

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA



“Estudios de absorción *in vitro* de los ácidos
3 α -hidroximasticadienónico y
masticadienónico aislados de Cuachalalate
(*Amphipterygium adstringens*)”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ERICK ALEJANDRO MORALES MARTÍNEZ

TUTOR: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

ASESORA: M. en F. MARÍA MARTHA UGALDE HDEZ.

Año: 2011





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.

Dedicada a mis padres
José Morales y Julieta Martínez por
haberme enseñado a trabajar
incansablemente para lograr mis
objetivos, por todo su apoyo no solo
para mi formación profesional sino
también como ser humano
los amo

Agradecimientos

Este Proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto DGAPA IN 210910, Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado a través del proyecto PAIP 6390-18 y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 82 613.

A la Facultad de Química por el apoyo recibido durante la participación en el Subprograma 127 Formación Básica en Investigación.

Agradecimientos

Al Dr. Andrés Navarrete por la gran oportunidad para la realización de este proyecto y por todo su apoyo y guía.

A la Dra. Laura Guzmán, al QFB. Everardo Blaisdell, al M en C. Alejandro Alfaro y a la QFB. Gabriela Tapia por todo su apoyo y por todas sus enseñanzas personales y profesionales.

A mis amigos del laboratorio 126 de la Facultad de Química por haber hecho divertidos estos últimos años.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno MORALES MARTÍNEZ ERICK ALEJANDRO con número de cuenta 30282443-8 de la carrera de Q. F. B., se le ha fijado el día 06 del mes de Junio de 2011 a las 09:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
VOCAL* DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
SECRETARIO DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO
SUPLENTE Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO
SUPLENTE M. en C. JOSÉ LUIS BALDERAS LÓPEZ

Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines.

El título de la tesis que se presenta es: "Estudios de absorción in vitro de los ácidos 3α-hidroximasticadienónico y masticadienónico aislados de Cuachalálate (Amphipterygium adstringens)".

Opción de titulación: Tesis Experimental

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 06 de mayo de 2011.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCION
DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

RECIBÍ:
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vo.Bo.
DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: Dra. Leticia Cruz Antonio

Suplente: Q.F.B. Irma Alejandro Razo

Suplente: M. en C. José Luis Balderas López

Sitio de elaboración de la Tesis:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesora: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Erick Alejandro Morales Martínez

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	4
3.1. Absorción de fármacos	4
3.2. Métodos para estudiar absorción <i>in vitro</i>	5
3.3. Absorción de productos naturales	7
3.4. Terpenos	8
3.5. Ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico	9
4. Planteamiento del problema	12
5. Hipótesis	13
6. Objetivo	14
6.1. Particulares	14
7. Metodología	15
7.1. Material vegetal	15
7.2. Animales	15
7.3. Sustancias	15
7.4. Equipos	16
7.5. Aislamiento y extracción del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico	16
7.6. Preparación del extracto fluido comercial de Cuachalalate	16
7.7. Experimentos <i>in vivo</i>	17
7.7.1. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en sangre total de rata	17
7.7.2. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en heces de rata	18
7.8. Experimentos <i>in vitro</i>	18
7.8.1. Técnica para estudios de absorción <i>in vitro</i> en saco intestinal de rata	18
7.8.2. Diseño del estudio	21
7.8.3. Método analítico para cuantificar ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en muestras de estudios de absorción <i>in vitro</i>	22
7.8.4. Cálculos	22

8. Resultados	24
8.1. Extracción y aislamiento de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico	24
8.2. Validación del método analítico	26
8.3. Extracto fluido comercial de Cuachalalate	31
8.4. Experimentos <i>in vivo</i>	31
8.4.1. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en sangre total de rata para una administración oral	31
8.4.2. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico en heces de rata para una administración oral	33
8.5. Estudios de Absorción <i>in vitro</i>	33
8.5.1. Diferencia entre segmentos de intestino	34
8.5.2. Absorción <i>in vitro</i> del ácido 3 α -hidroximasticadienónico	35
8.5.3. Absorción <i>in vitro</i> del ácido masticadienónico	36
8.5.4. Absorción <i>in vitro</i> de la combinación de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico.	37
8.5.5. Absorción <i>in vitro</i> del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico a partir de un extracto fluido	39
8.5.6. Parámetros de comparación interexperimentos	40
9. Discusión de Resultados	42
10. Conclusiones	46
11. Perspectivas	47
12. Anexos	48
12.1 Validación de métodos para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico	49
12.2 Validación de métodos para el ácido masticadienónico	63
12.3 Espectroscopia del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y del ácido masticadienónico	76
13. Bibliografía	90

1. Resumen

Los ácidos triterpénicos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico se han identificado como los principales componentes bioactivos antiulcerosos de la corteza de *Amphipterygium adstringens*, una planta de amplio uso en la medicina tradicional mexicana (Navarrete, et. al. 2006) sin embargo, se desconocen sus propiedades de absorción. En un estudio *in vivo* en ratas, se encontró que después de la administración por vía oral de un extracto acuoso de la corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), no se detectan ambos compuestos en sangre total ni en orina. Por otro lado, el ácido 3 α -hidroximasticadienónico se recupera solo el 7.23 \pm 0.5 % en heces tras la administración por vía oral de una dosis de 150 mg/kg. En el presente trabajo se estudiaron las propiedades de absorción de estos ácidos triterpénicos, con el fin de contribuir se llevó a cabo el estudio de absorción *in vitro* en el modelo de saco intestinal de rata. Para ello, los ácidos triterpénicos se aislaron de la corteza de Cuachalalate y se realizó el estudio de absorción *in vitro* después de administrarlos solos, después de administrarlos en conjunto y después de administrarlos en forma de un extracto fluido comercial. Se encontró que el modelo matemático que describe el paso de ambos compuestos desde la luz intestinal hacia el intersticio se ajusta a un modelo biexponencial, descrito por la ecuación $C=403.8813\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.0772t(\text{min})}+73.5717\mu\text{g/mL}\cdot e^{-1.2660E-010t(\text{min})}$ para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y $C=445.7296\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1005t(\text{min})}+110.8922\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.013t(\text{min})}$ para el ácido masticadienónico, después de adicionar una concentración inicial de 500 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los ácidos. Cuando se administran conjuntamente y como extracto fluido se sigue el mismo modelo. Así mismo se demostró que no hay diferencia significativa en la absorción del ácido 3 α -

hidroximasticadienónico entre yeyuno e íleon de rata. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico se absorbe 92.55 ± 4.5 % y el ácido masticadienónico se absorbe 88.83 ± 7.2 % en un período de 60 minutos. Con esto se demostró que ambos compuestos tienen buenas propiedades de absorción intestinal y en complemento de los experimentos *in vivo* se considera que la biotransformación ocurre después de la absorción, aunque esto debe verificarse con experimentos de biotransformación adicionales.

2. Introducción

Los estudios de absorción de fármacos en intestino proporcionan información importante para determinar la factibilidad de la vía de administración oral, la dosificación y el diseño de la forma farmacéutica debido a la correlación que existe entre las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la permeabilidad intestinal de los productos naturales que se utilizan con fines terapéuticos, o de cómo se modifica la absorción de otras moléculas en presencia de éstos.

La corteza de *Amphipterygium adstringens*, conocida como Cuachalalate, es ampliamente utilizada en México como medicina en forma de decocción para el tratamiento de la úlcera péptica. Se han identificado al ácido 3 α -hidroximasticadienónico y al ácido masticadienónico como parte de los componentes activos gastroprotectores.

En este trabajo se realizó el estudio de la absorción intestinal *in vitro* de los ácidos triterpénicos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico en forma individual y como componentes de un extracto comercial de Cuachalalate para determinar su cinética de absorción en el modelo de saco intestinal de rata.

3. Marco Teórico

3.1. Absorción de fármacos

La absorción estudia el paso de sustancias en el organismo del sitio donde se depositan a la circulación sistémica (Lorenzo et al., 2009). Los mecanismos de absorción dependen de las características fisiológicas gastrointestinales, del pH y de la motilidad intestinal (Streubel et al., 2006). La penetración de los fármacos ocurre por varios mecanismos, pueden difundir pasivamente por conductos acuosos en las uniones intercelulares o a través de las membranas lipídicas. Los fármacos con características apropiadas son llevados al interior o al exterior por moléculas transportadoras. Los fármacos con dificultades para pasar a través de la membrana pueden unirse con receptores en la superficie celular, ser rodeados por la membrana (Endocitosis) y luego ser liberados dentro de la célula o expulsados en vesículas delimitadas por la membrana fuera de la célula hacia el espacio extracelular (Exocitosis), estos mecanismos se ejemplifican en la figura 1. (Katsung et. al., 2009)

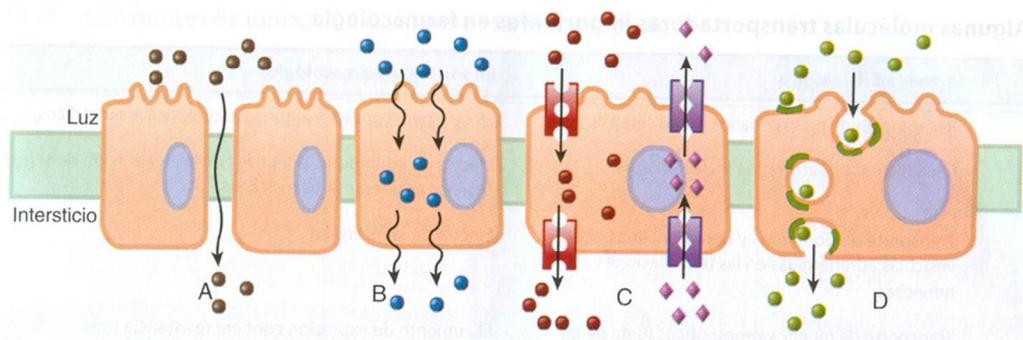


Figura 1. Mecanismos de penetración farmacológica. (A) Difusión pasiva a través de uniones intercelulares, (B) Difusión pasiva a través de membranas lipídicas, (C) Transportadores de flujo de entrada y de salida, (D) Endocitosis y Exocitosis. (Katsung et. al., 2009)

El intestino tiene la capacidad de absorber agentes externos debido a la presencia de vellosidades, microvellosidades y transportadores en las membranas apical y basolateral. La absorción en la región apical o serosa del enterocito es regulado por proteínas transportadoras de influjo como ASBT (Transportador Apical de Sales Biliares de Sodio), OATPs (Proteínas Transportadoras de Aniones Orgánicos), ENT1, 2 (Transportador Equilibrante de Nucleósidos 1 y 2), SGLT1 (Transportador de Glucosa Tipo 1), MCT1 (Transportador Monocarboxílico Tipo 1), CNT1, 2 (Transportador de Nucleósidos Tipo 1 y 2), OCTN2 (Transportador de Carnitina) y PepT-1 (Transportador de Péptidos 1). Estas proteínas están involucradas en el transporte de muchos compuestos endógenos, incluyendo péptidos, aniones y cationes orgánicos, aminoácidos, nucleósidos, así como una larga variedad de fármacos como los antibióticos β -lactámicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bifosfonatos, metotrexate, etcétera. Por otra parte, los transportadores de eflujo regulan la expulsión de xenobióticos de los enterocitos al lumen con la finalidad de evitar su llegada a la circulación sistémica y desempeñan un papel importante en la destoxificación entre estos transportadores se encuentran la glicoproteína P (P-gp o MDR-1), la proteína 2 asociada a la multiresistencia a fármacos (MRP-2 o ABCC2) y la proteína de resistencia al cáncer de pecho (BCRP o ABCG2), las cuales se presentan en la membrana apical de humanos y roedores (Colalto, 2010).

Uno de los mayores obstáculos de la absorción es la biotransformación intestinal. La superfamilia de enzimas citocromo P450 en los enterocitos, y principalmente la CYP3A, metabolizan, destoxifican y bioactivan xenobióticos (Yang et al., 2007).

3.2. Métodos para estudiar absorción *in vitro*

Existen diferentes modelos para estudiar la absorción de un fármaco *in vitro* que se utilizan para el estudio de absorción de nutrientes o fármacos. Los modelos están basados en el uso de preparaciones obtenidas de segmentos de intestino (Johnson et al, 2001): cultivos celulares (Borm et al., 1983), sacos formados con intestino (Kaplan y Cotler, 1972) o la cámara de Ussing (Rogers et al., 1987).

El sistema más comúnmente utilizado involucra el cultivo de líneas celulares para estudiar la permeabilidad y el transporte de fármacos a través de la barrera intestinal. En estos sistemas se pueden evaluar mecanismos de transporte, absorción, y toxicidad; sin embargo, estas células no presentan todas las enzimas metabólicas específicas presentes en el intestino y tienen baja expresión de transportadores (Deferme et al., 2008). La línea celular más comúnmente utilizada en experimentos de permeabilidad es la Caco-2, que proviene de adenocarcinoma de colón humano (Hunter et al., 1990). Otras líneas celulares que se utilizan pueden ser las de riñón Canino “Madin-Darby” (MDCK), Línea de células epiteliales de riñón porcino (LLC-PK1) , Células de intestino fetal de ratas (2/4/A1), Clon de pases tardíos de células Caco-2 (TC7) y Línea celular derivada de adenocarcinoma de colon humano grado II (HT29). (Deferme et al., 2008).

El modelo de saco formado con intestino de roedor es un modelo *in vitro* de fácil preparación, reproducible y que no requiere el uso de aparatos inusuales (Leppert y Fix 1994); sin embargo, la viabilidad de los tejidos es de pocas horas, en algunos experimentos se ha determinado un aproximado de al menos 120 min (Chan et al., 2005).

El saco formado, que puede estar o no invertido, contiene solución fisiológica y el fármaco se adiciona en el interior (Leppert y Fix, 1994).

El empleo del modelo de saco no invertido fue diseñado originalmente para evaluar los mecanismos de transporte (Kaulet al.1981), permite estudiar la permeabilidad pasiva de las moléculas transportadas activamente (Genty et al., 2001) y se pueden estudiar dos fármacos simultáneamente (Leppert y Fix, 1994). En ese modelo, la preparación de los sacos es más sencilla que cuando se requiere invertir el tejido y se evitan posibles daños morfológicos; las cantidades de fármaco que se requieren para el estudio son relativamente pequeñas y se pueden tomar muestras analíticamente limpias con frecuencia y en forma sucesiva (Ruan et al., 2006).

3.3. Absorción de productos naturales

Existe poca información dirigida al estudio de absorción de productos naturales. Se cuenta únicamente con estudios dirigidos a investigar posibles interacciones en la absorción de fármacos con extractos de plantas medicinales; como los extractos de *Allium sativum* L., *Camellia sinensis* Kuntze, *Capsicum*spp, *Cassiaspp*, *Citrus paradisi* Macfad, *Curcuma longa* L., *Echinacea spp.*, *Ginkgo biloba* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Piper nigrum* L., *Serenoa repens* (Bartr.) Small, *Silybum marianum* L. Gaert., *Valeriana officinalis* L., *Zingiber officinale* Roscoe (Colalto, 2010).

Algunos productos naturales pueden interferir en la absorción de fármacos. En un trabajo en donde se analizó el efecto de un extracto acuoso de hojas de *Bauhinia megalandra*,

Momordica charantia y *Taraxacum officinale* en la absorción de glucosa se encontró que el extracto de *B. megalandra* inhibe la absorción intestinal de glucosa al bloquear el cotransportador Na⁺-glucosa en segmentos de intestino aislados (Márquez y Gonzales, 2002). Un estudio enfocado al tratamiento de pacientes con SIDA, demostró que la absorción de algunos antirretrovirales como el nevirapino que es transportado activamente de la membrana basolateral a la membrana apical disminuye en presencia de verapamilo que es un inhibidor de la glicoproteína P, pero en combinación con extractos acuosos de *Hypoxis hemero callidea* aumenta su biodisponibilidad por una interacción Fármaco-Planta cuando se administra conjuntamente por vía oral ya que se ha demostrado tiene efectos como inhibidor de la glicoproteína P. (Brown et al., 2008).

3.4. Terpenos

Los terpenos son metabolitos secundarios sintetizados principalmente por plantas, y de manera limitada por insectos, microorganismos marinos y hongos; suelen estar presentes en los aceites esenciales y se han identificado aproximadamente 30000 de ese tipo de productos naturales (Dzubak et al., 2006).

Los terpenos se clasifican de acuerdo a la cantidad de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) en mono-, sesqui-, di-, sester-, tri-, tetra- y poli-terpenos. Los triterpenos cuentan con 6 unidades de isopreno, que equivalen a 30 átomos de carbono (Carey, 2006)

Los triterpenos han presentado efectos como: antiinflamatorio, hepatoprotectores, analgésicos, antimicrobianos, antimicóticos, virostáticos e inmunomoduladores. Por lo que son empleados principalmente en el tratamiento de hepatitis e infecciones parasitarias (Dzubak et al., 2006) y antiulceroso (Chávez-Piña y Navarrete, 2009).

Hasta la fecha, el conocimiento de los mecanismos moleculares a través de los cuales se absorben los terpenos es aún limitado. El sesquiterpeno Buagafuran (4-butil- α -agarofurano), derivado del componente agarofurano de la especie *Aquillaria agallocha* Roxb (Li y Li, 2008) y el diterpeno Criptotansinon (CTS), el mayor constituyente de las raíces de *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), son sustratos de la glicoproteína P (PgP/MDR1/ABCB1) (Yu et al., 2007). Mientras que, el triterpeno astragaloside IV es absorbido por un mecanismo típico de difusión pasiva y los inhibidores de glicoproteína P no afectan su cinética de absorción en intestino delgado (Huang et al., 2008).

3.5. Ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico

Los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico (Figura 2 y 3) son los principales componentes de la corteza del árbol de *Amphipterygium adstringens*, una planta medicinal conocida popularmente como Cuachalalate (Navarrete et al., 1989; Oviedo et al., 2004).

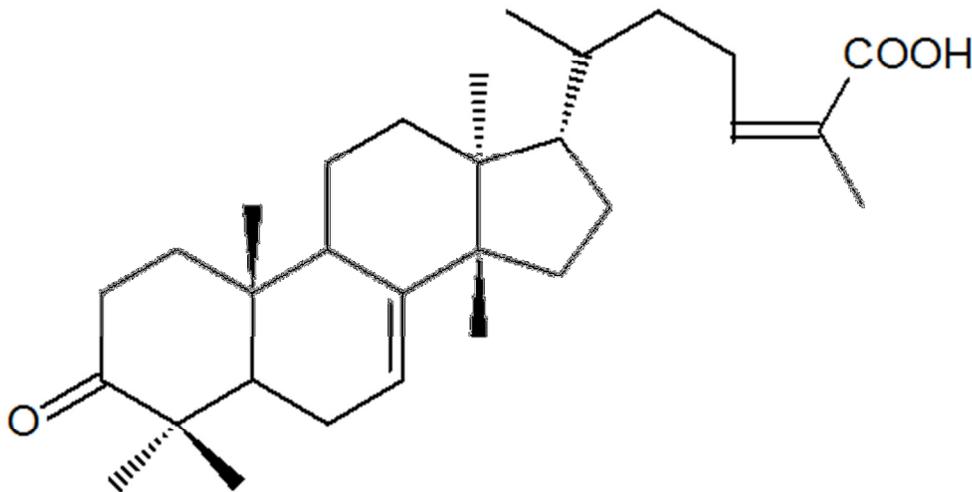


Figura 2. Estructura química del ácido masticadienónico

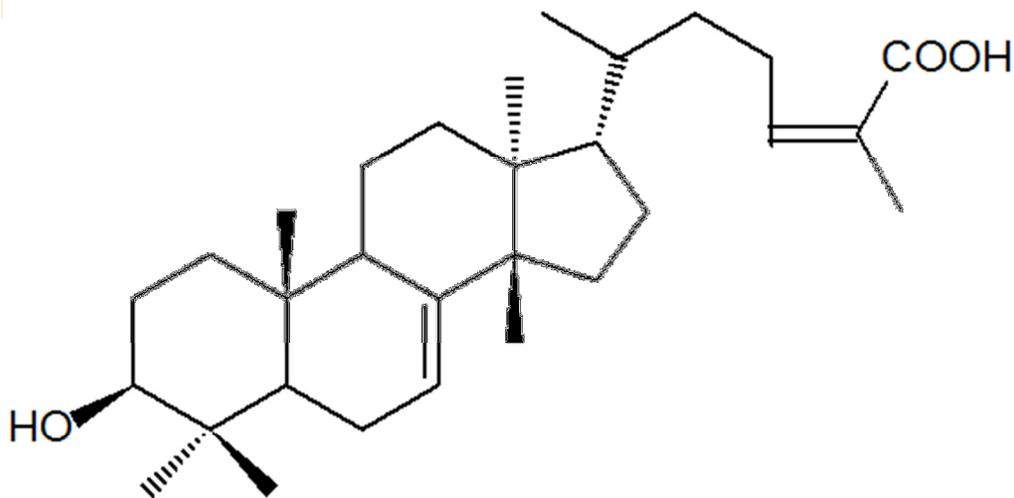


Figura 3. Estructura química del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

El Cuachalalate es una planta medicinal de uso común en la República Mexicana, su corteza se vende en la mayoría de los mercados atribuyéndosele varias propiedades curativas entre las que se encuentran: cicatrizante, calmante, antibiótico, en la disolución de cálculos biliares, agente hipocolesteremiante, antimalárico, antiinflamatorio, anticancerígeno, antitumoral, antiséptico y antiulceroso (Navarrete et al., 1989).

El efecto gastroprotector de esta planta se ha demostrado en modelos animales y se ha identificado al ácido 3 α -hidroximasticadienónico, el ácido 3-epioleanólico, y el β -sitoesterol como los principios activos gastroprotectores de la corteza del Cuachalalate (Arrieta et al., 2003). La actividad antiinflamatoria y citotóxica en células de leucemia de la línea (L-12-10) ha sido reportada para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico (Oviedo et al., 2004). El extracto hexánico de Cuachalalate presenta efecto hipocolesteremico en ratas (Mata et al., 1991). Los ácidos anacardicos presentes en

el Cuachalalate han mostrado efectos fisiológicos como la inhibición de algunas enzimas y efectos antitumorales, antimicrobianos, antiacné y molusquicidas (Navarrete et al., 2006; Navarrete et al., 1989; Oviedo et al., 2004). Más recientemente, se les ha demostrado efecto contra el *Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2007)

4. Planteamiento del problema

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el masticadienónico son los principios activos gastroprotectores de la corteza de Cuachalalate con un uso terapéutico potencial; sin embargo, no se ha estudiado completamente su farmacocinética. Se realizaron experimentos iniciales *in vivo* administrando por vía oral 300 mg/kg del extracto acuoso (seco) de la corteza de Cuachalalate en ratas Wistar macho, sin embargo no se detectaron ambos ácidos en sangre total. En otro experimento se administró una dosis inicial de 150 mg/kg de ácido 3 α -hidroximasticadienónico por vía oral y se determinó en heces fecales pero únicamente se recuperó el 7.27 \pm 0.5 % de este ácido triterpénico. En este trabajo se consideró importante realizar los estudios de absorción *in vitro* en el modelo de saco intestinal de rata para los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico con el fin de caracterizar su perfil cinético de absorción intestinal y así mismo para resolver la duda de si ambos compuestos se absorben o se biotransforman durante la misma.

5. Hipótesis

“El ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el ácido masticadienónico presentan baja absorción intestinal por lo que la velocidad de absorción será baja y la fracción que se absorba en una hora será menor al 33 % (Parrott & Lave, 2002), de la concentración inicial administrada”.

6. Objetivo

Estudiar la absorción *in vitro* de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico aislados de corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) utilizando el modelo del saco intestinal de rata.

6.1. Particulares

1. Determinar el perfil cinético de absorción intestinal de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico, en forma individual, en una mezcla de ambos y como componentes de un extracto fluido comercial.
2. Verificar si los compuestos se biotransforman en la luz intestinal.
3. Validar la metodología analítica para cuantificar los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico de muestras obtenidas en el sistema biológico *in vitro*.

7. Metodología

7.1. Material Vegetal

La corteza seca y molida de Cuachalalate se obtuvo como un donativo de Laboratorios Mixim SA de CV el día 25 de junio del 2009.

7.2. Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 60 a 90 días de edad y de un peso entre 250 y 300 g provenientes de Harlan México SA de CV En todos los procedimientos en que se ocuparon animales se siguieron los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Química de la UNAM.

7.3. Sustancias

Los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico se aislaron de la corteza de *Amphipterygium adstringens* como compuestos sólidos. Se utilizó un extracto fluido comercial de Cuachalalate donado por Laboratorios Mixim SA de CV. Para los análisis se utilizó Metanol, Etanol, Acetonitrilo, Ácido Acético y 2-propanol todos de grado HPLC adquiridos de JT Baker. Para la solución Krebs-Henseleit (KHS) se utilizó D-glucosa, MgSO₄•7H₂O, KH₂PO₄, KCl, NaCl, CaCl₂•H₂O, NaHCO₃ y EDTA grado reactivo adquiridos de JT Baker.

7.4. Equipos

El sistema cromatográfico consistió de una bomba Waters Delta 600 (Waters Corp., Milford, MA, USA), un inyector Waters 717 Plus, un controlador automático de gradientes Waters 600, un detector UV con arreglo de fotodiodos Waters 2996 y una estación computarizada para procesamiento de datos equipada con el software Waters Empower.

7.5. Aislamiento y extracción del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico

2.625 kg de corteza seca y molida de Cuachalalate se extrajo con 7 L de diclorometano a reflujo durante 4 horas por triplicado, obteniéndose 208.3 g de extracto. Una fracción de este extracto (100 g) se adsorbió con 90 g de gel de sílice y se preparó en una columna cromatográfica preparada con 1.680 kg de gel de sílice en una relación 1:9, el volumen de cambio fue de 1.5 L y cada fracción fue de 500 mL. Se recolectaron 55 fracciones, eluidas sucesivamente con hexano, hexano-acetato de etilo (9:1) y (8:2), acetato de etilo y metanol. Cada fracción se monitoreó por cromatografía en capa fina comparando con los compuestos de interés obtenidos en estudios anteriores (Arrieta et al., 2003).

7.6. Preparación del extracto fluido comercial de Cuachalalate

A una muestra comercial de 150 mL de extracto fluido de Cuachalalate se le evaporó el disolvente obteniéndose 12.399 g de extracto seco, el cual posteriormente se pulverizó. A una muestra de 100 mg del extracto seco se le agregaron 10 mL de metanol HPLC y se disolvió por ultrasonido por 20 min. Se analizó por cromatografía de líquidos con el método reportado por Navarrete y colaboradores (2006).

7.7. Experimentos *in vivo*

7.7.1. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en sangre total de rata

Cinco ratas wistar macho de peso entre 250 a 300 g con ayuno previo de 24 horas y con libre acceso al agua, se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 35 mg/kg de peso de vía intraperitoneal. A cada animal se le realizó un corte longitudinal de 2 cm en la cola para descubrir la arteria caudal y canular con un tubo de polietileno previamente heparinizado (Cruz et al., 1999). Una vez canulada la arteria se sujetó con hilo y se suturó la incisión, el animal se dejó en reposo hasta que saliera del efecto anestésico. Una vez consciente, con ayuda de una cánula esofágica, se administró por vía oral 3 mL de extracto acuoso seco de Cuachalalate en solución salina isotónica con 1 gota de Tween 80, equivalente a una dosis de 300 mg/kg de extracto acuoso seco de Cuachalalate. Se tomaron muestras de sangre de 100 μ L a los tiempos: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 240 y 360 min con reemplazo del volumen extraído con solución salina isotónica, cada muestra se colectó en viales con heparina. A cada muestra incluyendo el blanco, se le adicionaron 300 μ L de metanol HPLC se agitaron en vortex por 30 segundos y se centrifugaron a 3000 rpm para precipitar las proteínas. Los sobrenadantes se filtraron en membranas de nylon de 0.45 μ m y se recibieron en viales para su posterior inyección en el cromatógrafo de líquidos y análisis con el método desarrollado por Navarrete y colaboradores (2006).

7.7.2. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en heces de rata

A cuatro ratas wistar macho con previo ayuno de 18 horas se les administró por vía oral por medio de una cánula esofágica una dosis de 150 mg/kg de ácido 3 α -hidroximasticadienónico a las 3 horas después de la administración se les dio alimento y agua y se pusieron en observación durante 48 horas, las heces previas a la administración del compuesto fueron usadas como blancos, se recolectaron las heces durante 48 horas. A una muestra correspondiente al 10 % del total de las heces de cada rata se homogenizó y se realizó una extracción con 5 mL de metanol grado HPLC, se agitaron en un vortex durante 30 segundos, posteriormente se colocaron en el sonicador por 20 minutos y enseguida se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Este procedimiento se repitió tres veces. Los sobrenadantes se juntaron y se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45 μ m. Se desechó el primer mililitro del filtrado y se tomó una muestra en un vial para su posterior análisis por cromatografía. El resto del filtrado se almacenó en frascos viales y en refrigeración. Se calculó el total del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en las heces de rata para obtener el porcentaje recuperado del compuesto.

7.8. Experimentos *in vitro*

7.8.1. Técnica para estudios de absorción *in vitro* en saco intestinal de rata.

Se utilizaron ratas macho Wistar con un período de ayuno de 18 horas, los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂, inmediatamente después se abrió la cavidad abdominal y se retiró el intestino del yeyuno al íleon, se lavó con 80 mL de solución Krebs-Henseleit (KHS) fría para eliminar el contenido intestinal, se cortó en segmentos de aproximadamente 13 cm para formar sacos. Los segmentos se cerraron en uno de los

extremos con hilo al cual se le ató una pesa de 3.1 g, el otro extremo del intestino se conectó al tubo central (Tubo a, Figura 4) de una cámara diseñada para estudios de absorción *in vitro* (Figura 4). La cámara se llenó con 45 mL de solución KHS y se mantuvo a temperatura constante de 37 °C con un baño recirculado, el tubo b de la Figura 4 sirve para oxigenar el tejido con gas carbógeno (95 % de O₂/ 5% CO₂). El experimento se inició colocando dentro del saco intestinal 2 mL de solución del compuesto de prueba en solución KHS. Se tomaron muestras de 200 µL del interior del saco intestinal con remplazo del volumen a través de la cánula (h, figura 4) a los tiempos 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 60 min. Las muestras se analizaron por el método analítico reportado por Navarrete et al. (2006). Cada experimento se realizó por sextuplicado.

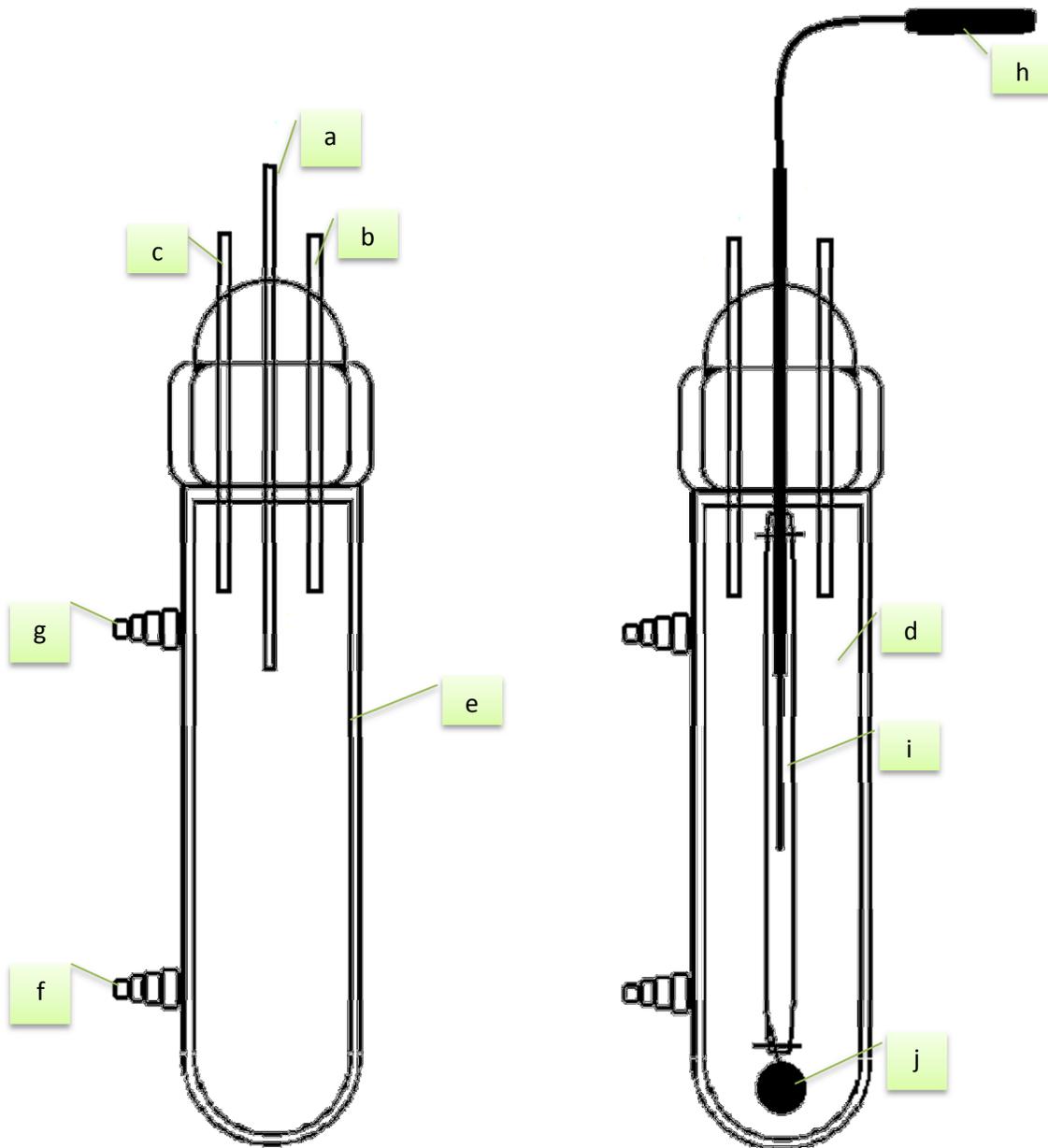


Figura 4. Cámara para estudios de Absorción: Tubo a sirve para colocar el saco intestinal; Tubo b, sirve para oxigenar la preparación con gas carbógeno; Tubo c sirve de salida del de gas después de oxigenar al tejido. El compartimiento d corresponde a la cámara de órgano aislado, cubierto por una chaqueta de calentamiento e, con sus respectivas entrada f y salida g de agua a temperatura constante. La cánula h que se inserta por el tubo a sirve para la toma de muestras, el saco intestinal se representa con la letra i en cuyo extremo se coloca la pesa j de 3g.

7.8.2. Diseño del estudio

Se realizaron 5 tipos de experimentos en el modelo de saco intestinal de rata:

Experimento 1: Estudio de la absorción *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico, en diferentes segmentos de intestino (yeyuno e íleon) utilizando una concentración de 70 $\mu\text{g/mL}$

Experimento 2: Estudio de la absorción intestinal *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico usando una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$

Experimento 3: Estudio de la absorción intestinal *in vitro* del ácido masticadienónico usando una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$

Experimento 4: Estudio de la absorción intestinal *in vitro* de la administración conjunta de del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el ácido masticadienónico usando una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ de cada ácido.

Experimento 5: Estudio de la absorción intestinal *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y del ácido masticadienónico como compuestos presentes en un extracto fluido comercial de Cuachalalate usando 40 mg del extracto seco.

7.8.3. Método analítico para cuantificar ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en muestras de estudios de absorción *in vitro*

Cada una de las muestras de 200 μ L obtenidas a cada tiempo se diluyeron con 0.5 mL de metanol grado HPLC, se agitaron en un agitador tipo Vortex por 30 s y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos, se filtraron en un acrodisco con una membrana de nylon de 0.45 μ m y el filtrado se recibió en un frasco vial para su posterior inyección en el cromatógrafo de líquidos.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la lectura de las muestras fueron las siguientes (Navarrete et al., 2006):

- Columna: Luna (Phenomenex®, tamaño de partícula de 5 μ m), de 4.6 mm x 150 mm con una precolumna de seguridad LC-18 (Superlco®, tamaño de partícula de 5 μ m) de 2 cm de longitud.
- Fase móvil: Sistema Isocrático ternario H₂O (0.1% Ácido Acético) 18%- Acetonitrilo (0.1% Ácido Acético) 52%- Alcohol Reactivo (90% Etanol, 5% Metanol, 5% 2-Propanol) 30%.
- Velocidad de Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.
- Volumen Inyección: 10 μ L
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Tiempo de la corrida: 20 min.
- Tiempo de lavado entre inyecciones: 5 min.
- Longitud de onda de la lectura: 215 nm

7.8.4. Cálculos.

El modelo de desaparición del compuesto del lumen intestinal en el modelo de saco intestinal utilizado se ajustó a la ecuación general 1:

$$C=Ae^{-at}+Be^{-bt} \quad (1)$$

El cálculo de las constantes del modelo poliexponencial se obtuvo por el método de los residuales a partir de la gráfica concentración-tiempo, donde C es la concentración del compuesto a un tiempo específico, B_0 es el antilogaritmo de la ordenada al origen de la parte lineal de la gráfica y β la pendiente negativa, A_0 es el antilogaritmo de la ordenada al origen de los residuales de la parte no lineal y α la pendiente negativa. Figura 5. (Calpena y Escribano, 2008).

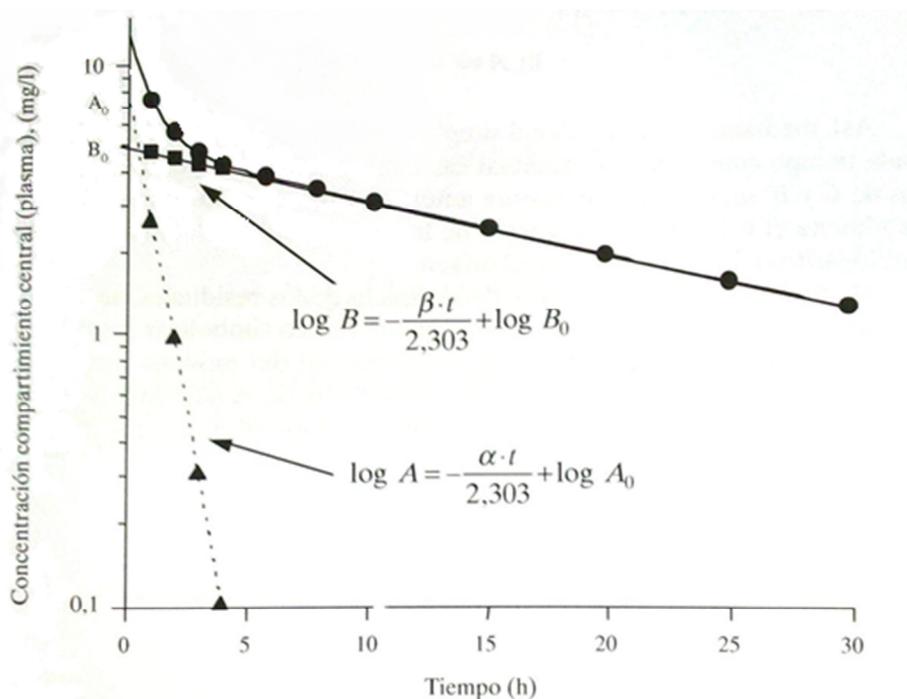


Figura 5. Representación de las constantes obtenidas por el método de los residuales para un modelo biexponencial. (Calpena y Escribano, 2008).

8. Resultados

8.1. Extracción y aislamiento de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico

El ácido masticadienónico se aisló de las fracciones 9 a 14 eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1, se obtuvieron 900 mg con punto de fusión de 174-179 °C y una pureza cromatográfica del 97 %. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico se aisló de las fracciones 17 a 42 eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2, se obtuvieron 11 g de este compuesto con un punto de fusión de 142-147 °C con una pureza cromatográfica del 95 %.

Así mismo se realizó la espectroscopia completa de los compuestos aislados para su identificación. Los espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (RMN) de una y dos dimensiones se encuentran en el Anexo 12.3 de este trabajo y corresponden con los reportados previamente (Navarrete et al., 1989; Arrieta et al., 2003). Por vez primera se realizó la asignación completa de las señales de resonancia magnética nuclear de los C y de los H de las estructuras de los compuestos de estudio (Figura 6, Cuadro 1)

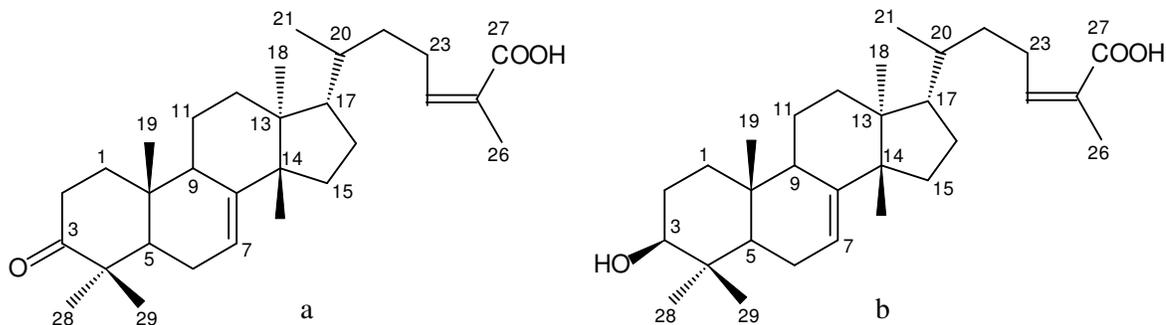


Figura 6. Estructuras del ácido masticadienónico (a) y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (b).

Cuadro 1. Asignación de las señales de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono e Hidrógeno del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico

Posición	Ácido masticadienónico		Ácido 3 α -hidroximasticadienónico	
	δ (^{13}C)	δ (^1H)	δ (^{13}C)	δ (^1H)
1	23.89	2.02 (<i>m</i>)	23.4	1.86 (<i>m</i>)
2	37.61	1.88 (<i>m</i>) 1.39 (<i>m</i>)	35.52	1.41 (<i>m</i>) 1.29 (<i>m</i>)
3	215.15	-	75.49	3.35 (<i>t</i> , <i>J</i> = 2.8 Hz)
4	35.48	-	35.31	-
5	51.43	1.67 (<i>m</i>)	48.08	2.23 (<i>m</i>)
6	17.76	1.52 (<i>m</i>)	17.46	1.45 (<i>m</i>)
7	117.38	5.27 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 6.3, 3.4 Hz)	117.35	5.15 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 6.5, 2.8 Hz)
8	145.57	-	145.61	-
9	33.65	1.42 (<i>m</i>)	30.75	1.37 (<i>m</i>)
10	47.14	-	42.97	-
11	27.69	1.92 (<i>m</i>)	27.68	1.82 (<i>m</i>)
12	34.51	2.05 (<i>m</i>)	33.49	1.36 (<i>m</i>)
13	43.07	-	36.89	-
14	50.79	-	50.71	-
15	34.45	2.09 (<i>m</i>)	33.3	1.66 (<i>m</i>)
16	47.65	2.26 (<i>m</i>)	43.97	1.70 (<i>m</i>)
17	52.31	1.43 (<i>m</i>)	52.35	1.38 (<i>m</i>)
18	21.63	0.76 (<i>s</i>)	21.38	0.72 (<i>s</i>)
19	21.15	1.03 (<i>s</i>)	26.77	0.88 (<i>s</i>)
20	33.09	1.73 (<i>m</i>) 1.55 (<i>m</i>)	24.99	1.93 (<i>m</i>) 1.83 (<i>m</i>)
21	18.05	0.84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.4 Hz)	17.76	0.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6.3 Hz)
22	35.24	1.44 (<i>m</i>) 1.06 (<i>m</i>)	34.2	1.03 (<i>m</i>) -
23	25.93	2.44 (<i>m</i>) 2.30 (<i>m</i>)	26.21	2.41 (<i>m</i>) 2.35 (<i>m</i>)
24	141.83	5.89 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7.4, 1.1 Hz)	143.16	5.82 (<i>td</i> , <i>J</i> = 7.5, 1.4 Hz)
25	127.26	-	126.47	-
26	20.66	1.79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 0.9 Hz)	20.38	1.80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.3 Hz)
27	169.02	-	169.89	-
28	24.45	0.93 (<i>s</i>)	21.36	0.82 (<i>s</i>)
29	12.38	0.94 (<i>s</i>)	12.51	0.67 (<i>s</i>)
30	27.23	0.97 (<i>s</i>)	27.39	0.84 (<i>s</i>)

8.2. Validación del Método Analítico

Se revalidó el método analítico desarrollado por Navarrete y colaboradores (2006) para analizar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico conforme a los parámetros marcados en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de QFB (2005). Se validaron dos métodos analíticos para cada compuesto para poder cuantificarlos en dos diferentes muestras: la primera muestra contiene al compuesto de estudio en solución fisiológica Krebs-Henseleit (KHS) en el interior de un saco intestinal *in vitro* y la segunda muestra se cuantifica el compuesto de interés presente en un extracto fluido de Cuachalalate en solución fisiológica KHS dentro del saco intestinal *in vitro*. Los resultados de la validación se presentan en los Cuadros 2 a 5. Los datos que originaron estos resultados pueden verificarse en el Anexo 13.3 Todos los métodos cumplen con los parámetros de validación y son adecuados para cuantificar a los ácidos triterpénicos en estudios de absorción *in vitro* en el modelo de saco intestinal.

Cuadro 2. Validación del método analítico para cuantificar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico en intestino *in vitro* de rata en el rango de concentración 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$

Sistema	Limite	Resultado
Precisión	$CV \leq 1.5$	0.3376%
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$	0.9994
	IC(β_1) No debe incluir el cero	15240.4695 a 15685.73923
	Ecuación	$C=17492.7942 * \text{Area}-146239.8870$
Método		
Especificidad	Especifico del analíto	La respuesta del método es únicamente al analíto
Repetibilidad	$CV \leq 5\%$	0.4849%
Exactitud	IC(μ) entre 95-105 %	99.4911 a 100.5090%
Linealidad	IC(β_1) incluye la unidad	0.9958 a 1.0231
	IC(β_0) incluye el cero	-14159.0973 a 27224.5922
	$CV_{y/x} \leq 5\%$	1.4323%
Precisión Intermedia	$CV \leq 5\%$	2.2028%
Robustez	$ d_1 \leq 5\%$	
	Velocidad de Flujo 0.8 mL/min	20.2063%
	Velocidad de Flujo 1.2 mL/min	21.3594%
	Temperatura 35°C	0.9560%
	Temperatura 45°C	4.0439%
Estabilidad	$ d_1 \leq 5\%$ 4 días	2.7231%
Límite de Cuantificación y Detección	IC(β_1) No debe incluir el cero	15281.0820 a 15987.7679
	r^2	0.9994
	LC	9.3646 $\mu\text{g/mL}$
	LD	3.0903 $\mu\text{g/mL}$

Resultados de la validación del método analítico que cumplen con los parámetros de validación.

Cuadro 3. Validación del método analítico para cuantificar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico del extracto fluido en el intestino *in vitro* de rata en el rango de concentración de 20 a 200 μ g/mL.

Sistema	Limite	Resultado
Precisión	$CV \leq 1.5$	0.3376%
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$	0.9994
	IC(β_1) No debe incluir el cero	15240.4695 a 15685.73923
	Ecuación	$C=17492.7942*Area-146239.8870$
Método		
Especificidad	Especifico del analíto	La respuesta del método es únicamente al analíto
Repetibilidad	$CV \leq 5\%$	0.5241%
Exactitud	IC(μ) entre 95-105%	99.4909 a 100.5916%
Linealidad	IC(β_1) incluye la unidad	0.9976 a 1.0453
	IC(β_0) incluye el cero	-55558.7592 a 24711.6837
Precisión Intermedia	$CV_{y/x} \leq 5\%$	2.7476%
	$CV \leq 5\%$	1.7864%
Robustez	$ d_1 \leq 5\%$	
	Velocidad de Flujo 0.8 mL/min	17.1586%
	Velocidad de Flujo 1.2 mL/min	22.3864%
	Temperatura 35 °C	0.5893%
	Temperatura 45 °C	2.6915%
	Estabilidad $ d_1 \leq 5\%$ 4 días	2.3436%
	Límite de Cuantificación y Detección	IC(β_1) No debe incluir el cero
	r^2	0.9993
	LC	9.7100 μ g/mL
	LD	3.2043 μ g/mL

Resultados de la validación del método analítico que cumplen con los parámetros de validación.

Cuadro 4. Validación del método analítico para cuantificar el ácido masticadienónico en el intestino *in vitro* de rata en el rango de concentración de 20 a 200 µg/mL.

Sistema	Limite	Resultado
Precisión	$CV \leq 1.5$	0.4257%
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$	0.9993
	IC(β_1) No debe incluir el cero	17222.9448 a 17676264.3651
	Ecuación	$C=15463.10435*Area-119179.1681$
Método		
Especificidad	Especifico del analíto	La respuesta del método es únicamente al analíto
Repetibilidad	$CV \leq 5\%$	2.2048%
Exactitud	IC(μ) entre 95-105%	100.0127 a 104.7509%
Linealidad	IC(β_1) incluye la unidad	0.97144 a 1.0179
	IC(β_0) incluye el cero	-37727.3521 a 51843.6585
	$CV_{y/x} \leq 5\%$	2.7723%
Precisión Intermedia	$CV \leq 5\%$	3.9178%
Robustez	$ d_1 \leq 5\%$	
	Velocidad de Flujo 0.8mL/min	20.0263%
	Velocidad de Flujo 1.2mL/min	18.2523%
	Temperatura 35°C	1.5174%
	Temperatura 45°C	5.5481%
	$ d_1 \leq 5\%$ 4 días	4.4369%
Límite de Cuantificación y Detección	IC(β_1) No debe incluir el cero	16697.8967 a 17241.6700
	r^2	0.9997
	LC	6.6387 µg/mL
	LD	2.1907 µg/mL

Resultados de la validación del método analítico que cumplen con los parámetros de validación.

Cuadro 5. Validación del método analítico para cuantificar el ácido masticadienónico del extracto fluido en el intestino *in vitro* de rata en el rango de 20 a 200 µg/mL

Sistema	Límite	Resultado
Precisión	$CV \leq 1.5$	0.4257%
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$	0.9993
	IC(β_1) No debe incluir el cero	17222.9448 a 17676264.3651
	Ecuación	$C=15463.10435*Area-119179.1681$
Método		
Especificidad	Especifico del analíto	La respuesta del método es únicamente al analíto
Repetibilidad	$CV \leq 5\%$	1.9850%
Exactitud	IC(μ) entre 95-105%	96.5676 a 100.6764%
Linealidad	IC(β_1) incluye la unidad	0.9957 a 1.0144
	IC(β_0) incluye el cero	-22766.4648 a 13186.4591
	$CV_{y/x} \leq 5\%$	1.1076%
Precisión Intermedia	$CV \leq 5\%$	2.7834%
Robustez	$ d_1 \leq 5\%$	
	Velocidad de Flujo 0.8mL/min	13.1108%
	Velocidad de Flujo 1.2mL/min	27.0237%
	Temperatura 35°C	4.7927%
	Temperatura 45°C	0.6502%
Estabilidad	$ d_1 \leq 5\%$ 4 días	4.5058%
Límite de Cuantificación y Detección	IC(β_1) No debe incluir el cero	16648.9171 a 17275.8828
	r^2	0.9996
	LC	7.6577 µg/mL
	LD	2.5270 µg/mL

Resultados de la validación del método analítico que cumplen con los parámetros de validación.

8.3. Extracto fluido comercial de Cuachalalate

El ácido masticadienónico apareció con un tiempo de retención de 14 minutos (pico 1; Figura 7), en tanto que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico apareció con un tiempo de retención de 16 minutos (pico 2; Figura 7). El contenido de estos ácidos triterpénicos en el extracto comercial fue de: 437.523 μ g (0.437% p/p) de ácido masticadienónico y 823.334 μ g (0.823 % p/p) de ácido 3 α -hidroximasticadienónico en el extracto seco.

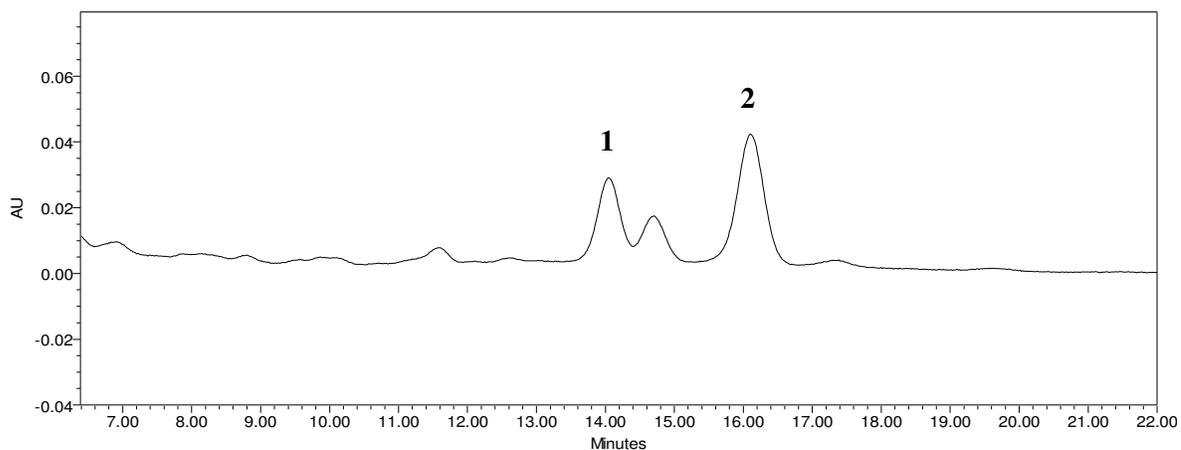


Figura 7. Cromatograma del extracto fluido de Cuachalalate que muestra los picos de los compuestos de interés: (1) ácido masticadienónico y (2) ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

8.4. Experimentos *in vivo*

8.4.1. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico en sangre total de rata para una administración oral

Se repitió este experimento 5 veces pero en ningún caso fue posible observar en la circulación sistémica alguno de los dos ácidos en los tiempos (15, 30, 45, 60, 120 y 240 min), los cromatogramas de las muestras se presentan a continuación en la figura 8:



Figura 8. Cromatogramas representativos del análisis de las muestras en sangre total para los ácidos 3 α -hidroximasticdienónico y ácido masticdienónico. a Muestra de sangre enriquecida con ácido 3 α -hidroximasticdienónico, b Muestra de sangre enriquecida con ácido masticdienónico. Muestras sangre después de una administración oral de 300 mg/kg de extracto seco de Cuachalalate por vía oral a los tiempos: c 0 min, d 15 min, e 30 min, f 45 min, g 60 min, h 120 min y i 240 min.

Para estos experimentos se verificó que la extracción del compuesto fuera la adecuada para confirmar que los compuestos no aparecen en sangre total y esto se verificó usando muestras enriquecidas, lo que verificó que los compuestos no están presentes en sangre en su forma sin alterar, pero no se ha confirmado si están presentes como metabolitos que no sean detectados por el método analítico.

8.4.2. Determinación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico en heces de rata para una administración oral.

Este experimento se realizó 4 veces con la dosis de 150 mg/kg de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y se comprobó que el compuesto sí está presente en las heces de rata en forma inalterada. En promedio sólo se recuperó el 7.23 \pm 0.5 % en 48 horas del ácido 3 α -hidroximasticadienónico de la cantidad total administrada. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados experimentales de la cuantificación de ácido 3 α -hidroximasticadienónico en heces de rata después de una administración oral de 150 mg/kg.

Rata	Peso rata (g)	Cantidad administrada (mg)	Peso de heces totales (g)	Ác. 3 α -hidroximasticadienónico en heces total (mg)	% Recuperado
1	271.3	40.67	6.605	4.144	6.831
2	295.3	44.25	8.196	3.345	7.559
3	275.3	41.29	7.076	2.821	6.832
4	284.6	42.67	9.064	3.363	7.883

8.5. Estudios de Absorción *in vitro*

En todos los experimentos de absorción *in vitro* de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico se estudió la absorción midiendo la disminución de la concentración de los compuestos dentro del saco intestinal y se encontró que el mejor modelo

matemático que describe la cinética es un modelo biexponencial representado por la ecuación general 1:

$$C=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t} \quad (1)$$

8.5.1. Diferencia entre segmentos de intestino

La absorción intestinal del ácido 3 α -hidroximasticadienónico a una dosis de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no presentó diferencias entre la región del íleon y del yeyuno del intestino de rata (Figura 9). La ecuación 2 que describe el cambio de la concentración con respecto al tiempo en la región del íleon es:

$$C=48.0890\mu\text{g}/\text{mL}*e^{-0.0917t(\text{min})}+15.4031\mu\text{g}/\text{mL}*e^{-7.8404\text{E}-011t(\text{min})} \quad (2)$$

$$r^2=0.8610$$

En tanto que para el yeyuno es:

$$C=59.3758\mu\text{g}/\text{mL}*e^{-0.0724t(\text{min})}+10.3396\mu\text{g}/\text{mL}*e^{-4.7644\text{E}010t(\text{min})} \quad (3)$$

$$r^2=0.9202$$

Con base a los errores estimados para cada constante y a una prueba $t_{\alpha=0.05}$ de las áreas bajo la curva se muestra que no hay una diferencia significativa entre los valores estimados de concentración-tiempo en el uso de los segmentos de yeyuno ($1472.96\pm 307.427 \mu\text{g}/\text{mL}*\text{min}$) e íleon ($1576.33\pm 195.278 \mu\text{g}/\text{mL}*\text{min}$) para el estudio de absorción *in vitro* ácido 3 α -hidroximasticadienónico, se asume el mismo comportamiento para el ácido masticadienónico.

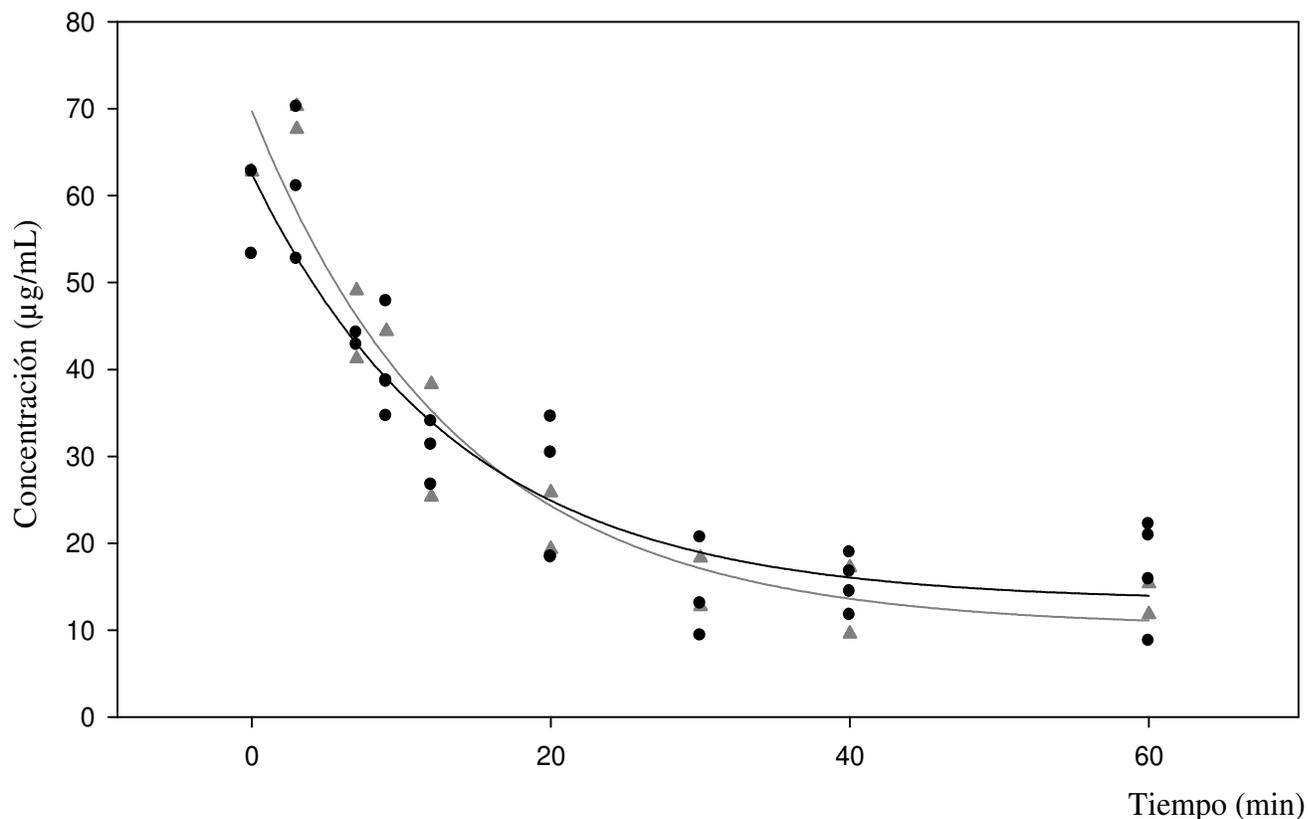


Figura 9. Curva de concentración-tiempo de la absorción *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en yeyuno (▲) e íleon (●) después de una administración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

8.5.2. Absorción *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Una vez demostrado que la absorción del ácido 3 α -hidroximasticadienónico no cambia con la región del intestino se procedió a realizar el estudio de los dos ácidos triterpénicos en el intestino de rata, sin diferenciar entre las zonas intestinales. Después de la administración de 500 $\mu\text{g/mL}$ del ácido 3 α -hidroximasticadienónico se observó una caída biexponencial de los cambios de concentración respecto al tiempo (Figura 10) regido por la ecuación 4:

$$C = 403.8813 \mu\text{g/mL} * e^{-0.0772t(\text{min})} + 73.5717 \mu\text{g/mL} * e^{-1.2660E-010t(\text{min})} \quad (4)$$

$$r^2 = 0.9209$$

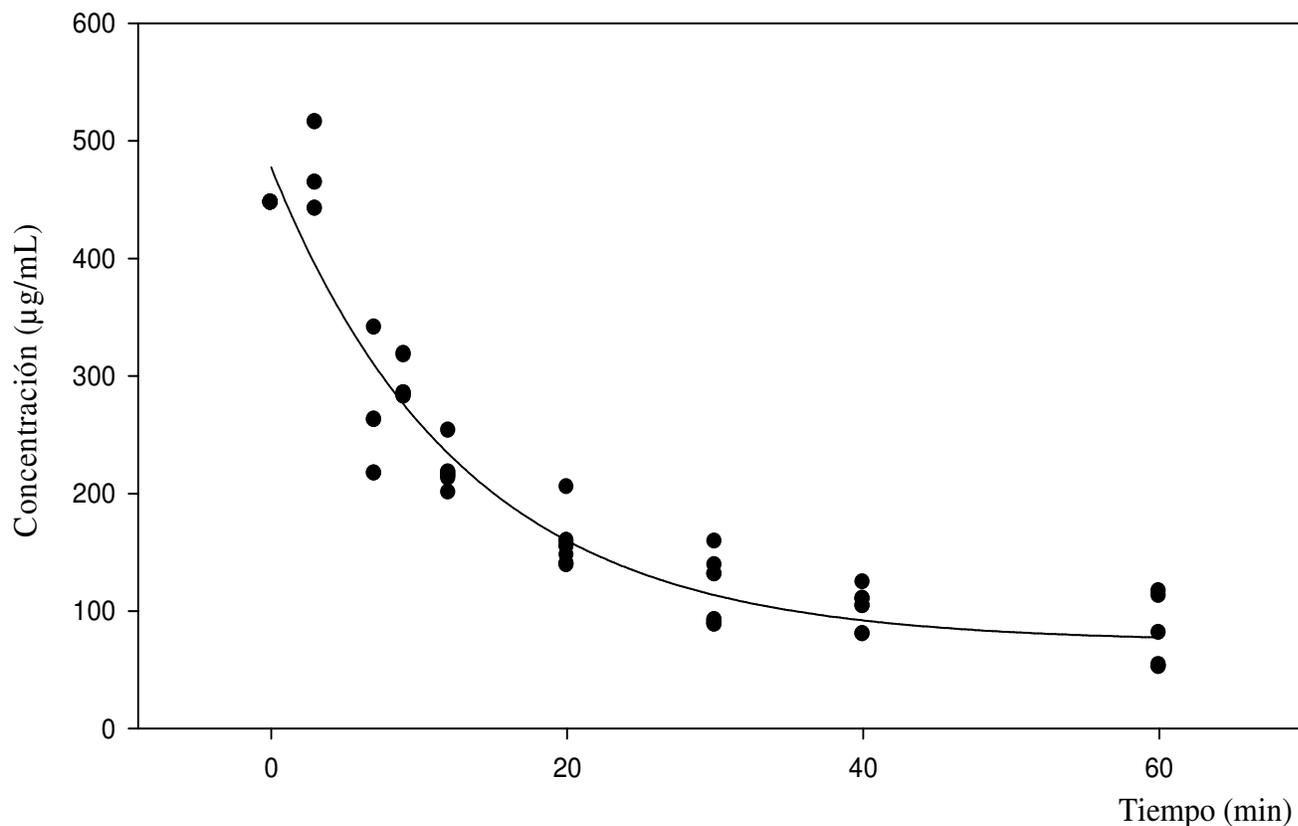


Figura 10. Curva de concentración-tiempo de la absorción *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico después de una administración de 500 $\mu\text{g/mL}$

8.5.3. Absorción *in vitro* del ácido masticadienónico

Del mismo modo que para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico, se utilizó una concentración inicial de 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido masticadienónico y su absorción se describió por la ecuación biexponencial (Figura 11):

$$C=445.7296\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1005t(\text{min})}+110.8922\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.013t(\text{min})} \quad (5)$$

$$r^2=0.8926$$

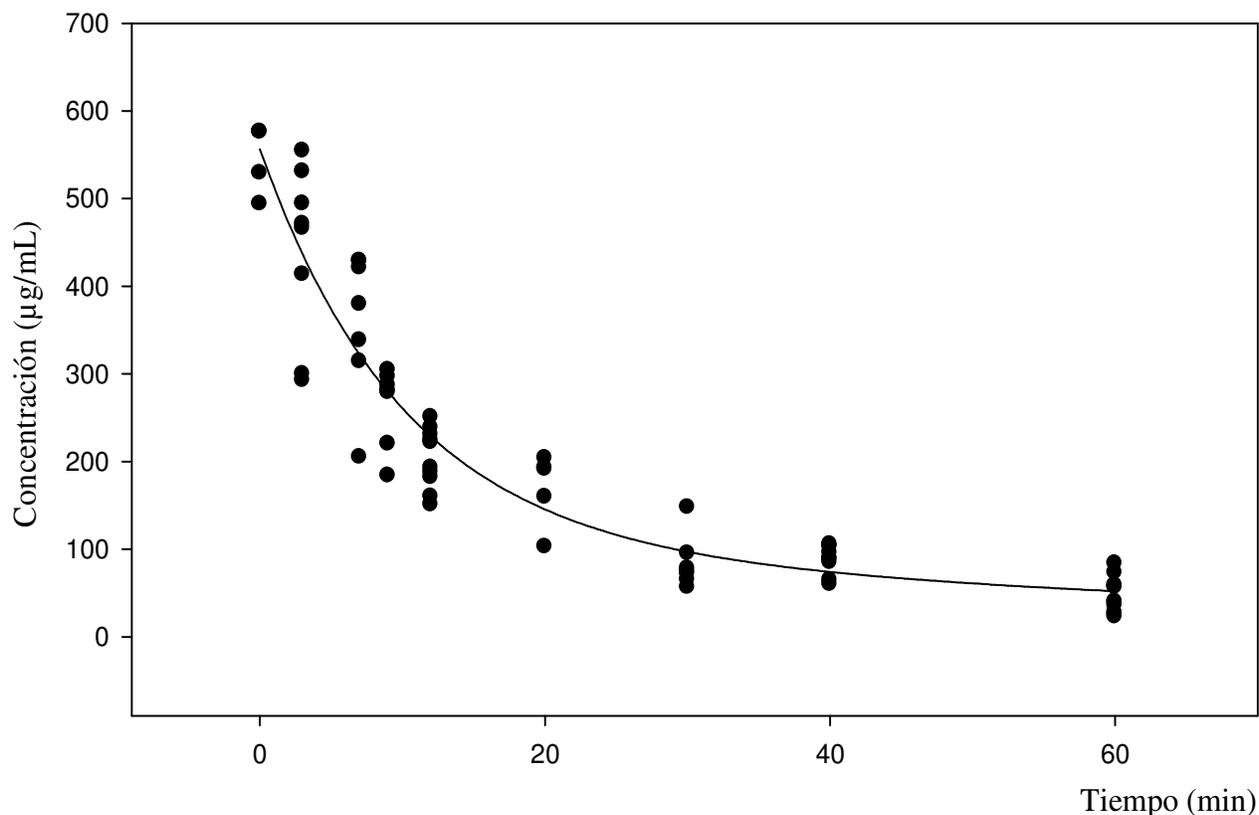


Figura 11. Curva de concentración-tiempo de la absorción *in vitro* del ácido masticadienónico después de una administración inicial de 500 µg/mL.

8.5.4. Absorción *in vitro* de la combinación de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico.

Con el propósito de investigar si la administración conjunta de estos dos ácidos altera la absorción de uno respecto al otro y dado que es la forma en la que se encuentran en la corteza de Cuachalalate, se realizó el estudio de la absorción conjunta de los dos ácidos triterpénicos administrándose cada uno de ellos a una concentración inicial de 500 µg/mL. La absorción de ambos ácidos no se modificó por la presencia de uno respecto al otro. Para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico su absorción quedó descrita por la ecuación 6:

$$C=551.1248\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1033t(\text{min})}+87.1363\mu\text{g/mL}\cdot e^{-1.2055\text{E-}010t(\text{min})} \quad (6)$$

$$r^2= 0.8246$$

En tanto que para el ácido masticadienónico la ecuación 7 que describe su absorción es:

$$C= 459.4302\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1069t(\text{min})}+73.4592\mu\text{g/mL}\cdot e^{-1.2094\text{E-}010t(\text{min})} \quad (7)$$

$$r^2= 0.8635$$

En la Figura 12 se presenta la gráfica de los cambios de concentración para ambos ácidos triterpénicos

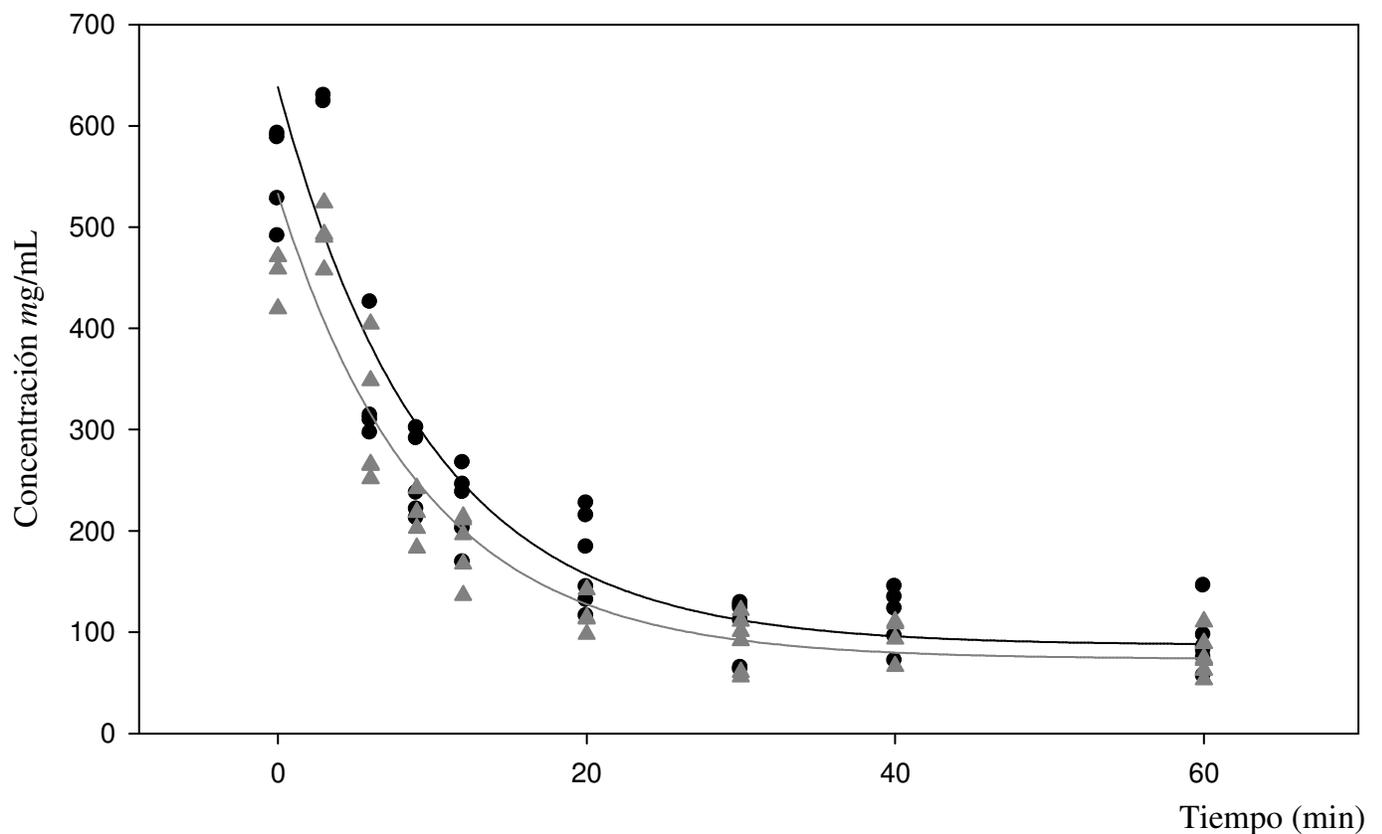


Figura 12. Curva de concentración-tiempo de la absorción in vitro de los ácidos 3α-hidroxi-masticadienónico (●) y ácido masticadienónico (▲) después de una administración inicial de 500 μg/mL.

8.5.5. Absorción *in vitro* del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico del extracto fluido

Se determinó la absorción de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico a partir del extracto fluido comercial de Cuachalalate que contienen 833.334 % p/p de ácido 3 α -hidroximasticadienónico y 432.573% p/p de ácido masticadienónico. En cada experimento se usaron 40 mg de extracto seco, para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico se tuvo una concentración inicial de 237.807 $\mu\text{g/mL}$ y la absorción se describe por el siguiente modelo biexponencial:

$$C=201.5883\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1372t(\text{min})}+46.7570\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.0018t(\text{min})} \quad (8)$$
$$r^2= 0.8939$$

Para el ácido masticadienónico se tuvo una concentración inicial de 126.673 $\mu\text{g/mL}$ y su absorción se describe por el siguiente modelo biexponencial:

$$C=101.0039\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.1366t(\text{min})}+32.5605\mu\text{g/mL}\cdot e^{-0.0010t(\text{min})} \quad (9)$$
$$r^2= 0.9004$$

Los cambios de la concentración de los ácidos triterpénicos en función del tiempo a partir del extracto fluido se presentan en la Figura 13.

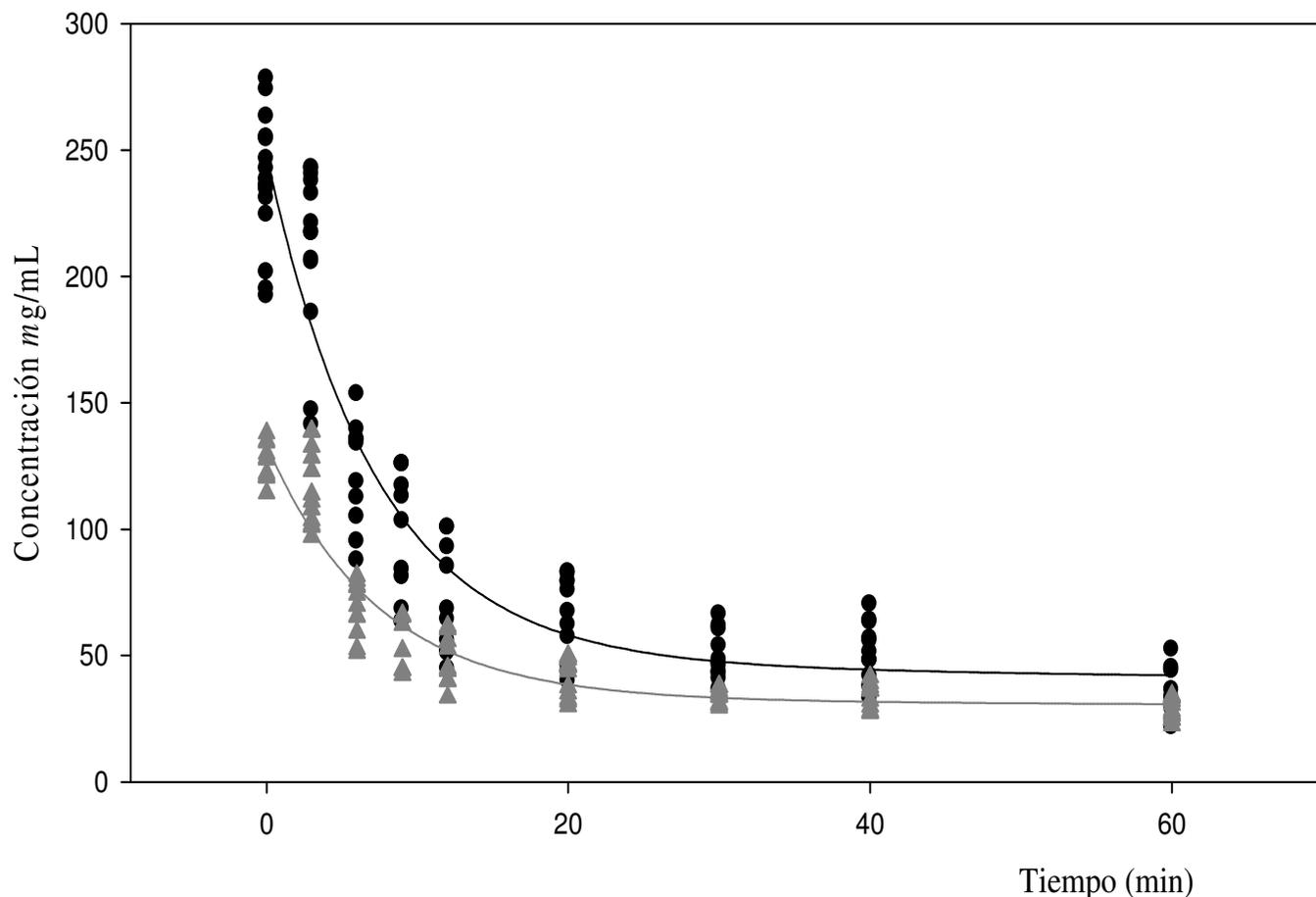


Figura 13. Curva de concentración-tiempo de la absorción *in vitro* de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico (●) y ácido masticadienónico (▲) en el extracto fluido de Cuachalalate.

8.5.6. Parámetros de comparación interexperimentos

Se determinó el valor del Área Bajo la Curva (ABC) calculada por el método de los trapecios en los experimentos de absorción *in vitro* para determinar la similitud en las cinéticas de los experimentos realizados de los compuestos aislados, de los compuestos administrados en conjunto y de los presentes en el extracto fluido de Cuachalalate y se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Áreas Bajo la curva de los compuestos analizados

Compuesto	ABC ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$)	Error ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{min}$)
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico	10588.3234	1920.655
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico en combinación	11252.0505	2390.440
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico en el extracto fluido	4310.5139	1032.6723
Ac. masticadienónico	9393.1126	2164.309
Ac. masticadienónico en combinación	9227.5906	1700.485
Ac. masticadienónico en el extracto fluido	2706.1161	425.319

Se calculó la fracción absorbida de los compuestos a los 60 min a partir de los datos experimentales de la gráfica concentración-tiempo considerando la concentración que alcanzó al tiempo para los diferentes experimentos estos valores se presentan en el Cuadro 8:

Cuadro 8. Fracción absorbida de los compuestos a los 60 min

Compuesto	Fracción absorbida (%)	Error (%)
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico	92.546	4.555
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico en combinación	83.572	6.690
Ac. 3 α -hidroximasticadienónico en el extracto fluido	74.499	8.768
Ac. masticadienónico	88.833	7.182
Ac. masticadienónico en combinación	85.843	4.991
Ac. masticadienónico en el extracto fluido	87.635	2.872

La fracción absorbida se determinó a los 60 minutos donde se observa que se ha absorbido más del 80 % del compuesto y donde se tiene ya una absorción más lenta y prolongada.

9. Discusión de Resultados

El método analítico desarrollado por Navarrete y colaboradores (2006) se revalidó para determinar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico en estudios de absorción *in vitro* en intestino de rata como compuestos aislados y como compuestos presentes en un extracto fluido de Cuachalalate y es adecuado ya que cumple con los parámetros de validación analítica. Igualmente el equipo diseñado en vidrio y utilizado para realizar el estudio de absorción *in vitro* fue adecuado para llevar a cabo esta investigación al mostrar resultados reproducibles y comparables entre experimentos, además el procedimiento es sencillo y permite tener condiciones controladas y requirió de cantidades mínimas de los compuestos para realizar los estudios.

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico se absorbe en un 92.546 ± 4.555 % de la dosis inicial de 500 $\mu\text{g/mL}$ en 60 minutos, en tanto que el ácido masticadienónico se absorbe en un 88.833 ± 7.182 % en el mismo tiempo y después de administrar la misma dosis inicial, además las gráficas muestran que antes de los 20 minutos se absorbe muy rápido de forma exponencial la dosis administrada. Estos resultados ponen de manifiesto que estos dos ácidos tiene una alta capacidad de absorción intestinal. La absorción *in vitro* se describe en las pruebas realizadas por la desaparición del compuesto dentro del saco intestinal donde fue administrado, en los tres experimentos realizados para cada compuesto (compuesto aislado, combinación con el otro compuesto y en el extracto fluido) y se encontró que el mejor modelo matemático que describe la cinética de la absorción es un modelo biexponencial por que tiene el mayor valor de coeficiente de correlación que otros modelos probados, descrito por la ecuación general 1:

$$C=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t} \quad (1)$$

El modelo tiene pendientes negativas y se asemeja a una administración en un modelo bicompartimental de una dosis intravenosa rápida (bolus) en el que se tienen dos velocidades de desaparición de la sustancia en el lumen intestinal, una rápida y una lenta, la suma de las dos constantes representa la velocidad de absorción. (Rowland y Tozer, 1995).

Por otro lado en el modelo *in vitro* también se pudo demostrar que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico se absorbe de forma indistinta en el íleon y el yeyuno. Se puede asumir lo mismo para el ácido masticadienónico al no observarse diferencia en las repeticiones de los experimentos al usar indistintamente ambos segmentos del intestino. La administración concomitante no modifica la cinética de absorción de estos dos ácidos triterpénicos, ni administrados en forma pura ni cuando se administran en un extracto fluido de la planta que los contienen.

En los análisis de los estudios de absorción de los ácidos triterpénicos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico en intestino de rata se buscaba observar la presencia de picos nuevos a lo largo del cromatograma, lo que indicaría que dentro del intestino los ácidos triterpénicos pueden estar biotransformándose antes y no necesariamente absorbiéndose, sin embargo podría ocurrir que los metabolitos de ambos ácidos no puedan ser detectados por el método analítico empleado. Por otro lado una de las reacciones de biotransformación que podría ocurrir es la reducción del ácido masticadienónico a ácido 3 α -hidroximasticadienónico, sin embargo no se observó la

aparición de éste en los cromatogramas. Se requieren experimentos adicionales para confirmar la posible formación de metabolitos que no absorben al UV. Por otro lado se puede decir que las actividades biológicas descritas para estos compuestos como gastroprotectores (Arrieta et al., 2003) y antiinflamatorio (Oviedo et al. 2004) pueden ocurrir después de que estos compuestos se absorban. Igualmente, la observación que originó esta investigación respecto a la duda de que si se absorbía o se biotransformaba está parcialmente resuelta, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos estos compuestos se absorben eficientemente en el yeyuno e íleon de rata y al parecer no se biotransforma en el lumen intestinal. Con respecto a los resultados de los experimentos *in vivo* obtenidos que demuestran que después de la administración oral de 150 mg del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en rata sólo se recuperó el 7% del compuesto inalterado en heces, indicaría que los ácidos triterpénicos estudiados se absorben y que el hecho de no observarlo en sangre indicaría que puede ocurrir una biotransformación postabsorción. Desde luego son necesarios más estudios para poder afirmar lo anterior. Pero es claro que los ácidos triterpénicos tienen buenas propiedades de absorción intestinal.

Es importante resaltar que este es el primer estudio de absorción *in vitro* para los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico. Estudios que generalmente son escasos para los productos naturales. Esto último es una aportación importante del presente trabajo ya que si bien se han realizado los estudios farmacológicos de estos productos naturales (Arrieta et al., 2003; Oviedo et al., 2004; Castillo-Juárez et al., 2007) se desconoce sus propiedades farmacocinéticas. Adicionalmente el estudio farmacocinético de los productos naturales activos de las planta que se utilizan como medicamentos o de productos comerciales que las contienen son las nuevas tendencias y en breve serán

requisitos indispensables para el registro de los productos medicinales elaborados con plantas, como ha sido planteada por la directora del Centro Nacional de Medicinas Alternativas y Complementarias (NCCAM, por su siglas en inglés) del Instituto Nacional de Salud (NIH, por su siglas en inglés) de los Estados Unidos de Norteamérica (Natural Products Research at NCCAM: Current Priorities, 10th Annual Oxford International Conference on the Science of Botanicals).

10. Conclusiones

Las conclusiones que derivan del presente trabajo son:

1. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico y el ácidos masticadienónico aislados de corteza de Cuachalalate tienen buenas propiedades de absorción intestinal en un modelo *in vitro* siguiendo una cinética biexponencial.
2. Aparentemente el ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico no se biotransforman en el intestino, previo a su absorción en yeyuno e íleon de rata.
3. El ácido 3 α -hidroximasticadienónico y ácido masticadienónico se absorben indistintamente en yeyuno e íleon de rata donde su fracción absorbida es alta.
4. El equipo diseñado, la técnica y el método analítico son adecuados para llevar a cabo estudios de absorción *in vitro* del modelo de saco intestinal de rata de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico.

11. Perspectivas

- Confirmar el planteamiento de que no se están biotransformado en el intestino en el yeyuno e íleon de rata en un modelo *in vitro* de saco intestinal de rata los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico utilizando otros detectores de mayor sensibilidad como puede ser la espectrometría de masas/ masas.
- Realizar estudios de absorción *in vitro* de fármacos en presencia de estos productos naturales y determinar de qué forma se ve afectada la absorción tanto de los fármacos como de los productos naturales. Se han iniciado los estudios de la interacción a nivel de la glicoproteína P y con fármacos que utilizan esta vía de eflujo.
- Definir el mecanismo de absorción de los ácidos 3 α -hidroximasticadienónico y masticadienónico *in vivo*.

ANEXOS

Anexo 12.1 Validación de métodos para ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Sistema

Se validó el sistema utilizando el ácido 3 α -hidroximasticadienónico extraído de la corteza de Cuachalalate.

Precisión del Sistema

Se preparó por sextuplicado la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvieron las siguientes áreas (Cuadro 9), con un tiempo de retención de 16 minutos.

Cuadro 9. Precisión del sistema

Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
1416867
1416607
1423094
1422486
1411853
1412436
CV 0.32%

Linealidad del Sistema

Como se conocen los componentes Se prepararon por dilución 5 niveles de concentración de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (20, 60, 100, 120 y 200 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose las siguientes respuestas de áreas (Cuadro 10):

Cuadro 10. Linealidad del sistema

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)		
20	186896	183945	187451
60	776442	782566	789782
100	1457334	1454383	1450402
120	1753158	1741911	1774912

200 2951801 2974755 2941231

Los resultados para el análisis estadístico de la linealidad se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Parámetros estadísticos de la linealidad.

Σx	1500
Σy	21406969
Σx^2	205200
Σy^2	43756915107951.00
Σxy	2994260260
n	15
β_1	15463.10
β_0	-119179.16
r^2	0.99
$S_{x/y}$	24212.23
Sb_1	103.05
$t_{0,975,13}$	2.1604
$IC(\beta_1)$	15240.46 a 15685.73

La gráfica de linealidad se presenta en la Figura 14, El sistema es lineal en el rango de concentraciones entre 20 y 200µg/mL

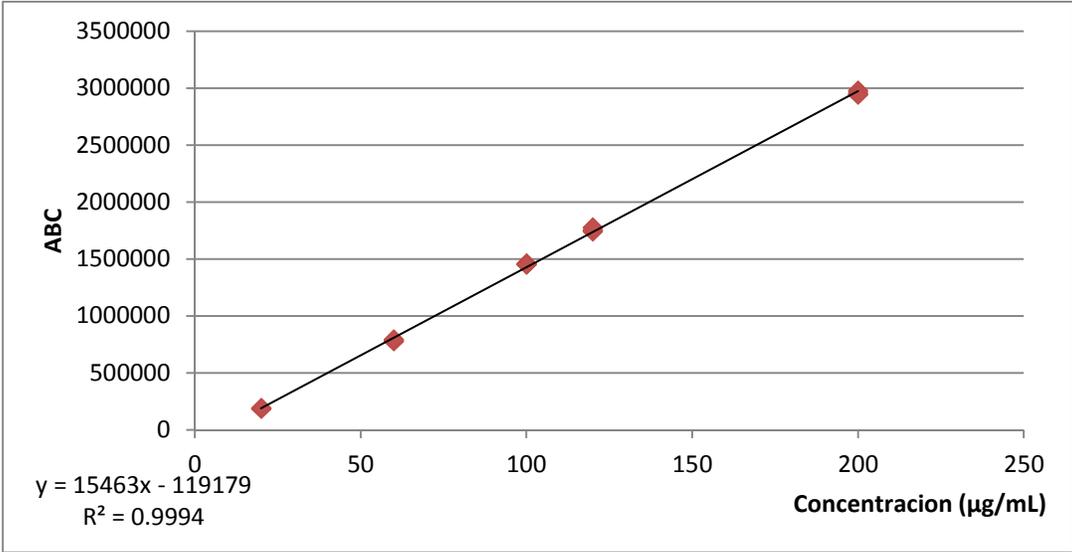


Figura 14. Linealidad del Sistema del ácido 3α-hidroximasticadienónico

Especificidad

Se determinó que el método es específico para el ácido 3 α -hidroximasticadienónico al analizar por el mismo método soluciones blancos que no muestra respuesta al mismo tiempo de retención (16 minutos) y longitud de onda (215 nm) que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

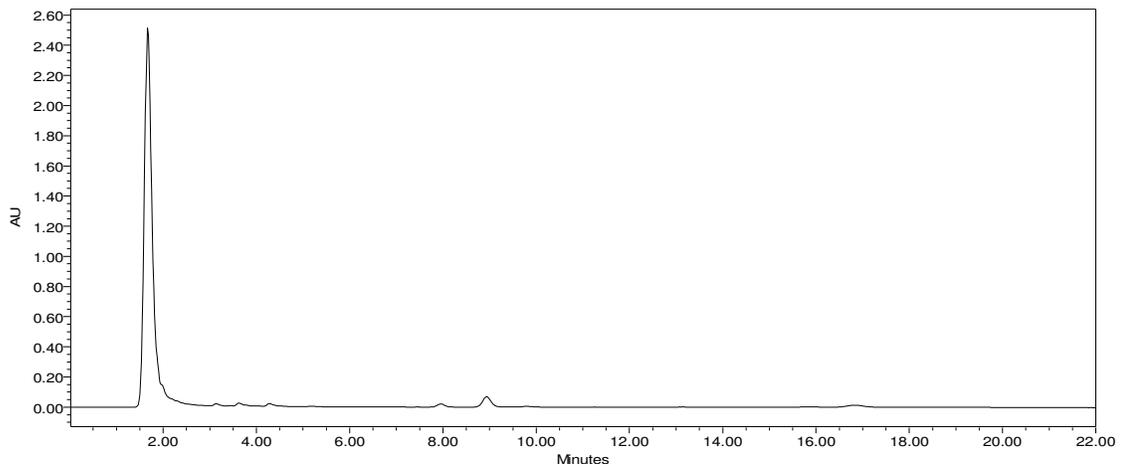


Figura 15. Cromatograma del blanco de ácido 3 α -hidroximasticadienónico. No se observa ningún otro pico en el blanco en el tiempo de retención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico a los 16 min.

B. Método

Se validaron dos métodos para cuantificar ácido 3 α -hidroximasticadienónico, por que se determinó en dos diferentes muestras analíticas.

Método 1

El placebo de este método se preparó con solución fisiológica Krebs-Henseleit, intestino de rata y metanol HPLC.

Linealidad del Método

Como se conocen los componentes de la muestras se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración de ácido 3 α -hidroximasticadienónico usando cantidades constantes de placebo

analítico preparado con los mismos componentes y cantidades que en las muestras procesadas para determinar el ácido 3 α -hidroximasticadienónico extraído de corteza de Cuachalalate en intestino de rata de este trabajo. En el Cuadro 12 se presentan las áreas bajo la curva de los picos a una longitud de onda de 215 nm y en el Cuadro 13 se presentan los parámetros estadísticos para definir la linealidad del método 1 para ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

Cuadro 12. Muestras para determinar la linealidad del método en 5 niveles de concentración.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área Estándar ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Área Recobros ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	174803	186896
20	175553	183945
20	175312	187451
60	787212	776442
60	772021	782566
60	772242	789782
100	1438833	1457334
100	1418639	1454383
100	1420458	1450402
120	1742535	1753158
120	1736557	1741911
120	1753009	1774912
200	2870304	2951801
200	2955287	2974755
200	2945814	2941231

Cuadro 13. Parámetros estadísticos de la linealidad del método 1.

Σx	21138579
Σy	21406969
Σx^2	42779949471821.00
Σy^2	43756915107951.00
Σxy	43262893065082.00
n	15
b_1	1.00
b_0	6532.74
r^2	0.99
$S_{y/x}$	20441.47
Sb_1	0.01
$t_{0.975,13}$	2.16
IC(β_1)	0.99 a 1.02
x media	1409238.60
Sb_0	9577.92
IC(β_0)	-14159.09 a 27224.59
y media	1427131
$CV_{y/x}$	1.43%

Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y Repetibilidad del método se determinó preparando una solución de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido 3 α -hidroximasticadienónico adicionada un sextuplicado de placebo analítico, se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Muestras para determinar exactitud y repetibilidad.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área Adicionada ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Área Recobro ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	% Recobro
100	1421156	1428833	100.54%
100	1421156	1418639	99.82%
100	1421156	1410458	99.24%
100	1421156	1428071	100.48%
100	1421156	1422588	100.10%
100	1421156	1418347	99.80%
		σ	0.484%
		Promedio	100.00%
		CV	0.48%
		IC(μ)	99.49% a 100.50%

Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia se preparó por triplicado una muestra de ácido 3 α -hidroximasticadienónico a 100 $\mu\text{g/mL}$ por dos analistas y en dos días diferentes. Con la misma cantidad de placebo analítico. Los resultados se muestran en el Cuadro 15 y en el Cuadro 16 la estadística para determinar la precisión intermedia del método.

Cuadro 15. Muestras de ambos analistas en los diferentes días.

	Analista Área($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Analista 2 Área($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
Día 1	1383914	1450998
	1388861	1448080
	1396216	1460965
Día 2	1466073	1409195
	1455292	1409141
	1467019	1422977

Cuadro 16. Constantes para determinar precisión intermedia

Σy	17158731
Σy^2	24546083610391.00
n	12
Promedio	1429894.25
s	31497.21
CV	2.20%

Robustez

Se preparó un triplicado de muestras de ácido 3 α -hidroximasticadienónico a 100 $\mu\text{g/mL}$ y se cuantificaron por HPLC cambiando las condiciones críticas del análisis: Temperatura y Velocidad de Flujo, variando estas condiciones hacia arriba y hacia abajo de los valores indicados en el método. Los resultados para la variación de la velocidad de flujo de la fase móvil se presentan en el Cuadro 17 y los resultados para la variación de la temperatura de la columna en el Cuadro 18.

Cuadro 17. Robustez del método para velocidad de flujo de la fase móvil

Muestra	Baja (0.8mL/min)	Normal (1.0mL/min)	Alta (1.2mL/min)
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1159535	1450998	1780359
2	1161718	1448080	1761606
3	1157788	1460965	1749357
Promedio	1159680.333	1453347.67	1763774
d	293667.3333		310426.333

Cuadro 18. Robustez del método para la temperatura de la columna

Muestra	Baja (35°C)	Normal (40°C)	Alta (45°C)
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1424160	1450998	1402153
2	1456033	1448080	1388592
3	1438169	1460965	1392981
Promedio	1439454	1453347.67	1394575.33
d	13893.66		58772.33

Estabilidad

Una vez que son obtenidas las muestras de los experimentos son analizadas inmediatamente, únicamente tardan en ser analizadas el tiempo que permanecen en el carrusel del equipo para su posterior inyección (4.5 horas la última muestra). Se determinó su estabilidad hasta 4 días en refrigeración una vez que son obtenidas de los experimentos. Se utilizó la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cuadro 19).

Cuadro 19. Estabilidad de la muestra analítica

Muestra	Días		
	1	3	4
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1438833	1450998	1409195
2	1418639	1448080	1409141
3	1420458	1460965	1422977
Promedio	1425976	1453347	1413771
d	27371		39576
% d	1.88%		2.72%

Límite de Detección y cuantificación

Se determinó por la desviación estándar de la regresión lineal usando tres niveles de concentración 20, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$. En el Cuadro 20 se presentan las áreas de los picos de absorción y en el Cuadro 21 se presentan los parámetros estadísticos y los valores de los límites de detección y de cuantificación.

Cuadro 20. Muestras para determinar límite de detección y cuantificación

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	174803
20	175553
20	175312
60	787212
60	772021
60	772242
100	1438833
100	1418639
100	1420458

Cuadro 21. Constantes para determinar el límite de detección y cuantificación.

Σx	540
Σy	7135073
Σx^2	42000
Σy^2	8004664049885.00
Σxy	578194860
n	9
b_1	15634.42
b_0	-145279.61
r^2	0.99
$S_{y/x}$	14640.97
Sb_1	149.42
$t_{0.975,13}$	2.3646
$IC(\beta_1)$	15281.08 a 15987.70
Límite de Detección	3.09 $\mu\text{g/mL}$
Límite de Cuantificación	9.36 $\mu\text{g/mL}$

Método 2

El placebo de este método se preparó con solución fisiológica Krebs-Henseleit, intestino de rata y un extracto acuoso que contiene una cantidad no detectable de ácido 3 α -hidroximasticadienónico. El extracto acuoso que se utilizó como placebo del extracto fluido se preparó haciendo una decocción con 100 mg de corteza de Cuachalalate y 250 mL de agua, se filtró y al filtrado se le evaporó todo el disolvente hasta obtener un polvo seco, el Cromatograma se representa en la Figura 16:

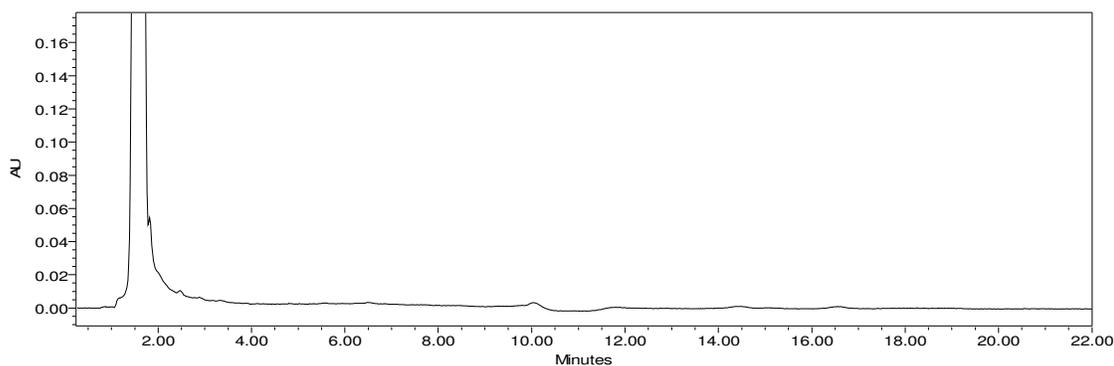


Figura 16. Cromatograma del extracto acuoso de Cuachalalate. No se observa ningún otro pico en el blanco en el tiempo de retención del ácido 3 α -hidroximasticadienónico

Linealidad del Método

Para la linealidad del método 2 para ácido 3 α -hidroximasticadienónico se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración de ácido 3 α -hidroximasticadienónico usando cantidades constantes del placebo analítico que se preparó con el extracto acuoso de Cuachalalate. En el Cuadro 22 se presentan las áreas bajo la curva de los picos de absorbancia a 215 nm y en el Cuadro 23 se presentan los parámetros estadísticos para definir la linealidad del método.

Cuadro 22. Muestras para determinar la linealidad del método en 5 niveles de concentración.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área Estándar ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Área Recobros ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	189589	186896
20	172893	183945
20	176727	187451
60	786489	776442
60	788485	782566
60	791495	789782
100	1447509	1457334
100	1438156	1454383
100	1459266	1450402
120	1744696	1753158
120	1753720	1741911
120	1766194	1774912
200	2860866	2951801
200	2837505	2974755
200	2970833	2941231

Cuadro 23. Constantes para determinar la linealidad del método.

Σx	21184423
Σy	21406969
Σx^2	42557615357765.00
Σy^2	43756915107951.00
Σxy	43142719329110.00
n	15
b_1	1.02
b_0	-15423.5378
r^2	0.9985
$S_{y/x}$	39211.23438
Sb_1	0.01
$t_{0.975,13}$	2.1604
$IC(\beta_1)$	0.9976 a 1.0453
x promedio	1412294.8667
Sb_0	18577.95033
$IC(\beta_0)$	-55558.759 a 24711.683
y promedio	1427131
$CV_{y/x}$	2.747%

Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y Repetibilidad del método se determinó preparando una solución de 100 µg/mL de ácido 3α-hidroximasticadienónico y se adiciono a un sextuplicado de placebo analítico, se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 24.

Cuadro 24. Muestras para determinar exactitud y repetibilidad.

Co (µg/mL)	Área Adicionada (µV*seg)	Área Recobro (µV*seg)	%Recobro
100	1421560	1417509	99.69%
100	1421156	1428156	100.49%
100	1421156	1409266	99.16%
100	1421156	1424304	100.22%
100	1421156	1423282	100.14%
100	1421156	1428640	100.52%
		σ	0.524%
		Promedio	100.04%
		CV	0.52%
		IC(µ)	99.49% a 100.59%

Precisión intermedia

Se preparó por triplicado una concentración de 100 µg/mL de ácido 3α-hidroximasticadienónico en el placebo analítico por dos analistas y en dos días distintos. Se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 25 y en el Cuadro 26 se presenta la estadística para determinar el coeficiente de variación.

Cuadro 25. Muestras de ambos analistas en los diferentes días

	Analista 1 Área (µV*seg)	Analista 2 Área (µV*seg)
Día 1	1343253	1396850
	1359596	1400656
	1369728	1398046
Día 2	1409293	1369101
	1410944	1369314
	1418420	1358808

Cuadro 26. Constantes para determinar precisión intermedia.

Σy	16604009
Σy^2	22981147057207.00
n	12
Promedio	1383667.41
σ	24718.07
cv	1.78%

Robustez

La robustez del método 2 se determinó con dos condiciones críticas del análisis; la velocidad de flujo y la temperatura. Se determinó preparando una solución de ácido 3 α -hidroximasticadienónico a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en el placebo analítico. Los resultados y los parámetros estadísticos se presentan los Cuadros 27 y 28 respectivamente.

Cuadro 27. Robustez del método para velocidad de flujo de la fase móvil

Muestra	Baja (0.8mL/min)	Normal (1.0mL/min)	Alta (1.2mL/min)
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1207068	1396850	1725666
2	1131669	1400656	1699469
3	1136917	1398046	1709648
Promedio	1158551.33	1398517.33	1711594.33
d	239966		313077

Cuadro 28. Robustez del método para la temperatura de la columna

Muestra	Baja (35°C)	Normal (40°C)	Alta (45°C)
(Áreas $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1397496	1396850	1372416
2	1385327	1400656	1355677
3	1388006	1398046	1354536
Promedio	1390276.33	1398517.33	1360876.33
d	8241		37641

Estabilidad

Se determinó la estabilidad hasta 4 días en refrigeración una vez que son obtenidas de los experimentos. Se utilizó la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 29).

Cuadro 29. Estabilidad de la muestra analítica

Muestra	Días		
	1	3	4
	Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)		
1	1417509	1396850	1369101
2	1428156	1400656	1369314
3	1409266	1398046	1358808
Promedio	1418310.33	1398517.33	1365741.00
d		19793	32776.33
% d		1.41%	2.34%

Límite de Detección y cuantificación

Se determinó por la desviación estándar de la regresión lineal usando tres niveles de concentración 20, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$. En el Cuadro 30 se presentan las áreas de los picos de absorción y en el Cuadro 31 se presentan los parámetros estadísticos y los valores de los límites de detección y de cuantificación.

Cuadro 30. Muestras para determinar límite de detección y cuantificación.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	189589
20	172893
20	176727
60	786489
60	788485
60	791495
100	1447509
100	1438156
100	1459266

Cuadro 31. Constantes para determinar el límite de detección y cuantificación.

Σx	540
Σy	7250609
Σx^2	42000
Σy^2	8256838532443.00
Σxy	587265420
n	9
b_1	15857.17
b_0	-145807.27
r^2	0.99
$S_{y/x}$	15397.38
Sb_1	157.14
$t_{0.975,13}$	2.3646
$IC(\beta_1)$	15485.57 a 16228.77
Límite de Detección	3.20 $\mu\text{g/mL}$
Límite de Cuantificación	9.71 $\mu\text{g/mL}$

Anexo 12.2. Validación de métodos para el ácido masticadienónico

Sistema

Se validó el sistema utilizando el ácido masticadienónico extraído de la corteza de Cuachalalate.

Precisión del Sistema

Se preparó por sextuplicado la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvieron las siguientes áreas (Cuadro 32), con un tiempo de retención de 14 minutos.

Cuadro 32. Precisión del sistema

Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
1689976
1692587
1674805
1676069
1683445
1684752
CV 0.42%

Linealidad del Sistema

Como se conocen los componentes Se prepararon por dilución 5 niveles de concentración de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (20, 60, 100, 120 y 200 $\mu\text{g/mL}$), obteniéndose las siguientes respuestas de áreas (Cuadro 33).

Cuadro 33. Linealidad del sistema

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)		
20	215719	212893	214403
60	874643	879261	884498
100	1580586	1584791	1584051
120	1987166	1994623	2004402
200	3377841	3314889	3335827

Los resultados para el análisis estadístico de la linealidad se presentan en el Cuadro 34.

Cuadro 34. Constantes de linealidad del sistema

Σx	1500
Σy	24045593
Σx^2	205200
Σy^2	55448313624891.00
Σxy	3370161540
n	15
b_1	17492.7942
b_0	-146239.8870
r^2	0.9993
$S_{x/y}$	29346.9658
Sb_1	124.9089
$t_{0.975,13}$	2.1604
$IC(\beta_1)$	17222.9448 a 17762.6437

La gráfica de linealidad se presenta en la Figura 29, El sistema es lineal en el rango de concentraciones entre 20 y 200 $\mu\text{g/mL}$.

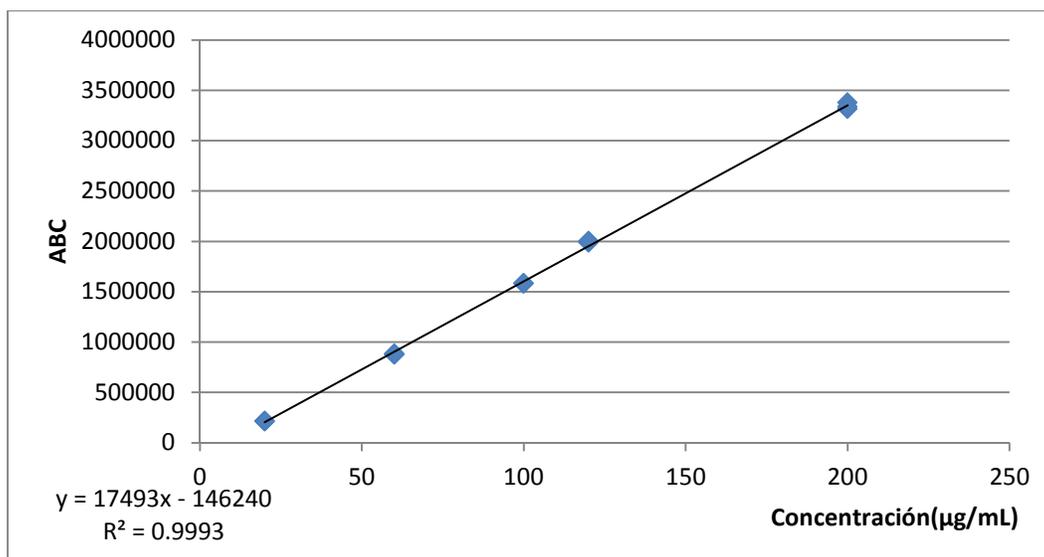


Figura 29. Linealidad del Sistema del ácido masticadienónico

Especificidad

Se determinó que el método es específico para el ácido masticadienónico al analizar por el mismo método soluciones blancos que no muestra respuesta al mismo tiempo de retención (14 minutos) y longitud de onda (215 nm) que el ácido masticadienónico.

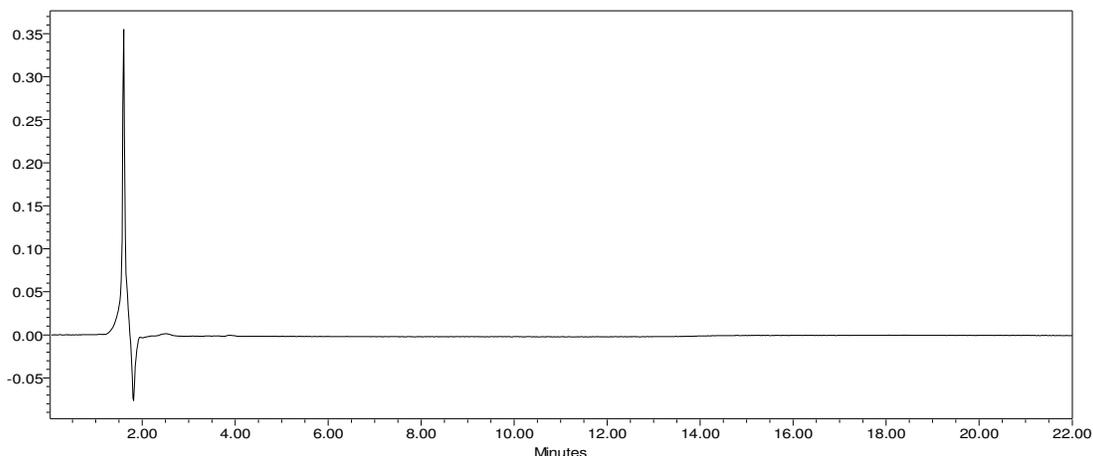


Figura 17. Cromatograma del blanco de ácido masticadienónico. No se observa ningún otro pico en el blanco en el tiempo de retención del ácido masticadienónico

B. Método

Se validaron dos métodos para cuantificar ácido masticadienónico, por que se determinó en dos diferentes muestras analíticas.

Método 1

El placebo de este método se preparó con solución fisiológica Krebs-Henseleit, intestino de rata y metanol HPLC.

Linealidad del Método

Como se conocen los componentes de la muestra se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración de ácido masticadienónico usando cantidades constantes de placebo analítico preparado con los mismos componentes y cantidades que en las muestras procesadas para determinar el ácido masticadienónico extraído de corteza de Cuachalalate en intestino de rata de este trabajo. En el Cuadro 35 se presentan las áreas bajo la curva de los picos a una longitud de onda de 215 nm y en el Cuadro 36 se presentan los parámetros estadísticos para definir la linealidad del método 1 para ácido masticadienónico.

Cuadro 35. Muestras para determinar la linealidad del método en 5 niveles de concentración.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área Estándar ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Área Recobro ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	216343	215719
20	216571	212893
20	225694	214403
60	876734	874643
60	884767	879261
60	876734	884498
100	1572945	1580586
100	1574370	1584791
100	1584041	1584051
120	1984712	1987166
120	1980022	1994623
120	1989798	2004402
200	3360882	3377841
200	3245681	3314889
200	3478217	3335827

Cuadro 36. Constantes para determinar la linealidad del método 1.

Σx	24067511
Σy	24045593
Σx^2	55673596885739.00
Σy^2	55448313624891.00
Σxy	55547861200738.00
n	15
b_1	0.99
b_0	7058.15
r^2	0.99
$S_{y/x}$	44441.14
Sb_1	0.01
$t_{0.975,13}$	2.16
$IC(\beta_1)$	0.9714 a 1.02
x media	1604500.73
Sb_0	20730.49
$IC(\beta_0)$	-37727.35 a 51843.65
y media	1603040
$CV_{y/x}$	2.77%

Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y Repetibilidad del método se determinó preparando una solución de 100 µg/mL de ácido masticadienónico adicionada un sextuplicado de placebo analítico, se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 37.

Cuadro 37. Muestras para determinar exactitud y repetibilidad.

Co (µg/mL)	Áreas Recobro (µV*seg)	Áreas Estándar (µV*seg)	%Recobro
100	1401723	1454370	103.7558%
100	1401723	1471141	104.9523%
100	1401723	1403926	100.1571%
100	1401723	1400698	99.9268%
100	1401723	1416514	101.0552%
100	1401723	1463993	104.4423%
		σ	2.25731%
		Promedio	102.3816%
		CV	2.2048%
		IC(µ)	100.01% a 104.75%

Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia se preparó por triplicado una muestra de ácido masticadienónico a 100 µg/mL por dos analistas y en dos días diferentes. Con la misma cantidad de placebo analítico. Los resultados se muestran en el Cuadro 38 y en el Cuadro 39 la estadística para determinar la precisión intermedia del método.

Cuadro 38. Muestras de ambos analistas en los diferentes días.

	Analista 1 Áreas (µV*seg)	Analista 2 Áreas (µV*seg)
Día 1	1473908	1403808
	1468533	1411701
	1460223	1404298
Día 2	1407889	1350335
	1398605	1369914
	1397796	1372779

Cuadro 39. Constantes para determinar precisión intermedia

Σy	16919789
Σy^2	23873546863775.00
n	12
Promedio	1409982.41
σ	39245.01
CV	2.78%

Robustez

Sé un preparo un triplicado muestras de ácido masticadienónico a 100 $\mu\text{g/mL}$ y se cuantificaron por HPLC cambiando las condiciones críticas del análisis: Temperatura y Velocidad de Flujo, variando estas condiciones hacia arriba y hacia debajo de los valores indicados en el método. Los resultados para la variación de la velocidad de flujo de la fase móvil se presentan en el Cuadro 40 y los resultados para la variación de la temperatura de la columna en el Cuadro 41.

Cuadro 40. Robustez del método para velocidad de flujo de la fase móvil

Muestra	Baja (0.8mL/min)	Normal (1.0mL/min)	Alta (1.2mL/min)
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1239621	1555360	1849053
2	1238177	1552039	1807532
3	1240501	1542003	1841438
Promedio	1239433	1549800.67	1832674.33
d	310367.6667		282873.667

Cuadro 41. Robustez del método para la temperatura de la columna

Muestra	Baja (35°C)	Normal (40°C)	Alta (45°C)
Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)			
1	1518601	1555360	1501683
2	1536588	1552039	1463785
3	1523663	1542003	1425979
Promedio	1526284	1549800.67	1463815.66
d	23516.66		85985

Estabilidad

Una vez que son obtenidas las muestras de los experimentos son analizadas inmediatamente, únicamente tardan en ser analizadas el tiempo que permanecen en el carrusel del equipo para su posterior inyección (4.5 horas la última muestra). Se determinó su estabilidad hasta 4 días en refrigeración una vez que son obtenidas de los experimentos. Se utilizó la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 42).

Cuadro 42. Estabilidad de la muestra analítica

Muestra	Días		
	1	3	4
	Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)		
1	1454370	1475471	1403926
2	1471141	1477657	1400698
3	1403926	1463993	1416514
Promedio	1443145	1472373	1407046
d		29228	65327
% d		1.9851%	4.4369%

Límite de Detección y cuantificación

Se determinó por la desviación estándar de la regresión lineal usando tres niveles de concentración 20, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$. En el Cuadro 43 se presentan las áreas de los picos de absorción y en el Cuadro 44 se presentan los parámetros estadísticos y los valores de los límites de detección y de cuantificación.

Cuadro 43. Muestras para determinar límite de detección y cuantificación.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	216343
20	216571
20	225694
60	876734
60	884767
60	876734
100	1572945
100	1574370
100	1584041

Cuadro 44. Constantes para determinar el límite de detección y cuantificación.

Σx	540
Σy	8028199
Σx^2	42000
Σy^2	9926765490733.00
Σxy	644601860
n	9
b_1	16969.78
b_0	-126164.88
r^2	0.99
$S_{y/x}$	11265.78
Sb_1	114.98
$t_{0.975,13}$	2.36
IC(β_1)	16697.89 a 17241.67
Límite de Detección	2.19 $\mu\text{g/mL}$
Límite de Cuantificación	6.63 $\mu\text{g/mL}$

Método 2

El placebo de este método se preparó con solución fisiológica Krebs-Henseleit, intestino de rata y un extracto acuoso que contiene una cantidad no detectable de ácido masticadienónico. El extracto acuoso que se utilizó como placebo del extracto fluido se preparó haciendo una decocción con 100 mg de corteza de Cuachalalate y 250 mL de agua, se filtró y al filtrado se le evaporó todo el disolvente hasta obtener un polvo seco, el Cromatograma se representa en la Figura 18.

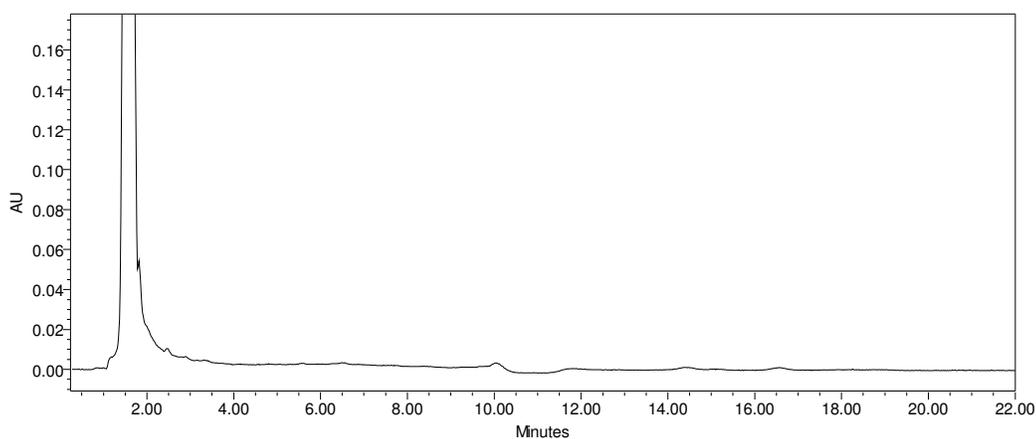


Figura 18. Cromatograma del extracto acuoso de Cuachalalate. No se observa ningún otro pico en el blanco en el tiempo de retención del ácido masticadienónico

Linealidad del Método

Para la linealidad del método 2 para ácido masticadienónico se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración de ácido masticadienónico usando cantidades constantes del placebo analítico que se preparó con el extracto acuoso de Cuachalalate. En el Cuadro 45 se presentan las áreas bajo la curva de los picos de absorbancia a 215 nm y en el Cuadro 46 se presentan los parámetros estadísticos para definir la linealidad del método.

Cuadro 45. Muestras para determinar la linealidad del método en 5 niveles de concentración.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas Estándar ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Áreas Recobros ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	222448	215719
20	219376	212893
20	216722	214403
60	881542	874643
60	876206	879261
60	876338	884498
100	1561290	1580586
100	1583842	1584791
100	1584390	1584051
120	1996801	1987166
120	1990000	1994623
120	1997895	2004402
200	3322873	3377841
200	3342789	3314889
200	3324248	3335827

Cuadro 46. Constantes para determinar la linealidad del método.

Σx	23996760
Σy	24045593
Σx^2	55119119229752.00
Σy^2	55448313624891.00
Σxy	55281376395760.00
n	15
b_1	1.00
b_0	-4790.00
r^2	0.99
$S_{y/x}$	17754.65
S_{b_1}	0.00
$t_{0.975,13}$	2.16
$IC(\beta_1)$	0.99 a 1.01
x promedio	1599784.00
S_{b_0}	8321.015926
$IC(\beta_0)$	-22766.46481 a 13186.4591
y promedio	1603040
$CV_{y/x}$	1.1076%

Exactitud y Repetibilidad

La exactitud y Repetibilidad del método se determinó preparando una solución de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido masticadienónico adicionada un sextuplicado de placebo analítico, se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 47.

Cuadro 47. Muestras para determinar exactitud y repetibilidad.

C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas Adicionada ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Áreas Recobro ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	%Recobro
100	1401723	1369914	97.73%
100	1401723	1350335	96.33%
100	1401723	1354390	96.62%
100	1401723	1404298	100.18%
100	1401723	1403808	100.14%
100	1401723	1411701	100.71%
		σ	1.957%
		Promedio	98.62%
		CV	1.98%
		$IC(\mu)$	96.56% a 100.67

Precisión intermedia

Se preparó por triplicado una concentración de 100 μmL de ácido masticadienónico en el placebo analítico por dos analistas y en dos días distintos. Se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 48 y en el Cuadro 49 se presenta la estadística para determinar el coeficiente de variación.

Cuadro 48. Muestras de ambos analistas en los diferentes días.

	Analista 1 Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Analista 2 Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
Día 1	1473908	1403808
	1468533	1411701
	1460223	1404298
Día 2	1407889	1350335
	1398605	1369914
	1397796	1372779

Cuadro 49. Constantes para determinar precisión intermedia.

Σy	16919789
Σy^2	23873546863775.00
n	12
Promedio	1409982.417
σ	39245.01
CV	2.78%

Robustez

La robustez del método 2 se determinó con dos condiciones críticas del análisis; la velocidad de flujo y la temperatura. Se determinó preparando una solución de ácido masticadienónico a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en el placebo analítico. Los resultados y los parámetros estadísticos se presentan los Cuadros 50 y 51 respectivamente.

Cuadro 50. Robustez del método para velocidad de flujo de la fase móvil

Muestra	Baja (0.8mL/min)	Normal (1.0mL/min) Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	Alta (1.2mL/min)
1	1216847	1403808	1771177
2	1221894	1411701	1802874
3	1227815	1404298	1786102
Promedio	1222185.33	1406602.33	1786717.67
d	184417		380115.33

Cuadro 51. Robustez del método para la temperatura de la columna

Muestra	Baja (35°C)	Normal (40°C) Áreas (μV*seg)	Alta (45°C)
1	1478619	1403808	1410907
2	1474016	1411701	1422637
3	1469416	1404298	1413700
Promedio	1474017	1406602.33	1415748
d	67414.66		9145.66

Estabilidad

Se determinó la estabilidad hasta 4 días en refrigeración una vez que son obtenidas de los experimentos. Se utilizó la concentración de 100 μg/mL (Cuadro 52).

Cuadro 52. Estabilidad de la muestra analítica

Extracto + Acido Masticadienónico				
<i>Días</i>				
Muestra	1	3	4	
	Áreas (μV*seg)			
1	1404298	1473908	1407889	
2	1403808	1468533	1398605	
3	1411701	1460223	1397796	
Promedio	1406602	1467554	1401430	
d	60952		66124	
% d	4.1533%		4.5058%	

Límite de Detección y cuantificación

Se determinó por la desviación estándar de la regresión lineal usando tres niveles de concentración 20, 60 y 100 μg/mL. En el Cuadro 53 se presentan las áreas de los picos de absorción y en el Cuadro 54 se presentan los parámetros estadísticos y los valores de los límites de detección y de cuantificación.

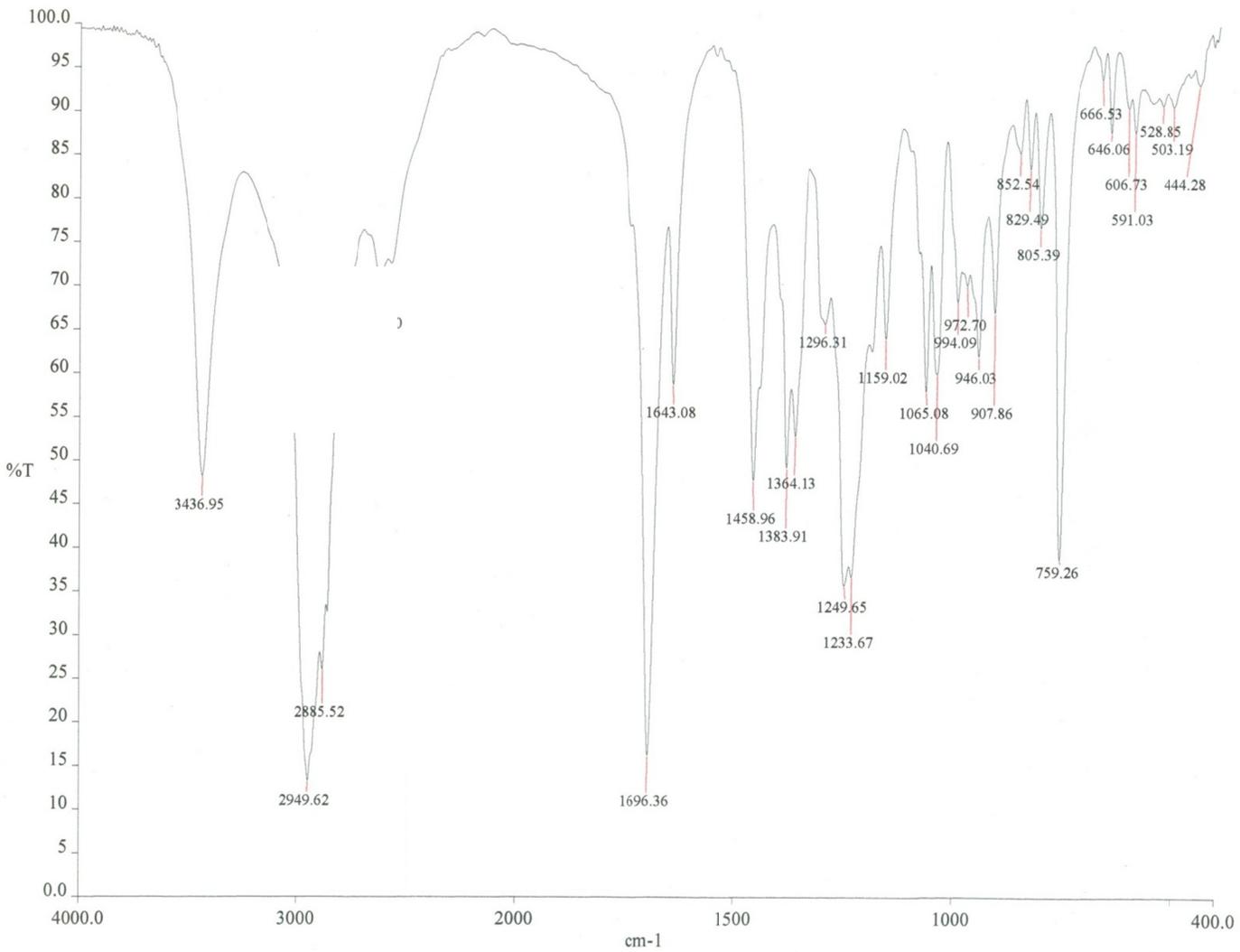
Cuadro 53. Muestras para determinar límite de detección y cuantificación.

Co ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)
20	222448
20	219376
20	216722
60	881542
60	876206
60	876338
100	1561290
100	1583842
100	1584390

Cuadro 54. Constantes para determinar el límite de detección y cuantificación.

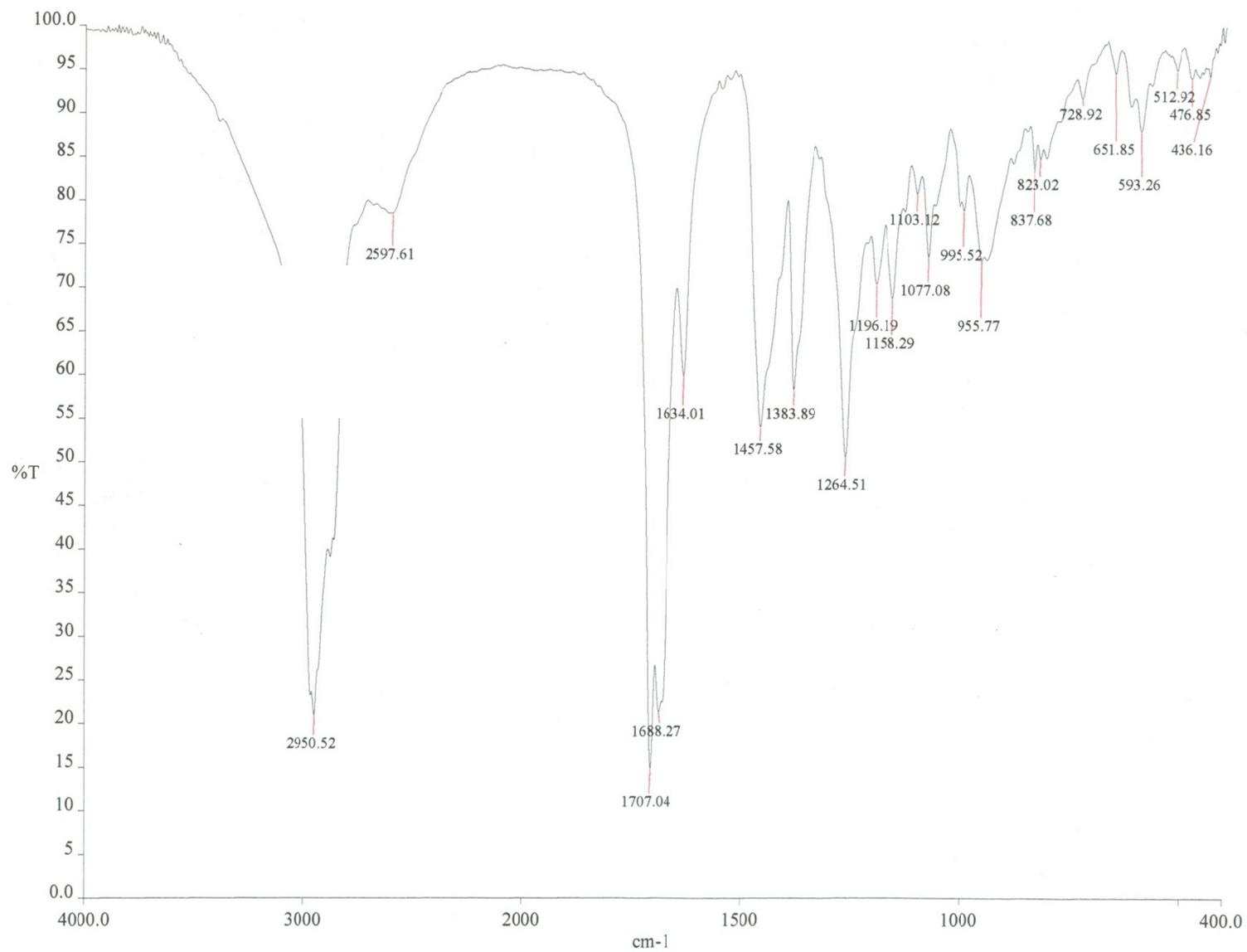
Σx	540
Σy	8022154
Σx^2	42000
Σy^2	9913872526972.00
Σxy	644168280
n	9
b_1	16962.40
b_0	-126393.55
r^2	0.99
$S_{y/x}$	12989.34
S_{b_1}	132.57
$t_{0.975,13}$	2.36
$IC(\beta_1)$	16648.91 a 17275.88
Límite de detección	2.52 $\mu\text{g/mL}$
Límite de Cuantificación	7.65 $\mu\text{g/mL}$

Anexo 12.3. Espectroscopia del ácido 3 α -hidroximasticadienónico y del ácido masticadienónico

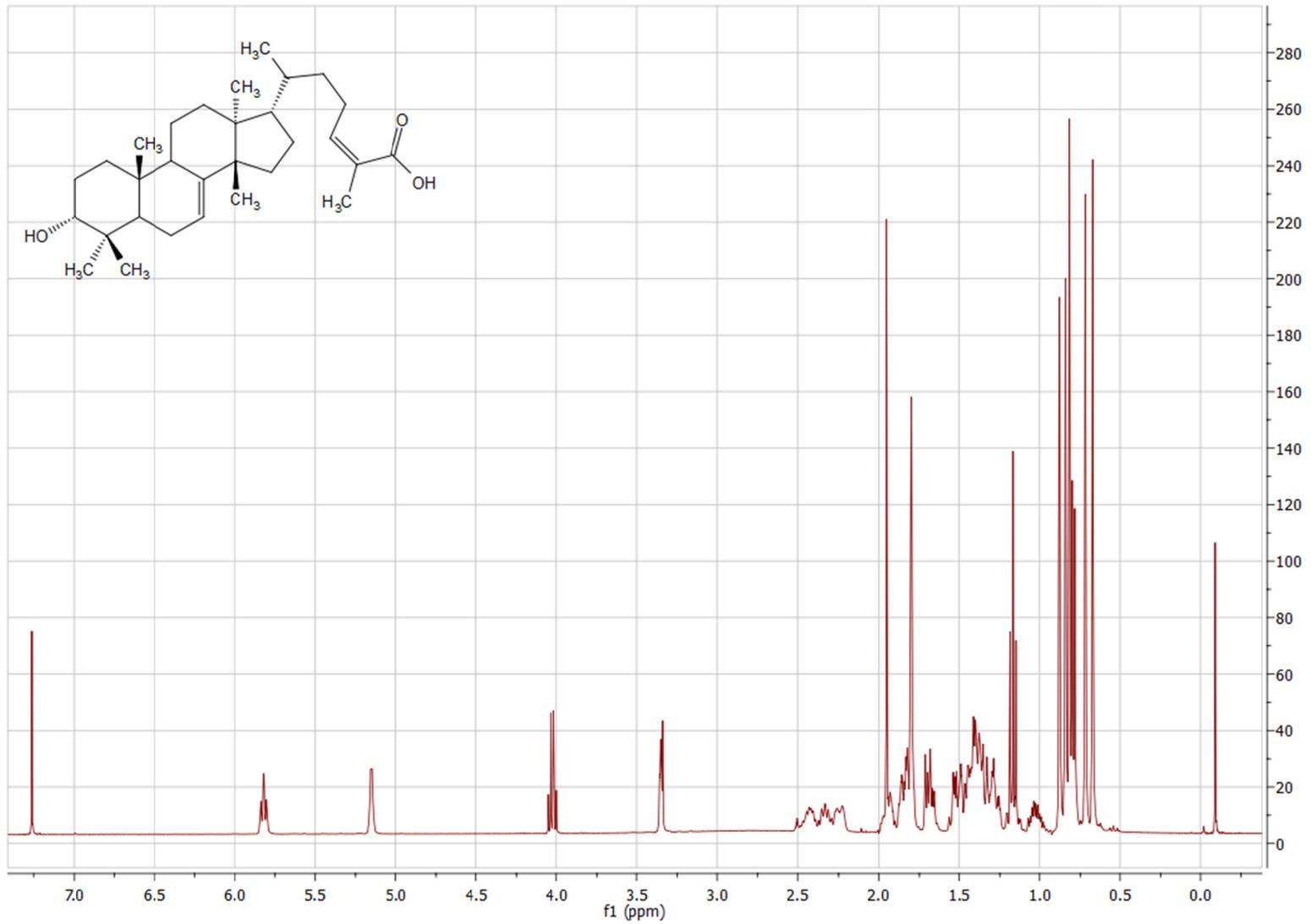


Espectro 1. Espectro de IR (Bromuro de potasio) del ácido 3 α -hidroximasticadienónico.

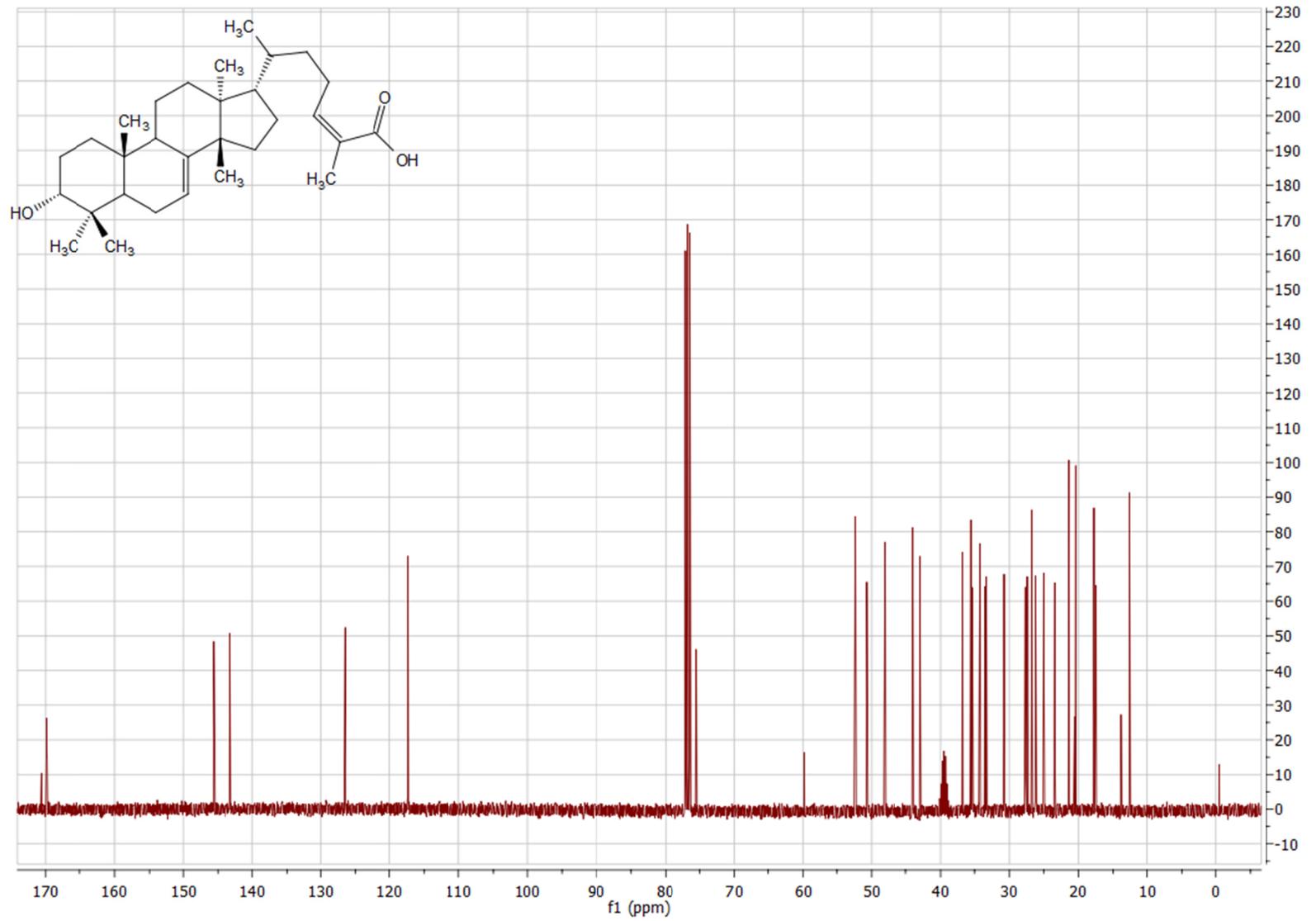
77



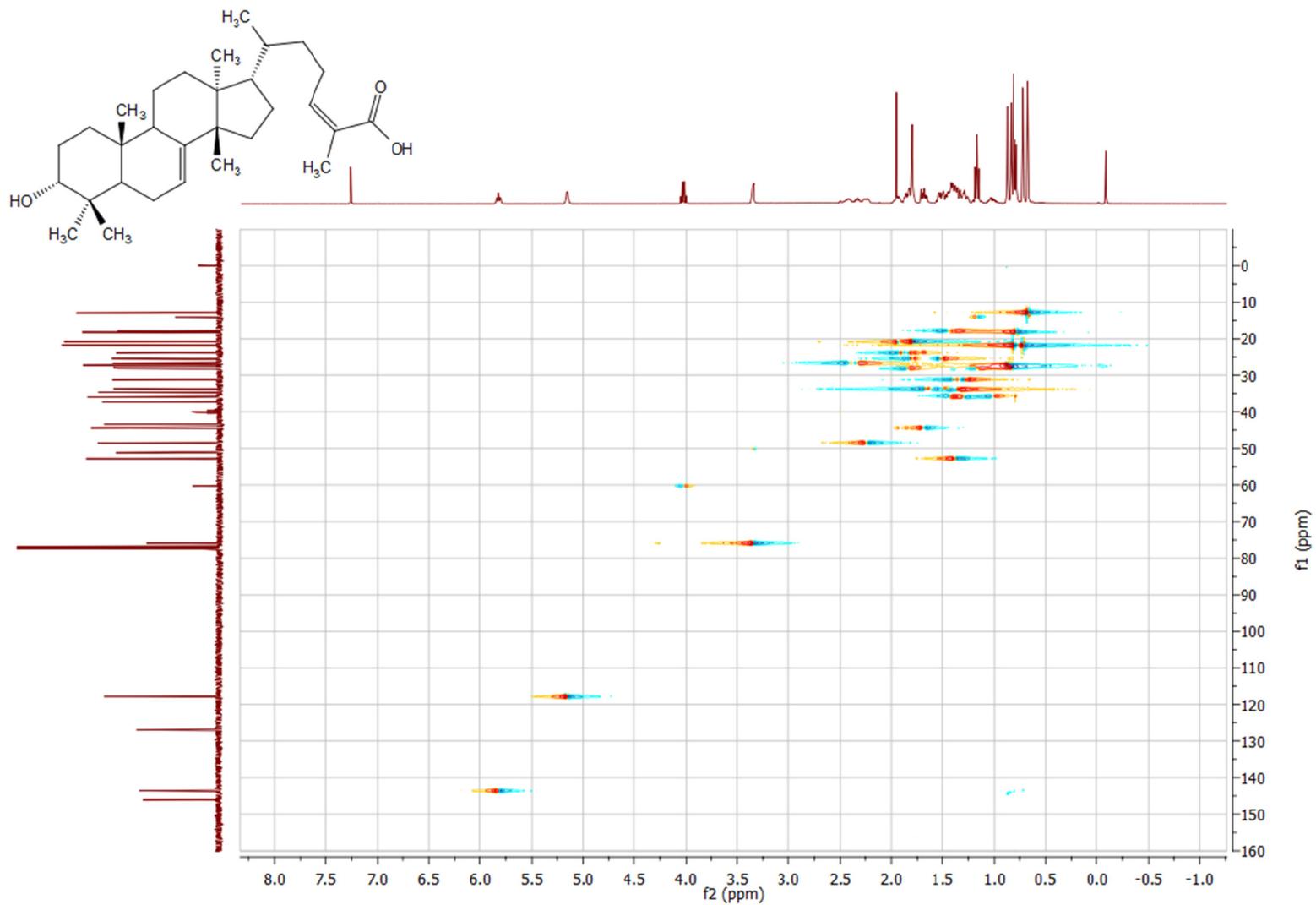
Espectro 1. Espectro de IR (Bromuro de potasio) del ácido masticadienónico.



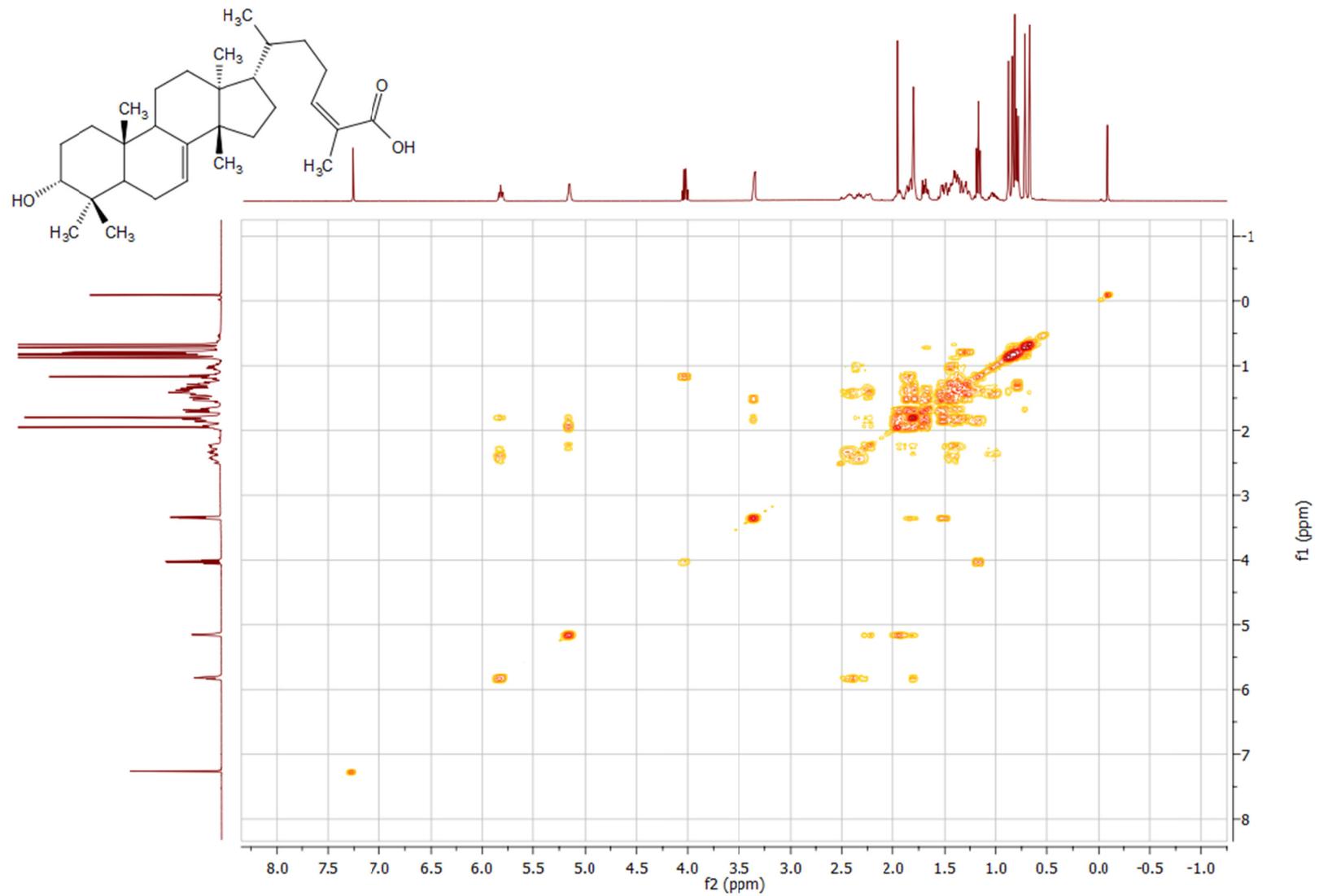
Espectro 3. Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3 ; TMS).



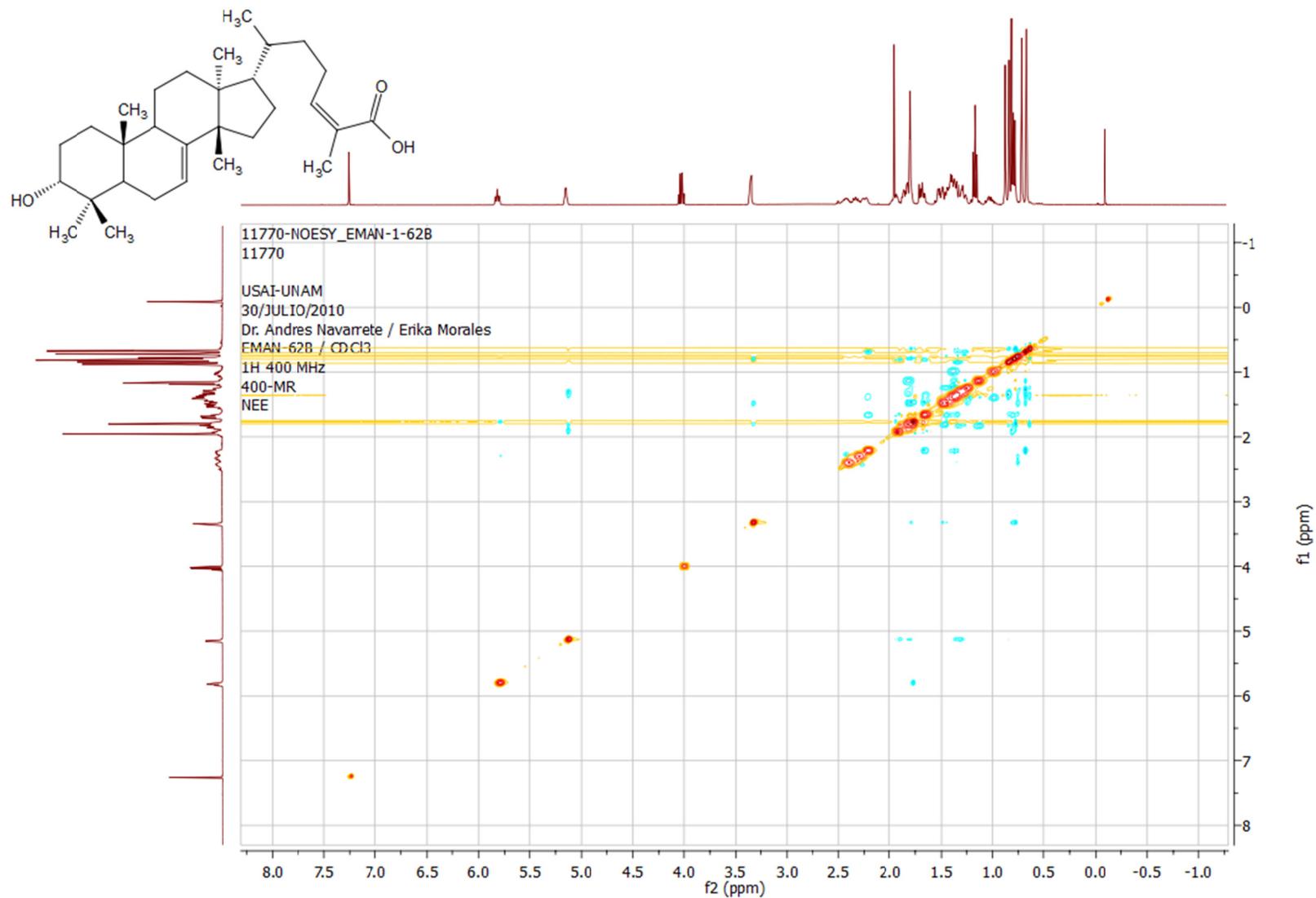
Espectro 4. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3 ; TMS).



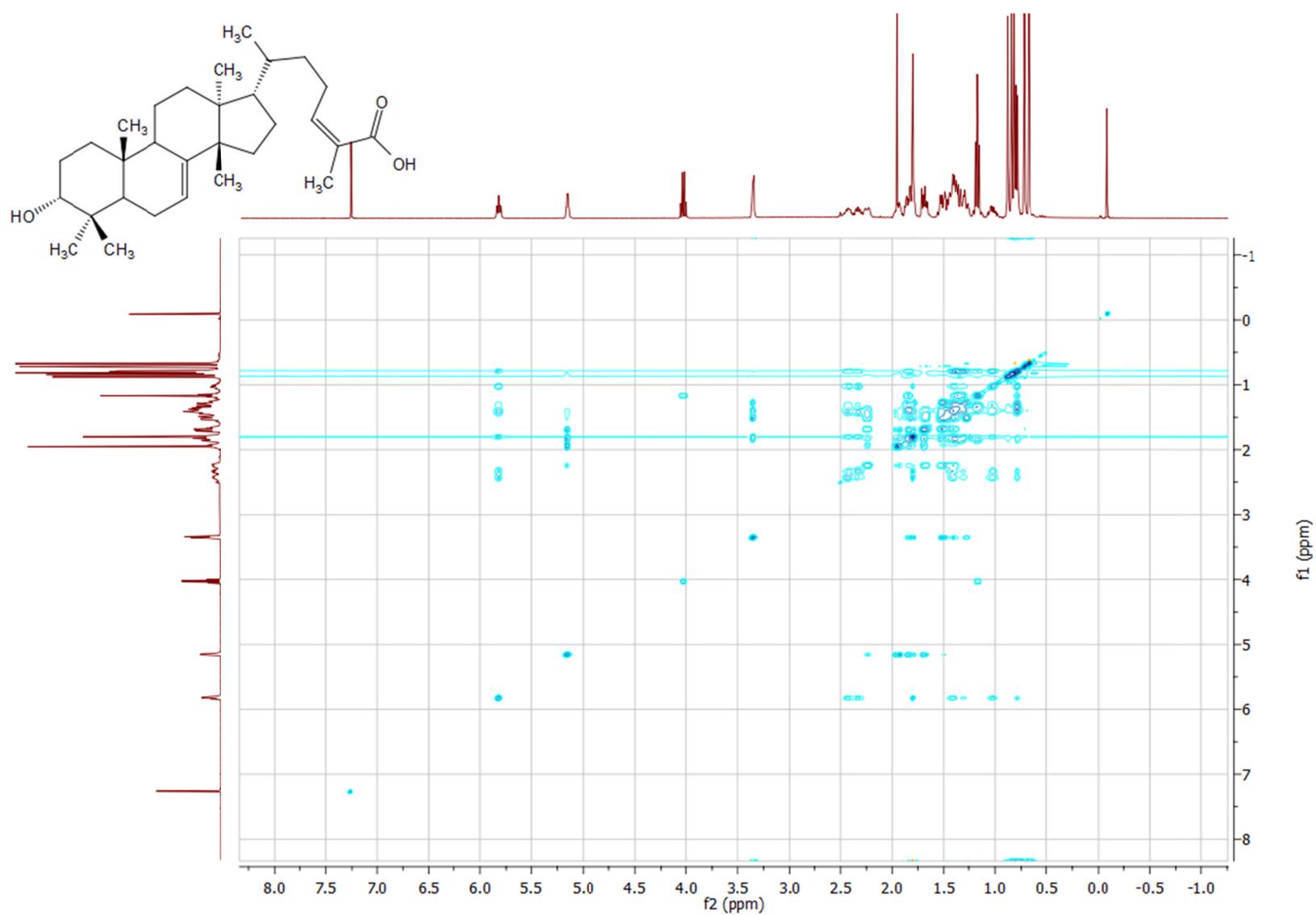
Espectro 5. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D HSQC del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl₃; TMS).



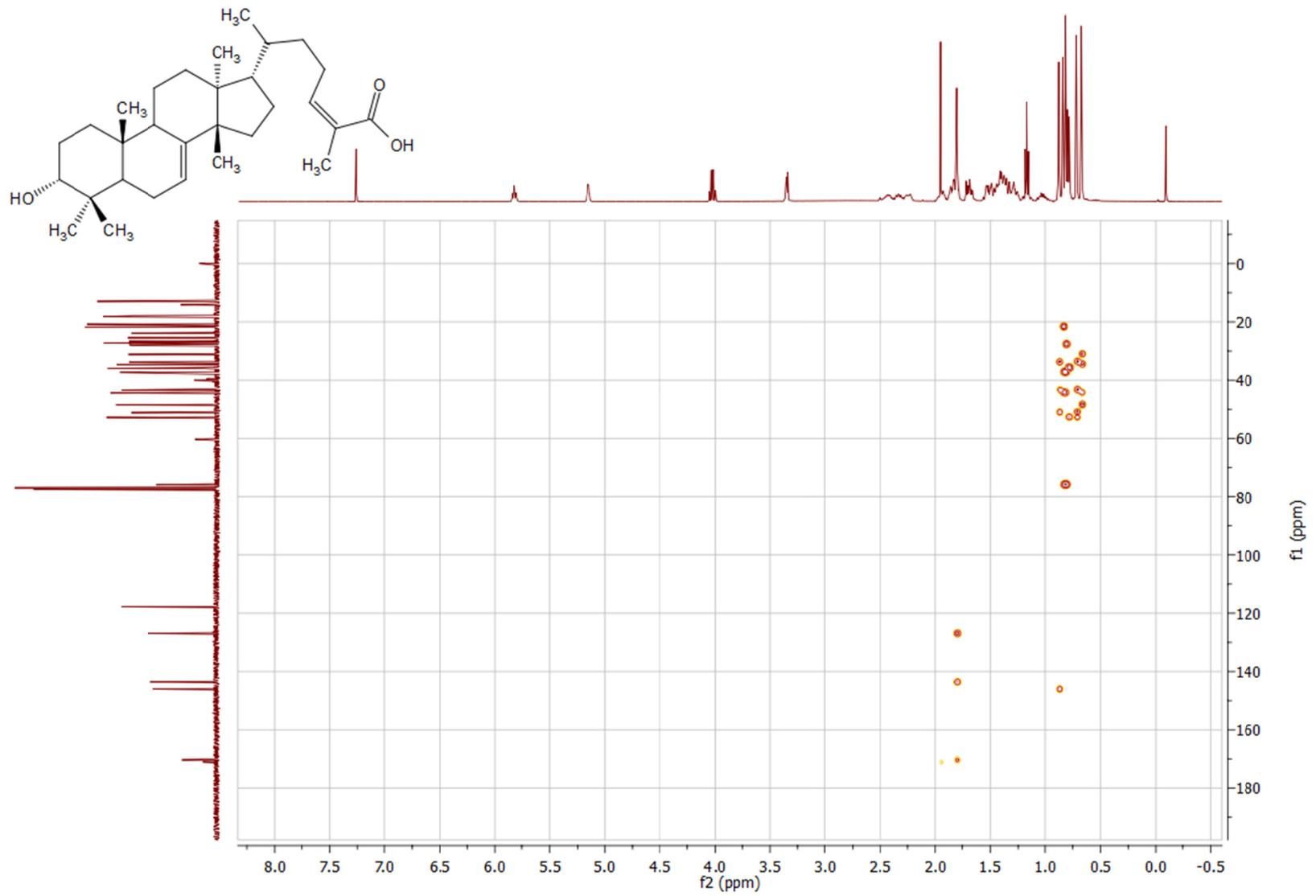
Espectro 6. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D ^1H - ^1H COSY del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, $\text{CD}\text{-Cl}_3$; TMS).



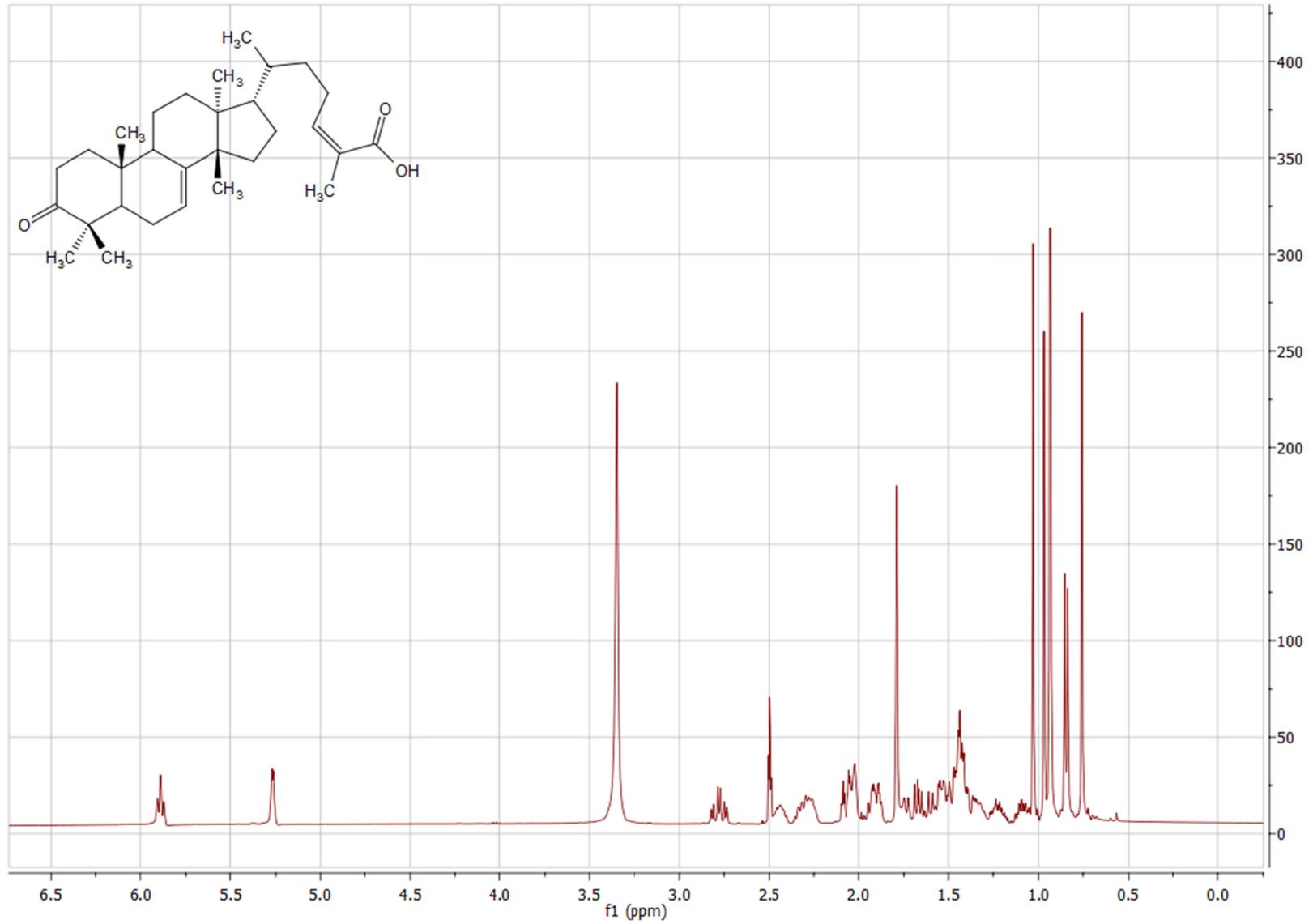
Espectro 7. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D NOESY del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl₃; TMS).



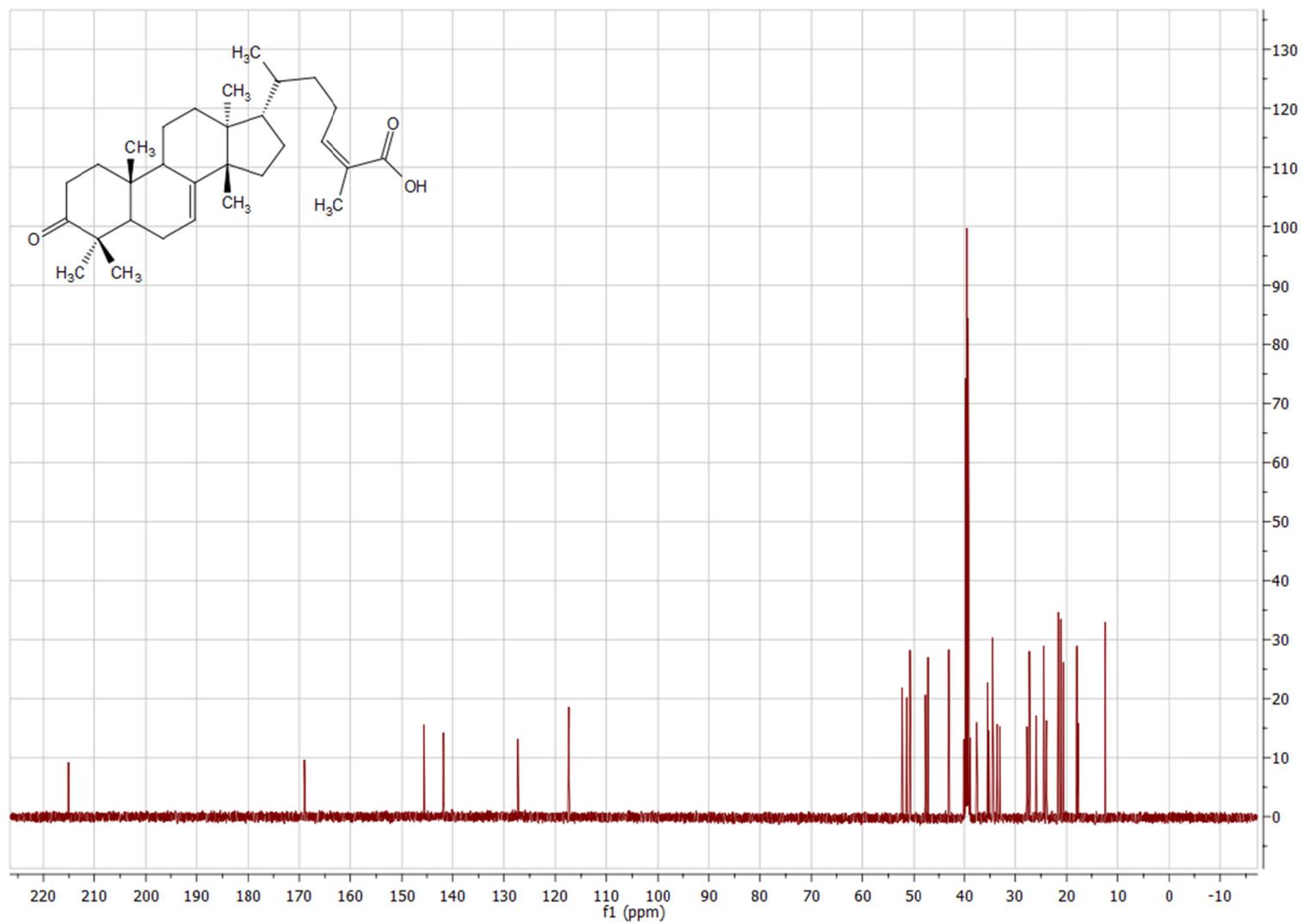
Espectro 8. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D TOCSY del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3 ; TMS).



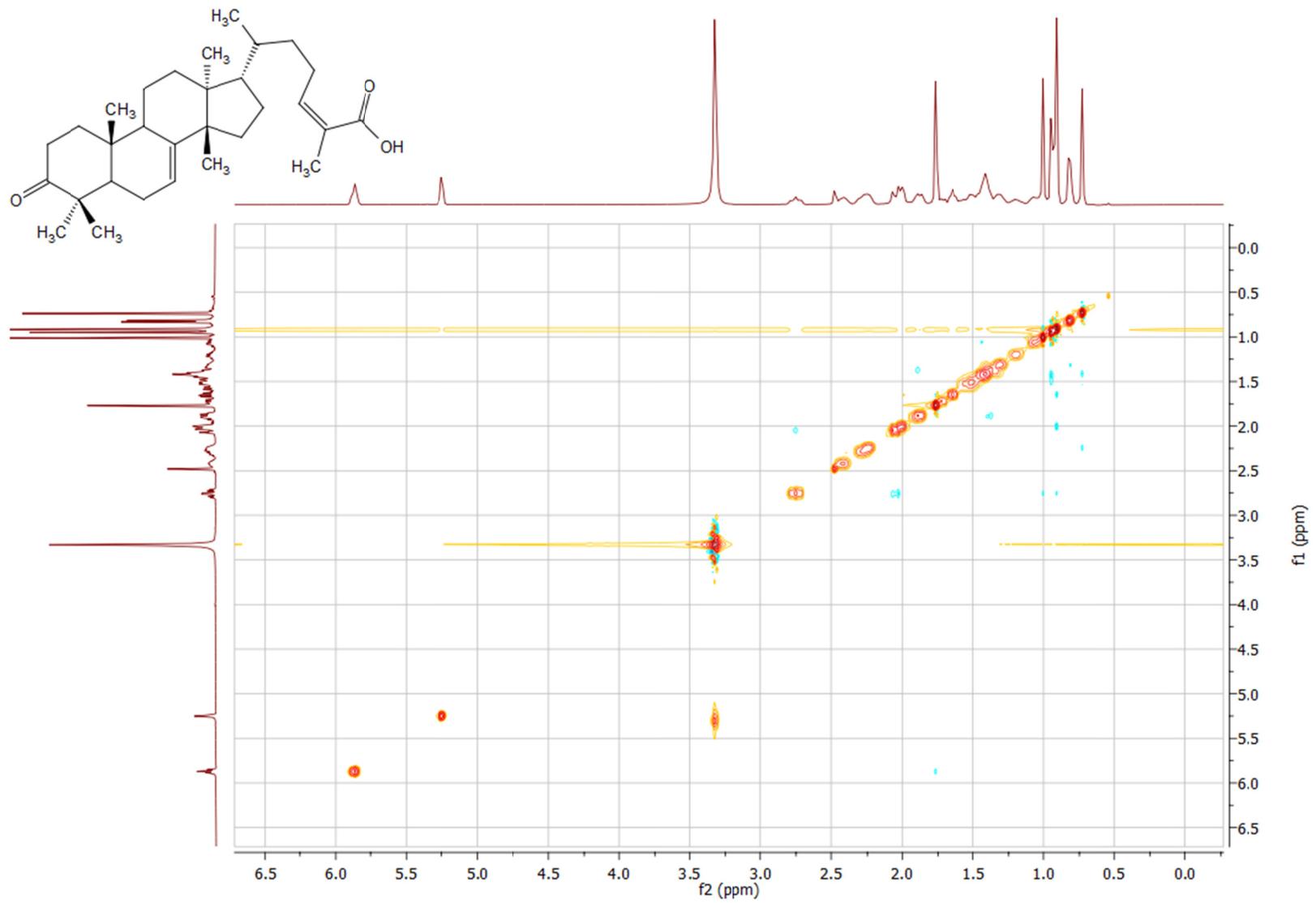
Espectro 9. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D HMBC del ácido 3 α -hidroximasticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3 ; TMS).



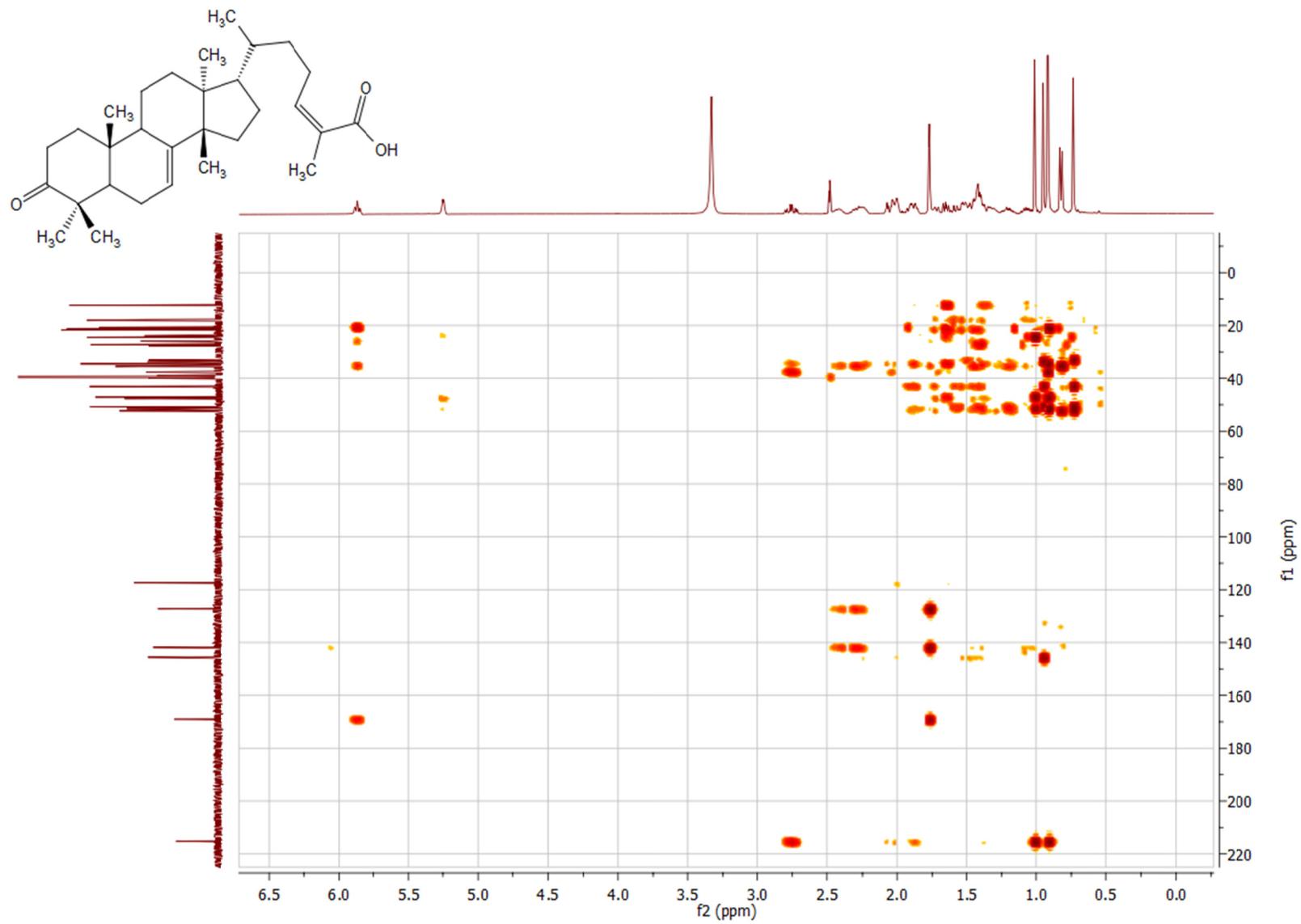
Espectro 10. Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3).



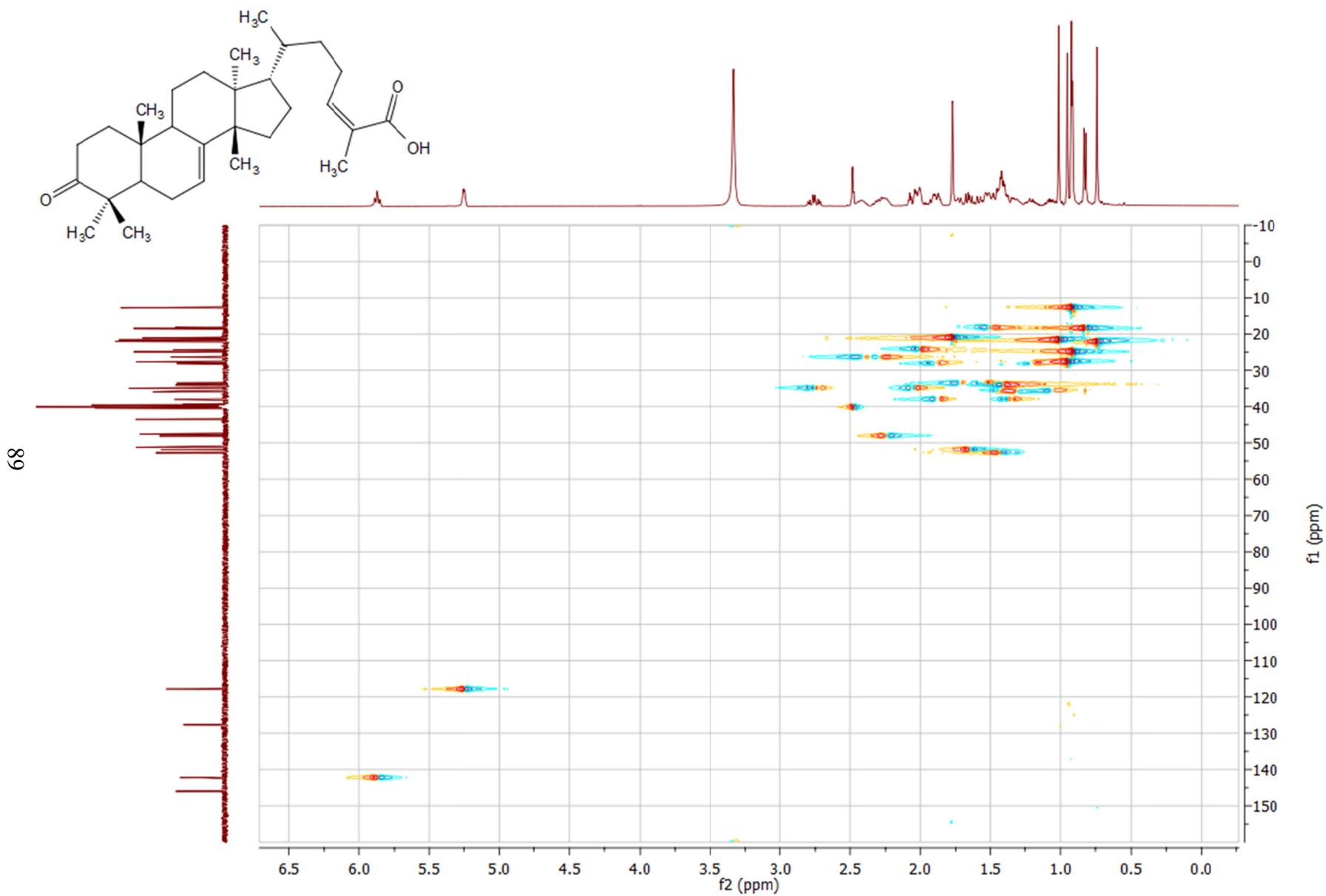
Espectro 11. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C del ácido masticadienónico (400 MHz, $\text{CD}-\text{Cl}_3$).



Espectro 12. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D NOESY del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3).



Espectro 13. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D HMBC del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl_3).



Espectro 14. Espectro de resonancia magnética nuclear 2D HSQC del ácido masticadienónico (400 MHz, CD-Cl₃).

13. Bibliografía

Arrieta, J., Benítez, J., Flores, E., Castillo, C. & Navarrete, A. (2003). Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae); Role of prostaglandins, sulfhidryls, nitric oxide and capsaicin sensitive neurons. *Planta Medica*; 69: 905-909.

Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Van Beijsterveldt, L., Anciaux, K., Verboven P., Meuldermans, W. & Lavrijsen, K. (2001). Strategies for Absorption Screening in Drug Discovery and Development. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 1(5): 367-383.

Borm, P.J., Koster, A.S., Frankhuijzen-Sierevogel, A. & Noordhoek, J. (1983). Comparison of two cell isolation procedures to study *in vitro* intestinal wall biotransformation in control and 3-methyl-cholanthrene pretreated rats. *Cell Biochem. Funct.*; 1(3): 161-167.

Brown, L., Heyneke, O., Brown, D., van Wyk, J.P.H. & Hamman, J.H. (2008). Impact of traditional medicinal plant extracts on antiretroviral drug absorption. *Journal of Ethnopharmacology*; 119: 588–592.

Calpena, A. & Escribano, E. (2008). *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol. 1 Bolus intravenoso modelo bicompartimental. España, Editorial Síntesis; 87-115pp.

Carey, F. (2006). *Química Orgánica*. 6a edición, USA, Mc Graw Hill; 1096pp.

Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. & Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*; 114: 72–77.

Chan, K., Qui Liu, Z., Hong Jiang, Z., Zhou, H., Fan Wing, Y., Xu, H. & Liu, L. (2006). The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat sac model. *Journal of Ethnopharmacology*; 103: 425–432.

Chávez-Piña, A. & Navarrete, A. (2009). Chapter 3. Gastroprotective Triterpenoids: Pharmacology Mechanism. *Medicinal Plants Classification, Biosynthesis and Pharmacology*. Nova Science Publishers, New York; 97-138 pp.

Colalto, C. (2010) Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacol Res*; 62(3): 207-27.

Colegio de QFB. (1995). *Guía de validación de métodos analíticos*, México.

Deferme, S., Annaert, P. & Augustijns, P. (2008). *Drug Absorption Studies in situ, in vitro and in silico models*. Springer US, USA; 187-189.

Dzubac, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Bidermann, D., Markova, L., Urban, M. & Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Reports*; 23: 394-411.

Genty, M., Gonzalez, G., Clere, C., Desangle-Gouty, V. & Legendre, J. (2001) Determination of the passive absorption through the rat intestine using chromatographic indices and molar volume. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12: 223–229.

Huang, H., Liu, C., Li, Y. & Gao, G. (2008) Study on absorption kinetics of astragaloside IV in rats intestines. *ZhongguoZhong Yao ZaZhi*; 33(13): 1609-1611.

Hunter, J., Jepson, M.A., Tsuruo, T., Simmons, N.L. & Hirst, B.H. (1990). Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 Cells. *J Biol Chem*; 268: 14991–14997.

Johnson, B., Charman, W. & Porter, C. (2001). The impact of P-glycoprotein efflux on enterocyte residence time and enterocyte-based metabolism of verapamil. *J Pharm Pharmacol*; 53(12): 1611-1619.

Katsung, B., Masters, S. & Trevor, A. (2009). *Farmacológica Básica y Clínica*. 11a edición. McGraw Hill, México: 8-9pp.

Kaplan, S. & Cotler, S. (1972). Use of cannulated everted intestinal sac for serial sampling as a drug absorbability (permeability) screen. *J Pharm Sci.*; 61(9): 1361-1365.

Kaul, S. & Ritschel, W.A. (1981). Studies of the intestinal transfer of coumarin and 7-hydroxycoumarin across guinea pig and rat small intestine. *Arzneimittelforschung*; 31(5): 790-795.

Leppert, P. & Fix, J., (1994). Use of everted intestinal rings for *in vitro* examination of oral absorption potential. *J. Pharm. Sci.*; 83: 976-981.

Li, E. & Li, Y. (2008). Effect of P-glycoprotein on the absorption of buagafuran in rat intestinal lumen. *Yao XueXueBao*; 43(4): 361-365.

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A. & Portolés, A. (2009). *Velázquez Farmacología Básica y Clínica*. 18a edición. Editorial Medica Panamericana España; 14-18pp.

Mata, R., Calzada, F. & Navarrete, A., Del Rio, F. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*; 34: 147-154.

Márquez, N. & Gonzales, M. (2002). Efectos de extractos vegetales sobre la Absorción Intestinal de Glucosa y su captación por Vesículas de Membrana Apical de Enterocitos. *Revista de la Facultad de Medicina*; 25: 107-110.

Navarrete, A., Avula, B., Joshi, V. & Ji, A. (2006). Quantitative Determination of Triterpenes from *Amphipterygium adstringens* by Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography and Morphological Analysis of Cuachalalate Preparations. *Journal of AOAC International*; 89: 1-7.

Navarrete, A., Mata, R. & Delgado, G. (1989). Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Medica*; 55: 579.

Oviedo, I., Ramírez, T., Soto, M. & Vázquez, M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*; 11: 436–445.

Parrott, N. & Lave, T. (2002). Predicting drug absorption by computational methods. *Eur J Pharm Sci*; 17(1-2): 51-61.

Praveen, V., Saeho, C. & Richard, A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 22: 301-312.

Quevedo, M. & Brinón, M. (2009). *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetic characterization of two novel prodrugs of zidovudine. *Antiviral Research*; 83: 103–111.

Rogers, S., Back, D.J. & Orme, M.L. (1987). Intestinal metabolism of ethinyloestradiol and paracetamol *in vitro*: studies using Ussing chambers. *Br J Clin Pharmacol*; 23(6): 727-734.

Rowland, M., & Tozer, T. (1994). *Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Applications*. 3a edition, USA, Williams & Wilkins; 18-31 pp.

Ruan, L., Chen S., Yu B., Zhu D., Cordell G. & Qiu S. (2006). Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *Eur J Med Chem.*; 41(5):605-610.

Sharma, P., Chawla, H. & Panchagnula, R. (2002). LC determination of cephalosporins in *in vitro* rat intestinal sac absorption model. *J. Pharm. Biomed. Anal.*; 27: 39–50.

Streubel A, Siepmann J, Bodmeier R. (2006). Drug delivery to the upper small intestine window using gastroretentive technologies. *Curr Opin Pharmacol* ;6:501–508.

Yang J., Jamei M., Yeo K., Tucker G. & Rostami-Hodjegan, A. (2007). Prediction of intestinal first-pass drug metabolism. *Curr Drug Metab.*; 8(7): 676-84.

Yu, X., Lin, S., Chen, X., Zhou, Z., Liang, J., Duan, W., Chowbay, B., Wen, J., Chan, E., Cao, J., Li, C. & Zhou, S. (2007). Transport of cryptotanshinone, a major active triterpenoid in *Salvia miltiorrhiza* Bunge widely used in the treatment of stroke and Alzheimer's disease, across the blood-brain barrier. *Curr. Drug. Metab.*; 8(4): 365-378.