética de cada condición de almacenaje
%	Porcentaje

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Heliopsis longipes*
- Tabla 2.** Metabolitos aislados de *Heliopsis longipes*
- Tabla 3.** Cromatografía de Gases
- Tabla 4.** Cromatografía de Líquidos
- Tabla 5.** Condiciones óptimas para el desarrollo de la validación
- Tabla 6.** Parámetros de desempeño
- Tabla 7.** Condiciones óptimas para el desarrollo de la validación
- Tabla 8.** Datos para la evaluación de linealidad del sistema.
- Tabla 9.** Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del sistema.
- Tabla 10.** Valores obtenidos para la determinación de la precisión del sistema.
- Tabla 11.** Datos para la estimación del parámetro de adecuabilidad.
- Tabla 12.** Parámetros de desempeño
- Tabla 13.** Áreas, FR y %CV obtenidos para la evaluación de la linealidad del método.
- Tabla 14.** Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del método
- Tabla 15.** Porcentajes de recobro calculados a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas, para la linealidad del método.
- Tabla 16.** Porcentajes de recobro calculados a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas, para la repetibilidad del método.
- Tabla 17.** Parámetros estadísticos evaluados para la repetibilidad del método.
- Tabla 18.** Áreas obtenidas para la evolución de la precisión intermedia.
- Tabla 19.** Parámetros estadísticos calculados para la evaluación de la precisión intermedia.
- Tabla 20.** Áreas obtenidas para la estimación de la estabilidad de afinina para cada condición de almacenaje.

Tabla 21. Parámetros estadísticos para la evaluación de estabilidad.

Tabla 22. Cantidad de afinina contenida en el extracto fresco.

Tabla 23. Cantidad de afinina contenida en el extracto seco.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Heliopsis longipes*, *Heliopsis annua*, *Heliopsis scabra*, *Heliopsis helianthoides*.
- Figura 2.** Distribución geográfica de *Heliopsis longipes* en la República Mexicana.
- Figura 3.** Estructura química de la afinina.
- Figura 4.** Formación de las amidas.
- Figura 5.** Raíz de *Heliopsis longipes*.
- Figura 6.** Cromatografía en capa fina de los extractos correspondientes a la raíz seca y fresca de *Heliopsis longipes* con referencia de afinina .
- Figura 7.** Espectro en el IR de la afinina.
- Figura 8.** Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300MHz) de afinina.
- Figura 9.** Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75MHz) de afinina.
- Figura 10.** Espectro UV de la afinina.
- Figura 11.** Cromatograma de co-inyección del extracto de acetonitrilo de la raíz seca correspondiente y la solución de referencia de afinina.
- Figura 12.** Cromatograma de co-inyección del extracto de acetonitrilo de la raíz fresca correspondiente y la solución de referencia de afinina.
- Figura 13.** Cromatograma de la solución de referencia de la afinina correspondiente al 100% (100 µg/mL) con respecto a la solución de trabajo.
- Figura 14.** Cromatograma del extracto de acetonitrilo de la raíz fresca correspondiente al 100% de la solución de trabajo.
- Figura 15.** Cromatograma del extracto de acetonitrilo de la raíz seca correspondiente al 100% de la solución de trabajo.

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Curva de calibración para la linealidad del sistema.
- Gráfica 2.** Curva de calibración para la linealidad del método.
- Gráfica 3.** Curva obtenida para la evaluación de la exactitud del método.

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Plan de trabajo para la validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de afinina en *Heliopsis longipes*

INDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	I
LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE GRÁFICAS.....	VII
LISTA DE ESQUEMAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Familia Asteracea o Compositae.....	2
2.2 Género <i>Heliopsis</i>	2
2.3 <i>Heliopsis longipes</i> (Gray).....	4
2.3.1 Nombres comunes.....	4
2.3.2 Usos.....	5
2.3.3 Distribución geográfica.....	5
2.4 Composición química del género <i>Heliopsis</i>	6
2.5 Alcamidas.....	8
2.6 Plantas que contienen alcamidas.....	9
2.7 Cromatografía.....	11
2.7.1 Cromatografía en capa fina	12
2.7.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	13
2.8 Validación.....	16
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos particulares.....	18

4. PARTE EXPERIMENTAL	20
4.1 Material y Equipo.....	20
4.2 Reactivos.....	21
4.3 Material vegetal.....	21
4.4 Identificación de afinina en <i>Heliopsis longipes</i>	22
4.5 Preparación de la solución de referencia de afinina.....	22
4.6 Determinación de la concentración de la solución de referencia que representa el 100% de la solución de trabajo.....	22
4.7 Preparación de la solución de trabajo (extracto de raíces fresca y seca de <i>Heliopsis longipes</i>).....	23
4.8 Ensayos preliminares a la validación por CLAR.....	24
4.9 Desarrollo y validación del método para la cuantificación de afinina por CLAR.....	24
4.9.1 Validación del sistema por CLAR.....	26
4.9.2 Validación del método analítico por CLAR.....	27
4.10 Estabilidad analítica de la muestra.....	29
4.11 Cuantificación de afinina en <i>Heliopsis longipes</i>	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1 Identificación de afinina en extractos de <i>Heliopsis longipes</i>	31
5.2 Confirmación estructural de la afinina.....	32
5.3 Ensayos preliminares a la validación del método analítico por CLAR.....	33
5.4 Determinación de la concentración de la solución de referencia que representa el 100% de la solución de trabajo.....	36
5.5 Desarrollo y validación del método para la cuantificación de afinina por CLAR.....	37
5.5.1 Validación del sistema por CLAR.....	37
5.5.2 Validación del método analítico por CLAR.....	42
5.6 Estabilidad analítica de la muestra	48
5.7 Cuantificación de afinina en las raíces fresca y seca de <i>Heliopsis longipes</i>	50

6. CONCLUSIONES.....	53
7. BIBLIOGRAFIA.....	54
ANEXOS.....	58



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son el recurso vegetal más importante de la medicina tradicional. Su estudio es tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística. *Heliopsis longipes* (Gray) comúnmente llamado “chilcuague” es una planta de uso medicinal y culinario que crece al norte de Guanajuato, se utiliza como anestésico y analgésico local, así como antibiótico para infecciones de los aparatos digestivo y respiratorio. Además se utiliza como condimento en los platillos de la región. Crece en forma silvestre en 18 comunidades de los municipios de Xichú, Atarjea y Victoria. Esta especie del género *Heliopsis* se caracteriza por el alto contenido de alcaloides en sus raíces. La afinina es la alcaloide mayoritaria en las raíces de esta planta y la principal responsable de los efectos biológicos observados, entre los que se destacan el efecto analgésico en dolor de muelas, la acción anestésica y las propiedades insecticidas. Sin embargo, los estudios taxonómicos y fitoquímicos realizados sobre *Heliopsis longipes* son muy escasos, de allí la necesidad de dar un seguimiento en su investigación (Correa *et. al*, 1971; Martínez, 1994; García-Chávez *et. al*, 2004).

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), es una técnica que permite la separación de sustancias y que ha resultado ser adecuada para la identificación, obtención y cuantificación de metabolitos presentes en plantas medicinales. En el presente trabajo se desarrolló un método analítico para cuantificar afinina en raíces frescas y secas de *Heliopsis longipes* con base en la técnica CLAR.



2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Asteraceae o Compositae

Las asteráceas también denominadas compuestas son plantas que pertenecen a la tribu Heliantheae, que comprende cerca de 2,500 especies agrupadas en 189 géneros y se encuentra fraccionada en diez subtribus. *Heliopsis*, *Zinnia*, *Philactis*, *Sanvitalia*, *Acmella*, *Podachaenium*, *Squamopappus*, *Spilanthes* y *Salmea*, conforman la subtribu Zinniinae (Bremer, 1994), cuyos miembros comparten, en su morfología, la presencia de capítulos solitarios, receptáculos cónicos o hemisféricos, flores liguladas pistiladas, fértiles y persistentes, flores del disco fértiles y aquenios del disco lateralmente comprimidos o angulados. Las Compuestas presentan una considerable importancia ecológica y económica que comprenden plantas ornamentales, alimenticias, oleaginosas y medicinales. Los miembros de esta familia se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos, conquistando todos los hábitats disponibles, desde los desiertos secos hasta los pantanos y desde las selvas hasta los picos montañosos (www.conabio.gob.com.mx/institucion/proyectos/resultados/InU029.pdf)

2.2. Género *Heliopsis*

Este género está representado por 14 especies conocidas (*H. filifolia*, *H. longipes*, *H. sinaloenses*, *H. annua*, *H. anomala*, *H. novogaliciana*, *H. parviceps*, *H. procumbens*, *H. buphthalmoides*, *H. parviflora*, *H. decumbens*, *H. gracilis*, *H. helianthoides*, *H. lanceolata*) (**Figura 1**), aunque tal número varía con el criterio de los diferentes autores. La mayor parte de los representantes de *Heliopsis* son plantas perennes con la excepción de cinco especies anuales (*H. annua*, *H. anomala*, *H. filifolia*, *H. parviceps* y *H. sinaloensis*) endémicas de México (García-Chávez *et. al.*, 2004).



Figura 1. *Helianthus longipes*, *Helianthus annuus*, *Helianthus scabra*, *Helianthus helianthoides*.

Las especies que conforman este género son plantas herbáceas perennes o anuales con hojas opuestas o a veces alternas, subenteras a dentadas; cabezuelas terminales o axilares; involucro hemisférico a anchamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, las exteriores a menudo herbáceas; receptáculo convexo a cónico, provisto de páleas persistentes; flores liguladas fértiles, sus corolas sésiles (carentes de tubo), persistentes, amarillas, rojas o moradas; flores del disco hermafroditas aunque a veces mayormente estériles, sus corolas tubulosas, amarillas, amarillo-cafés o moradas; anteras con las bases brevemente aflechadas; ramas del estilo de las flores hermafroditas lineares, aplanadas, provistas de apéndice corto; aquenios gruesos, 3 a 4-angulares, vilano ausente (Rzedowski, *et. al.*, 2001).

En la **Tabla 1** se muestra la clasificación taxonómica de *H. longipes* (www.itis.gov/download/download.do)

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Heliopsis longipes*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Orden	Magnoliopsida
Clase	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Heliopsis</i>
Especie	<i>H. longipes</i>

2.3. *Heliopsis longipes* (Gray)

2.3.1. Nombres comunes

Heliopsis longipes (Gray) tiene una larga tradición en la herbolaria indígena como lo indican sus denominaciones de origen náhuatl. Algunos nombres registrados son: ichcha, citado en la traducción de la obra del Dr. Francisco Hernández “De historia plantarum Novae Hispaniae”; chilcuán o chilcuague, significando chile de víbora; chilmécatl, de chili, chile y mécatl, mecate, aludiendo a las raíces filiformes y al sabor picante de éstas (Martínez, 1989); chilicau, nombre que se usa en el municipio de San Joaquín, en Querétaro. En la actualidad se puede encontrar esta especie comercializada en los puestos de hierbas medicinales de casi todo el país con nombres más modernos como raíz de oro y raíz azteca (Martínez, 1989).



2.3.2. Usos

En la medicina popular se emplea como analgésico, anestésico local y como antibiótico para infecciones de los aparatos respiratorio y digestivo. También se utiliza para condimentar diversos platillos (Molina-Torres *et. al.*, 2001). Por sus propiedades insecticidas, fue una de las plantas descubiertas por los Estados Unidos durante la segunda guerra mundial, observando que los extractos de estas raíces tienen acción parálitica y toxicidad contra insectos (Little, 1948).

Otras actividades biológicas que se han atribuido al chilcuague son: actividad antiviral, en el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes; actividad fungicida, en el tratamiento de pie de atleta; actividad molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales. (Molina-Torres y García Chávez, 2001).

2.3.3. Distribución geográfica

La distribución geográfica de *Heliopsis longipes* comprende principalmente la parte noroeste de Guanajuato, en la sierra Gorda, cerca de la carretera desde San Luis de la Paz en dirección oriental a las comunidades Xichú, Palmillas, Vergel, Macuala, Ahorcados, Charco azul hasta Santa Catarina. También al sur de San Luis Potosí y en la región norte de Querétaro. En la **Figura 2** se muestra la distribución geográfica de *Heliopsis longipes* en la República Mexicana.



Figura 2. Distribución geográfica de *Heliopsis longipes* en la República Mexicana

2.4. Composición química del género *Heliopsis*.

En el género *Heliopsis* sólo se han encontrado alcanidas alifáticas y acetilénicas. *H. longipes* fue la primera especie en la que se determinó la presencia de una alcanida olefínica, formada a partir de un ácido graso de cadena alifática de 10 átomos de carbono con tres insaturaciones unido a una isobutilamina, probablemente producto de descarboxilación de la leucina (Acree *et. al.*, 1945; Ramirez-Chávez *et. al.*, 2000). Sin embargo, la planta cuya muestra de raíces fue sometida para su análisis en laboratorio resultó erróneamente identificada como *Erigeron affinis* y así, la amida aislada fue denominada afinina. El descubrimiento de la afinina, como compuesto insecticida en esta especie, despertó interés por su notoria actividad. La afinina (**Figura 3**) es la alcanida mayoritaria en las raíces de esta planta y la principal responsable de los efectos biológicos específicos observados, entre los que se pueden considerar la acción de anestésico local, el estímulo organoléptico, así como la actividad insecticida y bactericida. Por mucho tiempo se consideró a la afinina como único componente bioactivo en esta especie, cuyo extracto crudo se ha utilizado para el estudio de sus aplicaciones, mismas que recientemente se han extendido (Romero *et. al.*,



1989; Gutiérrez-Lugo *et. al.*, 1996) mostrando un potencial agronómico importante en el control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos (Ramírez-Chávez *et. al.*, 2000).

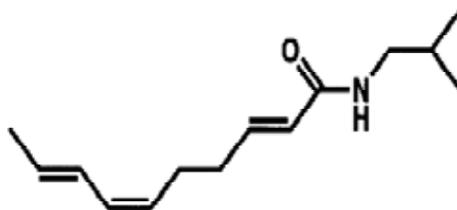


Figura 3. Estructura química de la afinina

El análisis fitoquímico más detallado de las raíces de *H. longipes* ha revelado la presencia de otros principios bioactivos y de propiedades antimicrobianas de algunas alcanidas individuales (Molina-Torres *et. al.*, 2001). En la siguiente tabla se muestran los metabolitos secundarios que se han aislado a partir de *Heliopsis longipes* (Gray).

Tabla 2. Metabolitos aislados de *Heliopsis longipes*

Metabolito secundario	Referencia
<i>N</i> -isobutildecanamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -monoendecamida	Wang-Hong <i>et. al.</i> , 1999 García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
<i>N</i> -isobutil-6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -diendecamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -triendecamida	Molina-Torres, 1999. Ríos y Aguilar, 2004 García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -en-8,10-diinundecamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -triendecamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004



3β -sn-glicerol-(1''-palmitoxi)urs-12-ene	Ríos y Aguilar, 2004
3(18)-ursen- 3β - 3β acetato	Misra <i>et. al.</i> , 1984 Ríos y Aguilar, 2004
3(18)-ursen- 3β -ol	Misra <i>et. al.</i> , 1984 Ríos y Aguilar, 2004
N-isobutil-2Z,4E-dien-8,10-diinundecamida	Bauer <i>et.al.</i> , 1989 Ríos y Aguilar, 2004
N-isobutil-2E-en-8,10-diinundecamida	Bauer <i>et.al.</i> , 1988 Ríos y Aguilar, 2004
N-isobutil-2E,4E-dien-8,10-diinundecamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
N-isobutil-2E,4Z,8Z,10E-tetraendodecamida	García-Chávez <i>et. al.</i> , 2004
2E,6Z,8E-triendecanoato de bornilo	Molina <i>et. al.</i> , 1996
4:6 2'-hidroxihinokina	Wang-Hong <i>et. al.</i> , 1999 Ríos y Aguilar, 2004
β -sitosterol	Aldrich library spectra, 1992a

2.5. Alcamidas

La condensación química de un ácido con una amina resulta en la formación de una amida (**Figura 4**). El grupo funcional amida es ubicuo, se encuentra en todos los organismos vivos constituyendo los enlaces peptídicos, esto es, la unión entre los aminoácidos para la formación de la estructura primaria de las proteínas, moléculas que son la base de la vida como la conocemos hasta ahora. Las amidas como metabolitos secundarios, por otra parte, no son tan frecuentes. Un ejemplo interesante de este grupo de compuestos es el de las alquilamidias o alcamidas que comprenden un conjunto de aproximadamente 70 estructuras conocidas, distribuidas en diversos niveles del reino vegetal (García-Chávez *et. al.*, 2004).



Figura 4. Formación de las amidas.

Las alcanidas representan una clase singular de productos naturales que, desde el punto de vista biogénico, se forman al combinarse dos diferentes rutas metabólicas. La parte ácida se origina de un ácido graso de longitud de cadena de mediana a larga, que puede ser de ocho a dieciocho carbonos, generalmente alifática o lineal; éste, al condensarse con un aminoácido y con descarboxilación concomitante, resulta en la producción de una alcanida. Las amidas cuya cadena ácida es alifática, dependiendo del tipo de enlaces insaturados que presenten, se pueden separar en dos grupos: las alcanidas olefínicas, con al menos una doble ligadura; y las alcanidas acetilénicas, con al menos una triple ligadura (Greger, 1984). Otro conjunto lo constituyen las amidas que presentan anillos homo o heterocíclicos. Este tipo de estructuras se observan en forma particularmente diversa en la familia Piperaceae e incluye a varios alcaloides (Parmar *et. al.*, 1997).

2.6. Plantas que contienen alcanidas.

Las alcanidas, por su actividad bactericida, insecticida y fungicida, deben constituir un elemento de defensa en especies vegetales pertenecientes a grupos taxonómicos muy distantes. Estos metabolitos constitutivos se han encontrado hasta la fecha en diez familias: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae y Solanaceae. En la subtribu Zinniinae de la familia Asteraceae presentan alcanidas los géneros *Heliopsis*, *Acmella*, *Sanvitalia* y *Salmea* (Greger, 1984; Christensen y Lam, 1991; Christensen, 1992) y su estudio puede revelar importancia quimiotaxonómica. En general



las especies en que se han encontrado alcanidas, frecuentemente han sido utilizadas por el hombre como plantas medicinales.

A continuación se describen brevemente algunos ejemplos de especies más que sintetizan alcanidas:

-*Acmella radicans*: pertenece a la familia *Asteraceae*, se encuentra distribuida desde nuestras latitudes hasta Sudamérica (Colombia), en esta planta la cantidad de alcanidas es menor a la encontrada en *Heliopsis longipes*. Entre las alcanidas producidas por *Acmella* también podemos encontrar a la afinina aunque en menor proporción. Las alcanidas se encuentran presentes en las partes aéreas, pero principalmente en los tallos y cabezas florales (Molina-Torres y García Chávez, 2001).

-*Echinacea purpurea*: esta planta pertenece a la familia *Asteraceae* se ha incorporado a la agricultura y al uso ornamental, en el comercio de hierbas medicinales se le considera como complemento alimentario o *botanicals*, de acuerdo a la clasificación de la *Food and Drug Administration* (FDA). Entre sus propiedades terapéuticas se encuentra la estimulación del sistema inmune contra infecciones por virus, hongos y bacterias, dichas características terapéuticas se atribuyen principalmente a sus tres ingredientes activos: dos equinocósidos, el polisacárido heteroxilán y las alcanidas olefinicas presentes (Molina-Torres y García Chávez, 2001).

-*Achillea millefolium*: esta planta pertenece a la familia *Asteraceae*, es una planta perenne nativa de Eurasia. Se le atribuyen propiedades astringentes, antisépticas, cicatrizantes, antiinflamatorias y anestésicas. Se han indentificado decenas de compuestos activos, entre los que destacan varias alcanidas olefinicas y acetilénicas (Molina-Torres y García Chávez, 2001).



-*Capsicum annum*: pertenece a la familia *Solanaceae*, presenta propiedades organolépticas importantes, su compuesto bioactivo es la alquenamida capsaicina, la cual se diferencia estructuralmente de la afinina en la presencia de un anillo aromático y la carencia de una doble ligadura conjugada al carbonillo (Molina-Torres y García Chávez, 2001).

-*Piper nigrum* (entre otras especies de *Piper*): de la familia *Piperaceae*, es una planta perenne originaria del sudoeste de la India y la costa de Malabar. Se le atribuyen efectos como depresor en el sistema nervioso, antipirético, analgésico y antiinflamatorio, debido a la alcaloide presente llamada piperina (Molina-Torres y García Chávez, 2001).

2.7. Cromatografía

La Cromatografía es una técnica desarrollada a principios del siglo XX, que permite la separación de sustancias que se encuentran en una mezcla. El nombre de cromatografía se debe a que las primeras separaciones se llevaron a cabo con pigmentos de plantas, los cuales se observan como bandas coloridas. En general, la cromatografía es un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados selectivamente por una fase móvil (gas o líquido) y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido. De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos (FEUM, 2000) (**Tablas 3 y 4**).

Tabla 3. Cromatografía de Gases

Cromatografía Gas-Líquido (partición)	Cromatografía Gas-Sólido (adsorción)
---	--

**Tabla 4.** Cromatografía de líquidos

<i>Cromatografía plana</i>	<i>Cromatografía en columna</i>
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía Líquido-Sólido (adsorción)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía Líquido-Sólido (partición)
	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión

2.7.1. Cromatografía en Capa Fina

Es una técnica particularmente valiosa para la determinación cualitativa de pequeñas cantidades de compuestos e impurezas. Esta técnica es una forma de cromatografía de adsorción y absorción que consiste en un soporte sólido o fase estacionaria (adsorbente), alúmina o gel de sílice por ejemplo, distribuido uniformemente sobre una superficie plana, generalmente vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente (FEUM, 2000).



La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo a las necesidades de separación aunque el factor más importante para que ésta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida.

El movimiento de cada sustancia en un determinado sistema característico puede ser un dato valioso en la identificación de ella. Esta característica se conoce con el nombre de factor de retención (R_f) y representa la distancia recorrida por el compuesto en relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores siempre oscilan entre 0 y 1 (FEUM, 2000).

$$R_f = \frac{\text{trayecto recorrido por un componente desde el origen}}{\text{trayecto recorrido por el frente de la fase móvil}}$$

Una vez eluida es necesario observar la placa cromatográfica después de haberla sometido a procesos de desarrollo de coloración, ya que la presencia de una gran cantidad de sustancias no se observan a simple vista, dependiendo del compuesto. Entre los agentes desarrolladores de color se encuentra la luz UV (254nm ó 365nm), luz visible o compuestos cromogénicos como el sulfato cérico amoniacal, entre otros (FEUM, 2000).

2.7.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Esta técnica es conocida también como Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE). El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación.



La migración diferencial en la CLAR es el resultado de la distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hasta un detector donde se registran sus concentraciones y los tiempos de retención en la columna. El cromatograma restante muestra cada compuesto que sale de la columna en forma de picos simétricos con un tiempo de retención característico por lo que este tiempo de retención puede emplearse para identificar el compuesto (FEUM, 2000).

Los mecanismos o procesos de separación que dan como resultado la retención de las moléculas de una muestra y parte de la fase estacionaria dan lugar a diferentes métodos de Cromatografía Líquida esto es: líquido-líquido o de partición, que consta de una fase estacionaria líquida de composición diferente a la de la fase móvil y son inmiscibles entre sí (FEUM, 2000).

Existen modificaciones en cada tipo de las cromatografías mencionadas, como en la cromatografía de fases enlazadas en la cual la fase estacionaria está unida químicamente a las partículas de soporte. Esta variante se puede llevar a cabo en fase normal o inversa; en la primera se utilizan empaques polares que funcionan de manera semejante a la cromatografía líquido-sólido (adsorción). La cromatografía de fase inversa, involucra una fase estacionaria relativamente poco polar con cadenas de hidrocarburos de 8 a 18 átomos de carbono unidos a los grupos silano del soporte y se utiliza por lo general con fases móviles muy polares para separar componentes poco polares (FEUM, 2000).

Esencialmente un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de las siguientes partes:



- a) Sistema de bombeo.- Tiene por objeto impulsar la fase móvil a través de la columna y debe cumplir ciertas especificaciones como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo constante.

- b) Sistema de Inyección.- Un factor muy importante para obtener una buena resolución en la separación es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. El más sencillo consiste en introducir la muestra manualmente con una jeringa, otra opción es la introducción de la muestra mediante un inyector automatizado, la ventaja de este sistema es que minimiza errores. Este dispositivo ayuda a mantener la reproducibilidad entre inyecciones y elimina el error en la medición del volumen inyectado.

- c) Detector.-Puede ser de dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente.

- d) Columna.- Se considera la parte fundamental en la cromatografía ya que es en ésta, en donde se va a llevar a cabo la separación. El material de empaque y dimensiones dependerán básicamente de la separación que se desea hacer.

- e) Registrador de señales.- Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que emite debe ser registrada por un graficador o un integrador. En el caso del graficador es necesario calcular manualmente el área obtenida, mientras que un integrador electrónico evita los errores en la medición de las áreas. Estos integradores registran las señales e imprimen el área de los picos de forma numérica.



2.8. Validación

De acuerdo a la FDA la validación es la evidencia documentada, que provee con un alto grado de seguridad que un proceso específico, produce consistentemente un producto de acuerdo a especificaciones predeterminadas y atributos de calidad (Alpizar y Hernández, 2004).

La validación se clasifica en (Alpizar y Hernández, 2004):

- Validación prospectiva.-Es aquella que establece mediante la evidencia documentada obtenida en forma experimental, si un proceso se comporta consistentemente. Su desarrollo requiere de la elaboración previa de un protocolo de validación.
- Validación retrospectiva.-Es aquella que se aplica cuando se cuenta con la evidencia documentada de que el sistema desempeña lo que se propuso hacer, basada en la revisión y análisis histórico de la información del proceso.
- Validación concurrente.-Establece la evidencia documentada de que el proceso hace lo que se propuso hacer, basada en la información generada durante el desarrollo del proceso.

La Validación de un método analítico es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas (García *et. al.*, 2002). El método de validación se basa principalmente en el cumplimiento de una serie de requerimientos, explica cómo seleccionar esos requerimientos y la forma en que se suministran evidencias (Boqué *et. al.*, 2002).



3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La Medicina tradicional se ha usado extensamente para necesidades de salud durante muchos siglos, y cada vez se hace más popular, sobre todo en la última década. Los datos indican que el uso de plantas medicinales será mayor en los años venideros y que habrá esfuerzos inusitados, para llevar a cabo su complementación y articulación respetuosa dentro de los sistemas nacionales de salud, en decenas de países. De allí la necesidad de implementar sistemas regulatorios en recursos naturales.

Heliopsis longipes se ha usado desde tiempos remotos por distintas comunidades humanas para el tratamiento de diversos padecimientos; hoy en día su uso se conserva y se comercializa en puestos de hierbas medicinales de todo el país, esto es un indicativo de que el chilcuague es usado con mucha frecuencia, por lo que se requiere un control de calidad que brinde mayor seguridad al consumidor. Con la finalidad de impulsar dicho control se desarrolló este trabajo en el cual se realizó la cuantificación de la afinina, responsable de los efectos terapéuticos del vegetal.

Por otro lado se pretende aportar información científica, con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre esta especie y a futuro, integrando toda la información existente de la planta, intentar incluirla en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Lo anterior redundará en un uso racional de la planta y evitará por otra parte, el empleo de vegetales adulterantes de *H. longipes*.



Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar afinina como metabolito secundario mayoritario presente en la planta *Heliopsis longipes*

Objetivos particulares

1. Búsqueda bibliográfica sobre antecedentes de estudios químicos y biológicos realizados a la planta.
2. Seleccionar un disolvente adecuado a la técnica de CLAR para la detección de afinina a partir de la raíz de *H. longipes*.
3. Optimizar las condiciones de elución por cromatografía en capa fina del extracto clorofórmico, para detección de la afinina.
4. Confirmar estructuralmente a la afinina por:
 - IR
 - RMN-¹H
 - RMN-¹³C
5. Establecer un plan de trabajo y determinar las condiciones experimentales óptimas para la separación de compuestos de referencia (afinina) del extracto de la planta *Heliopsis longipes*.
6. Determinar los siguientes parámetros requeridos para la validación del método de cuantificación de afinina por CLAR:



- Linealidad del sistema
 - Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LQ)
 - Precisión del sistema
 - Adecuabilidad del sistema
 - Linealidad y exactitud del método
 - Precisión del método
7. Evaluar la estabilidad de la muestra en distintas condiciones de almacenaje.
8. Cuantificar la cantidad de afinina contenida en las raíces frescas y secas de *Heliopsis longipes*, a partir de sus extractos en el disolvente encontrado como idóneo para la extracción.



4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material y Equipo

En el proceso de obtención del extracto clorofórmico se empleó un rota evaporador BUCHI modelo B-480 y para la preparación de la solución de trabajo se utilizó una balanza analítica marca Explorer OHAUS, un baño de ultrasonido marca *Sonicor* modelo SC200TH y una centrífuga marca Hermle, modelo Z230AmkII.

El análisis por cromatografía en capa fina se realizó en cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel Duren, como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline Modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365nm, y una solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% en ácido sulfúrico 2N.

Para la validación y cuantificación del analito se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) marca Waters (Waters Corp., Milford MA, USA), modelo 515 con dos bombas A y B marca Waters modelo 515, 510 respectivamente, un inyector automatizado Jasco, AS-2055PLUS, un controlador de gradiente automático marca Waters modelo 680, un detector UV/VIS modelo 2487 con dos canales y un software Waters Millennium 32.

La separación se llevó a cabo en una columna Kromasil 100 C18 (tamaño de partícula de 3 μm , tamaño de poro 100 Å , dimensiones 150 x 4.6 mm), prefiltros Acrodisc 13 mm Syringe Filter, y jeringas para insulina de 100 UI.

Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599, los de RMN se determinaron a 300 MHz para el caso de ^1H y 75



MHz para el caso de ^{13}C , para esto, se utilizó un espectrómetro analítico Varian XR 300S; como disolvente se empleó CDCl_3 . Los espectros de masas se obtuvieron de un espectrómetro de masas HP 5890. Estos análisis se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación (USAI) de la Facultad de Química.

4.2. Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Acetona grado RA
- Solución de sulfato cérico amoniacal
- Solución de cloruro de cobalto

4.3. Material Vegetal

La raíz de *Heliopsis longipes* (Compositae) fue colectada a 3 Km S de “Las presillas” y a 4 Km N de “Mesa de palotes” ($21^{\circ}29'31\text{N}$, $100^{\circ}25'34\text{W}$) a 2285 m sobre el nivel del mar, en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México; un ejemplar de referencia se encuentra depositado en el herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (FEZA) con el número 5904. El material fue identificado por el M. en C. Ramiro Ríos Gómez.



Figura 5. Raíz de *Heliopsis longipes*.



4.4. Identificación de afinina en extractos clorofórmicos de *Heliopsis longipes*

Para identificar a la afinina en las raíces de *Heliopsis longipes*, se procedió de la siguiente manera: se maceró 1g de la raíz fresca y 1g de la raíz seca de manera independiente en matraces de fondo redondo, se agregó un volumen de 20 mL de cloroformo como disolvente, se dejaron reposar por 24hrs a temperatura ambiente y con agitación constante, dicho proceso se realizó hasta agotar los compuestos solubles, el disolvente fue eliminado en el rotaevaporador mediante destilación al vacío. Se obtuvieron los residuos correspondientes a cada raíz, con los cuales se realizó el análisis de cromatografía en capa fina (CCF), empleando como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo en una proporción 75:25, monitoreando la presencia de afinina en el extracto por comparación con una muestra analítica de referencia obtenida en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma de Morelos, mediante la metodología expuesta por Ríos y colaboradores (Ríos *et. al.*, 2006)

4.5. Preparación de la solución de referencia de afinina

La solución de referencia de afinina se preparó disolviendo 20 mg de afinina en 50 mL de acetonitrilo, obteniendo una concentración final de 400 µg/mL.

4.6. Determinación de la concentración de la solución de referencia que representa el 100% de la solución de trabajo.

A partir de la solución de referencia se realizaron las diluciones adecuadas para obtener las siguientes concentraciones: 2, 5, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 µg/mL, dichas soluciones se inyectaron al CL obteniendo las respectivas respuestas analíticas. Posteriormente se prepararon extractos tanto de raíz



seca como de raíz fresca, partiendo de 100, 50 y 25 mg de materia prima en ambos casos, con el fin de encontrar entre cada una de ellas, la de respuesta cromatográfica similar en ambos extractos; esta respuesta también deberá ser similar a la obtenida en alguna de las soluciones de referencia, para que ésta última corresponda a la concentración al 100% en el extracto.

4.7. Preparación de la solución de trabajo (extracto de raíces fresca y seca de *Heliopsis longipes*)

Se maceraron independientemente con acetonitrilo, 25 mg de raíz fresca y 50 mg de raíz seca previamente fragmentadas en un mortero de porcelana hasta obtener un tamaño de partícula <2 mm. Una vez macerada cada muestra se colocó en un tubo para centrifuga de 5 mL al cual se agregó 2.5 mL de acetonitrilo grado HPLC como disolvente, y se sonicó por 15 minutos; posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, se colectó el sobrenadante en un matraz volumétrico de 10 mL, dicha operación se realizó tres veces con la misma materia prima (matriz de trabajo). El sobrenadante total colectado (7.5 mL) se llevó hasta el aforo con el mismo disolvente; se tomaron alícuotas de ambos extractos para ser inyectados al CL, previamente filtradas en un prefiltro de tamaño de poro de 45 μm y colocadas en los viales correspondientes.

4.8. Ensayos preliminares a la Validación por CLAR

Se prepararon dos muestras de forma independiente, con 50 mg de la raíz seca y 25 de la raíz fresca, procediendo como se indica en “preparación de solución de trabajo”, las muestras fueron inyectadas en el CL probando para la elución mezclas de disolventes en distintas proporciones en modo isocrático y de gradiente.



Se seleccionó el uso de un detector de luz UV para monitorear la salida de los compuestos, la longitud de onda en el detector se estableció a partir de un análisis en el ultravioleta realizado en la USAI.

Con la finalidad de conocer el tiempo de retención de la afinina, dentro de los picos del cromatograma se realizó la co-inyección de la solución de referencia de este compuesto (500 μ L) a los extractos obtenidos de ambas raíces.

4.9. Desarrollo y validación del método para la cuantificación de afinina por CLAR.

El desarrollo y validación del método empleó parámetros analíticos y criterios establecidos por las Guías de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos (García *et. al.*, 2002) y la Guía de Harmonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2 (R1) 2005).

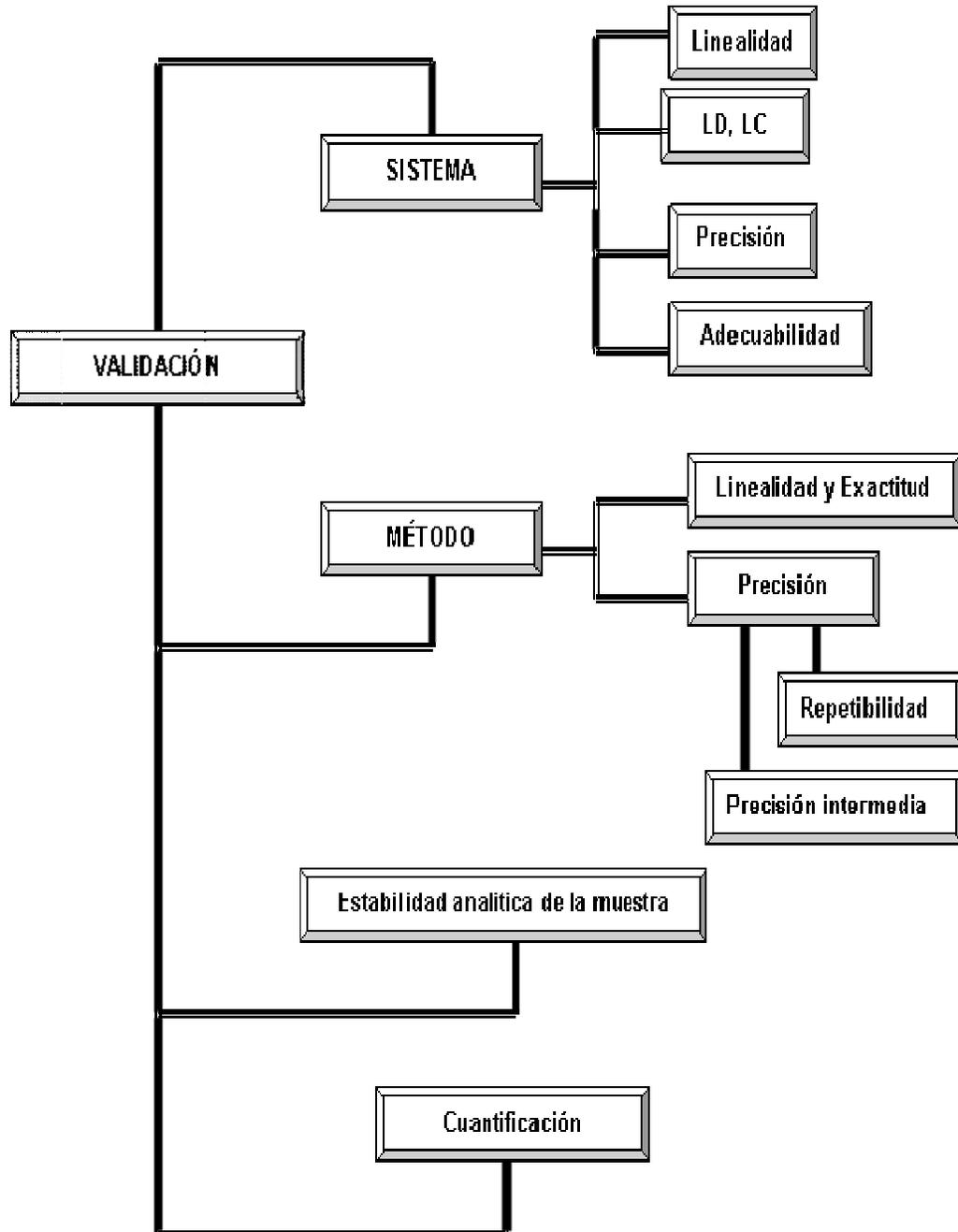
A continuación se mencionan las condiciones cromatográficas óptimas de trabajo establecidas en los ensayos preliminares a la validación.

Tabla 5. Condiciones óptimas para el desarrollo de la validación.

Tiempo de retención	21.4min
Flujo de la fase móvil	0.8mL/min
Temperatura del horno	30°C \pm 3
Volumen de inyección	10 μ L
Fase móvil	ACN (55%): H ₂ O (45%)
Modo de trabajo	Isocrático
λ	213 nm



En el **Esquema 1** se muestra el plan de trabajo a seguir, así como los parámetros de desempeño a evaluar.



Esquema 1. Plan de trabajo para la validación del método analítico por CLAR para la cuantificación de afinina en *Heliopsis longipes*.



4.9.1 Validación del sistema por CLAR

4.9.1.1. Linealidad del sistema

Para la evaluación de la linealidad del sistema, se prepararon por dilución de la solución de referencia de afinina, cinco niveles de concentración por triplicado con 50, 75, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$; se seleccionó como concentración central a la que representó el 100% en la solución de trabajo. Las soluciones anteriores se inyectaron al CL y se reportó la relación concentración vs respuesta analítica. A partir de ésta se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente ($\text{IC}(\beta_1)$). *Criterios de aceptación:* $r^2 \geq 0.98$, ($\text{IC}(\beta_1)$) no debe incluir el cero.

4.9.1.2. Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC).

La estimación del límite de detección y cuantificación se realizó con base en la curva de calibración y desviación estándar de regresión, mediante los datos obtenidos en la linealidad del sistema. El cálculo se efectuó con las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3xS_{y/x}}{b_1} \quad LC = \frac{10xS_{y/x}}{b_1}$$

4.9.1.3. Precisión del sistema

Se preparó un sextuplicado de soluciones a la concentración de la solución de referencia que representa al 80% de la muestra procesada, preparada por dilución, se midió la respuesta analítica y posteriormente se calculó la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). Criterio de aceptación $\text{CV} \leq 2\%$.



4.9.1.4. Adecuabilidad del sistema

Para evaluar la adecuabilidad del sistema se preparó por quintuplicado una solución stock de afinina de 80 $\mu\text{g/mL}$, la cual corresponde a un 80% de la cantidad de afinina total contenida en el extracto. Se reportó la respuesta del analito y se calculó el coeficiente de variación (CV). *Criterio de aceptación:* $CV \leq 2\%$ En la siguiente tabla se muestran los parámetros evaluados así como los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 6. Parámetros de desempeño

PARÁMETRO	LÍMITE
Tiempo de retención (min)	–
Tiempo muerto (min)	–
Factor de capacidad (K')	>2
Factor de coleo (T)	<2
Número de platos teóricos (N)	–

4.9.2. Validación del método analítico por CLAR

4.9.2.1. Linealidad y Exactitud del método

Se preparó por triplicado un placebo analítico equivalente a la muestra por cada una de las concentraciones a evaluar con 75,100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ adicionando 1 mL a cada matriz de trabajo. Se determinó la cantidad recuperada del analito y se calculó el porcentaje de recobro de cada placebo adicionado obteniendo el cociente de la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada expresada en porcentaje. Usando el método de estimación por mínimos cuadrados se determinó el valor de 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 ($IC(\beta_0)$). Se calculó el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación ($CV_{y/x}$) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$. *Criterios de aceptación:* $r^2 \geq 0.98$, ($IC(\beta_1)$) no debe incluir el cero, ($IC(\beta_0)$) debe incluir el cero, $CV_{y/x}$ no mayor a 2%, $IC(\mu)$ en el intervalo 98-102%.

4.9.2.2. Precisión del Método

La precisión del método se evaluó mediante los parámetros de *Repetibilidad* y *Precisión intermedia*.

4.9.2.2.1. Repetibilidad

La determinación de la repetibilidad se llevó a cabo mediante la metodología empleada en “linealidad del método”, evaluando por sextuplicado cada placebo analítico adicionado de la solución de referencia correspondiente al 100%. A partir de la respuesta analítica se calculó el porcentaje de recobro para cada placebo, determinando el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro. *Criterios de aceptación:* $CV \leq 2\%$, $IC(\mu)$ en el intervalo 98-102%.

4.9.2.2.2. Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista.

La precisión intermedia se realizó analizando por triplicado una muestra homogénea en un nivel igual al 100% (100 μg) en dos días y por dos analistas diferentes, usando la misma sustancia de referencia, así como los instrumentos y equipos. A partir de las respuestas analíticas se calculó la



media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV). *Criterios de aceptación:* $CV \leq 2\%$.

4.10 Estabilidad analítica de la muestra

El proceso de estabilidad analítica de la muestra se llevó a cabo con muestras independientes a partir de una muestra homogénea, el análisis se realizó por triplicado y de manera simultánea para cada una de las siguientes condiciones:

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

Los resultados se reportaron en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 24 y 72 hrs, y a los 8 días. Se calculó la media aritmética del análisis inicial (\bar{y}_0), de cada condición de almacenaje (\bar{y}_i) y la diferencia absoluta de la muestra aritmética de cada condición de almacenaje respecto del análisis inicial ($|d_i|$). *Criterio de aceptación:* $(|d_i|) \leq 2\%$.

4.11. Cuantificación de afinina en *Heliopsis longipes*

Para determinar la cantidad de afinina presente en las raíces de *Heliopsis longipes* se empleó el método descrito en la “preparación de la solución de trabajo” de manera independiente tanto para la raíz seca como para la raíz fresca, por triplicado. Se obtuvo la respuesta analítica, misma que se interpoló en la curva de calibración diseñada en la linealidad del método. A



partir de la ecuación de regresión se calcularon los μg de afinina por g de raíz seca y fresca.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de afinina en *Heliopsis longipes*

El presente trabajo seleccionó a la afinina, como compuesto de referencia para ser cuantificado porque además de ser el metabolito mayoritario encontrado en la planta medicinal *Heliopsis longipes*, su estructura está restringida a un grupo muy limitado de especies vegetales, y por otra parte es el responsable de diversas actividades biológicas según se ha demostrado en estudios previos a este (Ríos et al, 2006; García-Chávez *et. al.*, 2004).

La identificación de la afinina en las raíces de *Heliopsis longipes* se llevó a cabo por medio de cromatografía de capa fina, en comparación con una muestra estándar. La **Figura 6** muestra la cromatoplaqueta obtenida en el análisis, en la cual se revela la presencia de afinina en los extractos de las raíces seca y fresca. ($R_f=0.84$)



Figura 6. Cromatografía en capa fina de los extractos correspondientes a la raíz seca (izquierda) y fresca (derecha) de *Heliopsis longipes* con referencia de afinina (centro).



5.2 Confirmación estructural de la afinina.

La confirmación estructural de la afinina se efectuó mediante la comparación de los datos de sus espectros de IR, RMN-¹H y RMN-¹³C con los reportados en la literatura (**Figuras 7,8 y 9**)

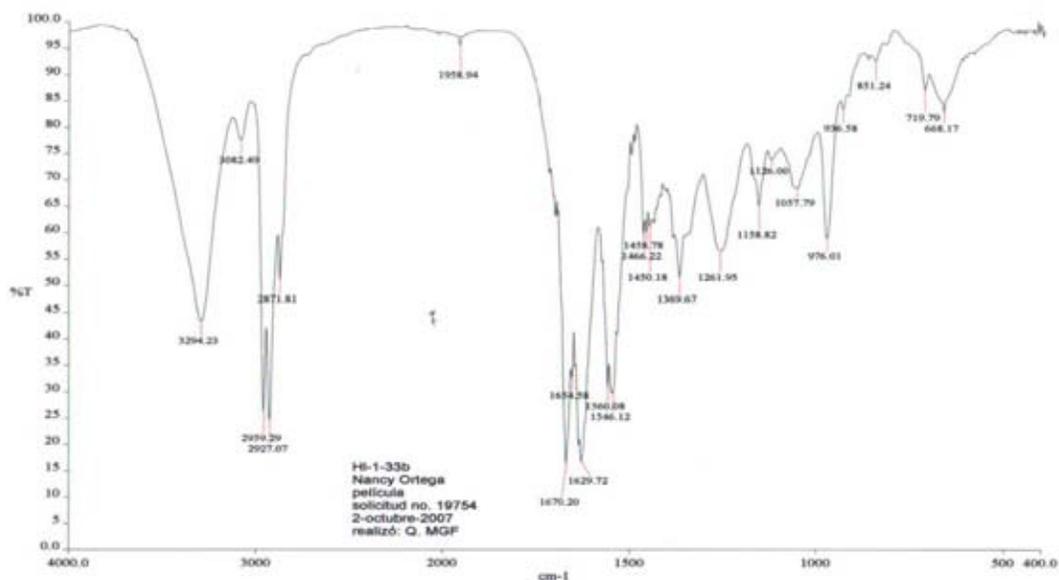


Figura 7. Espectro en el IR de la afinina

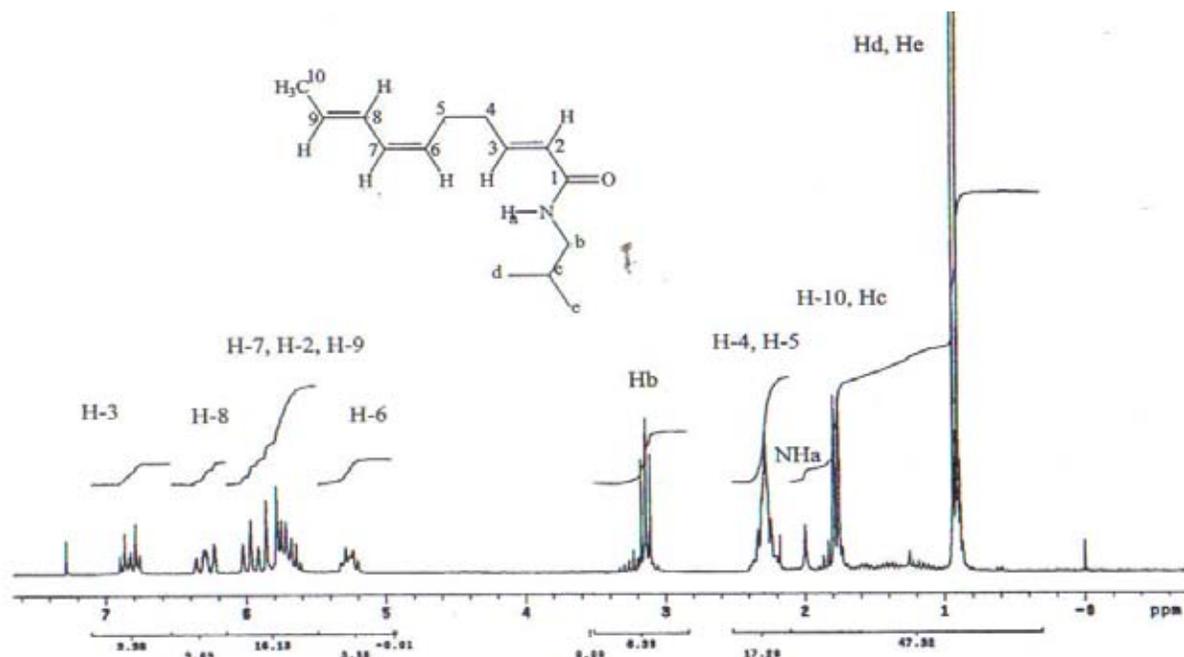


Figura 8. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de afinina.

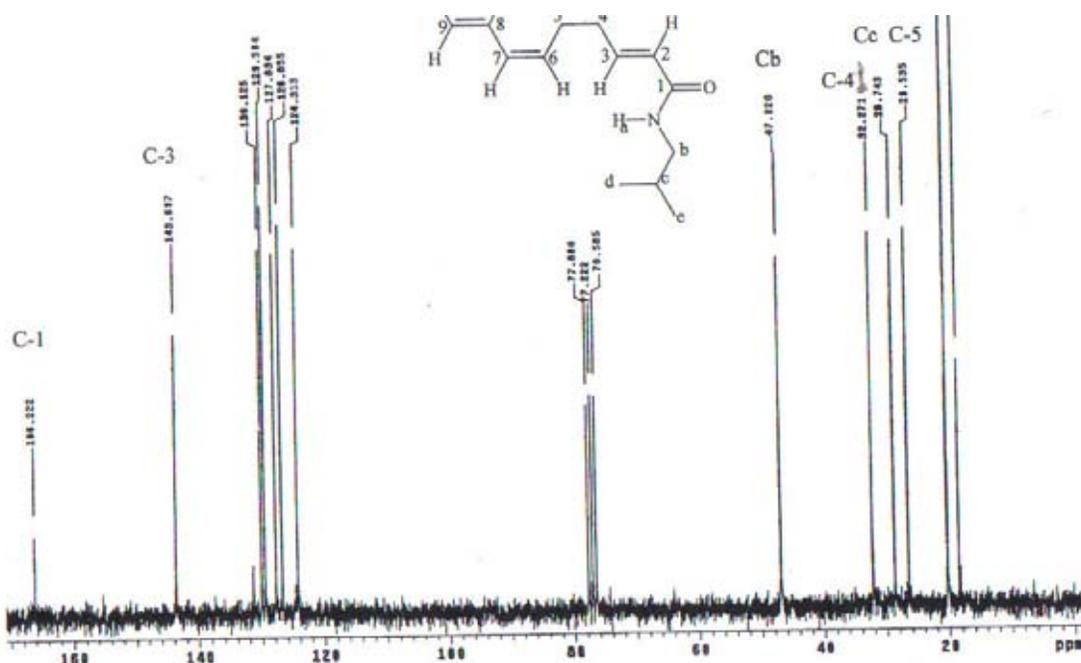


Figura 9. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de afinina.

5.3 Ensayos preliminares a la validación del método analítico por CLAR

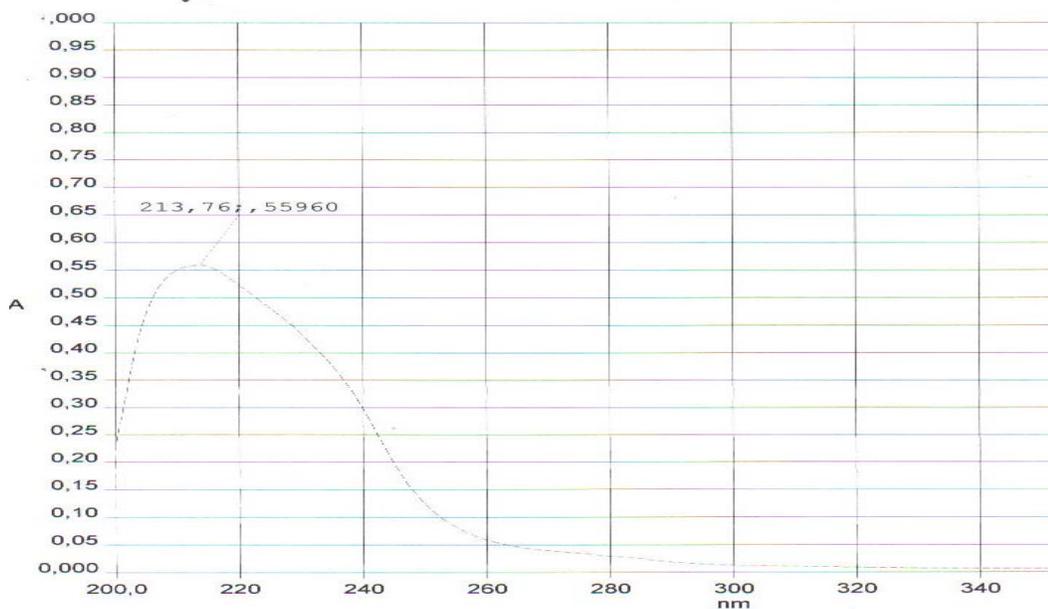
Consistieron en determinar las condiciones óptimas de separación en los cromatogramas obtenidos en los ensayos (**punto 4.8**). Así se establecieron los parámetros adecuados que se muestran en la **Tabla 7**.

Como se mencionó, en la parte experimental, el desarrollo del método para su validación se elaboró con base en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos y en las guías ICH.

**Tabla 7.** Condiciones óptimas para el desarrollo de la validación.

Tiempo de retención	21.4 min
Flujo de la fase móvil	0.8 mL/min
Temperatura del horno	30°C ±3
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil	ACN (55%) : H ₂ O (45%)
Modo de trabajo	Isocrático
λ	213 nm

Se seleccionó el uso de un detector en el UV para monitorear la salida de los compuestos con base en su respuesta al UV y la longitud de onda de trabajo se estableció a partir del espectro UV de la afinina, mismo que se muestra en la **Tabla 10**.

**Figura 10.** Espectro en el UV de la afinina.



Para localizar el pico correspondiente a la afinina dentro del cromatograma de líquidos de los extractos seco y fresco de *H. longipes*, se realizaron co-inyecciones a ambos con la solución de referencia, observándose una respuesta aumentada en el pico mayoritario (21.4 min) (**Figuras 11, 12, 14 y 15**).

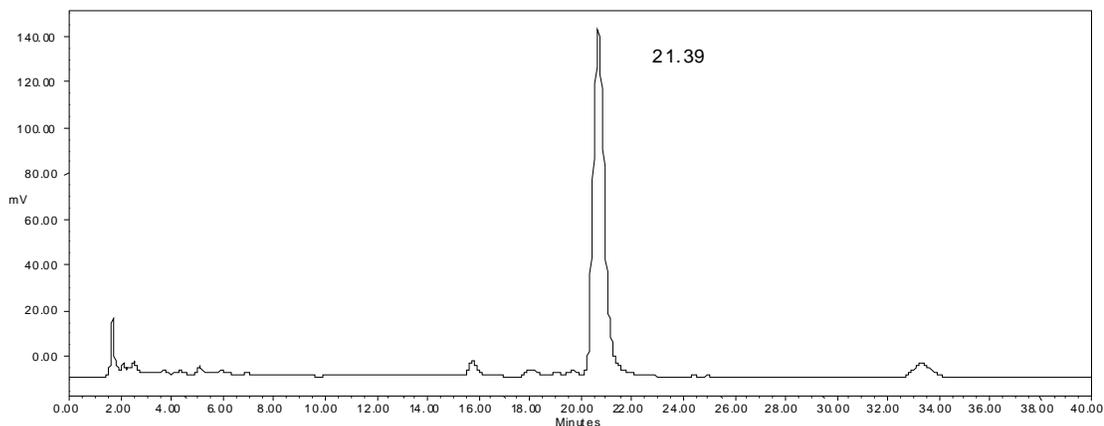


Figura 11. Cromatograma de co-inyección del extracto de acetonitrilo de la raíz seca correspondiente y la solución de referencia de afinina.

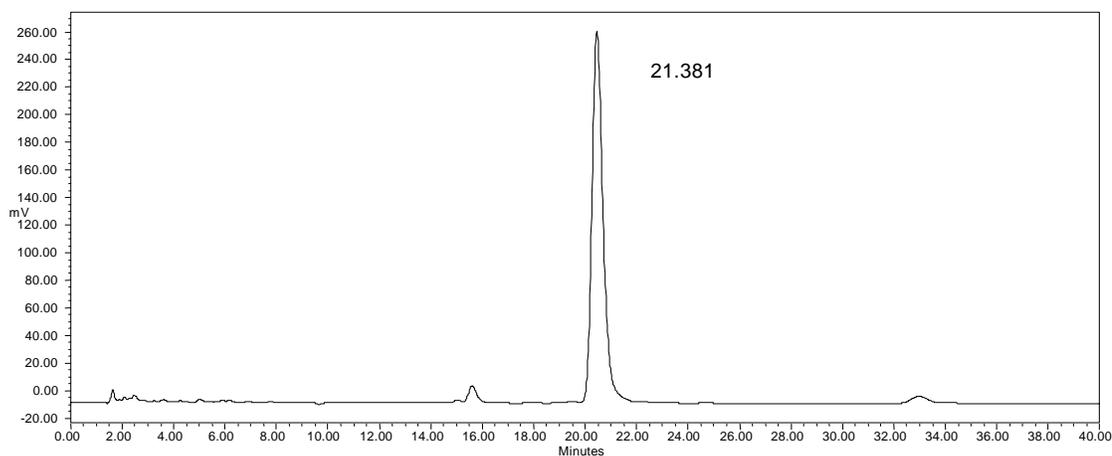


Figura 12. Cromatograma de co-inyección del extracto de acetonitrilo de la raíz fresca correspondiente y la solución de referencia de afinina.



5.4 Determinación de la concentración de la solución de referencia que representa el 100% de la solución de trabajo.

La solución de referencia (afinina) que representa el 100% de la solución de trabajo corresponde a la que muestra una respuesta analítica en el cromatograma de líquidos similar a la de los extractos de las raíces seca y fresca (**Figuras 14 y 15**). La concentración de la solución de referencia correspondió a la que contenía 100 $\mu\text{g/mL}$ de afinina.

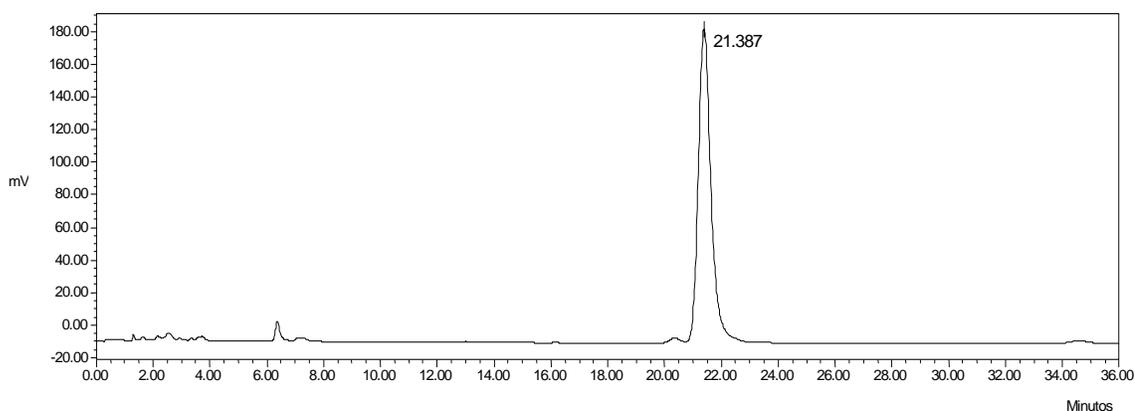


Figura 13. Cromatograma de la solución de referencia de la afinina correspondiente al 100% (100 $\mu\text{g/mL}$) con respecto a la solución de trabajo.

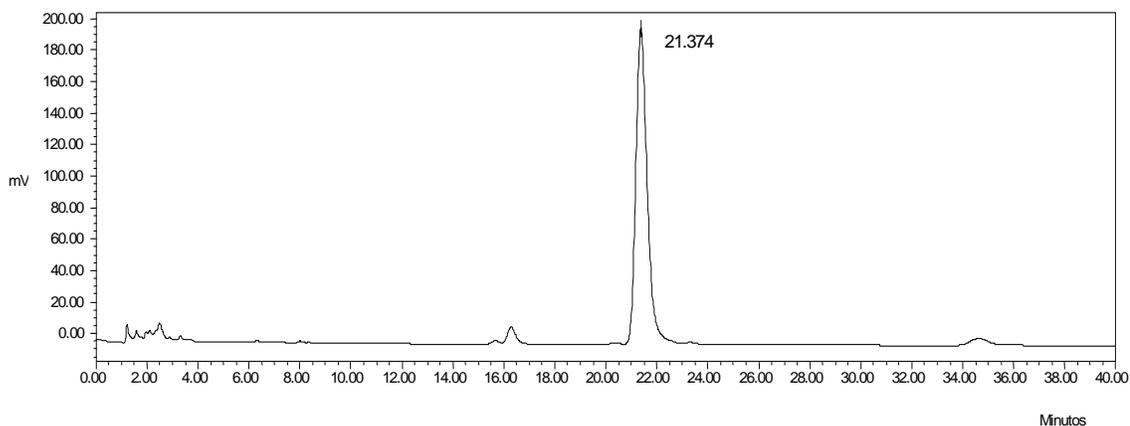


Figura 14. Cromatograma del extracto de acetoneitrilo de la raíz fresca correspondiente al 100% de la solución de trabajo.

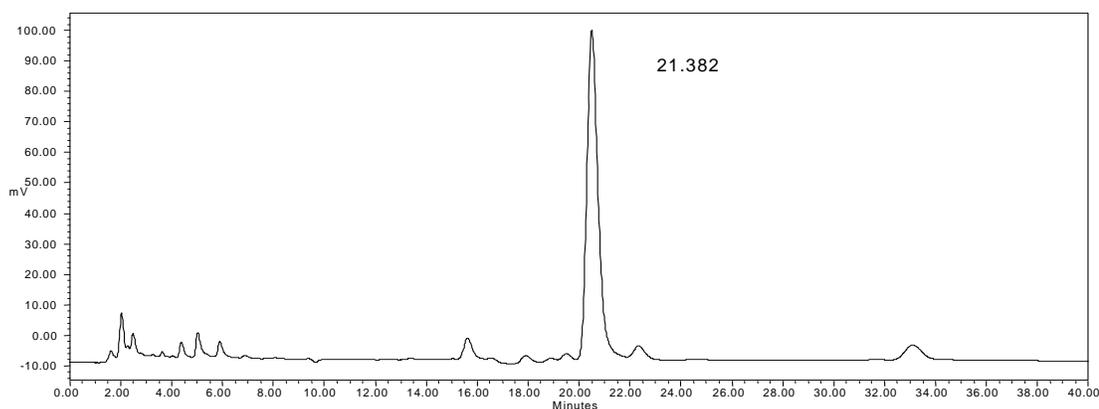


Figura 15. Cromatograma del extracto de acetonitrilo de la raíz seca correspondiente al 100% de la solución de trabajo.

5.5. Desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de afinina por CLAR

En el presente trabajo se diseñó el protocolo de validación del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución el cual incluyó la evaluación de los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, adecuabilidad y estabilidad. El procesamiento de datos se realizó con el programa de *Microsoft Office Excel 2003*.

5.5.1 Validación del sistema por CLAR

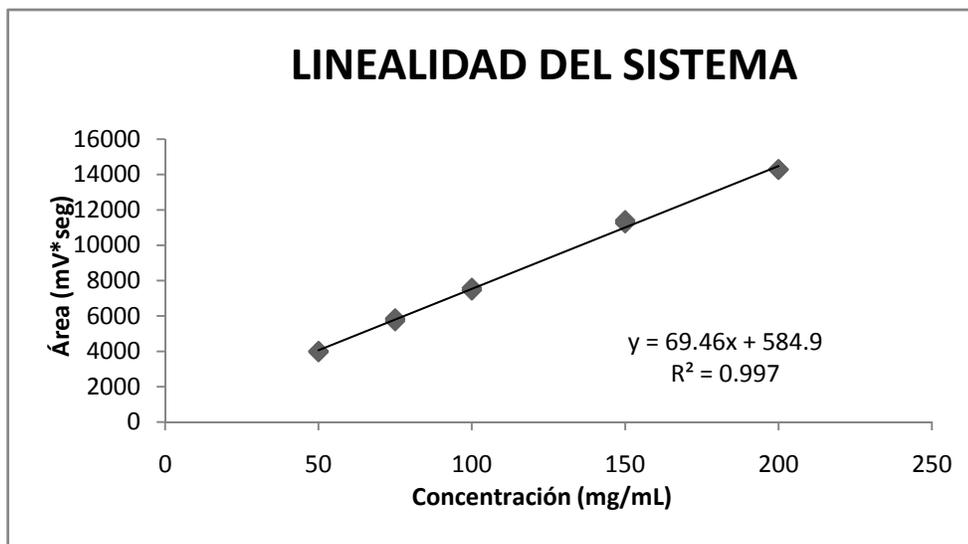
5.5.1.1. Linealidad del sistema.

La evaluación de la linealidad en el sistema se realizó mediante el análisis cromatográfico de cinco concentraciones de las soluciones de referencia por triplicado, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 8**, en la cual aparecen las áreas, el factor de respuesta y los coeficientes de variación para cada una de las concentraciones (menores al 2%), mismos que indican que el equipo se encuentra correctamente calibrado.

**Tabla 8.** Datos para la evaluación de linealidad del sistema.

# Inyección	Concentración [$\mu\text{g/mL}$]	Área ($\text{mV}\cdot\text{seg}$)	FR	%CV
1	50	4002.308	0.012492792	0.7861
2	50	3999.477	0.012501635	
3	50	3946.718	0.012668754	
4	75	5798.064	0.012935352	1.4113
5	75	5698.233	0.013161975	
6	75	5860.069	0.012798484	
7	100	7444.127	0.013433409	1.0165
8	100	7587.725	0.013179181	
9	100	7471.465	0.013384256	
10	150	11301.974	0.013272018	0.2864
11	150	11409.685	0.013146726	
12	150	11237.356	0.013348336	
13	200	14266.68	0.014018678	0.1007
14	200	14287.12	0.013998623	
15	200	14294.227	0.013991663	

La curva de calibración para determinar la linealidad del sistema (**Gráfica 1**) se construyó midiendo las áreas bajo la curva del compuesto de referencia (afinina) contra las concentraciones. Se obtuvo la ecuación de la curva de calibración $y = b_1x + b_0$, donde y corresponde al área ($\text{mV}\cdot\text{seg}$), x a la concentración ($\mu\text{g/mL}$), b_1 a la pendiente y b_0 al intercepto. El cálculo de los parámetros estadísticos se hizo bajo los siguientes criterios: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $r^2 \geq 0.98$ y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no incluye el cero.



Gráfica 1. Curva de calibración para la linealidad del sistema

Tabla 9. Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del sistema

b_1	69.46
b_0	584.91
r^2	0.997
$S_{y/x}$	52.6407
S_{b1}	2771.0394
IC (β_1)	186512.0218-198482.9122

El intervalo de confianza se calculó a partir del valor de la t de student, determinada con base en los datos contenidos en la tabla estadística de la distribución (**Anexo 2**)

$$t_{0.975, n-2} = 2.160$$

Donde

n = número de datos = 15

$n-2$ = grados de libertad = 13

0.975 = nivel de confianza



De acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos, el sistema muestra un comportamiento lineal, ya que el coeficiente de determinación (r^2) es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)) no incluye el cero.

5.5.1.2.- Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para la afinina.

El límite de detección (LD) se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación (LC) es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. Ambos se obtuvieron a partir de la curva de calibración realizada en la linealidad del sistema con base en la desviación estándar de regresión; el cálculo se efectuó como se muestra a continuación:

$$LD = \frac{3.3 * S_{y7x}}{b1} = \frac{3.3 * 52.6407}{186512.0218} = 0.000931 ppm$$

$$LC = \frac{10 * S_{y7x}}{b1} = \frac{10 * 52.6407}{69.4676} = 7.5778 ppm$$

5.5.1.3 Precisión del sistema

La *precisión* es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. La precisión se midió a partir de las respuestas analíticas obtenidas de las inyecciones efectuadas por sextuplicado, determinando así el coeficiente de variación que de acuerdo al criterio de aceptación no excede del 2%. Los resultados se presentan en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Valores obtenidos para la determinación de la precisión del sistema.

# Inyección	Área (mV*seg)
1	5943.456
2	6027.967
3	6018.959
4	6055.85
5	5961.139
6	6025.583
Promedio	6005.492333
S	43.4550712
%CV	0.723588821

5.5.1.4.- Adecuabilidad del Sistema

Se llama *adecuabilidad* a la verificación de que el sistema opera con base en criterios pre-establecidos, que permiten asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico. La evaluación de adecuabilidad se realizó inyectando por quintuplicado una solución de referencia al 80%, obteniendo las respectivas respuestas analíticas mediante las cuales se calculó el coeficiente de variación, el cual no excede del 2% según lo establecido por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos y las guías ICH. Los datos para estos cálculos se presentan en la **Tabla 11**.

Los parámetros de desempeño requeridos para la determinación de la adecuabilidad del sistema, se calcularon mediante los cromatogramas obtenidos de las soluciones inyectadas, dichos parámetros se encontraron dentro de los límites establecidos en la FEUM 7^a edición, mismos que se resumen en la **Tabla 12**.

**Tabla 11.** Datos para la estimación del parámetro de adecuabilidad.

#Inyección	Área (mV*seg)
1	5996.453
2	6015.635
3	6036.753
4	5986.895
5	5961.139
Promedio	5999.375
S	28.6695948
%CV	0.477876359

Tabla 12. Parámetros de desempeño.

PARÁMETRO	VALOR OBTENIDO	LÍMITE
Tiempo de retención (min)	21.4	–
Tiempo muerto (min)	1.3258	–
Factor de capacidad (K')	15.1412	>2
Factor de coleo (T)	1.0116	<2
Número de platos teóricos (N)	517.8463	–

5.5.2 Validación del método analítico por CLAR

5.5.2.1 Linealidad y Exactitud del Método

La linealidad del método se evaluó por medio de una curva de calibración, construida a partir de las respuestas emitidas de la inyección por triplicado de un placebo analítico equivalente a la muestra por cada una de las

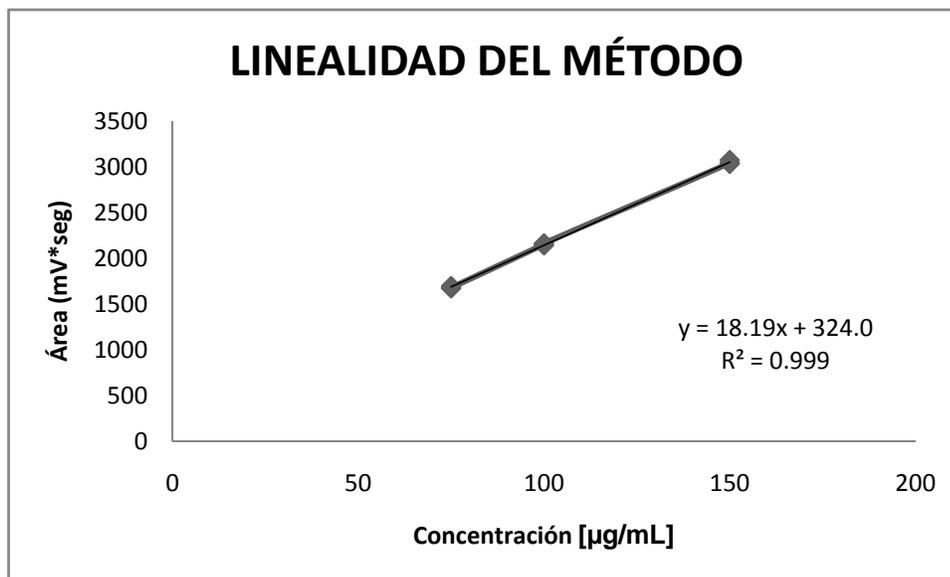


concentraciones correspondientes al 75, 100 y 150%. En la **Tabla 13** se muestran los datos procesados con los resultados obtenidos:

Tabla 13. Áreas, FR y %CV obtenidos para la evaluación de la linealidad del método.

# Inyección	Concentración [µg/mL]	Área (mV *seg)	FR	%CV
1	75	1672.247	0.0448	0.75629143
2	75	1696.856	0.0442	
3	75	1678.926	0.0447	
4	100	2152.536	0.0465	0.51098932
5	100	2141.816	0.0467	
6	100	2163.814	0.0462	
7	150	3042.976	0.0493	0.7113885
8	150	3074.823	0.0488	
9	150	3033.365	0.0495	

En la **Gráfica 2**, al igual que para la linealidad del sistema, se consideró a la ecuación de la recta para verificar la linealidad del método, en donde se muestra el comportamiento lineal de éste, además de que existe una buena correlación entre las áreas obtenidas con respecto a sus respectivas concentraciones.



Gráfica 2. Curva de calibración para la linealidad del método.

Se realizó el análisis estadístico (**Tabla 14**) mediante los datos obtenidos, mismos que cumplen con los criterios de aceptación que establece la Guía de Validación de Métodos Analíticos, siendo el coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98, el intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$ no incluye el cero, el intervalo de confianza para la ordenada al origen $IC(\beta_0)$ incluye el cero, el coeficiente de variación $CV_{y/x}$ no es mayor a 2% y el intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ se encuentra en el intervalo de 98-102%. El intervalo de confianza para la pendiente y para la media poblacional se calcularon a partir del valor de la t de student, determinada con base a la tabla estadística de la distribución (**Anexo 2**)

$$t_{0.975, n-2}(IC(\beta_1)) = 2.36 \quad t_{0.975, n-1}(IC(\mu)) = 2.306$$

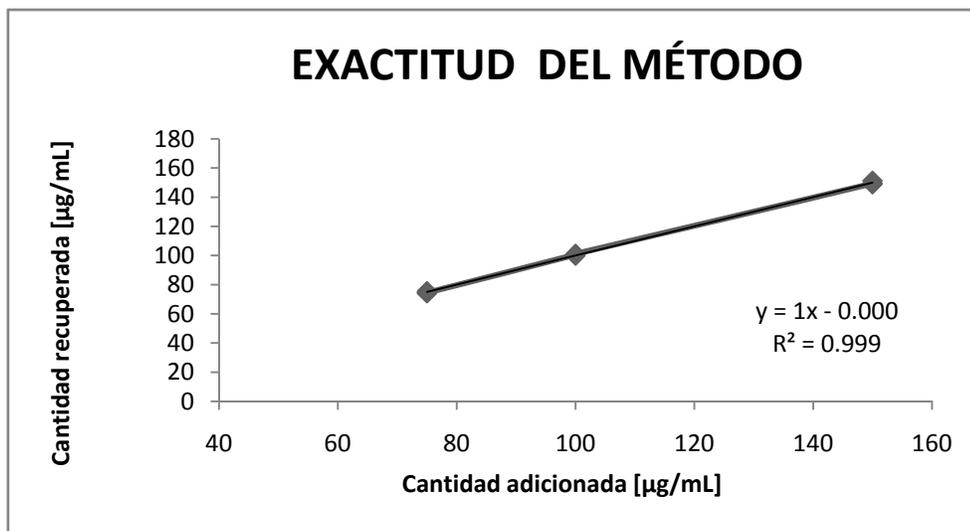
**Tabla 14.** Parámetros estadísticos evaluados para la linealidad del método

β_1	324.06
β_0	18.196
R^2	0.9993
IC(β_1)	0.9913,1.0086
IC(β_0)	-0.9739,0.9735
IC(μ)	99.3656,100.5942
%CV y/x	0.31535

Para evaluar la *exactitud*, definida como la concordancia entre el valor obtenido empleando el método y el valor de referencia, se calculó la cantidad recuperada con respecto a la cantidad adicionada de afinina (**Tabla 15**); cómo es posible apreciar, los valores del porcentaje de recobro se encuentran dentro del rango de 98 al 102%, siendo esto un indicativo de la exactitud del método propuesto (**Gráfica 3**).

Tabla 15. Porcentajes de recobro calculado a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas, para la linealidad del método.

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada [$\mu\text{g/ml}$]	Cantidad recuperada [$\mu\text{g/ml}$]	Porcentaje de Recobro (%)
1	75	74.0925	98.7899
2	75	75.4449	100.5932
3	75	74.4596	99.2794
4	100	100.4877	100.4878
5	100	99.8987	99.8987
6	100	101.1076	101.1076
7	150	149.4238	99.6159
8	150	151.1741	100.7827
9	150	148.8956	99.2638



Gráfica 3. Curva obtenida para la evaluación de la exactitud del método.

5.5.2.2.- Precisión del Método

Como se indica en la parte experimental, la precisión del método se expresó en términos de *Repetibilidad* y *Precisión intermedia*.

5.5.2.3.- Repetibilidad

Se le llama *repetibilidad* a la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y el mismo método. La repetibilidad se realizó inyectando por sextuplicado los placebos analíticos adicionados de la solución de referencia correspondiente al 100%. A partir de las respuestas emitidas, se calculó el porcentaje de recobro (**Tabla 16**). El valor del coeficiente de variación (%CV) resultó menor al 2% y el del intervalo de confianza para la media poblacional IC (μ) del porcentaje de recobro, calculada con una $t_{0.975, 5} = 2.571$, se encuentra entre 98 y 102%; estos resultados se resumen en la **Tabla 17**.



Tabla 16. Porcentajes de recobro calculados a partir de las cantidades de afinina adicionadas y recuperadas, para la repetibilidad del método.

Placebo analítico	Cantidad adicionada [µg/ml]	Área (mV*seg)	Porcentaje de Recobro (%)
1	100	2178.675	101.960186
2	100	2134.889	99.55298632
3	100	2164.986	101.2076131
4	100	2145.620	100.1429388
5	100	2098.086	99.39888728
6	100	2177.970	101.9214276

Tabla 17. Parámetros estadísticos evaluados para la repetibilidad del método

\bar{y}	100.6973399
S	0.210656669
%CV	0.209197849
IC(µ)	100.4762,100.9184

5.5.2.2 Precisión intermedia o tolerancia interdía / analista

La *precisión intermedia*, es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas y en distintos días. Esta se evaluó analizando por triplicado una muestra homogénea en un nivel igual al 100% (100 µg) en dos días y por dos analistas diferentes, usando la misma sustancia de referencia. Los resultados obtenidos



demuestran que el método es preciso, obteniendo así un %CV menor al 2% (Tabla 19).

Tabla 18. Áreas obtenidas para la evolución de la precisión intermedia.

		Analista	
		1	2
Día	1	6798,567	6832,42
		6776,699	6680,971
		6849,7	6978,355
	2	6857,166	6649,967
		6608,796	6706,05
		6785,564	6756,4

Tabla 19. Parámetros estadísticos calculados para la evaluación de la precisión intermedia.

\bar{y}	6773,38792
S	102,166928
%CV	1,50835784

5.6 Estabilidad analítica de la muestra

Para evaluar la estabilidad de la afinina se llevó a cabo la metodología descrita en la parte experimental, sometiendo cada muestra independientemente a distintas condiciones de almacenaje con el objetivo de conocer los cambios que puede sufrir el analito en un lapso de tiempo determinado.



Tabla 20. Áreas obtenidas para la estimación de la estabilidad de afinina para cada condición de almacenaje

Condiciones	Área (mV*seg)			
	0 hrs.	24 hrs.	72 hrs.	8 días
T. ambiente c/luz	7057.764	7040.266	7037.248	7015.467
T. ambiente c/luz	7029.614	7045.803	7058.724	6994.856
T. ambiente c/luz	7030.433	7094.86	7090.034	7073.584
T. ambiente s/luz	7049.701	7031.513	7018.214	6974.382
T. ambiente s/luz	7116.738	7194.023	7163.674	7156.084
T. ambiente s/luz	7042.553	7013.654	7015.342	7055.177
4°C c/luz	7043.74	7032.446	7076.65	7041.006
4°C c/luz	7194.453	7126.765	7152.72	7096.311
4°C c/luz	7005.571	7055.996	7067.44	7015.976
4°C s/luz	7096.985	7004.884	7090.731	7041.201
4°C s/luz	7051.348	7037.086	7022.549	7025.398
4°C s/luz	7111.596	7175.1	7158.623	7018.437
37°C s/luz	7027.005	7033.55	7028.003	6990.65
37°C s/luz	7087.861	7084.884	7069.768	7044.76
37°C s/luz	7159.298	7120.385	7059.988	7072.015

Se realizó el análisis estadístico para evaluar la estabilidad de la afinina. Como se especifica en los criterios de aceptación, la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial, no debe exceder al 2% sin embargo, a los 8 días de tratamiento, este valor excede el límite establecido por la Guía de Validación de métodos analíticos y las guías ICH (**Tabla 21**). Los cromatogramas muestran claramente la disminución de la concentración del analito, lo que indica que la muestra no es estable en este tiempo.

**Tabla 21.** Parámetros estadísticos para la evaluación de estabilidad.

	0hrs	24hrs	72hrs	8dias
\bar{y}	7073.644	7072.7476	7073.9805	7041.0203
S	53.3012	58.1249	50.0717	46.0399
%CV	0.75352	0.8218	0.7078	0.65389
l di l	0	0.8963	0.3365	32.6237

5.7.- Cuantificación de afinina en las raíces seca y fresca de *Heliopsis longipes*

En cualquier metodología analítica es esencial tener una curva de calibración muy bien diseñada para su mejor interpretación. Las concentraciones de un analito en muestras desconocidas comúnmente se pueden medir utilizando los resultados del modelo de regresión lineal; cuando el rango de un número x de valores es grande puede esperarse que la varianza para cada valor sea diferente. Grandes desviaciones entre los puntos para altas concentraciones, pueden deberse a la manipulación de pesada, por tanto, en la línea de regresión, la desviación estándar entre los puntos es menor al trabajar con bajas concentraciones y por tanto la exactitud en la calibración de la línea puede no ser adecuada. En la metodología expuesta por Almeida y colaboradores (2002), se expone la manera para resolver esta situación, e implica una corrección de la regresión lineal por el método de pesadas por mínimos cuadrados.

Con la finalidad de conocer si en nuestro caso era preciso aplicar dicha metodología, se realizó la prueba de homoscedasticidad (**Anexo 1**), en la cual se determinaron los valores de F experimental ($F_{\text{exp}}=2.9$) y de F de tablas



($F_{\text{tabla}} = 99$) con 2 grados de libertad. La F de tablas (**Anexo 3**) resultó ser mayor a la experimental, por tanto no fue necesario realizar la corrección de la regresión lineal por el método de pesadas.

Para llevar a cabo la cuantificación de afinina, se utilizó una ecuación generada con la curva de calibración para la evaluación de la linealidad del método, así, el cálculo de la cantidad de afinina se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{g de afinina}}{\text{g de raíz}} = \left(\frac{\text{Área} - b_0}{m} \right) \times (FD) \times \left(\frac{\text{cantidad total de raíz}}{\text{g de raíz}} \right)$$

Donde:

b_0 : ordenada al origen (18.196)

m : pendiente (324.06)

FD : factor de dilución (10mL)

cantidad total de la raíz: 0.025 g para el extracto fresco y 0.050 g para el extracto seco.

En las **Tablas 22 y 23** se resume la cantidad de afinina contenida en ambos extractos:

Tabla 22. Cantidad de afinina contenida en el extracto fresco.

# Inyección	Área (mV*seg)	Cantidad de afinina ($\mu\text{g/g}$ de raíz fresca)
1	6837.825	8417.7369
2	6859.131	8444.035
3	7038.518	8665.459
Promedio	6911.82467	8509.076

**Tabla 23.** Cantidad de afinina contenida en el extracto seco.

# Inyección	Área (mV*seg)	Cantidad de afinina ($\mu\text{g/g}$ de raíz seca)
1	11378.379	7011.1603
2	11159.96	6876.3587
3	11281.091	6951.1171
Promedio	11269.1695	6946.2120

Como se aprecia en las **Tablas 22** y **23**, la cantidad de afinina es mayor en el extracto fresco que la obtenida en el extracto seco, por lo que podemos inferir que la cantidad de afinina disminuye con la desecación por una probable degradación de este metabolito. Sin embargo de acuerdo con los datos de estabilidad de la muestra de afinina esta no sufrió degradación durante el tiempo que tomó realizar la validación.



6. CONCLUSIONES

Mediante el método analítico desarrollado y validado, fue posible la cuantificación de la afinina en las raíces fresca y seca de *Heliopsis longipes*.

Las condiciones experimentales preliminarmente determinadas para la separación de los compuestos en el extracto de las raíces resultaron ser las idóneas para los fines perseguidos.

El método desarrollado por CLAR es el adecuado, pues resultó ser lineal, preciso, exacto y reproducible.

Mediante el método analítico desarrollado y validado, se cuantificó a la afinina en las raíces fresca y seca de *Heliopsis longipes*, la cual se encontró en una proporción mayor en la raíz fresca (8.5 mg / g de raíz) que la contenida en la raíz seca (6.9 mg / g de raíz).

El uso de afinina como sustancia de referencia es adecuado ya que de acuerdo a los resultados de estabilidad esta permaneció inalterada durante el tiempo que tomó su cuantificación en la planta.

PERSPECTIVAS

Será conveniente cuantificar el contenido de afinina en lotes colectados en diferentes épocas del año y de otras localidades geográficas para analizar las condiciones climáticas relacionadas con la producción del metabolito secundario mencionado.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Aldrich library of ^{13}C and ^1H FT NMR spectra, vol. 3, 1992, p. 569A.
2. Acree, F., Jacobson, M., y Haller, L. 1945. The structure of affinin, the insecticidal amide from *Erigeron affinis* D.C. *Journal of Organic Chemistry*, 10: 449-451.
3. Almeida, A., Castel- Branco, M. and Falcao, A. (2002) Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods *Journal of Chromatography B*, 774: 215-222
4. Alpizar, M., Hernández, E., 2004. Formas Farmacéuticas sólidas. Pp. 13,17-18.
5. Bauer, R., Reminger, P., Wagner, H., 1988. Alkamides from the roots of *Echinacea purpurea*. *Phytochemistry*. 27: 2339–2342.
6. Bauer, R., Reminger, P., Wagner, H., 1989. Alkamides from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Phytochemistry*. 28: 505–508.
7. Blake, S. 1924. New American Asteraceae. *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake. Contributions from the U.S. National Herbarium. 22: 608-609.
8. Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., and Rius, X., 2002. Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites*. 53:128-143
9. Bremer, K. 1994. Asteraceae: cladistics & classification. Timber Press. Portland. 752 pp.



10. Christensen, L. y Lam, L. 1991. Acetylenes and related compounds in Heliantheae. *Phytochemistry* 30: 11-49.
11. Christensen, L. 1992. Acetylenes and related compounds in Anthemideae. *Phytochemistry* 31: 7-49.
12. Correa, J., Roquet, S., Díaz, E., 1971. Multiple NMR analysis of the affinin. *Organic Magnetic Resonance* . 3: 1-5.
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Séptima edición. 2000.
14. García-Chávez, A., Ramírez, E., Molina-Torres, J., 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana*. 69: 115-131.
15. García, M. A., Soberón, E., Cortes, M *et. al.* Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional De Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C (2002).
16. Gray, A. 1879. Characteristics of some new species of Compositae. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 15: 25-51.
17. Greger, H. 1984. Alkamides: structural relationships, distribution and biological activity. *Planta Médica*. 50: 366-375.
18. Gutiérrez-Lugo, M. T., T. Barrientos-Benitez, B. Luna, R. M. Ramírez-Gama, R. Bye, E. Linares y Mata, R., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine* 2: 341-347.



19. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2 (R1), 2005.
20. Little, E. 1948. El chilcuague (*Heliopsis longipes*). Planta insecticida. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 7: 23-27.
21. Martínez, M. 1989. Las plantas medicinales de México. 6a ed. Editorial Botas. México D.F. 113 pp.
22. Misra, T.N., Singh, R.S., Upadhyay, J., Srivastava, R., 1984. Chemical constituents of *Vernonia cinerea*, Part I. Isolation and spectral studies of triterpenes. *Journal of Natural Products*. 47, 368–372.
23. Molina-Torres, J., García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E. 1999. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: capsaicin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64:241-248.
24. Molina-Torres, J., García-Chávez, A. 2001. Alcamidas en Plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*. 20: 377-387.
25. Molina-Torres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramírez-Chávez y R. del-Río. 1995. Presence of the bornyl ester of deca-2E,6Z,8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *Journal of Natural Products*. 58: 1590-1591.
26. Parmar, V. S., S. C. Jain, K. S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O. D. Tyagi, A. K. Prasad, J. Wengel, C.E. Olsen y P.M. Bohl 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. 46: 597-673.



27. Ramírez-Chávez, E., L. Lucas-Valdez, G. Virgen-Calleros y J. Molina-Torres. 2000. Actividad fungicida de afinina y extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* sobre dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*. 34: 207-217.
28. Ríos, M.Y., Aguilar, B., Gutiérrez, M. 2006. *Analgesic activity of affinin, an alkamide from Heliopsis longipes. (Compositae) Journal of Ethnopharmacology*. 110: 364–367.
29. Ríos, M.Y., Aguilar, B., 2004. ^1H and ^{13}C assignments of two new triterpenes from *Cladocolea grahami*. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 42, 1066–1068.
30. Romero, M., Del-Castillo, A., Martínez, A. y Calderón, J. 1989. Preliminary studies on the antibacterial, insecticidal and toxicological effects of the chilcuan root *Heliopsis longipes*. *Veterinaria*. 20: 151-156.
31. Rzedowski, C. G. de, Rzedowski, J. y colaboradores. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro. 1406 pp.
32. Wang-Hong, L., Jim-Min, F., Yu, S.Ch. 1999. Lignans from *Taiwania cryptomerioides*. *Phytochemistry*. 50, 653–658.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

1. www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/infU029.pdf
2. www.itis.gov/download/download.do



ANEXOS

Anexo 1 FORMULARIO

Parámetro	Fórmula
Media aritmética de y (\bar{y})	$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$
Media aritmética de x (\bar{x})	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$
Desviación estándar (s)	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Coefficiente de variación (% CV)	$\% CV = \frac{s}{y} \times 100$
Coefficiente de variación de regresión (% $CV_{y/x}$)	$\% CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y} \times 100$
Pendiente (b_1)	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al origen (b_0)	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Coefficiente de determinación (r^2)	$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$



Desviación estándar de la pendiente (S_{b1})	$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Desviación estándar de regresión ($S_{y/x}$)	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$
Desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b0})	$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$
Intervalo de confianza para la media poblacional ($IC(\mu)$)	$IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$)	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$)	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$
Límite de detección (LD)	$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$
Límite de cuantificación (LC)	$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$
Media aritmética del análisis inicial (\bar{y}_0)	$\bar{y}_0 = \frac{\sum y_0}{n_0}$
Media aritmética del análisis de cada condición de almacenaje (\bar{y}_i)	$\bar{y}_i = \frac{\sum \bar{y}_i}{n_1}$

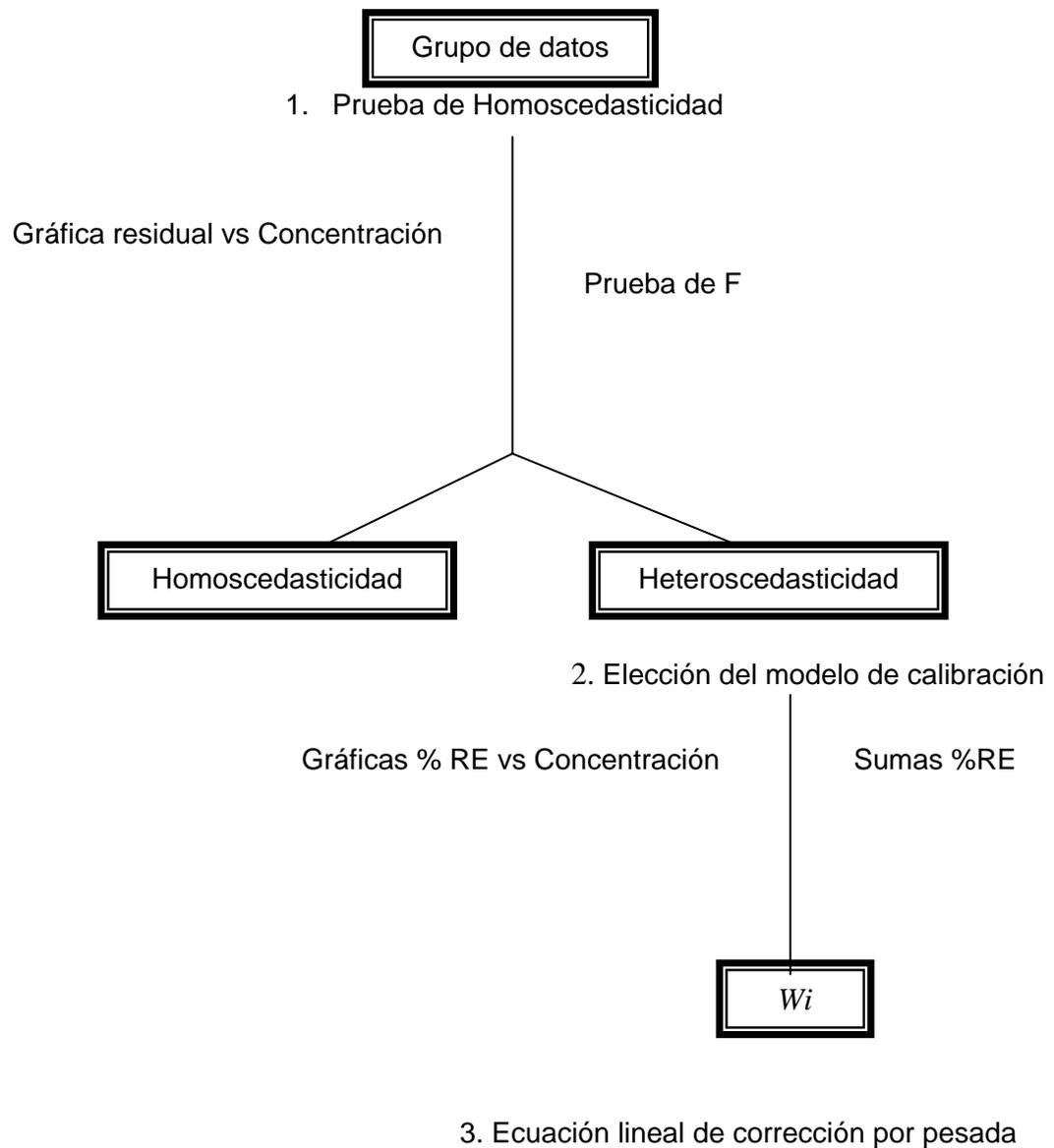


Diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje respecto de la media aritmética del análisis inicial (d_i)	$ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
% de Recobro	$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$



Anexo 2

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





Anexo 3

Tabla estadística 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
25	2.060	50	2.009	75	1.992



Anexo 4

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

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	19.50	199.50	799.50	4999.50	49999.50	500000.00
2	1.00	9.00	19.00	39.00	99.00	999.00	9999
3	2.89	5.46	9.75	16.01	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	8.13	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	4.09	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