



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Establecimiento de las pruebas de identidad química para el
control de calidad de la droga cruda de *Hofmeisteria schaffneri*
(A. Gray) R. M. King & H. Robinson (ASTERACEAE)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

Mariana Yetlanezy Hernández Arámburo



MÉXICO, D.F.

AÑO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
SECRETARIO: Dra. Araceli Pérez Vásquez
1er. SUPLENTE: Dr. José Fausto Rivero Cruz
2° SUPLENTE: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPTO. FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Araceli Pérez Vásquez

SUSTENTANTE:

Mariana Yetlanezy Hernández Arámburo

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos DGAPA (PAPIIT IN218110) y CONACyT 99395 a cargo de la Dra. Rachel Mata.

Gracias también al CONACyT por la beca del Sistema Nacional de Investigadores (SNI, No. De expediente 7786), programa a cargo de la Dra. Rachel Mata.

A la Doctora Rachel Mata por todo el apoyo y la confianza brindada, que permitió llevar a buen término el trabajo experimental y escrito.

A los profesores del jurado por el tiempo invertido en la revisión del presente trabajo, así como el aporte de sus conocimientos para la mejora del mismo.

Al Dr. Robert Bye y Edelmira Linares (Instituto de Biología, UNAM) por el material vegetal proporcionado.

A la Q. Georgina Duarte Lisci y Q. F. B. Margarita Guzmán (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de Masas y cromatogramas de gases.

A la Q. F. B. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de espectros en el infrarrojo.

A la M. en C. Nuria Esturau Escofet y Rosa Isela del Villar, por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero por la asistencia técnica y por ser una excelente compañera de laboratorio, siempre sonriente y contagiando su alegría.

A mi mami y papi, Mago y "Ale", no tengo manera de expresar toda mi gratitud. Porque sin su apoyo, amor, cuidado, dedicación y esta formación que siempre se han empeñado en inculcarme, no estaría donde me encuentro. Los quiero millones.

A mi hermanita "Fabio" por ser, para mí, la mejor hermana del mundo. Eres mi gran consejera.

Especialmente, a mi asesora Araceli Pérez, por ayudarme, apoyarme y formarme en esta rama de la investigación. Gracias por todo el conocimiento que por ti adquirí y por toda esa paciencia mostrada durante la realización del proyecto.

A mis amigos de la facultad, Adrianita, Guadalupe, Areli "china", Tanya, Sandy, Rafa, por todas las porras recibidas y los itú puedes! que durante todo este tiempo me han animado bastante. Mil gracias por su amistad incondicional. Hemos creado tantos recuerdos...

Y no menos importante agradecer a las chicas y chicos del laboratorio 124, porque han sido para mí una gran inspiración. Los admiro por quienes son y por lo que han conseguido.

Ya por último quiero agradecer a todas las personitas que no he nombrado, pero que el destino permitió que cruzaran por mi camino y dejaran una huellita de sabiduría por su paso.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE ESPECTROS	viii
ABREVIATURAS	ix
1. ANTECEDENTES	
1.1. Taxonomía y etnobotánica de <i>H. schaffneri</i>	1
1.2. Antecedentes químicos de <i>H. schaffneri</i>	2
1.3. Antecedentes farmacológicos de <i>H. schaffneri</i>	4
1.4. Control de calidad para drogas crudas y preparados fitofarmacéuticos	6
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	9
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1. Procedimientos generales	
3.1.1. Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	11
3.1.2. Análisis cromatográficos	11
3.2. Material vegetal	13
3.3. Preparación de las fracciones de CH ₂ Cl ₂ y AcOEt a partir de la infusión de las partes aéreas secas de <i>H.</i> <i>schaffneri</i>	13
3.4. Fraccionamiento primario de la fracción de CH ₂ Cl ₂	13
3.4.1. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F22	15
3.4.2. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FIII	16
3.5. Fraccionamiento primario de la fracción de AcOEt	17

3.6.	Análisis por CCD de extracto, fracciones y compuestos aislados de <i>H. schaffneri</i>	18
3.7.	Análisis de los componentes por CLAE de la infusión, extracto acuoso, fracción de CH ₂ Cl ₂ , fracción de AcOEt y los compuestos 6, 7 y 8	19
3.8.	Análisis de compuestos volátiles de <i>H. schaffneri</i> por MEFS/HS-CG-EM (IE)	20
3.9.	Prueba de sensibilidad antimicrobiana. Método de microdilución en caldo	20
3.10.	Búsqueda bibliográfica referente a la especie vegetal en estudio	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1.	Obtención de los perfiles cromatográficos por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	22
4.2.	Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de la infusión de <i>H. schaffneri</i>	24
4.3.	Análisis de la fracción orgánica de AcOEt de la infusión de <i>H. schaffneri</i>	30
4.4.	Identificación de componentes volátiles de <i>H. schaffneri</i> por MEFS/HS-CG-EM (IE)	33
4.5.	Ensayo de actividad antimicrobiana	36
5.	CONCLUSIONES	37
6.	PERSPECTIVAS	38
7.	REFERENCIAS	39
	ANEXOS	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estados donde se encuentra <i>H. schaffneri</i>	1
Figura 2. Compuestos aislados de <i>H. schaffneri</i>	3
Figura 3. Compuestos presentes en los aceites esenciales de <i>H. schaffneri</i> .	4
Figura 4. Diagrama general del fraccionamiento de la fracción orgánica de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. schaffneri</i> y obtención de los compuestos 6 y 8 .	14
Figura 5. Diagrama general del fraccionamiento de la fracción orgánica de AcOEt de <i>H. schaffneri</i> y obtención de los compuestos 8 y 14 .	18
Figura 6. Cromatograma por CCD de la fracción de CH ₂ Cl ₂ y compuestos aislados de <i>H. schaffneri</i> .	23
Figura 7. Cromatograma por CLAE de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. schaffneri</i> . $\lambda=220$ nm.	24
Figura 8. Cromatograma por CLAE de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. schaffneri</i> . $\lambda=220$ nm.	26
Figuras 9. Cromatograma por CCD del compuesto mayoritario 8 sometido a los factores indicados en la tabla 10.	28

Figura 10. Cromatograma por CLAE del compuesto 8 . $\lambda=220$ nm.	29
Figura 11. Cromatograma por CLAE del compuesto 8 después de 6 meses. $\lambda=220$ nm.	29
Figura 12. Cromatogramas por CCD del extracto acuoso, fracción de AcOEt y compuesto 14 .	30
Figura 13. Estructura del ácido 3,5-dicafeoilquínico (14)	32
Figura 14. Cromatograma por CLAE de la infusión de <i>H.</i> <i>schaffneri</i> . $\lambda=327$ nm	31
Figura 15. Cromatograma por CLAE de la fracción orgánica de AcOEt obtenida a partir de las partes aéreas secas de <i>H. schaffneri</i> . $\lambda=327$ nm	32
Figura 16. Cromatograma por CLAE del compuesto 14 . $\lambda=327$ nm	32
Figura 17. Cromatograma por CG de los compuestos volátiles de <i>H. schaffneri</i> .	35
Figura 18. Cromatograma por CG de los compuestos volátiles de <i>H. schaffneri</i> . Ampliación 3:1.	35
Figura 19. Cromatograma por CLAE de los compuestos mayoritarios de la fracción orgánica de diclorometano. $\lambda=220$ nm	42

Figura 20. Cromatograma por CLAE del extracto acuoso de *H. schaffneri*. $\lambda=327\text{nm}$.

43

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipo de marcadores químicos y su utilidad en el control de calidad.	8
Tabla 2. Fraccionamiento primario de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. schaffneri</i> .	15
Tabla 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F22 .	16
Tabla 4. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FIII .	16
Tabla 5. Fraccionamiento primario de la fracción de AcOEt obtenida a partir de la infusión de <i>H. schaffneri</i> .	17
Tabla 6. Condiciones de análisis de fracciones y compuestos de <i>H. schaffneri</i> por CCD.	19
Tabla 7. Condiciones por CCD para el análisis de la fracción de CH ₂ Cl ₂ y compuestos marcadores.	24
Tabla 8. Condiciones de la fracción de CH ₂ Cl ₂ y compuestos de <i>H. schaffneri</i> por CLAE.	24
Tabla 9. Tiempos de retención y proporción de los componentes de la fracción de CH ₂ Cl ₂ .	25

Tabla 10. Factores a los que se sometió el compuesto 8 .	27
Tabla 11. Condiciones de operación en el análisis del compuesto 8 de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. schaffneri</i> por CLAE.	28
Tabla 12. Condiciones de operación en el análisis de la infusión, fracción de AcOEt y 14 de <i>H. schaffneri</i> por CLAE.	31
Tabla 13. Condiciones de operación en el análisis de los componentes volátiles de <i>H. schaffneri</i> por CG-EM (IE).	34
Tabla 14. Compuestos mayoritarios volátiles presentes en <i>H. schaffneri</i> .	36
Tabla 15. Susceptibilidad de las bacterias Gram positivo <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> hacia los compuestos, extracto acuoso y fracción obtenidos de <i>H. schaffneri</i>	36

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de RMN- ¹ H (400MHz, CDCl ₃) del compuesto 8	44
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) del compuesto 8	45
Espectro 3. Espectro de RMN- ¹ H (400MHz, MeOD) del compuesto 14	46

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados Celsius
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada analítica
CCP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CG	Cromatografía de Gases
CG-EM	Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas
CG-FID	Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
cm	Centímetro
δ	Desplazamiento químico
DMSO	Dimetil sulfóxido
eV	Electrón Volts
EtOH	Etanol
FeCl ₃	Cloruro férrico
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
g	Gramo
ICDRA	Conferencia Internacional de Autoridades Regulatoras de Medicamentos

h	Hora
H ₂ O	Agua
H ₂ O _{dd}	Agua desionizada
KBr	Bromuro de potasio
Kg	Kilogramo
λ	Longitud de onda
L	Litro
MEFS /HS	Microextracción en Fase Sólida-Headspace
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHz	Megahertz
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
min	Minuto
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mm	Milímetro
μ m	micrómetro
MS-FAB	Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Acelerados
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear protónica

SSI	Solución Salina Isotónica
TFA	Ácido trifluoro acético
TMS	Trimetilsilano
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
WHA	Asamblea Mundial de la Salud
WHO	World Health Organization

1. ANTECEDENTES

1.1. Taxonomía y etnobotánica de *Hofmeisteria schaffneri*

Hofmeisteria schaffneri (A. Gray) H. R King & H. Robinson (Asteraceae), tribu Eupatorieae (syn. *Fleischmannia schaffneri*), es conocida con el nombre común de ámbar en el estado de México y manzanillo australiano en el estado de Michoacán. Es un arbusto perenne que crece de 25 a 35 cm y habita en ambientes húmedos y cálidos como son las grietas de las rocas, filtraciones, salientes húmedas y en las orillas de arroyos. Se distribuye en los bosques de encino y encino-pino de las montañas de los estados centrales de Jalisco, San Luis Potosí y Guanajuato. Se cultiva en jardines domésticos en el estado de México, Distrito Federal y Michoacán. Esta planta florece entre los meses de febrero y abril (Pérez Vásquez, *et al.*, 2005; 2008; 2011). En los mercados del centro de México se encuentra disponible ya sea fresca o seca.

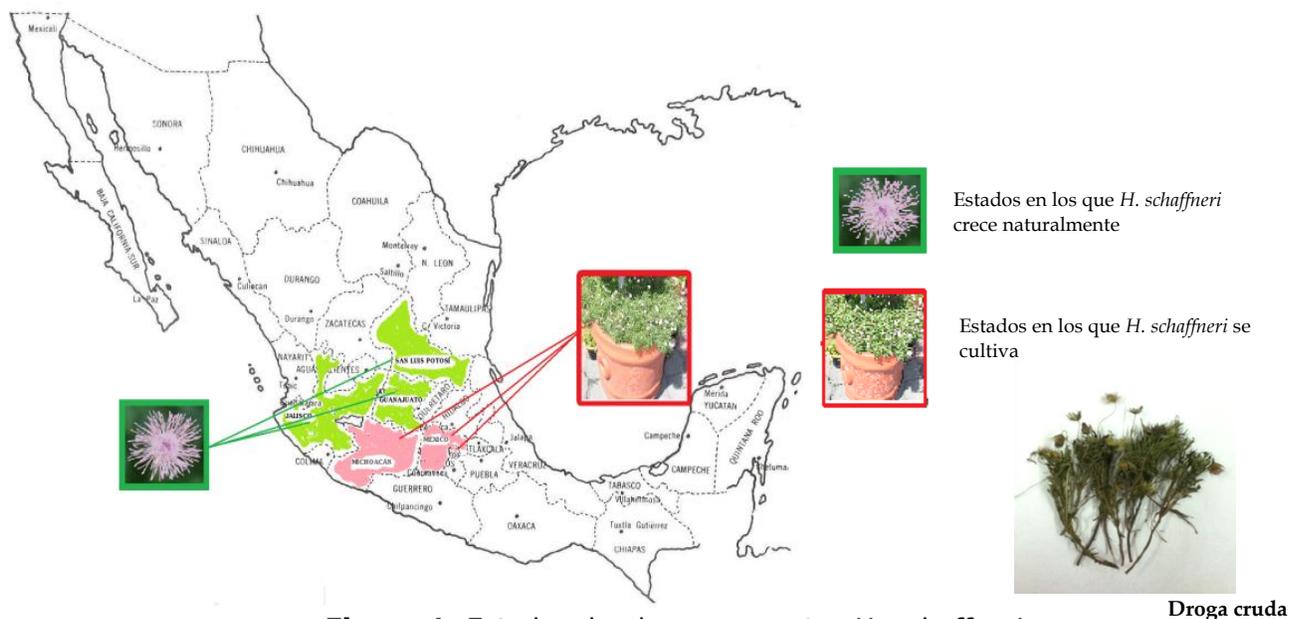


Figura 1. Estados donde se encuentra *H. schaffneri*.

En las prácticas médicas tradicionales de nuestro país, las partes aéreas son utilizadas para fiebres y en forma de cataplasma para tratar heridas en la piel. La infusión ya sea sola o acompañada con toronjiles se utiliza para malestares estomacales (Pérez Vásquez, *et al.*, 2005; 2008; 2011).

1.2. Antecedentes químicos de *H. schaffneri*

De las partes aéreas secas de *H. schaffneri* se han aislado, en su mayoría, derivados del timol funcionalizados principalmente en el grupo hidroxilo del fenol y en los carbonos de la cadena de isopropilo (**2-11**). El estudio químico de un extracto íntegro total permitió el aislamiento de los derivados **2-6**, **10** y **11**. De estos, **3** y **4** representan estructuras novedosas exclusivas de *H. schaffneri* que poseen esqueletos de tipo nortimol (Pérez-Vásquez, *et al.*, 2008), éstos se conocen con los nombres comunes de hofmeisterina y hofmeisterina II.

Por otra parte, el estudio químico de una fracción de diclorometano obtenida directamente de la infusión permitió el aislamiento de los derivados **6-9**, siendo este último exclusivo también para *H. schaffneri* y a quien se le designó con el nombre común de hofmeisterina IV. Los derivados **2**, **5** y **6-8** se han reportado únicamente para algunas especies pertenecientes a las tribus Senecioneae y Eupatorieae de la familia Asteraceae. Es importante mencionar que el compuesto **2** fue reportado por primera vez en *H. schaffneri* y recibió el nombre común de hofmeisterina III (Pérez-Vásquez, *et al.*, 2008).

También se ha reportado la presencia de β -sitosterol, euparina y en menor proporción el ácido angélico (Pérez-Vásquez, *et al.*, 2008).

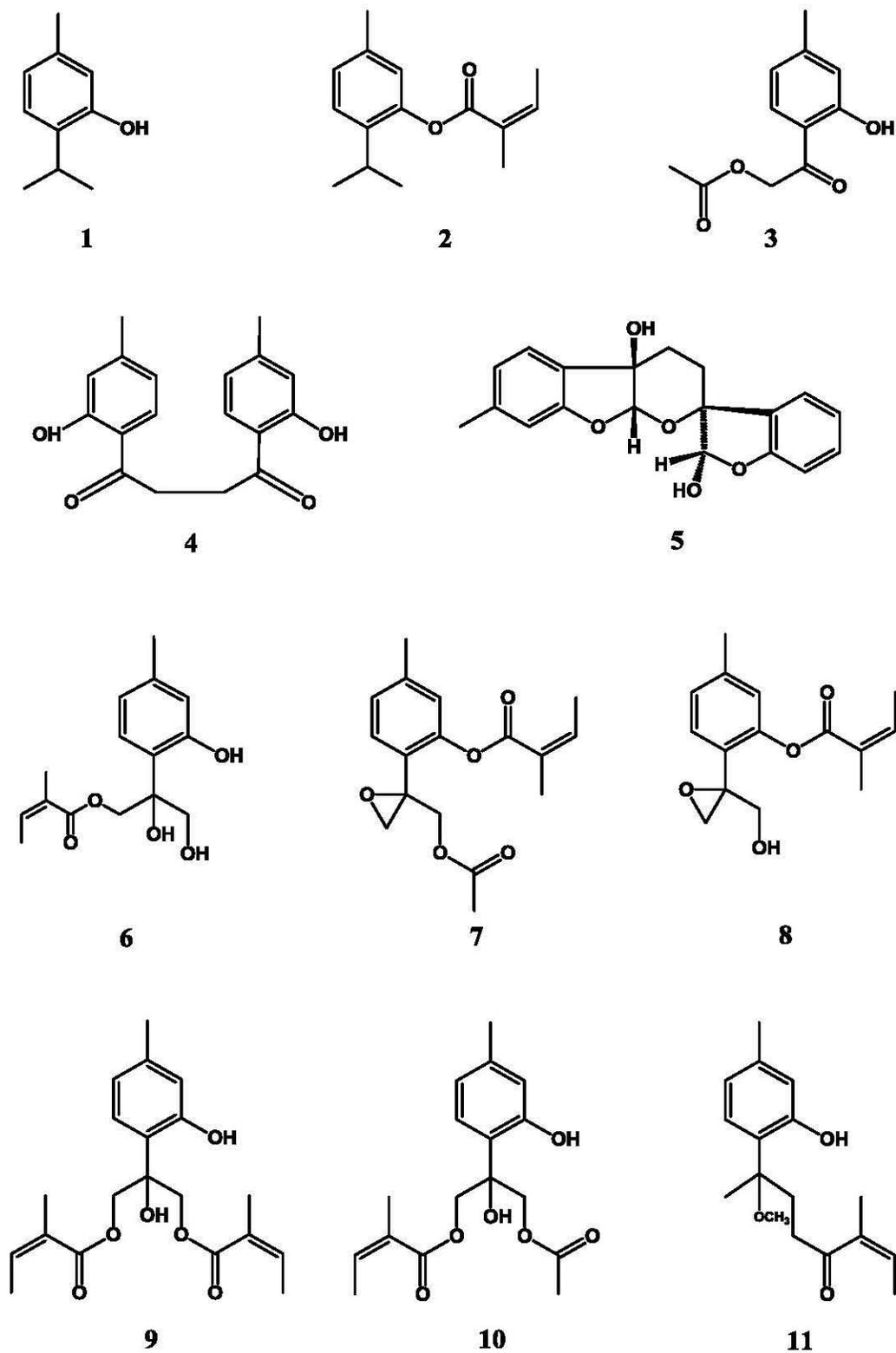


Figura 2. Compuestos aislados de *H. schaffneri*

De las partes aéreas frescas de *H. schaffneri*, se obtuvieron cuatro lotes de aceites esenciales de plantas recolectada a lo largo de un año, cubriendo principalmente las fechas de floración (enero y mayo) y no floración (agosto y octubre). Estas esencias fueron preparadas por hidrodestilación y analizadas por cromatografía de gases utilizando un detector de ionización de flama (CG-FID, por sus siglas en inglés). En general, se identificaron 44 componentes de los cuales el más abundante fue la hofmeisterina II (**2**) seguido de **13** y **12**. También, se encontró en menor proporción el derivado **7** (Pérez-Vásquez *et al.*, 2010).

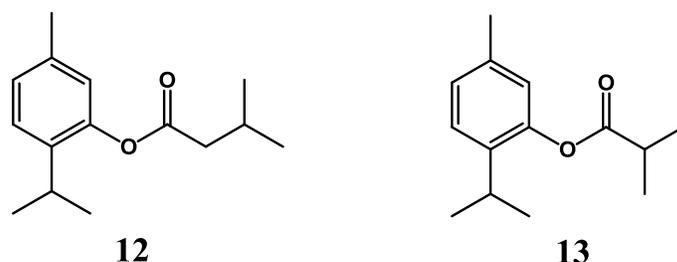


Figura 3. Compuestos presentes en los aceites esenciales de *H. schaffneri*

1.3. Antecedentes farmacológicos de *H. schaffneri*

Los estudios que se han realizado sobre la actividad farmacológica de *H. schaffneri* se han encaminado a validar el uso de la especie como agente antiséptico y analgésico.

Se sabe que la actividad antiséptica se debe a la acción de una sustancia o de mezcla de sustancias con propiedades antimicrobianas que se aplican entre otras formas, directamente a tejidos de la piel, lo que permite reducir la posibilidad de una infección. Una de las bacterias más importantes como flora transitoria de la piel y, por lo tanto, implicada en infecciones cutáneas es *Staphilococcus aureus* (Koneman, *et al.*, 2008; Saavedra-Lozano

et al., 2008). Otras bacterias de menor importancia que también están implicadas en infecciones de la piel son *Bacillus subtilis* y la levadura *Candida albicans* (Koneman, *et al.*, 2008).

Para conocer la actividad antimicrobiana de la planta, se utilizó el método de microdilución en caldo y se evaluaron el extracto acuoso, la fracción de diclorometano obtenida de la infusión y los cuatro aceites esenciales de *H. schaffneri* contra una serie de bacterias Gram positivo y Gram negativo, algunas de ellas implicadas en infecciones cutáneas y gastrointestinales. En estos ensayos, se encontró que la fracción de diclorometano presentó efecto antimicrobiano significativo contra *S. aureus*, con una concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de 64 $\mu\text{g/mL}$, y contra *C. albicans* (MIC= 128 $\mu\text{g/mL}$). Los aceites esenciales también fueron activos contra *S. aureus* (MIC= 48 a 192 $\mu\text{g/mL}$) (Pérez-Vásquez, *et al.*, 2011).

Utilizando el mismo ensayo de microdilución en caldo, también se analizaron algunos compuestos aislados de *H. schaffneri*, observándose que los derivados **7** y **12** muestran el mejor efecto antibacteriano contra *S. aureus* (MIC= 32 y 64 $\mu\text{g/mL}$), mientras que el timol (**1**) y el derivado **6** presentan el mejor efecto contra *C. albicans* (MIC= 64 y 32 $\mu\text{g/mL}$) (Pérez-Vásquez, *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha reportado la actividad antinociceptiva de preparados de *H. schaffneri*. Los resultados obtenidos del extracto orgánico, la fracción de diclorometano y el aceite esencial indican que todos tienen actividad antinociceptiva frente al dolor producido por estímulos térmicos (Ángeles-López, *et al.*, 2010).

Utilizando el mismo método se evaluó a la hofmeisterina III (**2**) y los derivados **8**, **12** y **13**, presentado la mejor actividad antinociceptiva por placa caliente la hofmeisterina III (**2**).

Finalmente, para conocer la toxicidad aguda de los extractos acuoso y orgánico, se utilizó el método de Lorke (Lorke, 1983) encontrándose que ninguno de los extractos es tóxico a dosis menores a 5000 mg/kg (Ángeles-López, *et al.*, 2010).

1.4. Control de calidad para drogas crudas y preparados fitofarmacéuticos.

Las plantas medicinales constituyen una fuente de materias primas, tanto para los sistemas de medicina tradicional, como para los de la medicina moderna (Bandaranayake, 2006). En el primer caso, las plantas juegan un papel muy importante dentro de los sistemas de salud en países en vías de desarrollo debido a razones históricas y culturales, lo que hace que se mantenga la popularidad de su uso (Giri *et al.*, 2010). En el caso de la medicina moderna, esta situación se debe a que en los países desarrollados también se ha comenzado a emplear terapias alternativas o complementarias, incluyendo a las plantas medicinales con la idea de que “lo natural es sinónimo de inocuo” (WHO, 1999; Cañigüeral y Vila, 2005).

Así, en años recientes se ha incrementado considerablemente el interés por los medicamentos herbolarios. Se estima que la tasa de crecimiento anual para el comercio de medicamentos derivados de plantas está entre el 5-15%, lo que indica la creciente demanda que éstos tienen (Giri, *et al.*, 2010).

Sin embargo, las plantas medicinales no son totalmente inocuas, tienen un efecto terapéutico sobre el ser humano pero también presentan riesgos si se emplean de manera inapropiada (Cañigüeral, 2002; FHEUM, 2001). Es por esto que la Asamblea Mundial de la Salud (WHA, por sus siglas en inglés) recomendó que se adopten las resoluciones WHA31.33 (1978), WHA40.33 (1987) y WHA42.43 (1989) con el fin de reglamentar y controlar

los productos elaborados a partir de plantas medicinales. La WHA31.33 de 1978 solicitaba que se compilara y actualizara periódicamente una clasificación terapéutica de las plantas medicinales, relacionada con la clasificación terapéutica de todos los medicamentos; tiempo después, la Asamblea de la Salud, por medio de la resolución WHA40.33, aprobada en 1987, instó a los Estados Miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a velar por el control de la calidad de los fármacos derivados de remedios vegetales tradicionales utilizando técnicas modernas y aplicando normas adecuadas y prácticas adecuadas de fabricación; y por último, mediante la resolución WHA42.43, de 1989, exhortó a los Estados Miembros a implantar medidas para la reglamentación y el control de los productos medicinales vegetales y para el establecimiento y el mantenimiento de normas adecuadas. Es así como la OMS ha hecho hincapié en lo esencial que es garantizar la calidad y la seguridad de los productos preparados a partir de plantas medicinales mediante el uso de técnicas instrumentales (cromatografía y espectroscopía, entre otras) (WHO, 2011).

A partir de estos requerimientos, durante la 4ª Conferencia Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA, por sus siglas en inglés) celebrada en Tokio en 1986, se pidió a la OMS compilar una lista de las plantas medicinales más utilizadas y establecer las especificaciones internacionales relacionadas a su calidad. Estos resultados se encuentran plasmados en una serie de volúmenes que cuentan con monografías sobre plantas medicinales seleccionadas (WHO, 1999), las cuales también contienen información relacionada a su eficacia y seguridad. Se espera que el prototipo de estas monografías sean adoptadas por países miembros de la OMS con el fin de difundir la información entre autoridades, profesionales de la salud y público en general.

Cada monografía de la OMS cuenta con información relacionada a la identidad, la composición y la pureza, que son los parámetros farmacopéicos en los cuales se basa la calidad de las drogas crudas vegetales, así como los aspectos relacionados con la eficacia en función de su uso medicinal y de datos relacionados a su seguridad (por ejemplo contraindicaciones, reacciones adversas y posología) (WHO 1999,2001).

Las pruebas de identidad se dividen en dos: la identidad botánica que se realiza a partir de las caracterizaciones anatómicas e histológicas y la identidad química que revela la presencia de compuestos presentes en las plantas a partir del uso de técnicas analíticas. Los métodos analíticos más utilizados son la cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) (Bandaranayake, 2006). Los cromatogramas obtenidos de los análisis por CG, CLAE o CCD son conocidos como huellas digitales e indican la presencia de uno o varios marcadores químicos dentro de una muestra (Li, *et al.*, 2008).

Los marcadores químicos se definen como un constituyente o mezcla de constituyentes de una planta o de un fitomedicamento que son de interés para el control de calidad independientemente de si posean alguna propiedad terapéutica o no, es decir sirven principalmente para propósitos analíticos (Li, *et al.*, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de marcadores químicos y su utilidad en el control de calidad*.

Categoría	Interés en el control de calidad
Componentes terapéuticos	Indicadores de eficacia
Componentes tóxicos	Útiles en el aseguramiento de la inocuidad
Componentes bioactivos	Pueden indicar eficacia, uno o la combinación de varios
Componentes mayoritarios	Útiles en ensayos de consistencia y estabilidad
Componentes característicos	Útiles en una identificación cualitativa
Componentes sinérgicos	Acción sinérgica relevante de multicomponentes
Componentes de correlación	Predicción del tiempo de almacenamiento, establecimiento de los métodos de extracción y conocimiento de los sitios de recolección

*Adaptado de: Li *et al.*, 2008.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus diferentes resoluciones de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) urgió a sus países miembros, entre los que se encuentra México, a realizar una evaluación cuidadosa de los sistemas tradicionales de salud, a efecto de realizar una serie de monografías de las plantas medicinales más utilizadas en cada región para que puedan incluirse en las farmacopeas herbolarias. Toda la información contenida en las monografías deberá ajustarse a los estándares de seguridad, eficacia y calidad recomendados por la OMS para los productos de salud.

Dentro de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional de los estados del centro de México se encuentra el ámbar (*Hofmeisteria schaffneri*), que cuenta con la información científica relacionada a su seguridad y eficacia. Sin embargo, a pesar de tener información relacionada a su composición química, aun no se han descrito las pruebas orientadas a establecer el control de calidad de la droga cruda.

Es por eso que este trabajo tiene como objetivo principal generar los perfiles cromatográficos (huellas digitales) conducentes a establecer la identidad química de la droga cruda de *H. schaffneri*, con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para el control de calidad de la planta.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener los componentes característicos (mayoritarios y/o activos) a partir del estudio fitoquímico de la planta.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

- Realizar los perfiles cromatográficos por CCD y CLAE de la infusión
- Identificar la mayoría de los compuestos presentes en cada uno de los perfiles obtenidos.
- Identificar los componentes volátiles de la planta.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procedimientos generales

3.1.1. Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en película y pastilla de KBr en un espectro Perkin Elmer 599. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) se registraron en un aparato Varian Unity Inova el cual se operó a una frecuencia de 400 MHz para RMN-¹H y de 125 para RMN-¹³C, empleando CDCl₃ o MeOD como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales se utilizó el programa MestReNova[®] (versión 6). Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas JEOL SX 102 utilizando como método de ionización bombardeo de átomos acelerados (EM-FAB, por sus siglas en inglés) en modo negativo con matriz glicerol y el método de impacto electrónico (IE) mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

3.1.2. Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa delgada analítica (CCD) se realizaron sobre placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (60F₂₅₄ Merck KGaA, Alemania) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales, utilizando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon solución de sulfato cérico amoniacal y cloruro férrico. Para desarrollar el color con el

agente revelador sulfato cérico, fue necesario calentar a 110°C durante un minuto. Adicionalmente, la visualización de las placas se realizó con una lámpara de UV (onda corta 254nm; onda larga 365nm).

Los análisis por cromatografía en capa delgada preparativa (CCP) se realizaron sobre placas de vidrio recubiertas con gel de sílice PLC (Silicagel 60 F₂₅₄ Merck KGaA, Alemania), de 1 y 2 mm de espesor y 20 x 20 cm, empleando para ello diversos sistemas de elución.

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Kieselgel 60 (Merck KGaA, Alemania) o con sephadex (Sephadex LH20, Pharmacia®).

Los análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996, Waters Corporation). El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de toda la información se realizó utilizando el software Empower versión 2.0 (Waters). Se utilizaron disolventes grado cromatográfico (J.T. Baker, México) y agua destilada y desionizada (H₂O_{dd}). Para este análisis se emplearon una columna Symmetry C8 (Waters corporation, USA) de 3.9 mm de diámetro interno x 150 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula y una columna LiChrospher® (Merck, KGaA, Alemania) de 4 mm de diámetro interno x 125 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula.

3.2. Material vegetal

El material vegetal (partes aéreas de *H. schaffneri* 1.5 Kg) que se empleó en este estudio fue recolectado en Tlacotitlán, Estado de México y fue identificado por los Dres. Robert Bye y Edelmira Linares del Instituto de Biología de la UNAM. Un ejemplar de referencia (4 de mayo del 2011, voucher 2694) se depositó en el herbario nacional (MEXU).

3.3. Preparación de las fracciones de CH₂Cl₂ y AcOEt a partir de la infusión de las partes aéreas secas de *H. schaffneri*

La infusión se preparó a partir de 729 g de partes aéreas secas trituradas, utilizando 20250 mL de agua destilada hirviendo y se dejó reposar por 30 minutos. Una vez encontrándose a temperatura ambiente se extrajo con CH₂Cl₂ (8500 mL X 6). La fracción orgánica obtenida se concentró a presión reducida para obtener finalmente 5.4 g (0.74%) de la fracción orgánica de CH₂Cl₂. Para preparar la fracción de AcOEt, se emplearon 171 g de partes aéreas secas trituradas con 4750 mL de H₂O desionizada, para obtener finalmente 1.4 g de la fracción de AcOEt (0.82%), siguiendo el mismo procedimiento mencionado para la fracción de CH₂Cl₂.

3.4. Fraccionamiento primario de la fracción de CH₂Cl₂

La fracción de CH₂Cl₂ (4.5 g) se sometió a un fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice desactivada al 10% p/v H₂O_{dd} como fase estacionaria (200 g) y como eluyentes hexano-CH₂Cl₂ (90:10→10:90) y CH₂Cl₂-CH₃OH (80:20→0:100). Este fraccionamiento generó 596 fracciones (Tabla 2), las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica para obtener 22 fracciones primarias (**F1-F22**). La Figura 4 presenta el diagrama del proceso de extracción y

fraccionamiento primario. La fracción primaria **F20** (175.1 mg) se sometió a una cromatografía en CCP utilizando como mezcla de elución hexano-AcOEt 65:35, para obtener 107 mg de angelato de 8-hidroxi-7,9-epoxitimilo (**8**) que corresponde al 0.01% de rendimiento.

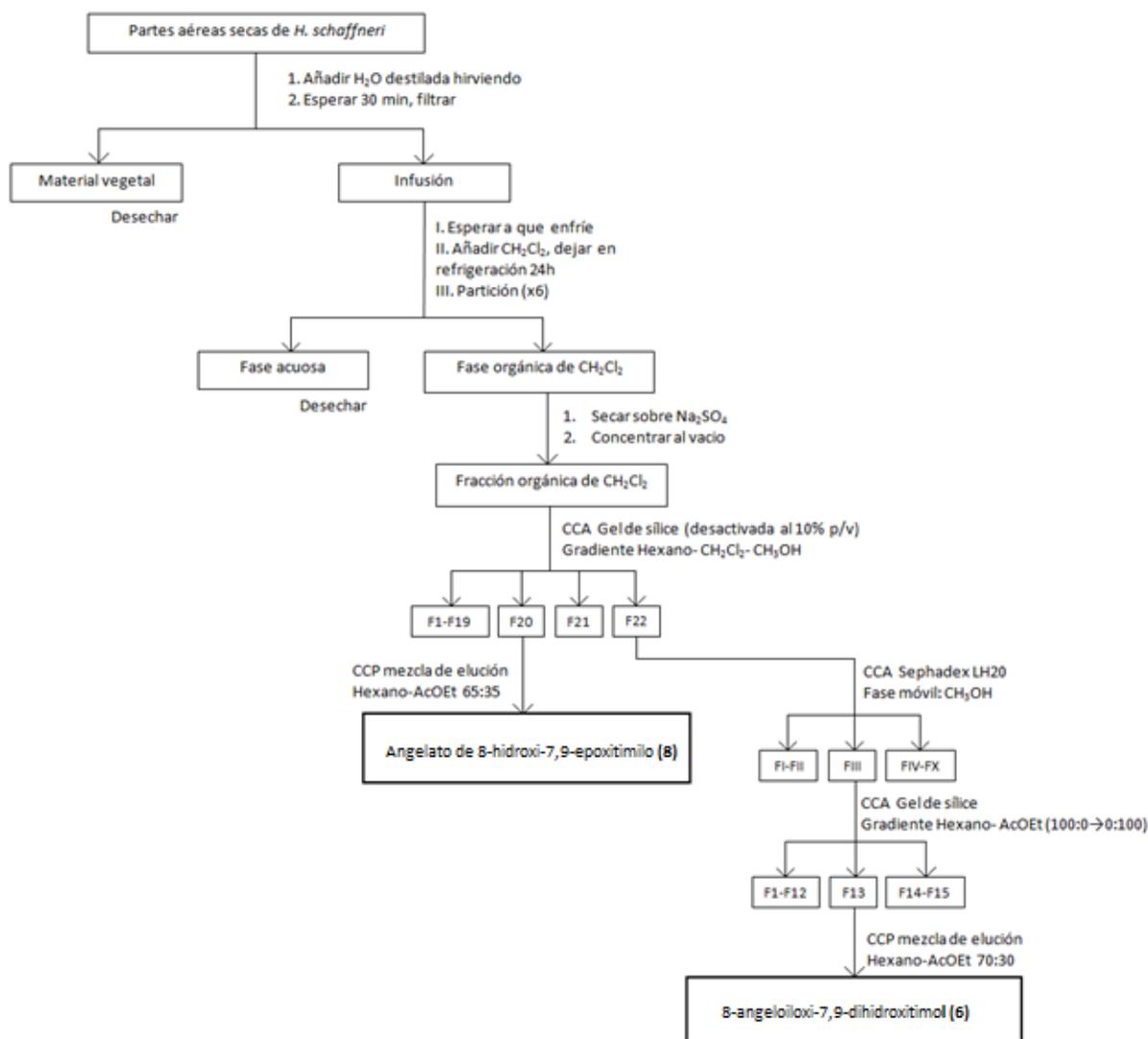


Figura 4. Diagrama general del fraccionamiento de la fracción orgánica de CH₂Cl₂ de *H. schaffneri* y obtención de los compuestos **6** y **8**

Tabla 2. Fraccionamiento primario de la fracción de CH₂Cl₂ de *H. schaffneri*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
Hexano- CH ₂ Cl ₂	90:10	1-11	1-15	F1
Hexano- CH ₂ Cl ₂	80:20	12-75	16	F2
Hexano- CH ₂ Cl ₂	75:25	76-97	17-36	F3
Hexano- CH ₂ Cl ₂	70:30	98-130	37-39	F4
Hexano- CH ₂ Cl ₂	65:35	131-193	40-79	F5
Hexano- CH ₂ Cl ₂	60:40	194-237	80-100	F6
Hexano- CH ₂ Cl ₂	55:45	238-289	101-163	F7
Hexano- CH ₂ Cl ₂	50:50	290-345	164-183	F8
Hexano- CH ₂ Cl ₂	45:55	346-375	184-205	F9
Hexano- CH ₂ Cl ₂	40:60	376-399	206-219	F10
Hexano- CH ₂ Cl ₂	30:70	400-441	220-234	F11
Hexano- CH ₂ Cl ₂	20:80	442-572	235-237	F12
Hexano- CH ₂ Cl ₂	10:90	573-590	238-280	F13
CH ₂ Cl ₂	100	591	281	F14
CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	80:20	592-595	282-364	F15
CH ₃ OH	100	596	365-392	F16
			393-404	F17
			405-435	F18
			436-447	F19
			448-518	F20
			519-591	F21
			592-596	F22

3.4.1. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F22

La fracción primaria **F22** (1.5 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil. El resultado de este proceso originó 109 fracciones que por afinidad cromatográfica se reunieron para dar como resultado 10 fracciones terciarias (Tabla 3).

Tabla 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F22**

Fracciones reunidas	Clave
1-48	FI
49-64	FII
65-86	FIII
87-88	FIV
89-92	FV
93-96	FVI
97-98	FVII
99-100	FVIII
101-102	FIX
103-109	FX

3.4.2. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria **FIII**

La fracción **FIII** (162.2 mg) se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (40 g) utilizando hexano-AcOEt (100:0→0:100) como eluyentes. De este proceso, se obtuvieron 75 fracciones que por afinidad cromatográfica se reunieron para dar 15 fracciones secundarias (Tabla 4). De la fracción **F13** (58.2 mg) se identificó un compuesto mayoritario el cual se purificó por CCP utilizando como mezcla de elución hexano-AcOEt 70:30 para obtener finalmente 5.7mg de 8-angeloiloxi-7,9-dihidroxitimilo (**6**).

Tabla 4. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria **FIII**.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
Hexano	100	1-3	1-10	F1
Hexano- AcOEt	95:5	4-19	11	F2
Hexano- AcOEt	90:10	20-29	12	F3
Hexano- AcOEt	85:15	30-42	13-25	F4
Hexano- AcOEt	80:20	43-54	26-27	F5
Hexano- AcOEt	75:25	55-74	28-30	F6
AcOEt	100	75	31	F7
			32-37	F8
			38	F9
			39-43	F10

Eluyente	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
AcOEt	44-49	F11
	50-55	F12
	56-64	F13
	65-72	F14
	73-75	F15

3.5. Fraccionamiento primario de la fracción de AcOEt

La fracción orgánica de AcOEt (1.1 g) se sometió a un fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y CH₃OH como fase móvil. Así, se obtuvieron 20 fracciones que se reunieron por afinidad cromatográfica para dar como resultado 9 fracciones primarias (Tabla 5). La fracción primaria **F2** (66.3 mg) se seleccionó para separarse por CCP, utilizando CH₂Cl₂-CH₃OH 95:5 como mezcla de elución, obteniendo de este proceso 8.3 mg de compuesto **8**.

De la fracción primaria **F5** (142.8 mg) precipitó un sólido amarillo, el cual se lavó varias veces con una mezcla hexano-CH₂Cl₂ 5:95 y hexano-AcOEt 10:90 para obtener finalmente 21.3 mg de ácido 3,5-dicafeoilquínico (**14**), correspondiente al 0.01% de rendimiento.

Tabla 5. Fraccionamiento primario de la fracción de AcOEt obtenida a partir de la infusión de *H. schaffneri*

Fracción	Clave
1-6	F1
7-10	F2
11	F3
12	F4
13	F5
14	F6
15	F7
16-19	F8
20-23	F9

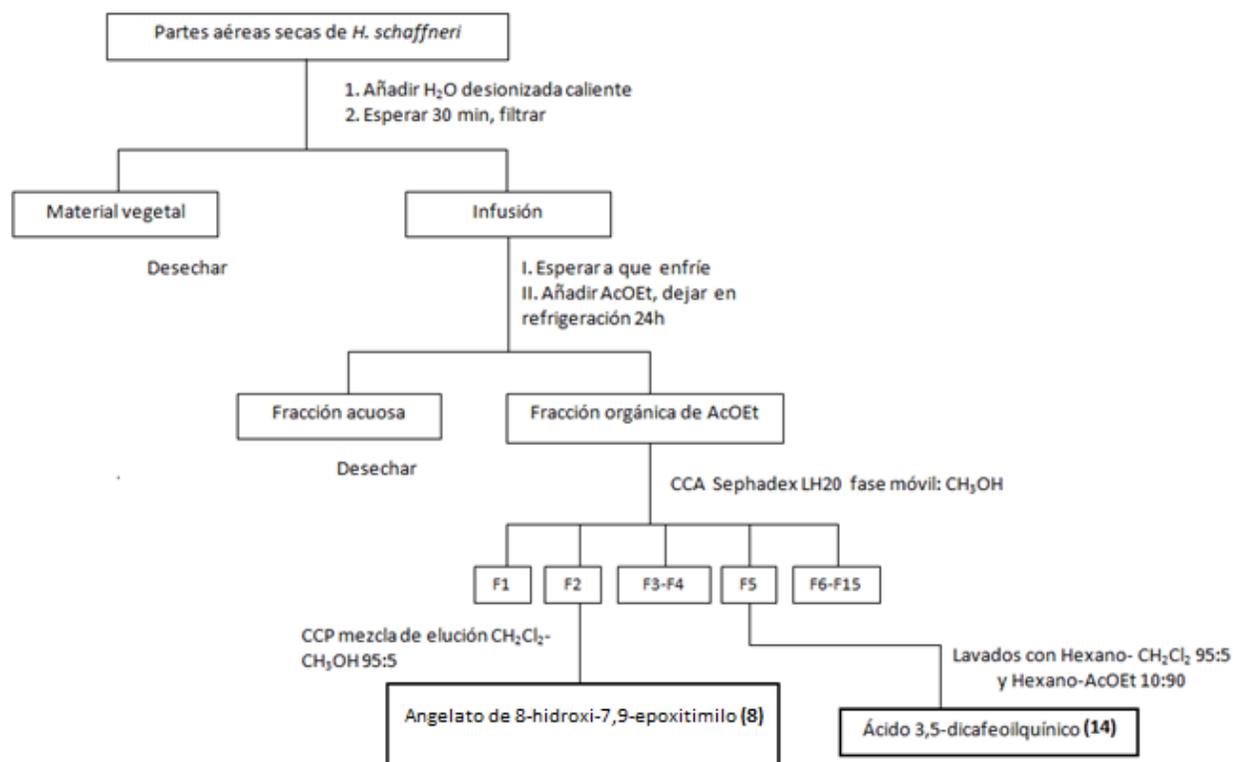


Figura 5. Diagrama general del fraccionamiento de la fracción orgánica de AcOEt de *H. schaffneri* y obtención de los compuestos **8** y **14**

3.6. Análisis por CCD de extracto, fracciones y compuestos aislados de *H. schaffneri*

El extracto acuoso y las fracciones orgánicas de CH_2Cl_2 y AcOEt, así como los compuestos aislados: 8-angeloiloxi-7,9-dihidroxitimol (**6**), angelato de 8-acetoxi-7,9-epoxitimilo (**7**), angelato de 8-hidroxi-7,9-epoxitimilo (**8**) y ácido 3,5-dicafeoilquínico (**14**), se analizaron por CCD haciendo uso de las condiciones indicadas en la tabla 6. Cada una de las muestras se aplicó a una concentración de 1 mg/mL.

Tabla 6. Condiciones de análisis de fracciones y compuestos de *H. schaffneri* por CCD.

Muestra	Mezcla de elución	Solubilidad	Agente cromógeno
Fracciones de CH ₂ Cl ₂ , AcOEt, compuestos 6, 7 y 8	Hexano-AcOEt 70:30	CH ₂ Cl ₂ y CH ₃ OH	Sulfato cérico amoniacal
Extracto acuoso, fracción de AcOEt y compuesto 14	AcOEt- CH ₃ OH-H ₂ O 80:15:5	CH ₃ OH	FeCl ₃ (20% EtOH)

3.7. Análisis de los componentes por CLAE de la infusión, extracto acuoso, fracción de CH₂Cl₂, fracción de AcOEt y los compuestos 6, 7 y 8

Para la identificación de los componentes mayoritarios presentes en la fracción orgánica de CH₂Cl₂, se empleó una columna LiChrospher[®] con un sistema de elución en gradiente de ACN-H₂O [0-7 min (45:55-45:55); 7-12 min (45:55-55:45); 12-17min (55:45-60:40); 17-22 min (60:40-65:35); 22-60 min (65:35-70:30)], flujo de 0.6 mL/min. La longitud de onda (λ) utilizada en la detección de los compuestos fue de 227 nm y 268 nm. Las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc[®]) de 0.45 μ m x 13 mm de diámetro, inyectándose finalmente un volumen de 20 μ L. Para tal fin, 1 mg de los compuestos **6, 7 y 8**, así como la fracción de CH₂Cl₂ se disolvieron en 1.5 mL de ACN.

En cuanto a la identificación del ácido 3,5-dicafeoilquínico (**14**), presente en la infusión, en el extracto acuoso y fracción de AcOEt de *H. schaffneri*, se usó una columna Symetry[®] C8. Como sistema de elución se utilizó un sistema isocrático con ACN-H₂O (acidificada al 0.1% TFA) 80:20. El flujo fue de 0.6 mL/min. La longitud de onda (λ) utilizada para la detección de este compuesto fue de 327 nm. En la preparación de las muestras se empleó 1 mg del compuesto y se disolvió en 1 mL H₂O, las muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc[®]) de 0.45 μ m x 13 mm de diámetro inyectándose un volumen final de 20 μ L.

3.8. Análisis de compuestos volátiles de *H. schaffneri* por MEFS/HS-CG-EM (IE)

Los compuestos volátiles de la planta en estudio se extrajeron mediante la técnica de microextracción en fase sólida- headspace (MEFS/HS). Se empleó para este análisis una fibra de un centímetro de largo, recubierta de polidimetilsiloxano (PDMS: fibra roja; Supelco Technology, St. Louis, Missouri, EE.UU.), previamente acondicionada en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases a 250 °C durante 2 horas.

El procedimiento de extracción se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocaron en frascos adecuados 500 mg de material vegetal seco y molido, 75 mg de cloruro de sodio y 5 mL de agua destilada, posteriormente, se perforó a través del septo de los viales con las agujas del equipo de MEFS/HS durante 30 minutos a temperatura de 50°C. Una vez que el equilibrio se alcanzó, las fibras se retiraron en la aguja y se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N equipado con un instrumento LECO® MS-TOF (Agilent Technology), se dejó 3 minutos en desorción. Los análisis se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron con el programa LECO® ChromaTOF® optimized for Pegasus® 4D.

3.9. Prueba de sensibilidad antimicrobiana. Método de microdilución en caldo

Para este ensayo se emplearon las bacterias Gram positivo *Staphilococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) las bacterias Gram negativo *Escherichia coli* (ATCC 11229) y *Salmonella typhi* (ATCC 9992).

Las bacterias se cultivaron inicialmente en agar nutritivo (Bioxon, Becton Dickinson de México) por 24 h a 37°C. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se utilizó caldo Mueller Hinton (DIFCO, Becton Dickinson) conteniendo 20 y 10 mg/L de CaCl₂ y MgCl₂.

Como control positivo se utilizó el antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich Chemical). Las soluciones stock de las muestras en estudio (fracciones, extracto y compuestos puros) se prepararon disolviendo 2 mg en 185 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), y aforando a un volumen final de 1 mL con caldo Mueller Hinton. De esta solución se hicieron las siguientes diluciones: 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 µg/mL.

El inóculo se preparó con solución salina isotónica (SSI) empleando como referencia un tubo Mc Farland (10⁵ UFC/mL). Para cada experimento se empleó un control estéril (SSI y caldo Mueller Hinton), un control negativo (medio e inóculo) y un control positivo (inóculo y antibiótico). Se colocaron por pozo 125 µL de las diluciones de las muestras y 125 µL de inóculo, y se incubó la placa a 37°C por 18 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Qaiyumi, 2007).

3.10. Búsqueda bibliográfica referente a la especie vegetal en estudio

La búsqueda bibliográfica se realizó en las bibliotecas digitales científicas ScienceDirect, Bi-Di UNAM, TesiUNAM, SerieUNAM, Science Finder y textos especializados en el tema.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como parte del proyecto de investigación enfocado a generar la monografía de la especie vegetal *Hofmeisteria schaffneri*, en este trabajo se presentan las pruebas de identidad química realizadas a la droga cruda, las cuales consistieron en la identificación de los componentes característicos de la planta a partir del desarrollo de los perfiles cromatográficos por CCD, CLAE y CG.

Para el desarrollo de los perfiles cromatográficos por CCD se ensayaron diferentes mezclas de elución; en el caso de CLAE diferentes condiciones de operación y en el caso de CG, se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos de extracción en el paso inicial de la extracción por MEFS/HS. Una vez obtenidos los perfiles, se procedió a la identificación de los componentes presentes en cada uno de ellos. Los compuestos utilizados en cada uno de los análisis se obtuvieron a partir de un estudio fitoquímico de la infusión de *H. schaffneri*. Los resultados y la discusión relativa a estos ensayos se presentan a continuación.

4.1. Obtención de los perfiles cromatográficos por Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Para la obtención de los compuestos marcadores utilizados en las pruebas de identidad, se realizó un estudio fitoquímico de la fracción diclorometánica de la infusión.

Del estudio fitoquímico se aislaron 2 metabolitos mayoritarios: el 8-angeloiloxi-7,9-dihidroxitimol (**6**) y el angelato de 8-hidroxi-7,9-epoxitimilo (**8**) y sus estructuras se elucidaron empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos y por comparación con muestras auténticas. En el caso del

angelato de 8-acetoxi-7,9-epoxitimilo (**7**), éste se había obtenido de fraccionamientos previos en buena cantidad por lo que no fue necesario aislarlo.

Una vez obtenido los marcadores, estos se analizaron utilizando las condiciones indicadas en la tabla 7 (figura 6).

Tabla 7. Condiciones por CCD para el análisis de la fracción de CH₂Cl₂ y compuestos marcadores

Condiciones cromatográficas	
Fase estacionaria	Gel de sílice (60F ₂₅₄)
Fase móvil	Hexano-AcOEt (70:30)
Agente revelador	Sulfato cérico amoniacal; UV $\lambda=254$ nm
Concentración	1mg/mL

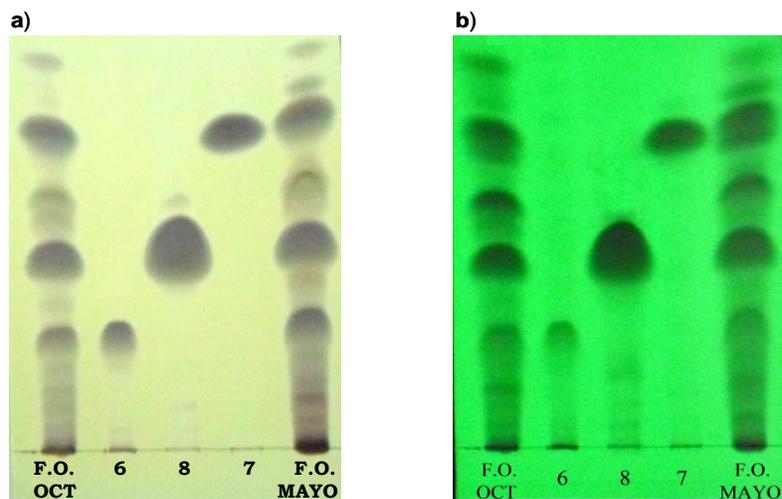


Figura 6. Cromatograma por CCD de la fracción de CH₂Cl₂ y compuestos aislados de *H. schaffneri*. **a)** Sulfato cérico amoniacal; **b)** Visualización con lámpara de UV.

4.2. Perfil cromatográfico por CLAE de la fracción de CH₂Cl₂ de la infusión de *H. schaffneri*

La fracción de CH₂Cl₂ se analizó por CLAE utilizando un detector de UV. El mejor perfil cromatográfico se obtuvo con las condiciones mostradas en la tabla 8 y a partir de coeluciones de muestra auténticas de compuestos aislados de la planta se pudo determinar que tres de los mayoritarios corresponden a **6-8** (Figuras 7 y 8).

Tabla 8. Condiciones de la fracción de CH₂Cl₂ y compuestos de *H. schaffneri* por CLAE

Condiciones de operación	
Columna	LiChrospher® 100 RP-18 (5µm; 250 x 4)
Fase móvil	ACN:H ₂ O _{dd} Gradiente: 0-7 min (45:55-45:55); 7-12 min (45:55-55:45); 12-17min (55:45-60:40); 17-22 min (60:40-65:35); 22-60 min (65:35-70:30)
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Tiempo de análisis	1h
Longitud de onda	220 y 274 nm
Volumen de inyección	20 µL

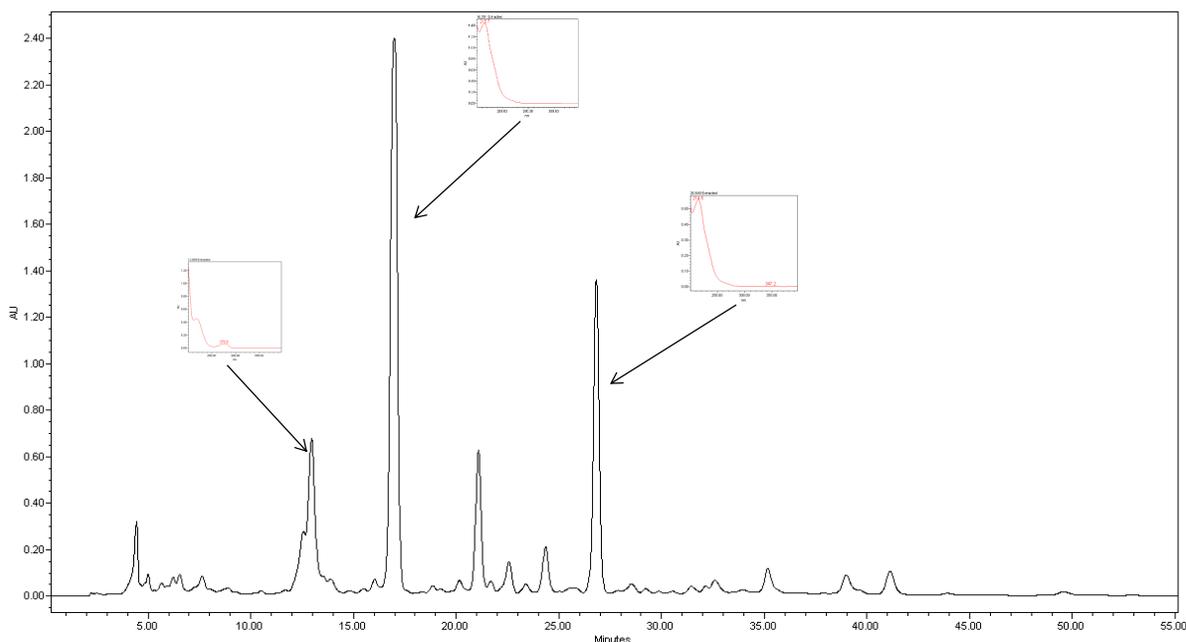


Figura 7. Cromatograma por CLAE de la fracción de CH₂Cl₂ de *H. schaffneri*. λ=220 nm. Condiciones ver parte experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, se identificó más del 78 % del total de los componentes presentes en la infusión. Los resultados obtenidos permitieron identificar como compuesto mayoritario al derivado epoxidado **8** (Tabla 9).

Tabla 9. Tiempos de retención y proporción de los componentes de la fracción de CH₂Cl₂

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área del pico (%)
7	12.958	7.61
8	16.995	48.35
6	26.822	22.06
	TOTAL	78.02

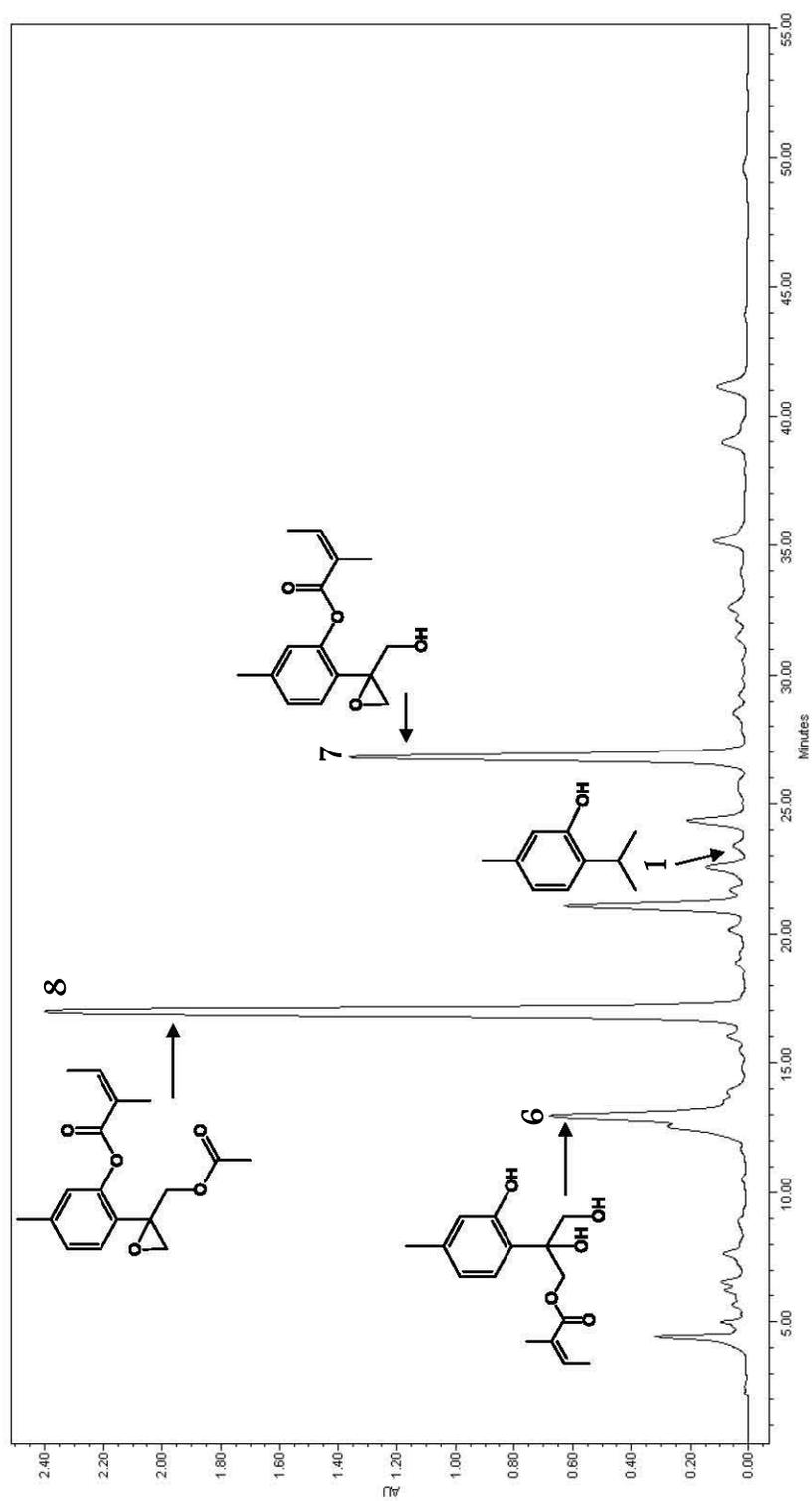


Figura 8. Cromatograma por CLAE de la fracción de CH_2Cl_2 de *H. schaffneri*. $\lambda=220$. Condiciones ver parte experimental.

En el transcurso de este proyecto, se realizaron algunas pruebas de estabilidad al compuesto epoxidado **8**, con la finalidad de proporcionar evidencia de cómo la calidad de este metabolito varía con el tiempo bajo la influencia de diferentes factores.

Los parámetros o especificaciones de estabilidad que son susceptibles de cambiar durante el análisis para la identificación y, en especial, en la cuantificación de un analito dentro de una matriz son de tipo físico, químico, biológico o microbiológico (NOM 073-SSA1- 2005).

En el caso de parámetros físicos y químicos, la estabilidad se puede determinar mediante el efecto de diferentes factores como son la temperatura, humedad, luz y los disolventes empleados, los cuales con frecuencia causan la degradación y/o transformación de componentes purificados (Li, *et al.*, 2008).

Las pruebas de estabilidad que se realizaron para el compuesto **8** se enlistan en la tabla **10** y los resultados de estos tratamientos se muestran en la figura 9. También, se obtuvo el cromatograma por CLAE del compuesto **8** a seis meses de almacenamiento y se puede ver que a este tiempo, el producto se descompone totalmente (Figuras 10 y 11).

Tabla 10. Factores a los que se sometió el compuesto **8**.

	Factor	Condiciones
8(a)	Tiempo	6 meses
8(b)	Reactividad	MeOH en H ₂ SO ₄ (1%)
8(c)	Temperatura	45 °C, 1 día

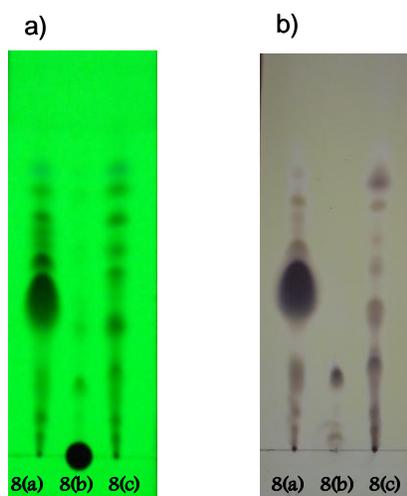


Figura 9. Cromatograma por CCD del compuesto mayoritario **8** sometido a los factores indicados en la tabla 10. Mezcla de elución hexano-AcOEt 70:30. a) Visualización con lámpara de UV $\lambda=254$ y b) con el agente revelador sulfato cérico amoniacal.

Tabla 11. Condiciones de operación para el análisis del compuesto **8** de la fracción de CH_2Cl_2 de *H. schaffneri* por CLAE.

Condiciones de operación	
Columna	LiChrospher®
Fase móvil	ACN:H ₂ O _{dd} Gradiente: 0-7 min (45:55-45:55); 7-12 min (45:55-55:45); 12-17min (55:45-60:40); 17-22 min (60:40-65:35); 22-60 min (65:35-70:30)
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Tiempo de análisis	1h
Longitud de onda	220, 274 nm
Volumen de inyección	20 μL

8

4.3. Análisis de la fracción orgánica de AcOEt de la infusión de *H. schaffneri*

También se analizó la fracción orgánica de la infusión obtenida por reparto con AcOEt con la finalidad de aislar una mayor cantidad del angelato de 8-hidroxi-7,9-epoxitimilo (**8**). Sin embargo, al obtener la fracción e ir reduciendo el volumen del disolvente se observó la formación de un precipitado en grandes cantidades. Este precipitado se pudo identificar por métodos espectroscópicos y espectrométricos como ácido 3,5-dicafeoilquínico (**14**), éste producto también se analizó por CCD (Figura 12) y CLAE, utilizando las condiciones que se indican en la tabla 12.

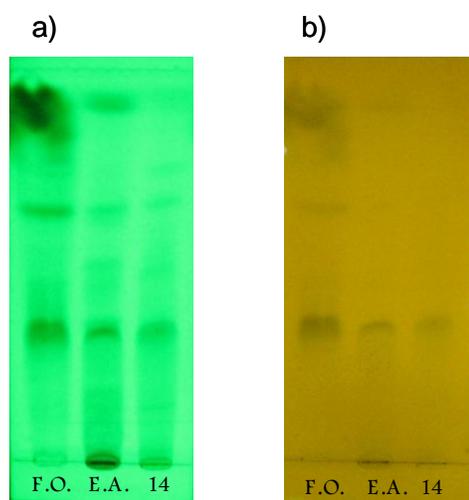


Figura 12. Cromatograma por CCD del extracto acuoso, fracción AcOEt y compuesto **14**. Mezcla de elución: AcOEt-MeOH-H₂O (80:15:5). **a)** Visualización con lámpara de UV ($\lambda = 254$ nm) y **b)** con el agente revelador FeCl₃.

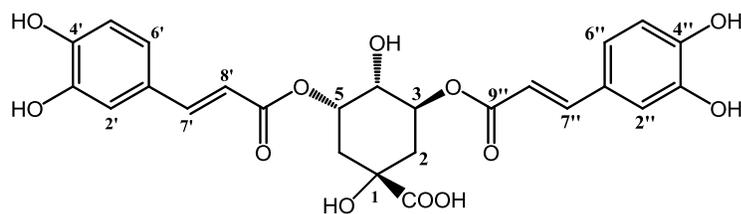


Figura 13. Estructura del ácido 3,5-dicafeoilquínico (**14**)

Tabla 12. Condiciones empleadas en el análisis de la infusión, fracción de AcOEt y **14** de *H. schaffneri* por CLAE.

Condiciones de operación	
Columna	Symmetry C8 [®]
Fase móvil	ACN: H ₂ O, TFA (0.1%)
	Isocrático: 80:20
Velocidad de flujo	0.6 mL/min
Tiempo de análisis	1h
Longitud de onda	327 nm
Volumen de inyección	20 µL

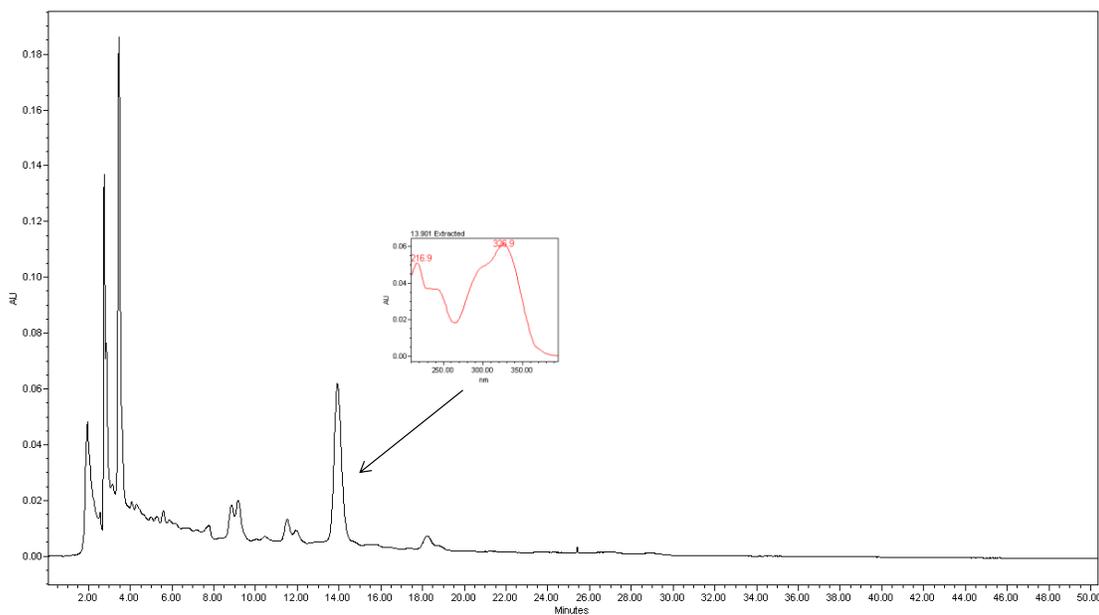


Figura 14. Cromatograma por CLAE de la infusión de *H. schaffneri*. $\lambda=327$. Condiciones, ver parte experimental.

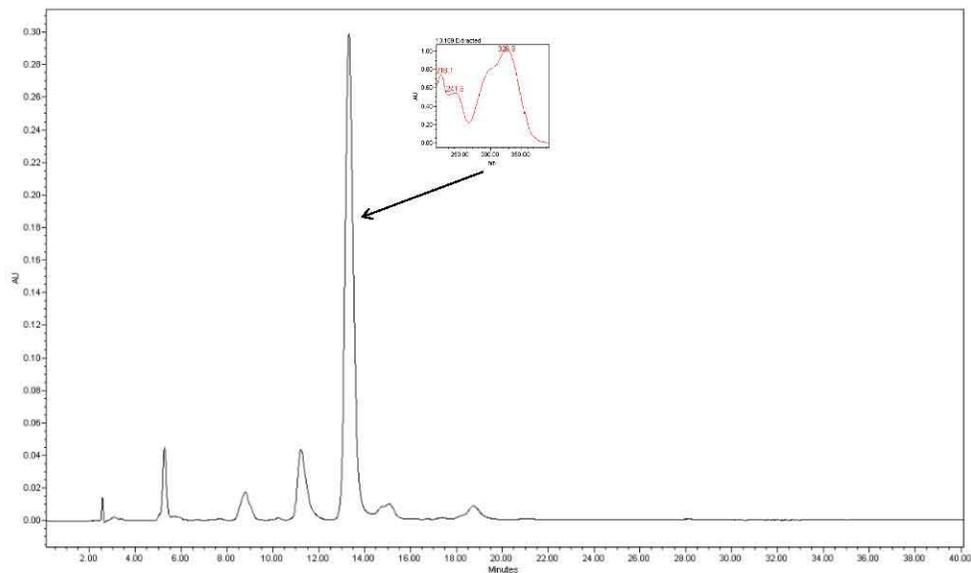


Figura 15. Cromatograma por CLAE de la fracción orgánica de AcOEt obtenida a partir de las partes aéreas secas de *H. schaffneri*. $\lambda=327$. Condiciones, ver parte experimental.

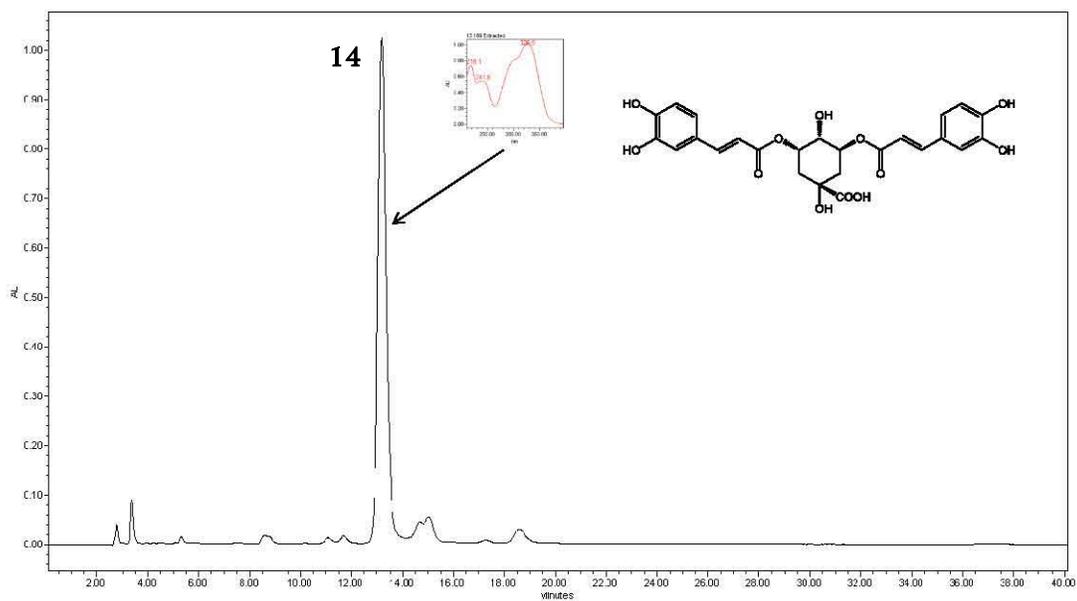
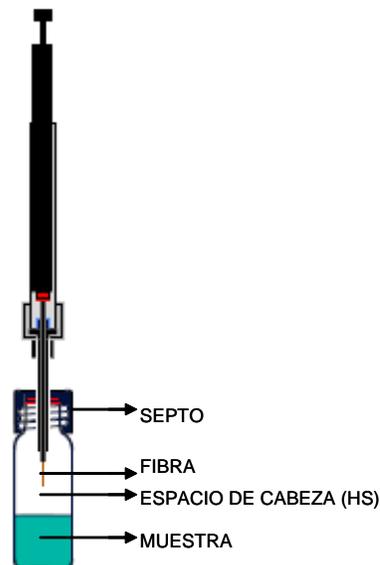


Figura 16. Cromatograma por CLAE del compuesto 14. $\lambda=327$ nm. Condiciones ver parte experimental

4.4. Identificación de componentes volátiles de *H. schaffneri* por MEFS/HS-CG-EM (IE)

Los componentes volátiles de la planta se identificaron por cromatografía de gases (CG) acoplado a un detector masas en su modalidad impacto electrónico (EM (IE)). Previo a esta identificación, los componentes volátiles se extrajeron mediante la técnica de microextracción en fase sólida-headspace (MEFS/HS). La MEFS es una técnica de preparación y concentración de analitos en donde éstos se extraen ya sea directamente de la muestra o de un espacio entre la muestra y la fibra de la MEFS. Este espacio se conoce por sus siglas en inglés como headspace (HS). En general, Las fibras utilizadas en el análisis para MEFS consisten de las mismas fases estacionarias utilizadas en las columnas de CG, por lo que llegan a clasificarse como polares (negra y azul), medianamente polares (gris) y no polares (roja).



La extracción de los componentes volátiles de la muestra se realizó utilizando la fibra roja, la cual está compuesta por 100 % polidimetilsiloxano (PDMS) (Rivero-Cruz, *et al.*, 2011). A partir de este análisis se identificaron 7 metabolitos que corresponden a más del 70 % de la composición de los volátiles presentes en la planta.

El volátil mayoritario fue la hofmeisterina III (**2**), seguido del timol y el isovalerato de timilo (**12**) lo cual concuerda con los resultados anteriormente obtenidos para el aceite esencial preparado por hidrodestilación (Pérez-Vásquez *et al.*, 2011).

Tabla 13. Condiciones de operación para el análisis de volátiles de *H. schaffneri* por CG-EM (IE).

Condiciones de operación	
Columna	DB-5 Dimensiones: 10m x 0.18mm d. i. x 18 μ m
Gas acarreador	Helio
Velocidad de flujo	1 mL/min
Programa de temperatura	40-250°C
Temperatura del inyector	300°C
Temperatura de línea de transferencia	250°C
Temperatura de cámara de ionización	200°C
Tipo de inyección	Split (división de flujo) 1:20
Tipo de detector	EM-TOF
Método de ionización	Impacto electrónico (IE)

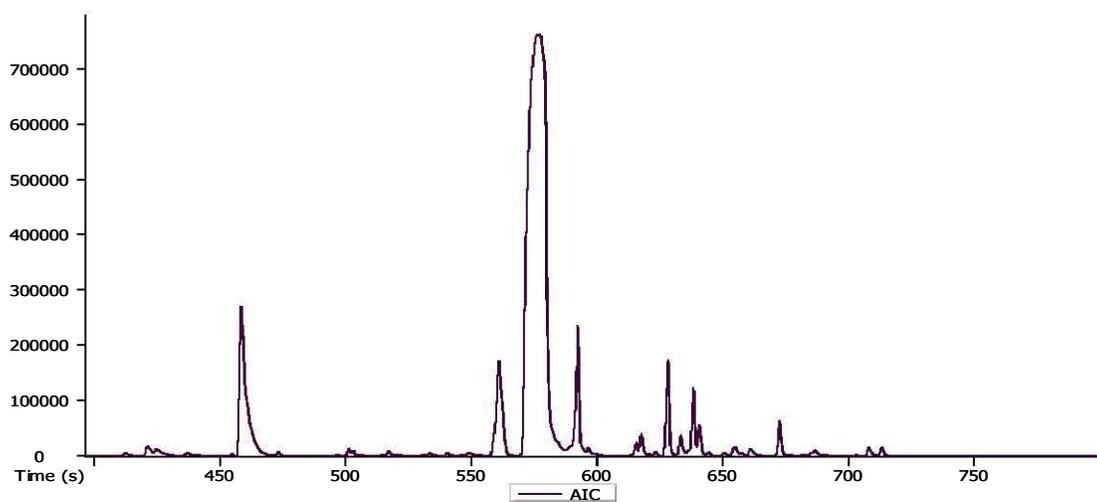


Figura 18. Cromatograma por CG de los compuestos volátiles de *H. schaffneri*. Ampliación 3:1. Condiciones ver parte experimental

Tabla 14. Compuestos mayoritarios volátiles presentes en *H. schaffneri*

Compuesto	IR	Área %
Limoneno	1042	1.5
Timol (1)	1329	9.1
β-cariofileno	1474	3.7
Isovalerato de timilo (12)	1593	6.5
Hofmeisterina III (2)	1644	53.3
Angelato de dehidrotimilo	1803	2.8
Angelato de 8,9-Epoxi- 10-acetoxitimilo (7)	1949	1
TOTAL		76.9

IR: Índice de retención en la columna DB-5; % calculado del promedio de 3 repeticiones en el

CG-EM

4.5. Ensayo de actividad antimicrobiana

Como complemento al estudio realizado por Pérez-Vásquez y colaboradores (Pérez-Vásquez *et al.*, 2011), se evaluó la actividad antimicrobiana por el método de microdilución en caldo el extracto acuoso, la fracción orgánica de AcOEt, el compuestos **8** y el timol (**1**), el cual se utilizó como control positivo (junto con el antibiótico de prueba). Los resultados obtenidos indican que tanto el extracto acuoso como la fracción de AcOEt presentaron muy baja actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis*. El compuesto **8** resultó muy activo (comparado con el timol) y presentó una actividad antimicrobiana muy parecida al derivado **7**, que también es uno de los mayoritarios presentes en la infusión.

Tabla 15. Susceptibilidad de las bacterias Gram positivo *S. aureus* y *B. subtilis* por los compuestos, extracto y fracción obtenidos de *H. schaffneri*

MIC (µg/mL)		
Muestra	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
1	256	256
8	64	64
Fracción orgánica	256	256
Extracto acuoso	>1024	>1024
Ampicilina	<2	<2

5. CONCLUSIONES

- La metodología analítica que se generó con este trabajo es de utilidad para la implementación de las pruebas de identidad necesarias para llevar a cabo el control de calidad de la droga cruda de *H. schaffneri*.
- El análisis por CCD y CLAE permitió la identificación de tres compuestos mayoritarios de la planta (**6-8**) que en su conjunto dan un total del 78 % de metabolitos presentes en la fracción de diclorometano obtenida de la infusión. En este mismo análisis el compuesto **8** resultó ser inestable, por lo que no sería útil como marcador para la valoración de los constituyentes mayoritarios y/o activos.
- El análisis por MEFS/HS-CG-EM permitió demostrar que la hofmeisterina III (**2**) es el constituyente volátil mayoritario presente en las partes aéreas de la planta.

6. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar las pruebas de composición de la droga cruda de *H. schaffneri* para la cuantificación de los compuestos mayoritarios y/o principios activos, presentes en la fracción de diclorometano de la infusión.
- ❖ Aplicar este mismo método analítico en la valoración de los componentes presentes en diferentes lotes (diferentes fechas de colecta) o preparados fitofarmacéuticos de *H. schaffneri* disponibles comercialmente. Se propone como compuesto marcador al derivado epoxidado **7**.

7. REFERENCIAS

- Ángeles-López G.**, Pérez-Vásquez A., Hernández-Luis F., Déciga-Campos M., Bye R., Linares E., Mata R. (2010). Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 425–432.
- Bandaranayake Wickramasinghe M.** Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs en *Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs*. Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil, Mohammad Owais (Eds). WILEY-VCH, KGaA 2006. Pp. 28–53
- Barnes J.** (2003). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and quality. *Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 226–233
- Cañigueral S., Vila R.** (2005). La fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y obstetricia clínica*. 6, 43–51.
- Cañigueral S.** (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*, 2, 101-21.
- Elmer Koneman, Stephen Allen.** Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. Editorial Panamericana 2008
- FHEUM.** Farmacopea Herbolaria de los Estados Unido Mexicanos 2001.
- Giri L.**, Andola C., Kant-Purohit V., Rawat M. S. M., Rawal R. S., Bhatt I. D. (2010). Chromatographic and spectral fingerprints standarization of traditional medicines: an overview as modern tools. *Research Journal of Phytochemistry* , 4, 234–241.
- Li S.**, Han Q., Qiao C., Song J., Cheng C. L., Xu H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, 3, 1–16
- Lorke D.** (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54, 276–287
- NOM 073-SSA1-2005.** Estabilidad de fármacos y medicamentos.
- Pérez-Vásquez A.**, Capella S, Linares E., Bye R., Angeles-López G., Mata R. (2011). Antimicrobial activity and Chemical composition of the essential

oil of *Hofmeisteria schaffneri*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63, 579–586.

Pérez-Vásquez A., Linares E., Bye R., Cerda-García-Rojas C., Mata R. (2008). Phytotoxic Activity and Conformational Analysis of Thymol Analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. *Phytochemistry* 69, 1339–1347.

Pérez-Vásquez A., Reyes A., Linares E., Bye R., Mata R. (2005). Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and Synthesis of 2'-(2''-Hydroxy 4''-Methylphenyl)-2'-oxoethyl Acetate. *Journal of Natural Products* 68, 959–962.

Prieto J.M. (2007). La regulación global de los medicamentos herbarios. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y aromáticas. 6, 92–101

Qaiyumi Sadaf. Methods of antimicrobial susceptibility testing en *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Schwalbe Richard, Steele-Moore Lynn, C. Goodwin Avery (Eds). CRC Press, Florida, 2007. Pp. 75–79

Rivero-Cruz I., Duarte G., Navarrete A., Bye R., Linares E., Mata R. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. *Journal of food science*. 76, C308–C317

Saavedra Lozano J., Santos Sebastián M., González F., Hernández-Sampelayo T., Navarro Gómez M. 15. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos en *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Infectología Pediátrica*. Madrid, 2008. Pp. 145-146

WHO. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vols. 1 y 2. World Health Organization (Geneva), 1999 y 2001.

WHO. Quality control methods for herbal materials. Updated edition of *Quality control methods for medicinal plant materials*. (Geneva), 1998 y 2011.

WHO. Traditional Medicine Strategy 2002–2005, Geneva 2002.

ANEXOS

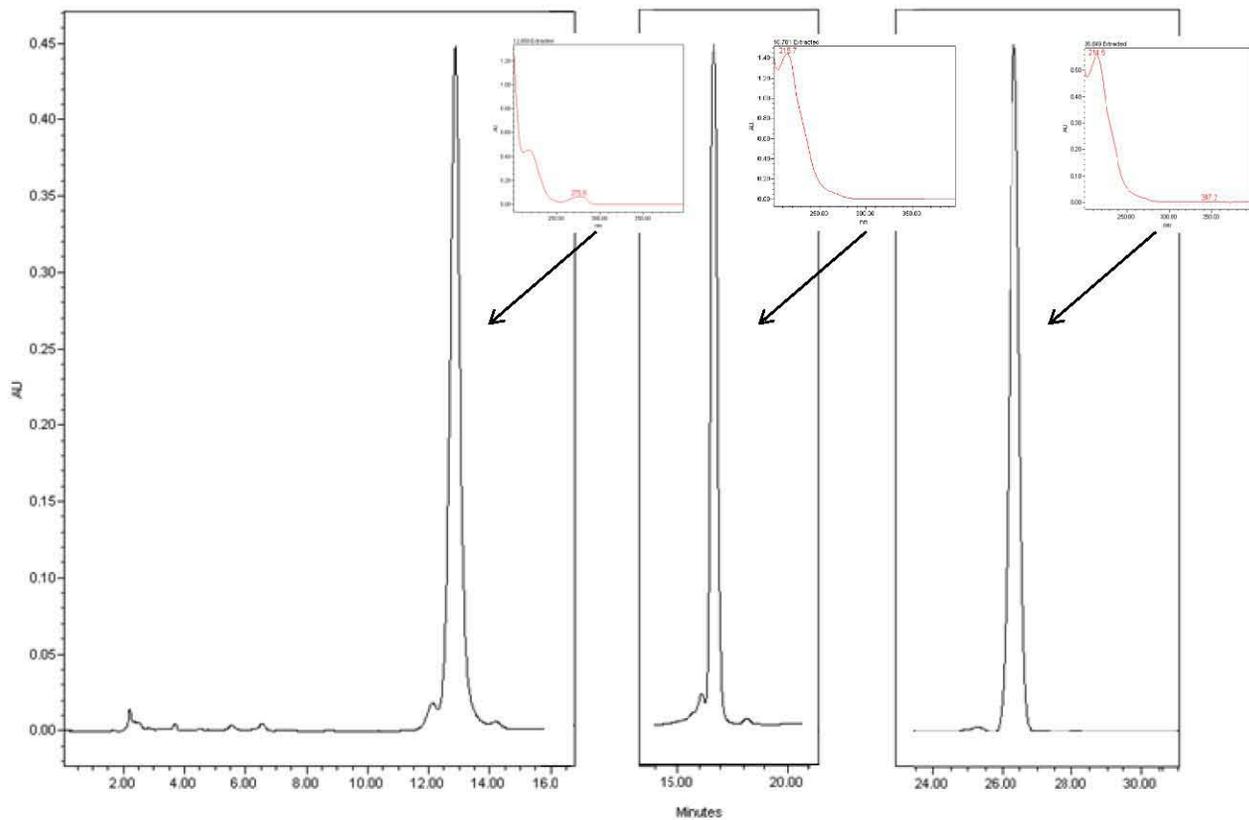


Figura 19. Cromatograma por CLAE de los compuestos mayoritarios de la fracción orgánica de diclorometano. $\lambda=220$ nm. Condiciones, ver parte experimental.

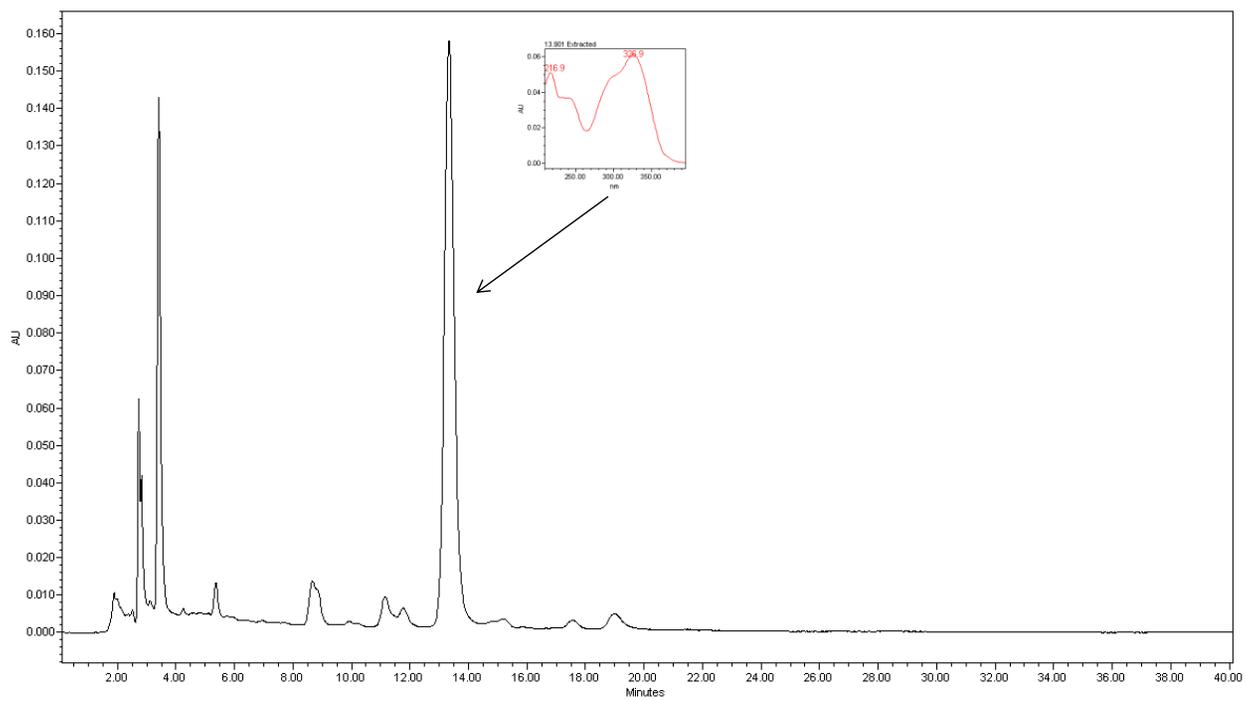
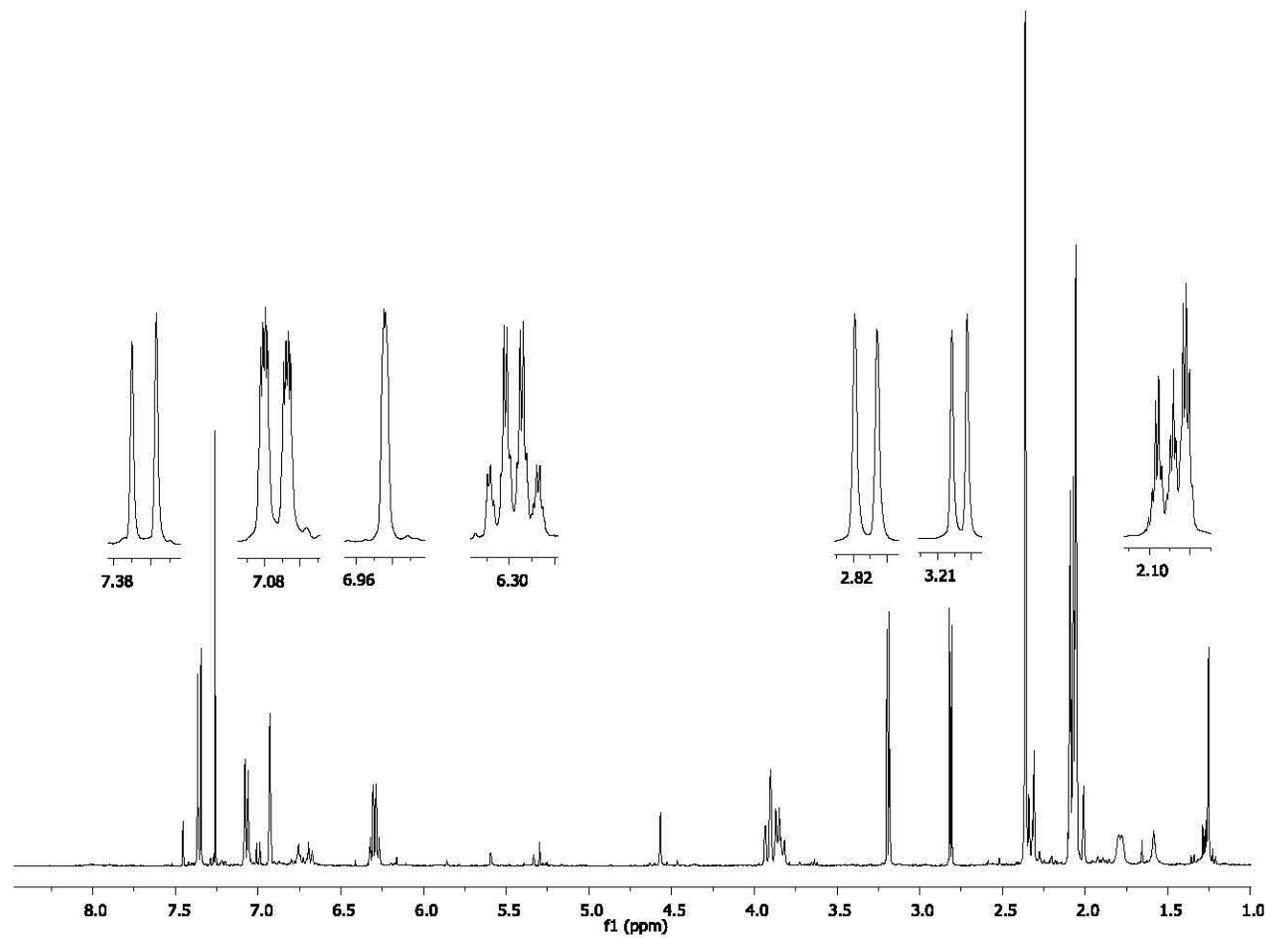
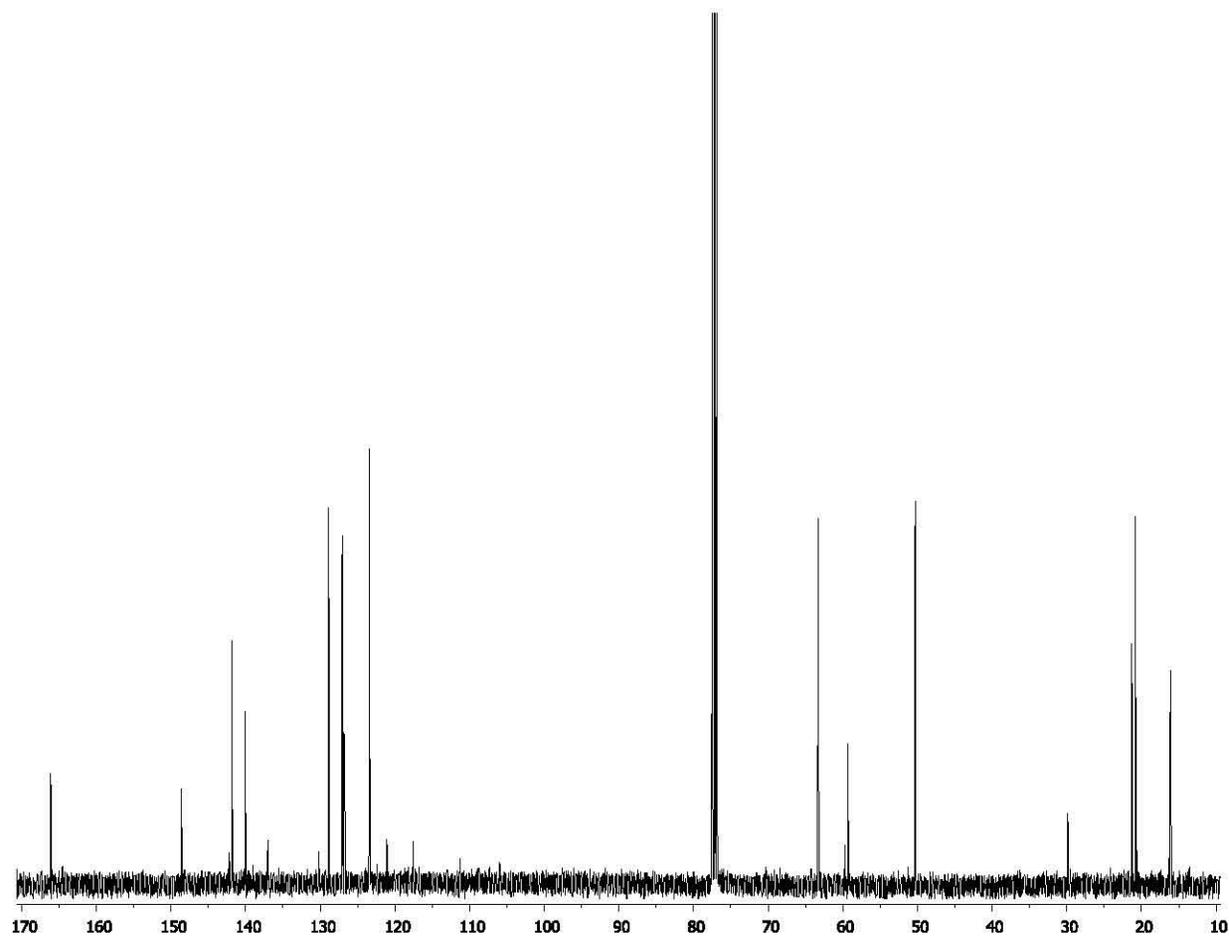


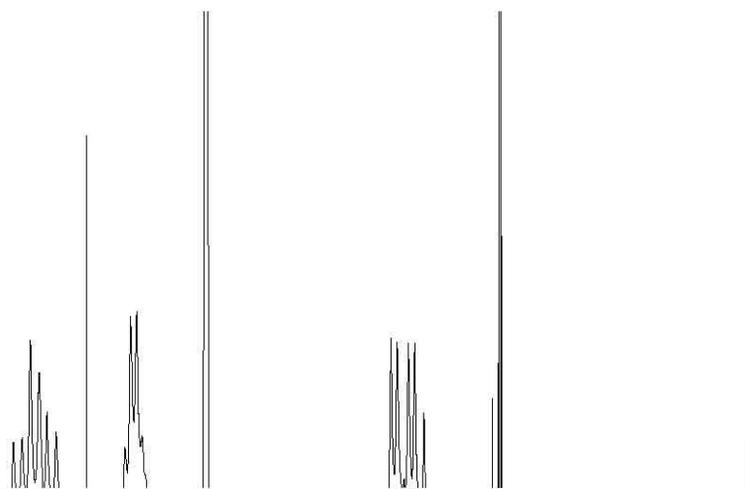
Figura 20. Cromatograma por CLAE del extracto acuoso de *H. schaffneri*. $\lambda=327$. Condiciones, ver parte experimental.



Espectro 1. Espectro de RMN-1H (400MHz, CDCl₃) del compuesto **8**



Espectro 2. Espectro de RMN- ^{13}C (125MHz, CDCl_3) del compuesto **8**



Espectro 3. Espectro de RMN-¹H (400MHz, MeOD) del compuesto **14**