



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRUEBAS DE COMPOSICIÓN E IDENTIDAD DE LA DROGA CRUDA DE  
*Brickellia cavanillesii* (Asteraceae)

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. F. B. MARIANA YETLANEZY HERNÁNDEZ ARÁMBURO

TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
VOCAL	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
VOCAL	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
SECRETARIO	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

**Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:**  
Laboratorio 124, edificio E. Facultad de Química.  
Universidad Nacional Autónoma de México

---

### TUTOR

Dra. Rachel Mata Essayag

---

### SUSTENTANTE

Q.F.B. Mariana Yetlanezy Hernández Arámburo

### CONGRESO

10ª RIIPN 2014. Cartel “Desarrollo y validación de un método analítico por CLAR-UV para la cuantificación de los cromenos activos presentes en la droga cruda de *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae)”, Mérida, Yucatán. 21-24 de mayo 2014.

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A CONACyT por la beca otorgada (becario No. 273440) para el desarrollo de mis estudios de maestría.

A CONACyT (Proyecto 150966) y DGAPA-UNAM (Proyecto IN212913) por el financiamiento económico que permitió la realización del presente trabajo.

A todos los miembros del jurado por su gran aporte para el enriquecimiento de este manuscrito, gracias por sus comentarios y observaciones.

A los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionar el material vegetal para este proyecto.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación USAI de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo brindado para el registro de los diferentes espectros empleados en la caracterización de los compuestos aislados.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz y en especial a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su valioso apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, creadora de este proyecto, por sus muy apreciables consejos y su apoyo total en la elaboración de esta tesis.

*Dedicada a mi hermosa familia, a mi adorado Gerardo y a mis amigos.  
Gracias por la confianza y todo el apoyo.*

*"No se sale adelante celebrando éxitos sino superando fracasos" J. Pericles*

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1 Generalidades sobre la especie <i>Brickellia cavanillesii</i> .....	5
2.1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos .....	5
2.1.2 Antecedentes farmacológicos .....	6
2.1.2 Antecedentes químicos.....	8
2.2 Control de calidad .....	17
2.2.1 Pruebas de identidad .....	19
2.2.2 Pruebas de composición .....	20
2.2.3 Pruebas de pureza.....	21
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	22
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	24
4.1 Material vegetal.....	24
4.2 Análisis cromatográfico.....	24
4.3 Obtención de la desmetilisoencecalina (29), 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno (30) y la escoparona (44), a partir de la fracción orgánica de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> de la infusión (lote 2764).....	25

4.4 Obtención de 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno (30), carvacrol (45), 4',7-dimetilapigenina (46), rutina (5) y ácido clorogénico (15) a partir de un extracto orgánico íntegro [CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1)] de <i>B. cavanillesii</i> (lote 36171) .....	28
4.5 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de la infusión de <i>B. cavanillesii</i> .....	30
4.6 Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes de la infusión de <i>B. cavanillesii</i> .....	32
4.6.1 Preparación de la solución stock, soluciones de trabajo y matriz.....	32
4.6.2 Selectividad.....	33
4.6.3 Linealidad del sistema.....	33
4.6.4 Linealidad y exactitud del método.....	34
4.6.5 Precisión.....	35
4.6.6 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	35
4.6.7 Estabilidad.....	36
4.7 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en la infusión de <i>B. cavanillesii</i> .....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
5.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de la infusión de <i>B. cavanillesii</i> .....	39
5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes de la infusión de <i>B. cavanillesii</i> .....	42
5.2.1 Selectividad.....	42
5.2.2 Linealidad del sistema.....	44
5.2.3 Linealidad y exactitud del método .....	46
5.2.4 Precisión.....	49
5.2.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación .....	50
5.2.6 Estabilidad .....	51
5.2.7 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en los extractos orgánicos de hexano de <i>B. cavanillesii</i> .....	52
6. CONCLUSIONES.....	55

7. BIBLIOGRAFÍA.....57  
ANEXO 1 .....61



## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> <i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A. Gray.	5
<b>Figura 2.</b> Droga cruda de <i>B. cavanillesii</i> y algunos preparados más conocidos.	6
<b>Figura 3.</b> Algunos documentos oficiales referentes al control de calidad de las plantas.	18
<b>Figura 4.</b> Obtención de los cromenos <b>29</b> , <b>30</b> y la cumarina <b>44</b> del FOID.	27
<b>Figura 5.</b> Obtención de los compuestos <b>30</b> , <b>45</b> , <b>46</b> , <b>5</b> y <b>15</b> .	30
<b>Figura 6.</b> Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de <i>B. cavanillesii</i> .	39
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de FOIH y sus compuestos mayoritarios.	40
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico de FOIH a 265 nm. Columna Waters® Symmetry C8 (100Å, 5µm, 3.9mm x150 mm). Flujo 0.7 mL/min.	41
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico de FOIH a 245 nm. Columna Waters® Symmetry C8 (100Å, 5µm, 3.9mm x150 mm). Flujo 0.7 mL/min.	42
<b>Figura 10.</b> Espectros de UV del cromeno <b>29</b> ; <b>a.</b> Desmetilisoencecalina ( <b>29</b> ); <b>b.</b> Matriz enriquecida con el cromeno <b>29</b> ; <b>c.</b> Desmetilisoencecalina ( <b>29</b> ) presente en matriz.	43
<b>Figura 11.</b> Espectros de UV del cromeno <b>30</b> ; <b>a.</b> 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno ( <b>30</b> ); <b>b.</b> Matriz enriquecida con el cromeno <b>30</b> ; <b>c.</b> Cromeno <b>30</b> presente en matriz.	44

*LISTA DE FIGURAS ~continuación~*

	PÁGINA
<b>Figura 12.</b> Gráfica para la evaluación de la linealidad de sistema para el cromeno <b>29</b> (desmetilisoencecalina).	45
<b>Figura 13.</b> Gráfica para la evaluación de la linealidad de sistema para el cromeno <b>30</b> (6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno).	46
<b>Figura 14.</b> Análisis de regresión lineal del método para el cromeno <b>29</b> (desmetilisoencecalina).	48
<b>Figura 15.</b> Análisis de regresión lineal del método para el cromeno <b>30</b> (6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno).	49
<b>Figura 16.</b> Fotografías de cuatro lotes diferentes de la droga cruda de prodigiosa.	54
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto escoparona ( <b>44</b> ).	63
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (100MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto escoparona ( <b>44</b> ).	63
<b>Figura 19.</b> Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto escoparona ( <b>44</b> ).	64
<b>Figura 20.</b> Espectro de masas (IE) del compuesto escoparona ( <b>44</b> ).	64
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto 4',7-dimetilapigenina ( <b>46</b> ).	65
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (100MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto 4',7-dimetilapigenina ( <b>46</b> ).	66

*LISTA DE FIGURAS ~continuación~*

	PÁGINA
<b>Figura 23.</b> Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46).	66
<b>Figura 24.</b> Espectro de masas (IE) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46).	67
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto carvacrol (45).	68
<b>Figura 26.</b> Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto carvacrol (45). Espectro de masas (IE) del compuesto carvacrol (45).	69
<b>Figura 27.</b> Espectro de masas (IE) del compuesto carvacrol (45).	69

## *LISTA DE TABLAS*

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Metabolitos identificados y/o aislados de <i>B. cavanillesii</i> .	9
<b>Tabla 2.</b> Pruebas de identidad para el control de calidad.	20
<b>Tabla 3.</b> Fraccionamiento primario de FOID.	26
<b>Tabla 4.</b> Fraccionamiento secundario de F4 de FOID.	26
<b>Tabla 5.</b> Fraccionamiento primario de EOI de <i>B. cavanillesii</i> .	28
<b>Tabla 6.</b> Fraccionamiento secundario de F3EO de EOI.	29
<b>Tabla 7.</b> Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico.	31
<b>Tabla 8.</b> Determinación de la adecuabilidad del sistema.	32
<b>Tabla 9.</b> Rango de concentración para la determinación de la linealidad.	33
<b>Tabla 10.</b> Rango de concentración para la evaluación de la linealidad y exactitud del método.	34
<b>Tabla 11.</b> Concentración de los estándares para la evaluación de la repetibilidad.	35

*LISTA DE TABLAS ~continuación~*

	PÁGINA
<b>Tabla 12.</b> Valores obtenidos para cada curva de calibración de los cromenos <b>29</b> y <b>30</b> .	45
<b>Tabla 13.</b> Valores obtenidos para la linealidad y exactitud de método del cromeno <b>29</b> .	47
<b>Tabla 14.</b> Valores obtenidos para la linealidad y exactitud de método del cromeno <b>30</b> .	48
<b>Tabla 15.</b> Parámetros calculados para la evaluación de la linealidad de método del cromeno <b>29</b> y <b>30</b> .	49
<b>Tabla 16.</b> Evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia.	50
<b>Tabla 17.</b> Límites de Detección y Límites de Cuantificación de los estándares <b>29</b> y <b>30</b> .	51
<b>Tabla 18.</b> Estabilidad de los estándares bajo condiciones de temperatura.	51
<b>Tabla 19.</b> Rendimiento de las fracciones orgánicas.	52
<b>Tabla 20.</b> Cuantificación de los metabolitos presentes en <i>B. cavanillesii</i> .	53

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

$ d_i $	Diferencia absoluta de medias
$\bar{y}_0$	Media aritmética del análisis inicial
$\bar{y}$	Media aritmética
$\leq$	Menor o igual a
$\geq$	Mayor o igual a
%	Por ciento
°C	Grado Celsius
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda$	Longitud de onda
$\nu_{\max}$	Frecuencia de máxima absorción
Å	Ångström
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AcOEt	Acetato de etilo
ANADEVA	Análisis de varianza
$b_0$	Ordenada al origen
$b_1$	Pendiente
C	Concentración
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de gases
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
cm	Centímetro
CV	Coefficiente de variación
d	Doblete

*LISTA DE ABREVIATURAS ~continuación~*

<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva media
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>ESCOF</b>	European Scientific Cooperative for Phytotherapy
<b>FHEUM</b>	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
<b>g</b>	Gramo
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<b>Hz</b>	Hertz
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µV/s</b>	Microvolts por segundo
<b>m</b>	multiplete
<b>mL</b>	Militros
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>min</b>	Minuto
<b>mm</b>	Milímetro
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>P.F.</b>	Punto de fusión
<b>R</b>	Coefficiente de correlación
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>Rf</b>	Factor de retención
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear Protónica

*LISTA DE ABREVIATURAS ~continuación~*

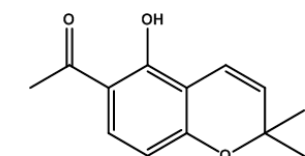
S	singulete
S	Varianza
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación
UV	Ultravioleta
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization



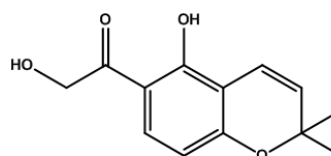
## RESUMEN

*Brickellia cavanillesii* es una planta ampliamente distribuida en México, de relevancia terapéutica, principalmente en el tratamiento de la gastritis y la diabetes.

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos para la identificación y cuantificación de los cromenos bioactivos de la especie, la desmetilisoencecalina (**29**) y el 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**30**).



Desmetilisoencecalina (**29**)



6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**30**)

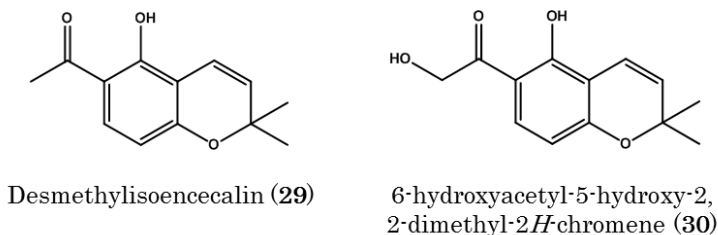
Se establecieron los perfiles característicos de la fracción hexánica de la infusión preparada a partir de la droga cruda de *B. cavanillesii*, tanto por CCD como por CLAE. En el último caso se empleó un sistema cromatográfico en fase reversa, columna Symmetry C<sub>8</sub> (5µm, 3.9 × 150 mm) y una mezcla de elución constituida por un gradiente de ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido ortofosfórico), un flujo de 0.7 mL/min y para la detección por UV una longitud de onda de 265 nm (cuantificación) y de 265 nm y 245 nm para la identificación.

El método de cuantificación desarrollado para los cromenos **29** y **30** resultó ser lineal, preciso y exacto, de acuerdo a los lineamientos de la guía ICH, de manera que podrá ser utilizado como método farmacopéico para el control de calidad de esta importante hierba.

De manera adicional, se logró la identificación de tres compuestos novedosos para la planta: la escoparona (**45**), el carvacrol (**46**) y la 4',7-dimetilapigenina (**47**).

## ABSTRACT

*Brickellia cavanillesii* is a widely distributed plant in Mexico. It is mainly used for treating gastritis and diabetes. In this study, a liquid chromatography analytical method was developed to identify and quantify two bioactive chromenes [desmethylisoececalin (**29**) and 6-hydroxyacetyl-5-hydroxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromene (**30**)] in this herb.



The characteristic profile for the hexane fraction of the infusion of *B. cavanillesii* was established by TLC and HPLC. The best HPLC conditions were: a reverse phase chromatographic system, with a Symmetry C<sub>8</sub> column (5 μM, 3.9 x 150 mm); the eluting mixture was composed by an ACN-H<sub>2</sub>O (0.1% orthophosphoric acid) gradient, a flow of 0.7 mL/ min was used; the UV detection wavelength was set at 265 nm (quantification) and at 265 and 245 for identification.

The developed method was validated according to the ICH criteria. It was linear, precise and accurate. Therefore it would be a valuable pharmacopeic method for quality control of this important herb.

Finally, three new compounds for the plant were isolated and characterized by spectroscopic methods. The compounds were: scoparone (**45**), carvacrol (**46**) and 4',7-dimethyl apigenin (**47**).

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen la base terapéutica de los sistemas alternativos o complementarios. También son parte importante de la medicina alopática ya que son fuentes potenciales de fármacos o de precursores de los mismos.

En México, la herbolaria indígena en tiempos precolombinos jugó un papel importante en las prácticas terapéuticas, tal como lo revelan algunas excavaciones en zonas arqueológicas del país (Cortez-Gallardo, *et al.*, 2004), el uso de muchas de esas plantas persiste en el México contemporáneo.

El consumo de plantas medicinales, tanto en México como a nivel global, se ha incrementado notablemente en las últimas décadas por múltiples factores. En consecuencia existe una gran preocupación por promover el uso de productos vegetales seguros y eficaces, lo cual se logra únicamente con drogas que son sometidas a estrictos procesos de control calidad.

En numerosos países desarrollados el mercado de medicamentos a base de plantas está muy bien regulado; en los mismos, los productos herbolarios son sometidos a rigurosos procesos de control de calidad. Sin embargo, en otros países en vías de desarrollo, el control de calidad y el registro de productos fitoterápicos deja mucho que desear.

En México se ha realizado un gran progreso en este sentido, sin embargo es necesario generar los procedimientos de control de calidad de aquellas hierbas de mayor consumo, bien sea bajo la forma de droga cruda o de productos fitoterápicos que se comercializan sin regulación alguna. La legislación vigente dispone de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2013) con el objetivo de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas, o sus derivados, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios para contribuir al mejoramiento de la calidad de estos productos y su uso racional (Cañigual y Vila, 2003, Cañigual, 2006).

El presente trabajo se formuló con la intención de fortalecer la investigación enfocada a la documentación científica de la eficacia, la seguridad y la calidad de las plantas medicinales más utilizadas en México; en este caso particular se pretende generar los procedimientos analíticos para el control de calidad de la “prodigiosa”, *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray, especie de la familia Asteraceae ampliamente comercializada para tratar trastornos digestivos y diabetes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades sobre la especie *Brickellia cavanillesii*.

#### 2.1.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

*Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray es una planta de la familia Asteraceae, que mide de 1 a 3 metros de altura. Sus hojas verde cenizo, son ovadas, lanceoladas, alternas las superiores y opuestas las demás, pecioladas, almenado-dentadas, trinervadas, casi lanosas, y con algunas glándulas apenas visibles a simple vista. Sus flores son amarillas y están en agrupaciones en cabezuelas colgantes. Tiene tallos ásperos, velludos y rojizos (Martínez, 1989) (Figura 1). Esta hierba se distribuye desde el norte hasta el sur de México, entre los estados de Durango, Jalisco, Puebla, Morelos, Distrito Federal, Veracruz, Oaxaca y Chiapas. Se conoce popularmente con los nombres de atanasia amarga, gobernadora de Puebla; amula de Monterrey; hierba del becerro; hierba amargosa; prodigiosa; zacatechichi y zacatexixi, entre otros. Esta especie se ha descrito con varios sinónimos, incluyendo: *Brickellia botterii* BL Rob., *Brickellia squarrosa* (Cav.) B.L. Rob., *Bulbactyles cavanillesii*, DC, *Eupatorium rosalesia* DC., *Eupatorium squarrosus* Cav., y *Coleosanthus cavanillesii*, Cass. (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; gbif.org, 2014; Tropicos.org, 2014).



Figura 1. *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray.

*Brickellia cavanillesii* se emplea en el tratamiento de afecciones del estómago y diarrea, así como para combatir la atonía secretora y motriz del aparato gastrointestinal, la gastritis y se le atribuyen propiedades vermífugas y antidiabéticas (Anales del IMN, 1894; Martínez, 1989; Poss *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006). Por su eficacia popular para el tratamiento de la gastritis, en la actualidad la planta se comercializa ampliamente sola o en combinación con otras hierbas. Entre los preparados más conocidos se encuentran: el gastrite y el Té Hamula de Monterrey (Figura 2). El uso de la planta para el tratamiento de la diabetes es reciente, y el primer registro aparece entre finales del siglo pasado (Nicholson *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Droga cruda de *B. cavanillesii* y algunos preparados más conocidos.

### 2.1.2 Antecedentes farmacológicos.

Los registros acerca de los usos médicos de *B. cavanillesii* datan del año 1894 en los Anales del Instituto Médico Nacional. En el siglo XX, se documentaron diversas propiedades de esta planta. Así Noriega (1902) describe el uso de la tisana a base de prodigiosa para tratar fiebres palúdicas, o como tónico y tenífugo. Este autor también documentó que la planta no era tóxica y que sus propiedades antipalúdicas no eran reproducibles. Otras investigaciones evaluaron la tintura y un extracto fluido de *B. cavanillesii* como aperitivo en caso de anorexia, y para el tratamiento de la dispepsia encontrándose buenos y medianos resultados, respectivamente (Loeza, 1907; Anales del INM, 1908). Por último, en 1912 el extracto de la planta administrado en forma pilular y antes de las principales comidas resultó eficaz para

la dispepsia hipoclorhídrica, la gastralgia y la atonía gástrica. La gastralgia fue uno de los síntomas que mejoró notablemente (Anales del INM, 1912).

Casi un siglo después, Aguirre-Crespo y colaboradores, demostraron el efecto vasorrelajante de un extracto metanólico de la planta utilizando un modelo de anillo de aorta aislado de rata (Aguirre, *et al.*, 2005). Posteriormente, se demostró que el extracto acuoso de la planta era citotóxico sobre una línea celular de carcinoma hepático (hepG2) (Jiniqui, *et al.*, 2008). El efecto fue dependiente del tiempo de exposición de las células y fue mayor al combinar los extractos de *B. cavanillesii* con el de la tronadora (*Tecoma stans*).

Palacios-Espinosa, en 2009, describió un estudio más detallado acerca de la farmacología de *B. cavanillesii*, demostrando mediante el método de Lorke que el extracto íntegro de la planta no es tóxico para ratones. Las pruebas farmacológicas realizadas sobre los extractos de la planta y el producto mayoritario de *B. cavanillesii* permitieron comprobar su potencial antinociceptivo en los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal (100-794 mg/Kg). Se establecieron además las propiedades gastroprotectoras del extracto de la planta ( $DE_{50} = 30$  mg/Kg). Estudios preliminares del mecanismo de acción demostraron que el efecto gastroprotector podría estar mediado en parte por las prostaglandinas endógenas (muy importantes para la protección de la mucosa gástrica). Estos resultados, aunados a la inhibición significativa del crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* ocasionada por el extracto orgánico, el aceite esencial y el cromeno mayoritario de la planta dan sustento científico al uso de la planta para el tratamiento de padecimientos asociados con la gastritis. Por último, se comprobó que tanto la esencia, así como el extracto orgánico de *B. cavanillesii*, provocan una disminución del tránsito intestinal del carbón administrado a los animales de prueba (Palacios, 2009).

Escandón Rivero, en 2012, describe un estudio de las propiedades antihiperglucémicas e hipoglucemiantes de algunos preparados de la especie *in*

*vivo*. De tal forma que la infusión resultó ser eficaz para disminuir los niveles de glucosa, tanto en ayunas como postprandial, en ratones hiperglucémicos mediante un tratamiento con nicotinamida-estreptozotocina. El extracto también inhibió de manera importante la actividad de las enzimas alfa-glucósidasas, lo que permitió proponer que su acción antihiper glucémica se debe en parte a la inhibición de estas enzimas. El estudio biodirigido del extracto activo permitió aislar y purificar trece compuestos, algunos de los cuales son responsables de los efectos del extracto acuoso (Escandón, *et al.*, 2012).

Eshiet y colaboradores realizaron un estudio sobre el efecto citotóxico potencial de un extracto metanólico liofilizado de *B. cavanillesii* y 12 de sus constituyentes volátiles (Eshiet *et al.*, 2013; 2014), empleando una línea celular derivada de carcinoma hepático (hepG2); también analizaron la expresión de los transportadores de glucosa GLUT 2 en las células tratadas utilizando la técnica de Western Blot. Los resultados sugieren que los compuestos del extracto inhiben la proliferación celular. También mencionan que el extracto liofilizado podría ser beneficioso para tratar la diabetes. En este trabajo no se consideran los resultados del estudio realizado por Escandón-Rivero y colaboradores en 2012, que describen las propiedades antihiper glucémicas e hipoglucemiantes *in vivo* e *in vitro* de la hierba.

### 2.1.3 Antecedentes químicos.

Los compuestos químicos que se han aislado e identificado de *B. cavanillesii* son principalmente de tipo flavonoide, cromenos, fenilpropanoides, cumarinas y terpenoides, incluyendo algunas lactonas sesquiterpénicas (Río de la Loza, 1894; Flores y Herrán, 1960; Rodríguez *et al.*, 1974; Bohlmann y Zdero, 1976; Bohlmann y Zdero, 1977; Rodríguez, *et al.*, 2006; Palacios, 2009; Escandón, *et al.*, 2012; Eshiet, *et al.*, 2013; García, 2014). En la Tabla 1 se enlistan los metabolitos que hasta la fecha se han identificado para esta importante especie. Cabe mencionar que la



mayoría de los mono y sesquiterpenoides volátiles fueron identificados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

**Tabla 1.** Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii*.

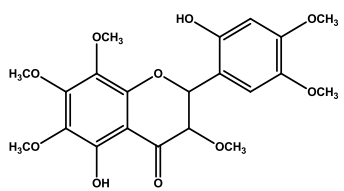
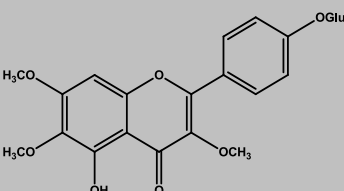
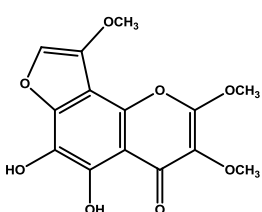
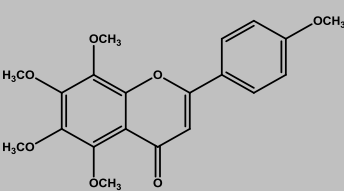
COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FLAVONOIDES</b>	
 <p style="text-align: center;">Brickelina (1)</p>	Río de la Loza, 1894
 <p style="text-align: center;">Pendulina (2)</p>	Flores y Herrán, 1960
 <p style="text-align: center;">Atanasina (3)</p>	Flores y Herrán, 1960
 <p style="text-align: center;">Gardenina B (4)</p>	Rodríguez <i>et al.</i> , 1974

Tabla 1. Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

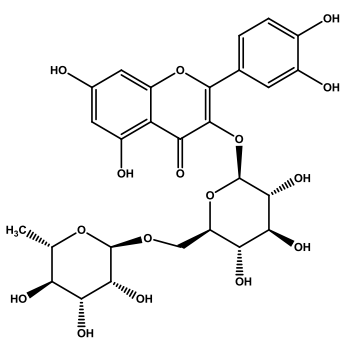
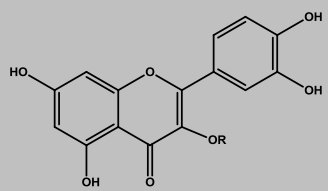
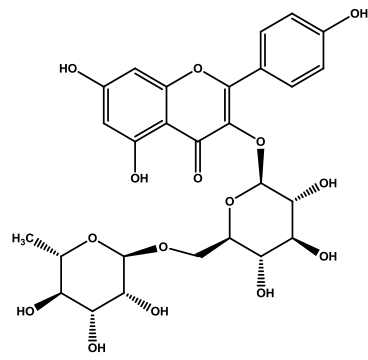
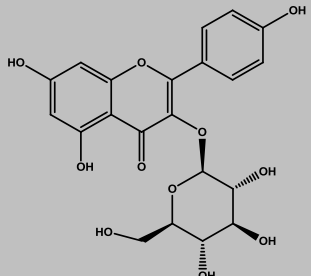
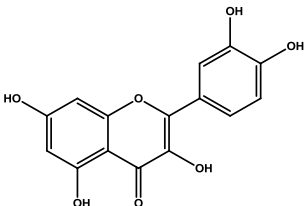
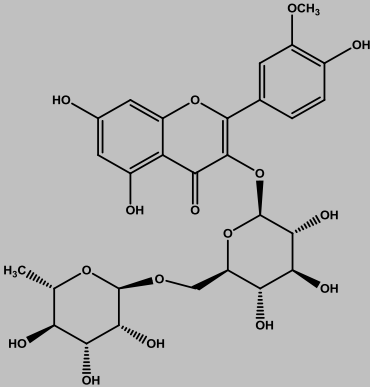
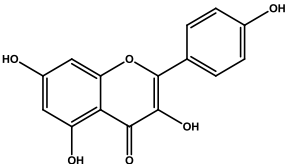
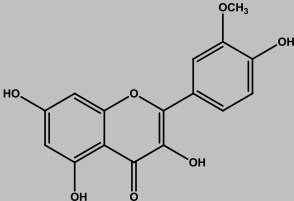
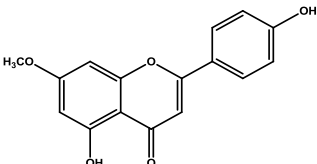
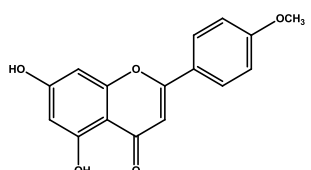
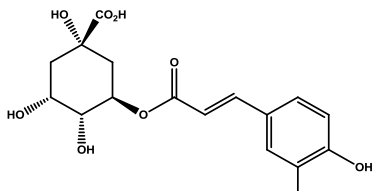
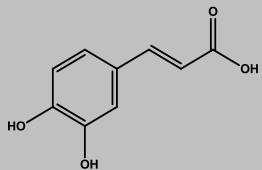
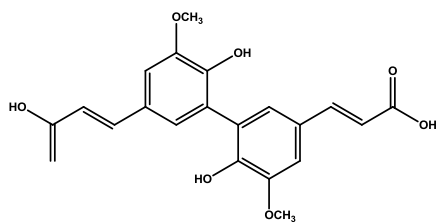
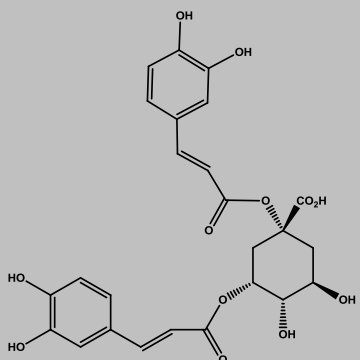
COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FLAVONOIDES</b>	
 <p>Rutina (5)</p>	Palacios, 2009
 <p>R= galactósido; ramnósido Hiperósido (6)</p>	Palacios, 2009
 <p>3-<i>O</i>-rutinósido del camperol (7)</p>	<i>Ibíd</i> em, 2009
 <p>3-<i>O</i>-glucósido del camperol (8)</p>	<i>Ib.</i> , 2009

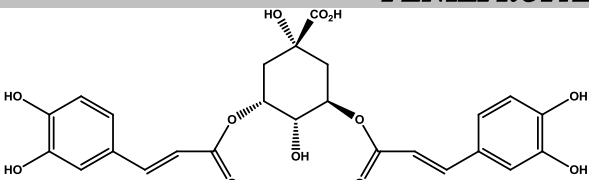
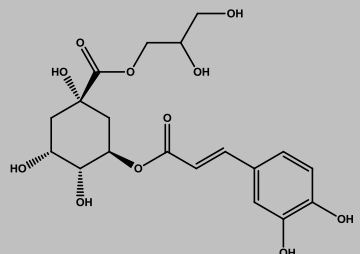
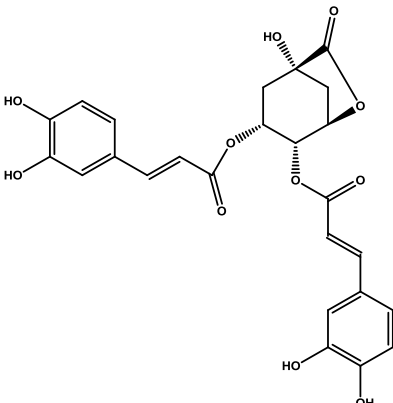
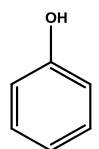
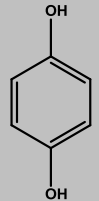
Tabla 1. Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FLAVONOIDES</b>	
 <p>Quercetina (10)</p>	Escandón <i>et. al</i> , 2012
 <p>3-<i>O</i>-rutinósido de la isoramnetina (9)</p>	Palacios, 2009
 <p>Camperol (11)</p>	Escandón <i>et al</i> , 2012
 <p>Isoramnetina (12)</p>	<i>Ib.</i> , 2012
 <p>Genkwanina (13)</p>	<i>Ib.</i> , 2012

**Tabla 1.** Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FLAVONOIDES</b>	
 <p>Acacetina (14)</p>	Escandón <i>et al</i> , 2012
<b>FENILPROPANOIDES</b>	
 <p>Ácido clorogénico (15)</p>	Palacios, 2009
 <p>Ácido caféico (16)</p>	<i>Ib.</i> , 2009
 <p>Ácido diferúlico (17)</p>	<i>Ib.</i> , 2009
 <p>Ácido 1,3-dicafeoilquínico (18)</p>	<i>Ib.</i> , 2009

**Tabla 1.** Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FENILPROPANOIDES</b>	
 <p>Ácido 3,5-dicafeoilquínico (19)</p>	Escandón <i>et al.</i> , 2012
 <p>Clorogenato de glicerilo (20)</p>	Palacios, 2009
 <p>Lactona del ácido 3-<i>O</i>-feruloil-4-<i>O</i>-cafeoilquínico (21)</p>	Palacios, 2009
<b>OTROS DERIVADOS FENÓLICOS</b>	
 <p>Fenol (22)</p>	Eshiet <i>et al.</i> , 2013
 <p>Hidroquinona (23)</p>	Eshiet <i>et al.</i> , 2013

**Tabla 1.** Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

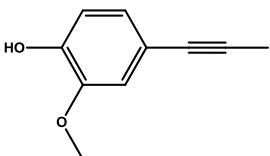
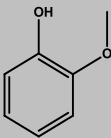
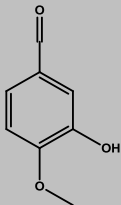
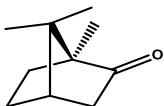
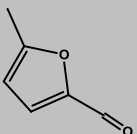
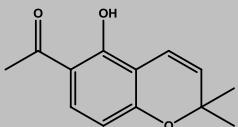
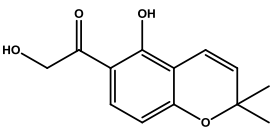
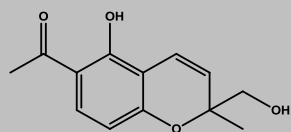
COMPUESTO	REFERENCIA
<b>OTROS DERIVADOS FENÓLICOS</b>	
	Eshiet <i>et al.</i> 2013
 <p>2-metoxi-4-(1-propenil)-fenol (24)</p>	Ib., 2013
 <p>2-metoxifenol (25)</p>	Ib., 2013
<b>ALDEHIDOS Y CETONAS</b>	
	Ib., 2013
 <p>3-hidroxi-4-metoxibenzaldehido (26)</p>	Ib., 2013
 <p>1,7,7-trimetil-(1<i>S</i>,4<i>S</i>)-biciclo(2.2.1)heptan-2-ona (27)</p>	Ib., 2013
 <p>5-metil-2-furancarboxaldehido (28)</p>	Ib., 2013
<b>CROMENOS</b>	
	Rodríguez <i>et al.</i> , 2006; Escandón <i>et al.</i> , 2012
 <p>6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2<i>H</i>-cromeno (29)</p>	Escandón <i>et al.</i> , 2012
 <p>6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2<i>H</i>-cromeno (30)</p>	

Tabla 1. Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

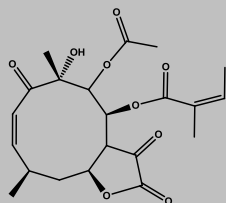
**CROMENOS**



6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2*H*-cromeno  
(31)

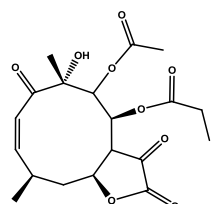
Escandón *et al.*, 2012

**TERPENOIDES**



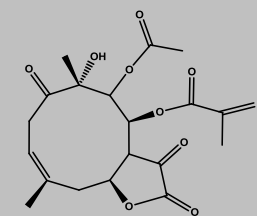
Caleína A (32)

*Ib.*, 2012



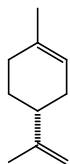
Caleína C (33)

*Ib.*, 2012



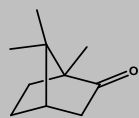
Calealactona C (34)

*Ib.*, 2012



Limoneno (35)

Eshiet *et al.*, 2013



Alcanfor (36)

García, 2014

**Tabla 1.** Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

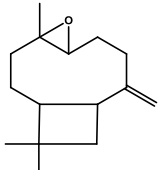
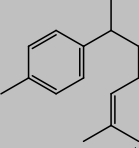
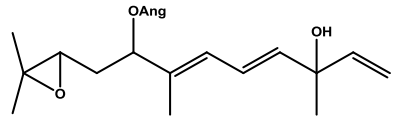
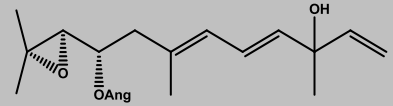
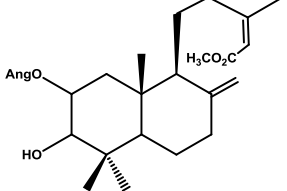
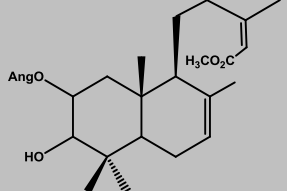
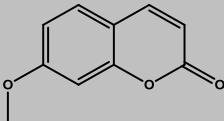
NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA
<b>TERPENOIDES</b>	
 Óxido de cariofileno (37)	García, 2014
 Curcumeno (38)	García, 2014
 8-a ngeloiloxi-10,11-epoxi-10,11-dihidrobrickelliol (39)	Bohlmann y Zdero, 1976
 Angelato de dehidroneridol (40)	<i>Ib.</i> , 1976
 Éster metílico del ácido (13 <i>Z</i> )-(8(17) <i>Z</i> )-2α-angeloiloxi-3α-hidroxi-8(17),13-labdadien-15-oico (41)	<i>Ib.</i> , 1976
 Éster metílico del ácido (13 <i>Z</i> )-2α-angeloiloxi-3α-hidroxi-7,13-labdadien-15-oico (42)	<i>Ib.</i> , 1976



Tabla 1. Metabolitos identificados y/o aislados de *B. cavanillesii* ~continuación~

<i>CUMARINAS</i>	
 <p>Herniarina (43)</p>	Escandón <i>et al.</i> , 2012

## 2.2 Control de calidad de las plantas.

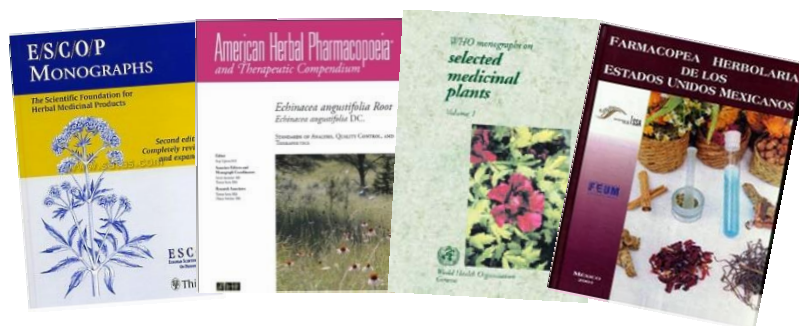
El incremento en el consumo de plantas medicinales con fines terapéuticos ha provocado un aumento en el comercio global de productos fitoterápicos; por ello es fundamental desarrollar pruebas analíticas y biológicas adecuadas que aseguren su calidad (Wickramasinghe, 2006; Sahoo *et al.*, 2010; WHO, 1998). Es necesario recordar que la calidad de las drogas crudas y sus preparados es primordial para garantizar su eficacia y seguridad (Cañigual y Vila, 2003; Cañigual, 2006).

El control de calidad de las plantas es difícil de conseguir, ya que su composición es compleja. Típicamente las hierbas contienen mezclas de diferentes compuestos químicos que pueden actuar individualmente, de forma aditiva o sinérgica para lograr sus efectos terapéuticos. Afortunadamente, existen técnicas analíticas modernas que permitan establecer las huellas digitales y/o perfiles químicos de las plantas. Sin embargo, estos perfiles se ven afectados por numerosos factores como las condiciones de recolección (plantas silvestres o cultivadas), la distribución geográfica y estacional, así como variables fisiológicas, genéticas o ambientales (Efferth y Greten, 2012; Sahoo, *et al.*, 2010).

Toda la información concerniente al control de calidad de las drogas vegetales, así como los métodos a emplear, se recopilan principalmente en las farmacopeas. A partir de 1991, la OMS comenzó una serie de publicaciones con la finalidad de facilitar el trabajo de los organismos regulatorios de cada país miembro (Figura 3), y así lograr el reconocimiento de la fitoterapia, y su uso racional (WHA, 2005). Es así, como después de una ardua labor, la OMS publica 28 monografías de las plantas

medicinales de mayor uso global. Posteriormente, en el año 2002, se publica un segundo volumen con 30 monografías adicionales. A la fecha, se cuentan con cuatro volúmenes y un total de 116 monografías, de gran utilidad para los usuarios de estos recursos terapéuticos. Estas, han servido como modelos para la generación de la información científica necesaria sobre plantas medicinales en las distintas regiones del mundo (Cañigüeral, 2006).

Los países europeos, siguiendo las recomendaciones de la OMS, crearon la European Scientific Cooperative for Phytotherapy (ESCOP por sus siglas en inglés, Figura 3), la cual promueve el avance del conocimiento científico de los medicamentos de origen vegetal y el establecimiento de los criterios armonizados para su regulación. La ESCOP también ha contribuido con la generación de trabajos monográficos, publicando a la fecha alrededor de un más de un centenar de monografías que han permitido el establecimiento de los estándares de calidad adecuados de las plantas medicinales y de sus preparados fitoterapéuticos (Cañigüeral, 2002; Cañigüeral, 2006). En los Estados Unidos de Norteamérica, la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP), también ha contribuido con la publicación de monografías cuyo contenido abarca tópicos relacionados con la preparación, almacenamiento, criterios de calidad, historia, estudios clínicos de aquellas plantas medicinales de mayor consumo en ese país (Figura 3).



**Figura 3.** Algunos documentos oficiales referentes al control de calidad de las plantas.

En lo concerniente a México, en el año 2001, se publicó la primera Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), la cual consta de 82

monografías de plantas medicinales y de algunas esencias, la mayoría de ellas de especies introducidas (Figura 3). Estas monografías describen de manera general, las características de identidad, de pureza y de composición de las drogas crudas (FHEUM, 2001). Sin embargo, las monografías de las plantas autóctonas resultaron escasas y deficientes, ya que no se disponía de la información adecuada para integrarlas. En 2013 se publica una segunda edición con 64 monografías adicionales. El número de monografías de plantas vernáculas incrementó sensiblemente debido al esfuerzo de varios científicos de instituciones educativas y de investigación del país.

### 2.2.1 Pruebas de identidad.

Las pruebas de identidad de las drogas crudas permiten su caracterización a través de una serie de pruebas botánicas, químicas y otras basadas en marcadores genéticos (Sahoo, *et al*, 2010; Efferth y Greten, 2012).

Las pruebas de identidad botánica corresponden al análisis macroscópico y microscópico de la planta en cuestión. Estos análisis comprenden un examen de las características organolépticas complementadas con un reconocimiento de las características morfológicas y el posterior estudio microscópico de los componentes utilizados de la planta.

En las pruebas de identidad química, mediante el análisis químico se determina la presencia de los constituyentes de la planta. Estas pruebas se realizan a través de ensayos fisicoquímicos cualitativos sobre la misma droga, entera o pulverizada, o, más frecuentemente, sobre extractos obtenidos por diferentes procedimientos de extracción a partir de la planta y con diferentes disolventes. También se realiza la identificación química mediante análisis cromatográficos (cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, etc.) que permiten establecer perfiles característicos e identificar los componentes marcadores.

La identificación por código genético de ADN es un desarrollo tecnológico reciente, se basa en la detección de los sitios variables del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal. La investigación actual en este campo se centra en la pregunta, cuántos y cuáles fragmentos de ADN son necesarios para la discriminación óptima de las diferentes especies. Estas últimas, dada su gran fidelidad, han adquirido una gran relevancia. Hay que recordar que el ADN es único para cada especie y no se ve afectado por los marcadores basados en la edad, factores ambientales, por lo que también son útiles en la identificación de la variación inter- e intra-especies.

**Tabla 2.** Pruebas de identidad para el control de calidad.

BOTÁNICA	QUÍMICA
<p><b>-Examen macroscópico</b> (características de los órganos como: forma, tamaño, entre otros)</p> <p><b>-Examen organoléptico</b> (olor, color, sabor)</p> <p><b>-Examen microscópico</b> (por cortes histológicos)</p>	<p>Ensayos fisicoquímicos:</p> <p><b>-Cualitativos</b> (reacciones de coloración, de precipitación, fluorescencia, etc.)</p> <p><b>-Cuantitativos</b> (métodos cromatográficos)</p>

### 2.2.2 Pruebas de composición.

Las pruebas de composición consisten en la cuantificación de los principios activos, si estos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados. Con esta finalidad es necesario crear métodos de análisis que sean confiables y reproducibles, por lo tanto, un método analítico debe describir a detalle los pasos necesarios para realizar una prueba e incluir el

tratamiento de las muestras, las sustancias de referencia empleadas, las concentraciones de trabajo, la preparación de reactivos, así como los materiales, equipos y aparatos empleados.

La validación de un método se puede definir como el proceso que se debe seguir para establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y de la identificación de las causas que pueden cambiar estas características, y en qué medida. Es por lo tanto, un componente esencial de las medidas que un laboratorio debe establecer para poder producir resultados confiables (Rambla, *et al.*, 2012). Existe un conjunto importante de parámetros aceptados para la validación apropiada de un método analítico. Estos son: especificidad, exactitud, precisión, límites de detección (LD) y cuantificación (LC), así como la linealidad. Cada uno de los cuales será descrito posteriormente.

### **2.2.3 Pruebas de pureza.**

La pureza está muy ligada con el empleo seguro de la droga cruda y trata sobre la determinación de la presencia de algún material ajeno o contaminante (químico, biológico y físico) presente en el material vegetal.

El análisis de pureza comienza con una inspección visual en la cual se detectan defectos en la desecación, el transporte, el almacenaje o la recolección, como pueden ser la presencia de sustancias extrañas a la planta (adulteraciones con otras plantas, mohos por una mala desecación, insectos, etc.) y continúa con una serie de ensayos fisicoquímicos cuantitativos (cenizas, disolventes residuales, contaminación microbiana, metales pesados, aflatoxinas, radioactividad, entre otros) aplicables a todas las especies.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Nuestro país se distingue por una gran tradición en el uso de plantas medicinales con fines curativos. Esta tradición forma parte importante de la riqueza histórica y cultural de los pueblos indígenas. Así, en el México actual, bajo esta influencia y la idea de que lo natural es sinónimo de inocuo, se ha propiciado un mercado desmedido de plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Evidentemente su uso racional requiere el establecimiento de parámetros de eficacia, calidad y seguridad.

Parte del aseguramiento de la calidad de las drogas son la identificación y cuantificación de los compuestos marcadores; el desarrollo y validación de estos métodos y su posterior integración en una monografía farmacopéica, lo que permitirá su empleo en cualquier laboratorio analítico sin la necesidad de modificarlo drásticamente.

La elección de *Brickellia cavanillesii* para la realización de este trabajo se debe al extenso uso que tiene esta especie en las prácticas médicas populares de México para el tratamiento de la diabetes y afecciones gástricas. Fue incluida en la Sección Extrafarmacopea de la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, lo que la destaca como una de las plantas importantes de la Materia Medica Nacional Moderna. Además el nombre común que la planta recibe (prodigiosa) permite en muchas ocasiones la adulteración o sustitución de *B. cavanillesii* por otras plantas con el mismo nombre común, pero que denotan un contenido metabólico y eficacia diferentes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). De allí, entonces la necesidad de contar con metodologías analíticas que permitan determinar los parámetros de calidad de la planta, incluyendo sus perfiles cromatográficos y pruebas de composición.

En este contexto el objetivo general de este trabajo consiste en establecer las pruebas de identidad química y composición la droga cruda de *B. cavanillesii* con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para

integrar su monografía farmacopéica. El establecimiento de estas pruebas podrá garantizar su uso racional, en conjunto con las pruebas encaminadas a corroborar la seguridad y eficacia de la planta.

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

- ✓ Establecer los compuestos marcadores de la planta mediante el estudio químico de sus extractos orgánico y/o acuoso.
- ✓ Aislar el mayor número posible de compuestos característicos de la planta empleando técnicas cromatográficas convencionales con la finalidad de establecer los perfiles cromatográficos característicos de la especie.
- ✓ Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para posteriormente cuantificar uno o más de los principios activos presentes en la infusión de la especie *B. cavanillesii*.

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

##### 4.1 Material vegetal.

Se utilizaron tres lotes de *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray silvestres, las cuales fueron recolectadas en el municipio de Yecapixtla, Morelos. En los tres casos ejemplares de herbario fueron depositados en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM. La primera se obtuvo en agosto de 2009 (Bye 36059); la siguiente, se recolectó en septiembre de 2009 (Bye 36171); y la última en marzo de 2013 (Bye y Linares 2764). Además, entre marzo y mayo de 2014, se adquirieron cuatro muestras comerciales: el té Hamula (**TH**, lote 070612540 Jun2017) en el local “Himet” del Mercado de Sonora; **PS** en el Mercado de Sonora en el local “Puente de la salud”; **PB** en el Mercado de Bola; finalmente, **PA** y **PM** en Pasaje Catedral en los locales correspondientes a “Plantas de América” y “Extenso surtido en plantas de todo el mundo”, respectivamente.

##### 4.2 Análisis cromatográficos.

Para los análisis de cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice (0.25 mm; 60 F254, Merck®), así como diversos sistemas de elución. Para la visualización de los mismos, se utilizó una lámpara UV con longitudes de onda de 254 y 365 nm, y como agente revelador químico una solución de sulfato cérico amoniacal en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguido de calentamiento en una parrilla eléctrica. 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®) o gel dextrano (Sephadex LH20, Pharmacia®).



La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos Waters 996 (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, Massachusetts, EE. UU.), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996). Los análisis cuantitativos se realizaron en un cromatógrafo Waters 600 (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, MA, EE. UU.), acoplado a un detector de UV Waters 2487 Dual.

#### **4.3 Obtención de la desmetilisoencecalina (29), 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (30) y la escoparona (44), a partir de la fracción orgánica de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la infusión (lote 2764).**

Las partes aéreas secas se fragmentaron en un molino Willey Modelo 4 (Thomas Scientific Incorporation, Swedesboro, New Jersey, EE.UU.) con malla de 2 mm.

Para obtener la fracción orgánica de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añadió 1L de agua destilada hirviendo a 40 g de la droga cruda; la mezcla se dejó reposar por 30 minutos; la infusión se filtró por gravedad y después se sometió a extracción por reparto por triplicado con 900 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica resultante se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Finalmente, se eliminó el disolvente por evaporación al vacío. Este procedimiento se repitió seis veces para obtener 2.22 g de la fracción orgánica de la infusión obtenida por reparto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (FOID).

1.5 g de FOID se fraccionaron mediante una cromatografía en columna sobre 120 g de gel de sílice desactivada al 10%, empleando como eluyentes: hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt y AcOEt. En la tabla 3 se resume el proceso cromatográfico.

**Tabla 3.** Fraccionamiento primario de la fracción orgánica FOID.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-14	1-40	F1
Hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	15-34	41-55	F2
	80:20	35-54	56-81	F3
	70:30	55-64	82-94	F4
	50:50	65-82	95-105	F5
	30:70	83-121	106-124	F6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	122-133	125-130	F7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt	50:50	134-143	131-134	F8
AcOEt	100	144-148	135-137	F9
			138-143	F10
			144-148	F11

De la fracción **F2** se obtuvieron 43 mg de desmetilisoencecalina (**29**), PF= 102-103°C; este compuesto se comparó por CCD y CLAE con una muestra auténtica.

La fracción **F4** (225.7 mg) se analizó por CCA con 7.5 g de gel de sílice utilizando los mismos disolventes señalados en el inciso 4.3.2. El proceso cromatográfico se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Fraccionamiento secundario de **F4** de FOID.

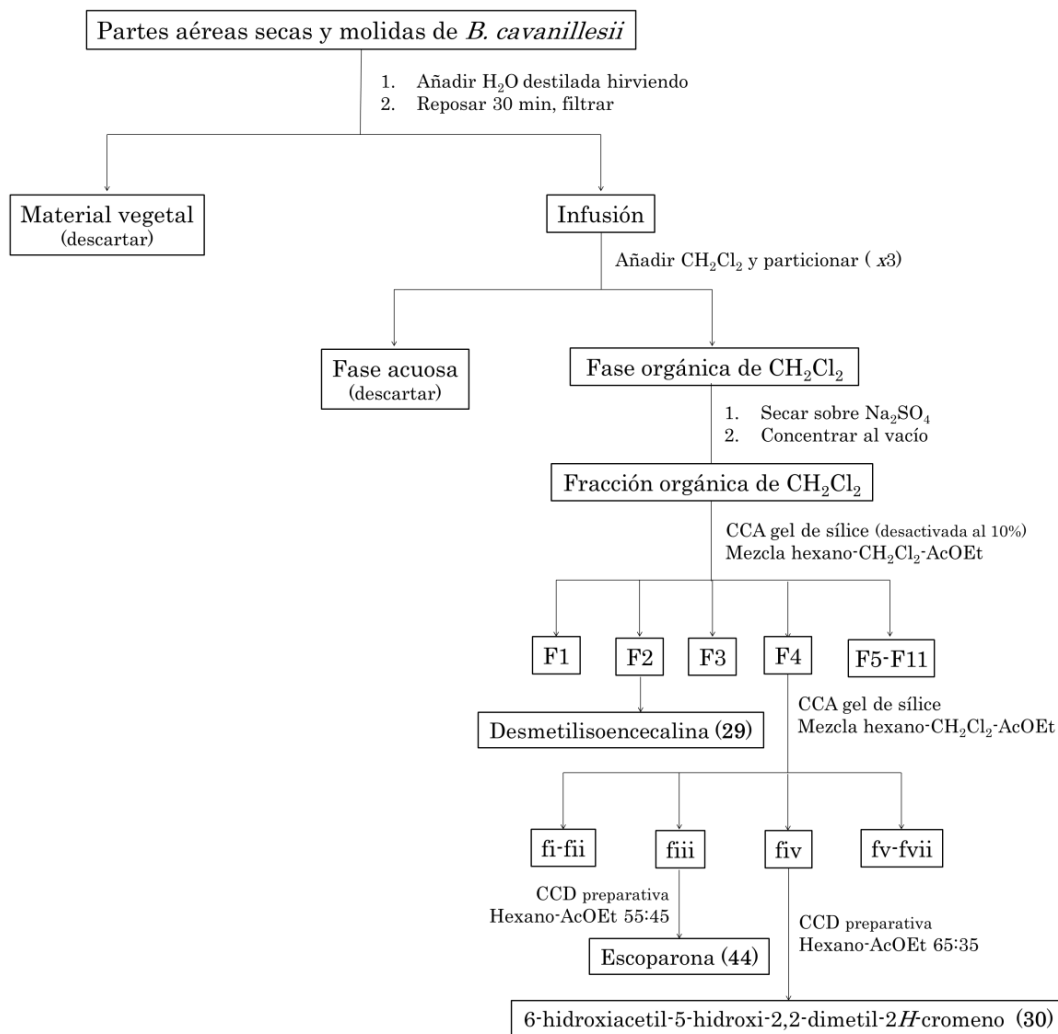
Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-8	1-4	fi
Hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	9-13	5-12	fii
		14-17	13-20	fiii
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	18-32	21-33	fiv
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -AcOEt	90:10	37-42	34-38	fv
		43-46	39-41	fvi
AcOEt	100	47-49	42-49	fvii

De la fracción **fiii** se aislaron 3.1 mg de la cumarina escoparona (**45**) por cromatografía preparativa en placa de gel de sílice; como eluyente se utilizó una mezcla de hexano-AcOEt 55:45. El compuesto se obtuvo bajo la forma de un sólido vítreo.

**6,7-dimetoxicromen-2-ona [Escoparona (44)].** C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>: IR (FTIR)  $\nu_{\max}$  2919, 2850, 1714, 1277, 1266, 1247 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.63 (H-4 d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 6.87 (H-5 s, 1H), 6.86 (H-8 s, 1H), 6.3 (H-3 d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 3.97

(OMe s, 3H), 3.94 (OMe s, 3H). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.4 (C-2), 152.9 (C-7), 150.0 (C-6), 146.4 (C-9), 143.3 (C-4), 113.6 (C-3), 111.4 (C-10), 108.0 (C-5), 100.0 (C-8), 56.4 (OMe). EM-IE m/z 206 [M<sup>+</sup>] (100%), 191, 163, 135, 107, 79, 69.

Además de **fiv** (66mg) se logró purificar 6.3 mg del cromeno **30** por cromatografía preparativa en placa de gel de sílice; como eluyente se utilizó una mezcla de hexano-AcOEt 65:35. Este compuesto se comparó por CLAE y CCD con una muestra auténtica (Figura 4).



**Figura 4.** Obtención de los cromenos **29**, **30** y la cumarina **44** del FOID.

4.4 Obtención de 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (30), carvacrol (45), 4',7-dimetilapigenina (46), rutina (5) y ácido clorogénico (15) a partir de un extracto orgánico íntegro [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1)] de *B. cavanillesii* (lote 36171)

La planta seca y molida (4.35 Kg) se sometió a una extracción por maceración con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) durante siete días; el proceso se repitió tres veces. La fase orgánica resultante se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y posteriormente, se eliminó el disolvente por evaporación al vacío. De este procedimiento se obtuvieron 415 g de extracto orgánico íntegro (EOI).

Se separaron 15 g de EOI por CCA sobre 500g de gel de sílice, utilizando como eluyentes: hexano, mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH y MeOH. En la tabla 5 se compendia el proceso cromatográfico.

**Tabla 5.** Fraccionamiento primario del extracto orgánico íntegro (EOI) de *B. cavanillesii*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave
Hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	1-10	1-12	F1EO
	70:30	11-47	13-25	F2EO
	50:50	48-76	26-28	F3EO
	30:70	77-120	29-54	F4EO
	100	121-133	55-65	F5EO
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	121-133	55-65	F5EO
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	134-169	66-80	F6EO
	100	170-180	81-89	F7EO
MeOH			90-109	F8EO
			110-115	F9EO
			116-124	F10EO
			125-142	F11EO
			143-166	F12EO
			167-170	F13EO
		171-180	F14EO	

De **F5EO** (19.3 mg) se obtuvieron 4.8 mg del 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (30), por cromatografía preparativa en placa de gel de sílice; como eluyente se utilizó una mezcla de hexano-AcOEt 85:15. Este compuesto se comparó por CLAE y CCD con una muestra auténtica.

La fracción **F3EO** (28.5 mg) fue sometida a CCA con 5 g de sílica gel y como eluyentes hexano y mezcla de hexano-AcOEt, como lo resume la tabla 6.

**Tabla 6.** Fraccionamiento secundario de las fracciones de F3EO de EOI.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave
Hexano	100	1-9	fI
Hexano- AcOEt	99:01	10-21	fII
	97:03	22-26	fIII
	90:10	27-31	fIV
	85:15	32-37	fV
	80:20	38-46	fVI
	70:30	47-48	fVII

De la fracción **fIII** se obtuvieron 4.6 mg de un líquido aceitoso incoloro y olor pungente, identificado como carvacrol (**45**).

**5-isopropil-2-metilfenol [carvacrol (45)].**  $C_{10}H_{14}O$ : IR (FTIR)  $\nu_{max}$  3424, 2955, 2919, 2850, 1725, 1456, 1180  $cm^{-1}$ . RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.04 (H-3 d,  $J=7.6$  Hz, 1H), 6.72 (H-2 y H-6 d,  $J=$  Hz, 1H), 6.66 (H-4 s, 1H), 4.62 (-OH s, 1H), 2.83 (H-7 m, 1H), 2.21 (H-10 s, 3H), 1.23 (H-8 y H-9 d,  $J=2.2$  Hz, 6H). EM-IE  $m/z$  150  $[M^+]$  (100%), 135  $[M-15]^+$ , 107  $[M-28-15]^+$ , 91, 77.

Asimismo de **F7EO**, se aisló un compuesto amarillo que precipitó espontáneamente, identificado como 4',7-dimetilapigenina (**46**, 6.2 mg). PF= 167-169° C.

**5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona [4',7-dimetilapigenina (46)].**  $C_{17}H_{14}O_5$ : IR (FTIR)  $\nu_{max}$  3070, 3051, 2917, 2849, 1664, 1603, 1509, 1442, 1382, 1338, 1314, 1297, 1270, 1162, 833. RMN- $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  12.81 (-OH, s, 1H), 7.85 (H-2' y H-6', d,  $J=9.2$  Hz, 2H), 7.02 (H-3' y H5' d,  $J= 8.8$  Hz, 2H), 6.58 (H-3 s, 1H), 6.49 (H-6 d,  $J=2.4$  Hz, 1H), 6.37 (H-8 d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 3.89 (7-OMe s, 3H), 3.88 (4'-OMe s, 3H). RMN- $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  182.3 (C-4), 167.2 (C-7), 163.8 (C-4'), 162.4 (C-2), 162.1 (C-9), 157.5 (C-5), 127.9 (C-2' y C-6'), 123.4 (C-

1'), 114.3 (C-3' y C-5'), 105.2 (C-10), 104.2 (C-3), 97.9 (C-6), 92.5 (C-8), 55.6 (7-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (4'-OCH<sub>3</sub>). EM-IE m/z 298 [M<sup>+</sup>] (100%), 269, 255, 117.

Igualmente de **F9EO** y de **F13EO** se obtuvo el ácido clorogénico (**15**, 4.5 mg) y la rutina (**5**, 5 mg) respectivamente. El primer compuesto se obtuvo puro en la fracción, mientras que el segundo compuesto precipitó espontáneamente. Ambos compuestos fueron caracterizados por comparación con una muestra comercial auténtica.

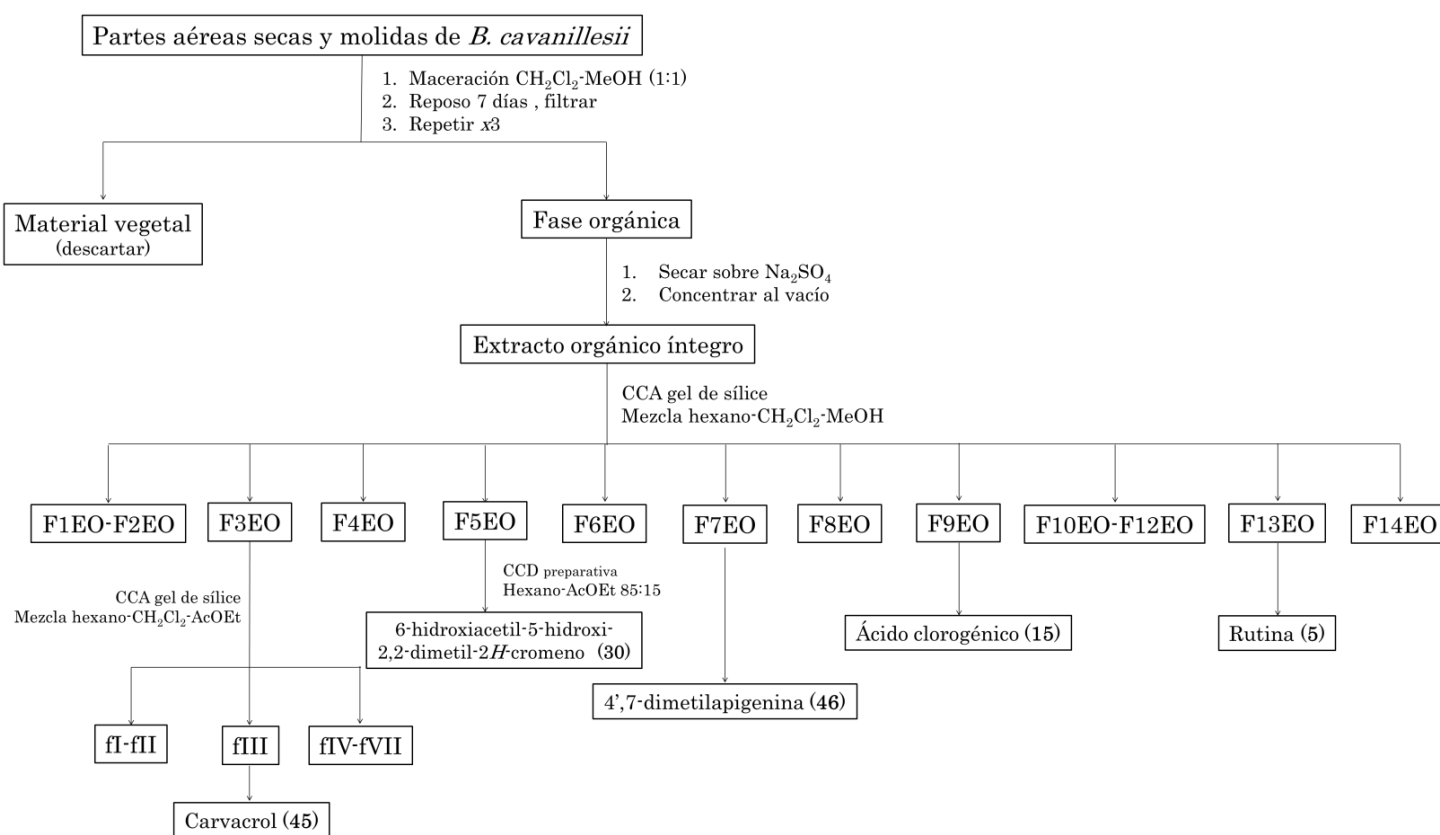


Figura 5. Obtención de los compuestos **30**, **45**, **46**, **5** y **15**.

#### 4.5 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de la infusión de *B. cavanillesii*.

60 g de planta molida (lote 2764) fueron tratados de la misma forma que FOID, descrito en el inciso 4.3.1, utilizando 1.5 L de agua destilada hirviendo.

El extracto acuoso resultante se sometió a un reparto con hexano; la fase orgánica se desecó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró por gravedad y al eliminar el disolvente se obtuvieron 76.23 mg de la fracción orgánica de la infusión obtenida por reparto con hexano (FOIH).

La FOIH fue analizada mediante CCD, empleando como fase móvil una mezcla de hexano-AcOEt 65:35. El cromatograma se comparó contra los estándares de cromenos **29** y **30**, previamente obtenidos, las muestras se disolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Para la CLAE se utilizó un sistema de elución en gradiente de acetonitrilo-ácido ortofosfórico 0.1% (Tabla 7), con un flujo de 0.7 mL/min. El establecimiento del perfil cromatográfico y la identificación de dos de los componentes mayoritarios presentes en FOIH se realizaron utilizando una Columna Waters Symmetry C8 (100Å) 5 $\mu\text{m}$ , 3.9mm x150 mm, los compuestos se detectaron a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 265 nm. Una vez filtradas las muestras (FOIH o compuestos) con un acrodisco de nylon, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución de cada muestra en el cromatógrafo. La identificación de los compuestos en el cromatograma se llevó a cabo por coelución, con base en el tiempo de retención y el enriquecimiento con cada uno de los compuestos aislados de *B. cavanillesii*. Con esta finalidad, se pesó 1 mg de los compuestos **29** y **30**, se disolvieron en 4 mL de ACN-H<sub>2</sub>O (65:35), asimismo se pesó 1 mg de extracto orgánico de hexano que se disolvió en 1mL de una mezcla ACN-H<sub>2</sub>O (65:35).

**Tabla 7.** Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLAE.

Tiempo	$\text{CH}_3\text{CN}$	Ácido ortofosfórico 0.1%
0	45	55
7	45	55
11	50	50
14	80	20
19	80	20
21	45	55
35	45	55

La adecuabilidad del sistema se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de una solución de la matriz de trabajo a la concentración de 1 mg/mL. Los parámetros de desempeño obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos de la selectividad ( $\alpha$ ), el factor de capacidad ( $k'$ ) y el número de platos teóricos (N) [Tabla 8].

**Tabla 8.** Determinación de la adecuabilidad del sistema cromatográfico.

Parámetros cromatográficos		
$\alpha$		2.69
$k'$	29	15.19
	30	5.64
N	29	6142
	30	769

#### 4.6 Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes de la infusión de *B. cavanillesii*.

La validación del método analítico se realizó con bases en los lineamientos establecidos por guías de validación ICH [Q2 (R1), 2005].

##### 4.6.1 Preparación de la solución stock, soluciones de trabajo y matriz.

Cada uno de los estándares (10 mg) se disolvió en 10 mL de ACN–H<sub>2</sub>O (65:35) [1 mg/mL], de esta solución stock se preparó una disolución con una concentración de 500  $\mu$ g/mL; de esta última se prepararon diferentes diluciones en un rango de 80 a 10  $\mu$ g/mL. El extracto orgánico se preparó bajo las mismas condiciones descritas en el punto 4.5 (FOIH). Este extracto (5 mg) se disolvió en 5 mL de ACN–H<sub>2</sub>O (65:35) [1 mg/mL]. Todas las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon.



#### 4.6.2 Selectividad

La evaluación de la selectividad del método se realizó mediante el registro de los espectros de UV de las muestras de cada uno de los estándares, compuestos **29** y **30**, la matriz de trabajo (FOIH) y la matriz enriquecida con los estándares. Las muestras correspondientes a los estándares se analizaron a la concentración de 60 µg/mL; la matriz de trabajo se analizó a una concentración de 1 mg/mL; por último, para medir los espectros de la matriz de trabajo enriquecida con cada estándar, la muestra se preparó añadiendo a una solución de 1.5 mg/mL de la matriz 60 µg de cada estándar.

#### 4.6.3 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada estándar con cinco niveles de concentración en el rango que se indica en la Tabla 9. Para la construcción de la curva de cada estándar se trabajó con una solución stock, tal como lo indica el punto 4.6.1.

**Tabla 9.** Rango de concentración para la determinación de la linealidad.

Estándar	Rango de linealidad (µg/mL)
<b>29</b>	20-65
<b>30</b>	10-80

El área bajo la curva (ABC) correspondiente a cada uno de los picos de cada estándar se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución. Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis por una prueba *t* de student para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad ( $H_0: R=0$ ;  $t_{0.975, 16} = 2.120$ , Cromeno **29**:  $t_{calculada}=121.633$ , Cromeno **30**:  $t_{calculada}=201.831$ ; en ambos casos se rechaza  $H_0$ ).

#### 4.6.4 Linealidad y exactitud del método.

La linealidad y exactitud del método se determinaron mediante la adición de tres diferentes concentraciones de los estándares a la matriz de trabajo (Tabla 10). Se evaluaron seis réplicas por concentración.

**Tabla 10.** Rango de concentración para la evaluación de la linealidad y exactitud del método.

Estándar	Rango de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
29	20-65
30	25-70

Los valores de ABC resultantes se interpolaron en las curvas de calibración desarrolladas para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) se analizaron para determinar los parámetros del análisis de regresión lineal simple ( $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $R \geq 0.99$ ,  $R^2 \geq 0.98$ ), así como el  $CV \leq 2\%$ . La exactitud del método se determinó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación, el cual se obtuvo enriqueciendo la matriz con cada estándar y empleando la siguiente fórmula:

$$RECUPERACIÓN(\%) = \frac{C_{me} - C_m}{C_a} * 100$$

Siendo  $C_{me}$  la concentración de la matriz enriquecida con el estándar,  $C_m$  la concentración de la matriz y  $C_a$  la concentración adicionada. Una vez obtenido el porcentaje de recuperación, se evaluó el  $CV (\leq 2\%$  en donde  $n=6$ ).

#### 4.6.5 Precisión.

La precisión se evaluó en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se determinó mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida (Tabla 11).

**Tabla 11.** Concentración de los estándares para la evaluación de la repetibilidad.

Estándar	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
29	50
30	60

La precisión intermedia se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la repetibilidad, aunque el análisis se efectuó durante dos días diferentes. Los resultados obtenidos se expresaron en términos del coeficiente de variación ( $\text{CV} \leq 2\%$ ).

#### 4.6.6 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de curvas de calibración con una serie de diluciones a partir de la solución stock. Las disoluciones empleadas contenían entre 4 y 12  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto **29**, y entre 2 y 8  $\mu\text{g/mL}$  del compuesto **30**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente a la referencia se graficó con respecto a la concentración en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3 \times \sigma}{b_1} \quad LC = \frac{10 \times \sigma}{b_1}$$

Donde  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar de la respuesta analítica y  $b_1$ , como ya se mencionó, corresponde a la pendiente de la recta para cada curva de calibración.

#### 4.6.7 Estabilidad.

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de cada uno de ellos en muestras preparadas a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  sometidas a condiciones de refrigeración, 37°C y ambientales, analizados por triplicado. Las mediciones se obtuvieron a las 24, 48 y 72 horas.

El resultado de la condición de almacenamiento se expresa como la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial  $|di|$  [Basado en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del CNQFB A. C. (2002)].

#### 4.7 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en la infusión de *B. cavanillesii*.

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar el contenido de cromenos **29** y **30** en ocho muestras diferentes. De la planta seca y molida se tomaron tres porciones de 8 g, posteriormente se trataron con agua a punto de ebullición (100 mL) por un periodo de 30 minutos, luego se filtraron por gravedad y después se sometieron a un reparto con 100 mL de *n*-hexano por triplicado. Cada una de las fases orgánicas resultantes se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y a continuación se eliminó el disolvente por evaporación al vacío. Este mismo procedimiento se realizó para cada lote estudiado.

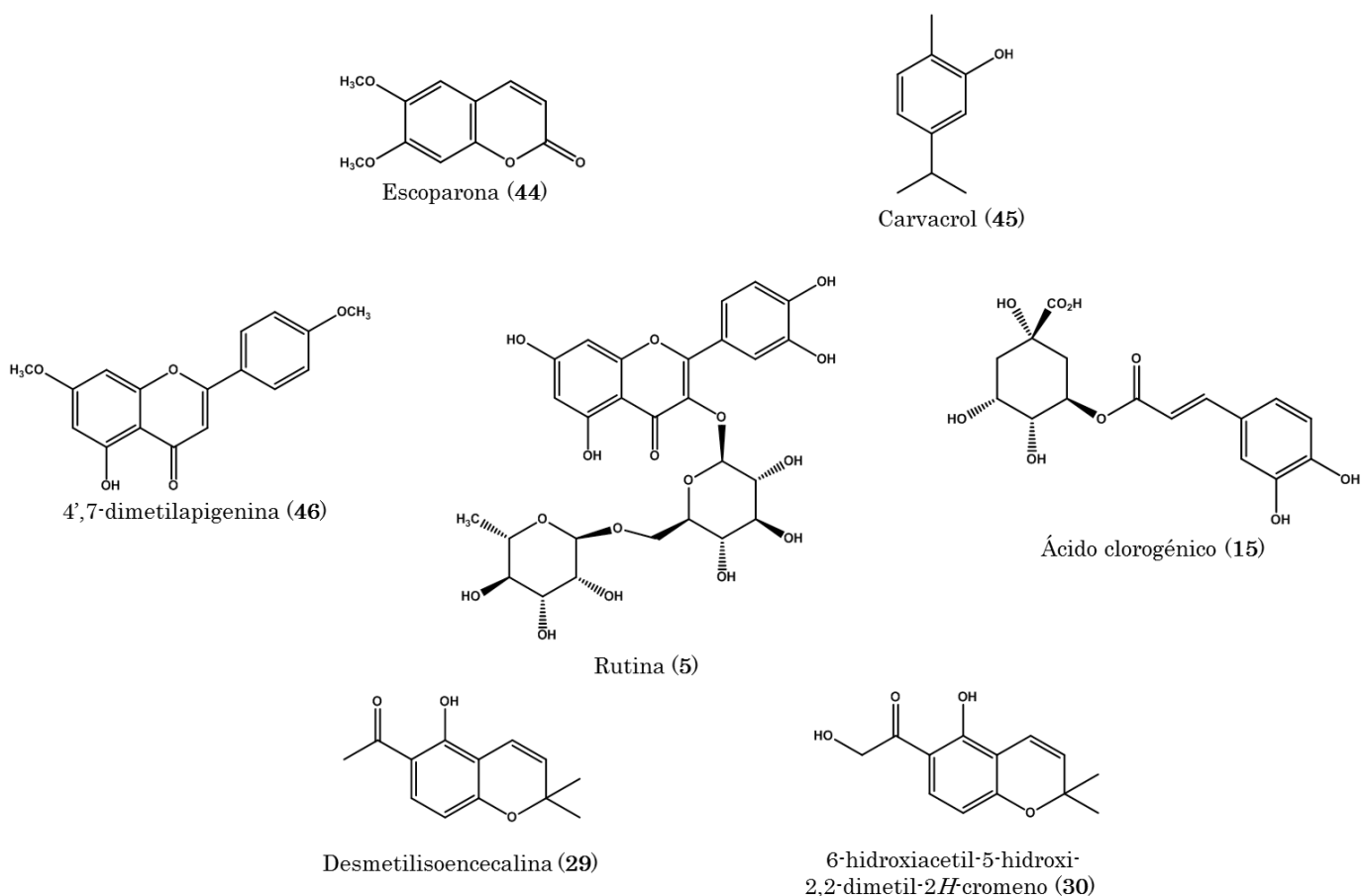
Cuatro miligramos de tres extractos preparados de manera independiente, de cada muestra de droga cruda de *B. cavanillesii* (TH, PS, PB, PA y PM) se

disolvieron en 1 mL de ACN-H<sub>2</sub>O 65:35 (4 mg/mL), mientras que para los lotes 36056, 36171 y 2764 la concentración utilizada fue de 1 mg/mL. Los compuestos presentes se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico, utilizando las condiciones indicadas en la Tabla 7. La concentración de los cromenos **29** y **30** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta, obtenidas a partir de las curvas de calibración diseñadas en la evaluación de la linealidad del sistema.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Brickellia cavanillesii* es una especie de amplio uso en las prácticas médicas populares de México para el tratamiento de la diabetes y gastritis. De ahí, la necesidad de contar con metodologías analíticas que permitan determinar los parámetros de calidad de la planta, incluyendo sus perfiles cromatográficos y pruebas de composición. Para este último cometido, en la primera fase del presente estudio se obtuvieron los cromenos **29** y **30** que luego se emplearon en la segunda fase como estándares para el desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE). Estos dos productos son algunos de los principios hipoglucemiantes y antihiperoglucémicos de la planta.

La combinación de los procedimientos cromatográficos convencionales descritos en la parte experimental, permitió obtener cinco compuestos adicionales, durante el proceso de aislamiento de **29** y **30**, tres de ellos novedosos en la planta, además del ácido clorogénico (**15**) y la rutina (**5**). Los metabolitos novedosos en la planta fueron: escoparona (**44**), carvacrol (**45**) y 4',7-dimetilapigenina (**46**). La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas previamente en la literatura o por comparación de sus propiedades con aquellas de muestras auténticas. En la Figura 6 se indican sus estructuras. Los espectros de IR y RMN utilizados para su caracterización se incluyen en el ANEXO 1.

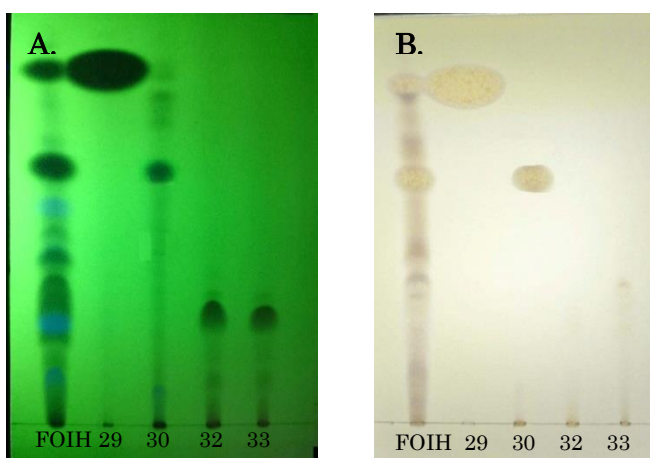


**Figura 6.** Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de *B. cavanillesii* en el presente estudio

### 5.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de la infusión de *B. cavanillesii*.

Una vez obtenidos los productos naturales se procedió al establecimiento de los perfiles cromatográficos de la fracciones hexánica (FOIH) y de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (FOID), obtenidas de la infusión tras un reparto con hexano y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , respectivamente. Ambas fracciones se analizaron por CCD utilizando cromatofolios de aluminio cubiertos de gel de sílice y diferentes sistemas de elución; el mejor eluyente fue hexano-AcOEt 65:35. El mejor perfil se obtuvo para FOIH debido a su menor complejidad. La cromatoplaca resultante se

visualizó con una lámpara de UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) y se reveló con una solución de sulfato cérico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. En la placa se observa que el producto mayoritario corresponde principalmente a la desmetilisoencecalina (**29**) con un factor de retención ( $R_f$ ) de 0.86. También fue posible detectar con facilidad dos de las lactonas sesquiterpénicas, las caleínas A (**32**) y C (**33**) con  $R_f$  de 0.42 y 0.36, respectivamente; por último se observó, el cromeno **30** con un  $R_f$  de 0.69. Las lactonas fueron aisladas previamente de la planta por Escandon-Rivera y colaboradores. (2012).

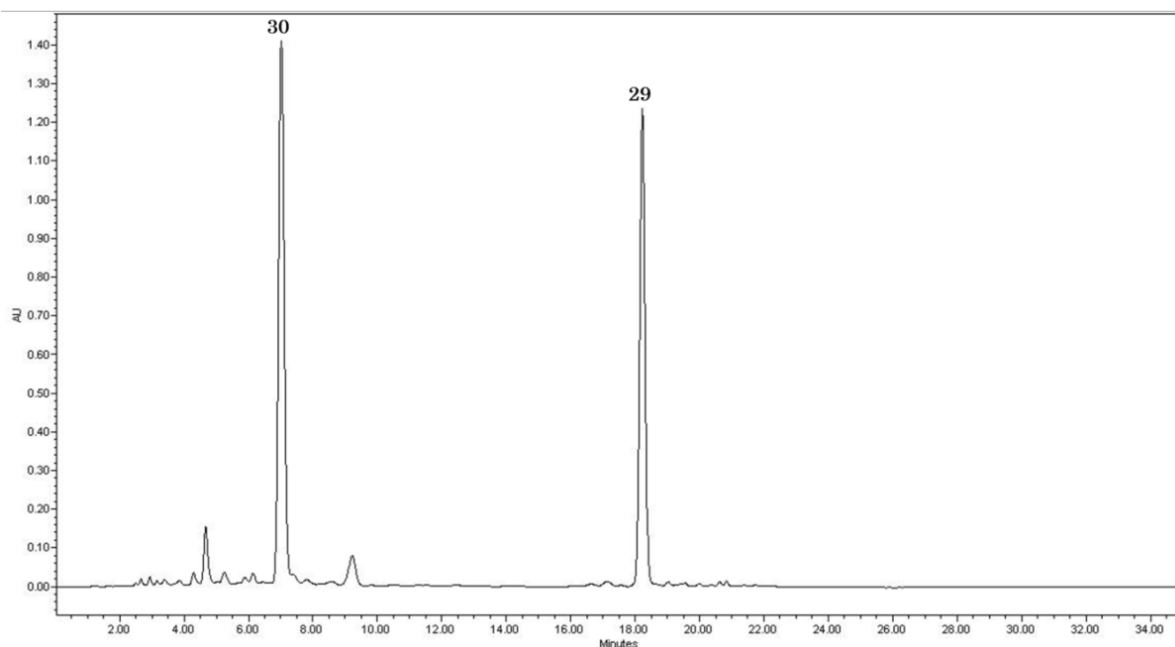


**Figura 7.** Cromatograma de FOIH y sus compuestos mayoritarios, visto con **A.** lámpara de UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ); **B.** agente revelador sulfato cérico.

Para establecer el perfil por CLAE se seleccionó también FOIH. La mejor fase estacionaria fue una columna de gel de sílice fase reversa (Symmetry C8). Se ensayaron diferentes mezclas de disolventes (MeOH-H<sub>2</sub>O, MeOH-ACN-H<sub>2</sub>O y ACN-H<sub>2</sub>O) y varios gradientes de elución. El mejor resultado se obtuvo con la mezcla compuesta por H<sub>2</sub>O y ACN utilizando un gradiente de elución (Tabla 7). La adición de diferentes ácidos orgánicos e inorgánicos a la fase móvil mejoró la resolución y la forma de los picos; se ensayaron distintas concentraciones de los ácidos fórmico (0.1-0.5%), acético (0.1-2%), ortofosfórico (0.1-0.5%) y trifluoroacético (0.1-0.05%), los cuales fueron adicionados al agua. Los mejores

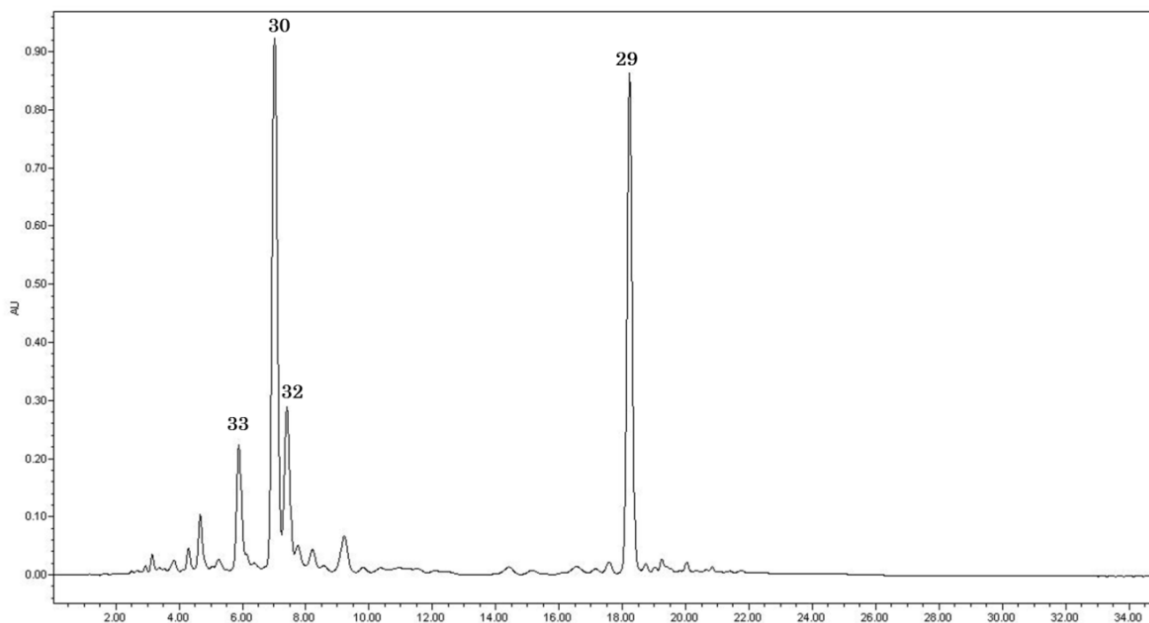


resultados se observaron con ácido ortofosfórico en una concentración de 0.1 %. La acidificación de la fase móvil posiblemente mejoro la resolución debido a la supresión iónica (Quattrocci, *et al.* 1992). La velocidad de flujo se estableció por ensayo y error; se analizaron flujos entre 0.3 y 0.7 mL/min; el mejor flujo fue el 0.7 mL/min. La longitud de onda utilizada fue de 265 nm. Las condiciones seleccionadas permitieron una buena separación de los picos de interés. En el perfil cromatográfico de FOIH se identificaron los cromenos **29** y **30** mediante la técnica de coelución. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Perfil cromatográfico de FOIH a 265 nm. Columna Waters® Symmetry Cs (100Å, 5µm, 3.9mm x150 mm). Flujo 0.7 mL/min.

Cuando se utilizaron las mismas condiciones arriba descritas, variando únicamente la longitud de onda a 245 nm, fue posible generar el cromatograma que se indica en la Figura 9. Donde además de observarse los cromenos **29** y **30**, se observan las caleínas A (**32**) y C (**33**), identificadas también por la técnica de coelución del estándar.



**Figura 9.** Perfil cromatográfico de FOIH a 245 nm. Columna Waters® Symmetry C<sub>8</sub> (100Å, 5µm, 3.9mm x150 mm). Flujo 0.7 mL/min.

## 5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes de la infusión de *B. cavanillesii*.

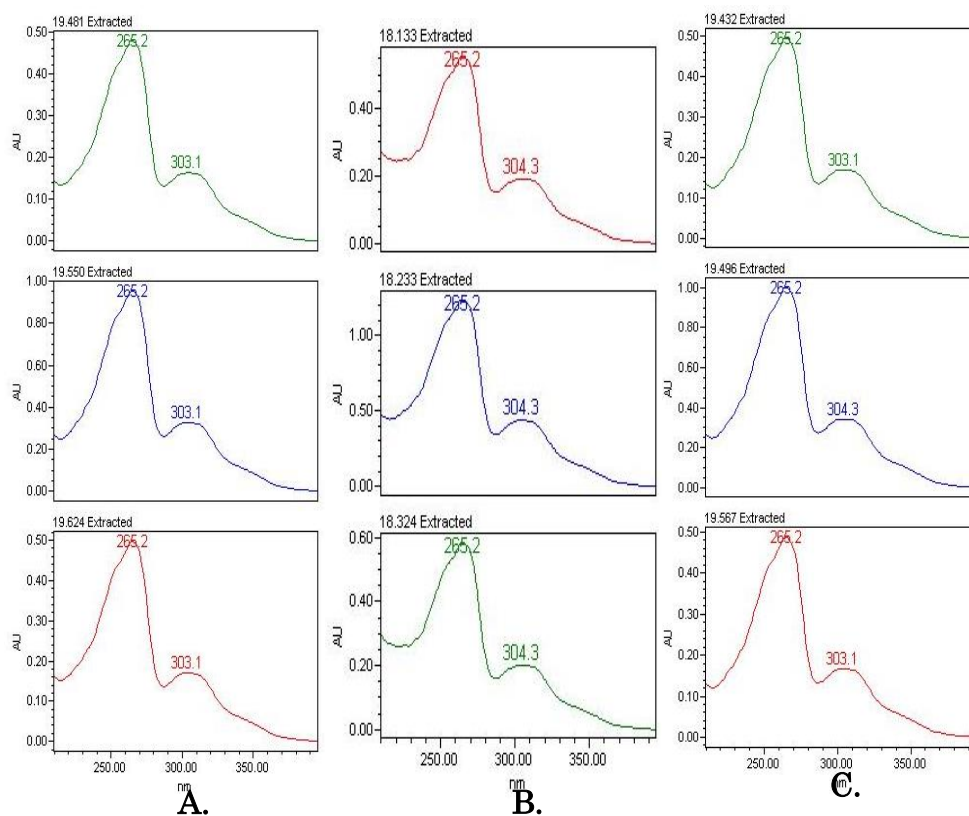
Una vez establecidos los perfiles cromatográficos se procedió a la validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de los cromenos **29** y **30**. En el presente estudio, los parámetros de calidad fueron evaluados de acuerdo a la Guía de Validación ICH [Q2 (R1), 2005]. Estos productos se seleccionaron como marcadores por su excelente actividad hipoglucemiante, su alto rendimiento y su buena estabilidad química durante el tiempo de análisis. A continuación se describe el proceso de validación.

### 5.2.1 Selectividad.

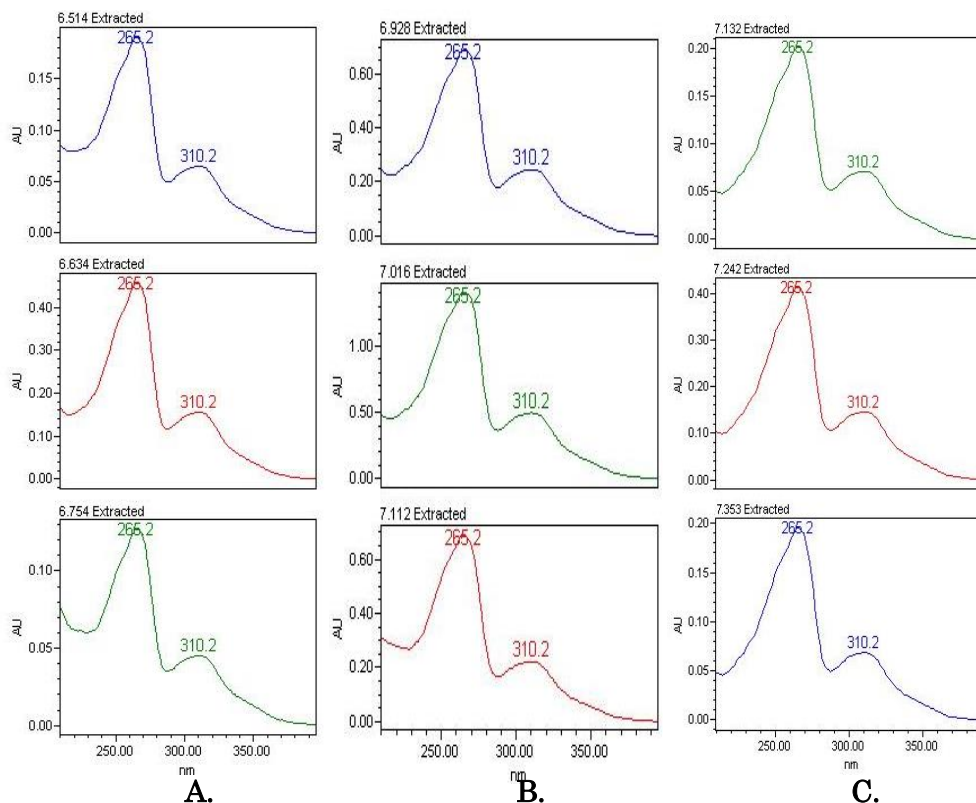
Un método es selectivo si la respuesta analítica obtenida de su aplicación se relaciona exclusivamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en la muestra de análisis [ICH Q2(R1), 2005)]. La selectividad se

evaluó mediante el registro de los espectros de UV de las muestras de cada uno de los estándares, la matriz de trabajo (FOIH) y la matriz enriquecida con los estándares.

Los resultados obtenidos (Figuras 10 y 11) permiten establecer que los máximos de absorción de los espectros obtenidos al 50% y 100% de altura de cada pico son los mismos, garantizando la pureza del pico en todas las muestras; la adición de cada uno de los estándares a la matriz de trabajo, produjo un incremento en la respuesta analítica de igual manera sin modificar los máximos de absorción.



**Figura 10.** Espectros de UV del cromeno **29**. **A.** Desmetilsoencecalina (**29**); **B.** Matriz enriquecida con el cromeno **29**; **C.** Desmetilsoencecalina (**29**) presente en matriz.



**Figura 11.** Espectros de UV del crotono **30**. **A.** 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-crotono (**30**); **B.** Matriz enriquecida con el crotono **30**; **C.** Crotono **30** presente en matriz.

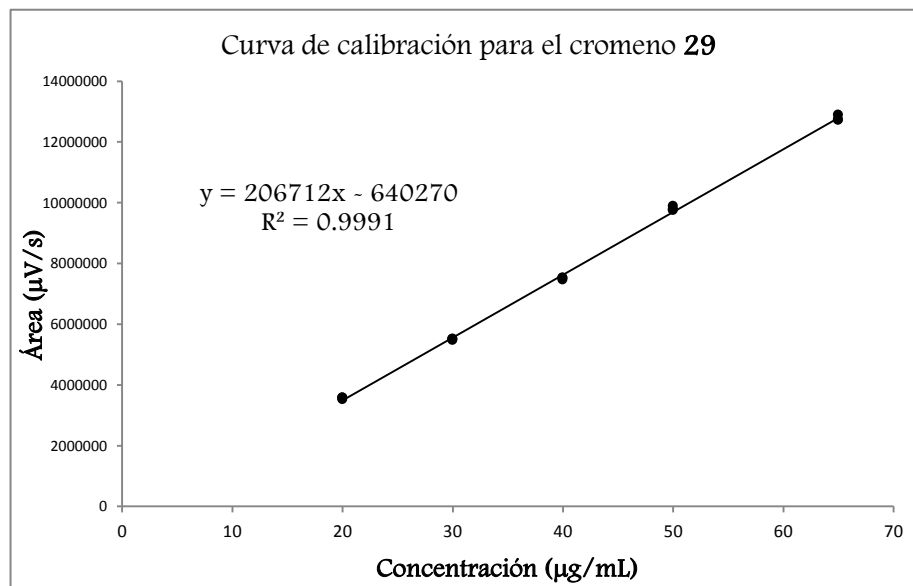
### 5.2.2 Linealidad del sistema.

La linealidad de un sistema se determina cuando las respuestas analíticas que provienen del mismo, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (EURACHEM, 1998; ICH Q2 (R1), 2005). La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada estándar con cinco niveles de concentración. Los compuestos utilizados durante el desarrollo del método analítico tienen una pureza mayor al 95 % de acuerdo con los análisis cromatográficos y espectroscópicos correspondientes. Los resultados de las curvas de calibración se resumen en la Tabla 12 y en las Figuras 12 y 13. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple,

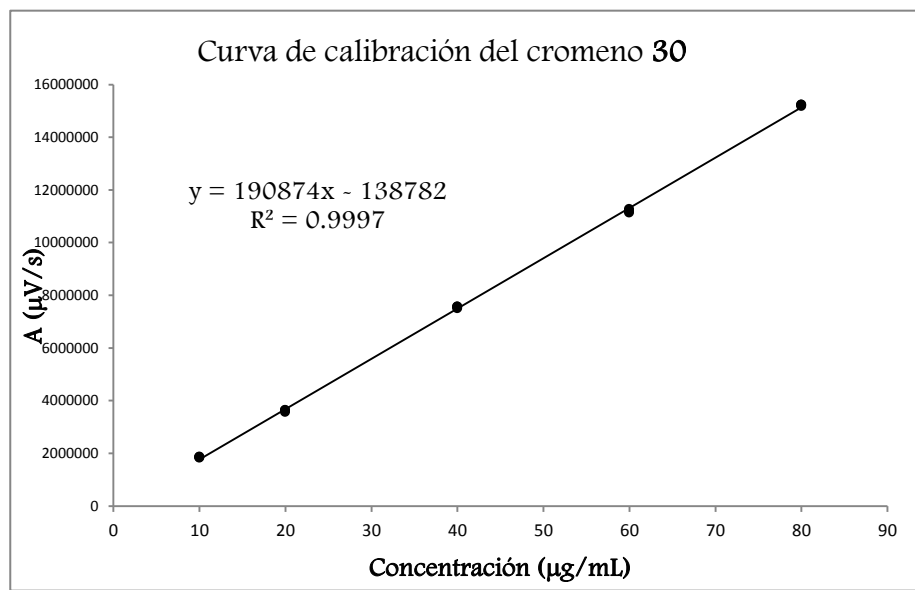
permitiendo establecer la linealidad del sistema cromatográfico en el intervalo de concentraciones analizadas.

**Tabla 12.** Valores obtenidos para cada curva de calibración de los cromenos **29** y **30**.

Cromeno 29			Cromeno 30		
C (µg/mL)	A (µV/s)	CV (%)	C (µg/mL)	A (µV/s)	CV (%)
65	12737372	0.7	80	15223547	0.2
65	12725430		80	15174929	
65	12891596		80	15229100	
50	9787919	0.7	60	11268423	0.6
50	9751468		60	11130371	
50	9887166		60	11187371	
40	7526238	0.5	40	7559549	0.5
40	7471903		40	7493471	
40	7536967		40	7551869	
30	5510174	0.4	20	3636113	1.0
30	5477272		20	3564880	
30	5524137		20	3620120	
20	3580878	0.9	10	1817625	1.2
20	3529714		10	1860176	
20	3585454		10	1851171	



**Figura 12.** Gráfica para la evaluación de la linealidad de sistema para el cromeno **29** (desmetilisoencecalina).



**Figura 13.** Gráfica para la evaluación de la linealidad de sistema para el cromeno **30** (6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno).

Los datos para evaluar la linealidad del sistema se procesaron empleando el software Microsoft Office Excel 2010, así se obtuvo la ecuación de la recta de la forma  $y=b_1x+b_0$ , donde  $y$  representa el área bajo la curva ( $\mu\text{V/s}$ ),  $x$  a la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $b_1$  corresponde a la pendiente de la recta y  $b_0$  a la ordenada al origen.

### 5.2.3 Linealidad y exactitud del método.

La linealidad del método se evaluó con las curvas de calibración construidas a partir de diferentes concentraciones de los estándares que enriquecieron a la matriz de trabajo. Las concentraciones de trabajo para el cromeno **29** se encontraron en un intervalo entre 20 a 65  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para **30** se encontraron en un intervalo de 25 a 70  $\mu\text{g/mL}$ . En las Tablas 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos para evaluar la linealidad del método, el ajuste de datos se realizó mediante regresión lineal simple. Las Figuras 14 y 15 corresponden a las gráficas de linealidad del método y los parámetros

estadísticos calculados se presentan en la Tabla 15. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el método analítico es lineal [ICH Q2 (R1), 2005].

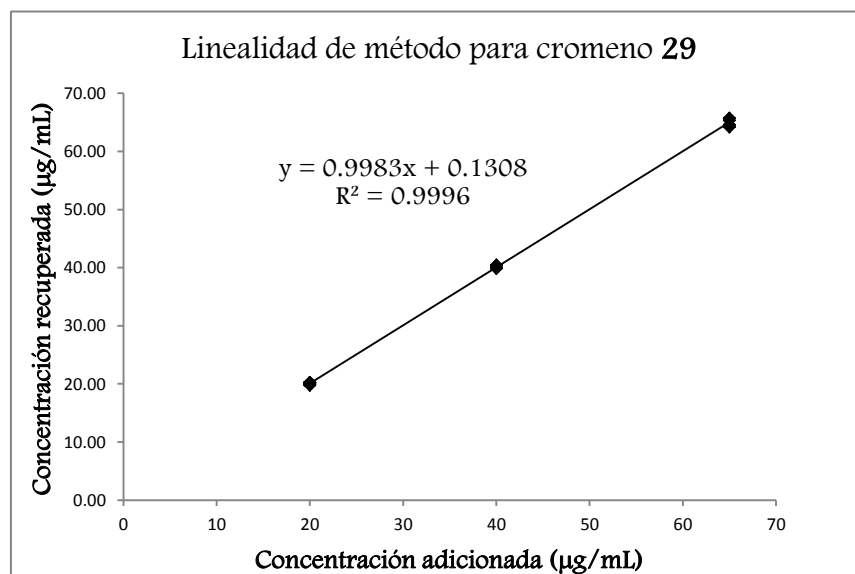
La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las Tablas 13 y 14. Los resultados obtenidos para los cromenos **29** y **30** se encuentran dentro de los límites establecidos por la guía de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%) por lo que el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas.

**Tabla 13.** Valores obtenidos para la linealidad y exactitud de método del cromeno **29**.

$C_{\text{adicionada}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área ( $\mu\text{V/sec}$ )	$C_{\text{recuperada}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	% recobro	CV (%)
65	12928856	65.64	100.99	1.0
65	12863680	65.33	100.50	
65	12701336	64.54	99.30	
65	12935824	65.68	101.04	
65	12706289	64.57	99.33	
65	12626142	64.18	98.74	
40	7688350	40.29	100.73	0.6
40	7719135	40.44	101.10	
40	7697599	40.34	100.84	
40	7603118	39.88	99.70	
40	7629394	40.01	100.01	
40	7594351	39.84	99.59	
20	3506683	20.06	100.31	1.1
20	3542189	20.23	101.17	
20	3432689	19.70	98.52	
20	3543831	20.24	101.21	
20	3539315	20.22	101.10	
20	3471318	19.89	99.45	

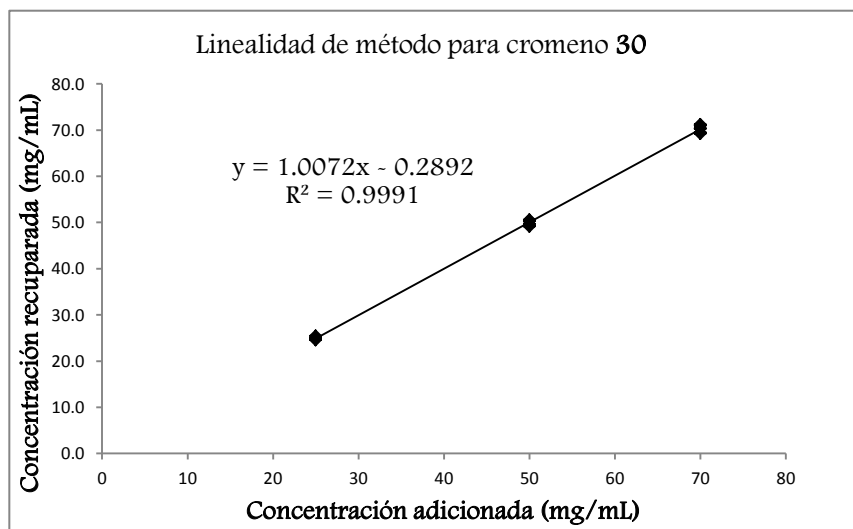
**Tabla 14.** Valores obtenidos para la linealidad y exactitud de método del cromeno **30**.

C <sub>adicionada</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área ( $\mu\text{V/sec}$ )	C <sub>recuperada</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	% recobro	CV (%)
70	13128856	69.5	99.29	1.1
70	13463640	71.3	101.80	
70	13407536	71.0	101.38	
70	13309824	70.5	100.65	
70	13076282	69.2	98.90	
70	13273142	70.3	100.37	
50	9501815	50.5	101.01	1.2
50	9298350	49.4	98.88	
50	9347591	49.7	99.39	
50	9243115	49.1	98.30	
50	9529371	50.6	101.30	
50	9462758	50.3	100.60	
25	4556683	24.6	98.40	1.1
25	4640931	25.0	100.16	
25	4596680	24.8	99.24	
25	4718639	25.4	101.79	
25	4607913	24.9	99.47	
25	4611082	24.9	99.54	



**Figura 14.** Análisis de regresión lineal del método para el cromeno **29** (desmetilisoencecalina).





**Figura 15.** Análisis de regresión lineal del método para el cromeno 30 (6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno).

**Tabla 15.** Parámetros calculados para la evaluación de la linealidad de método del cromeno 29 y 30.

Parámetro calculado	Cromeno 29	Cromeno 30
<b>b<sub>0</sub></b>	0.1308	-0.2892
<b>b<sub>1</sub></b>	0.9983	1.0072
<b>R</b>	0.9998	0.9996
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9996	0.9991

#### 5.2.4 Precisión.

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

La precisión se determinó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis [EURACHEM, 1998. ICH Q2 (R1), 2005].

La repetibilidad y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida. El análisis se efectuó en dos días diferentes. Los resultados obtenidos (Tabla 16) se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

**Tabla 16.** Evaluación de la repetibilidad y precisión intermedia.

Analito	Concentración (µg/mL)	Repetibilidad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
29	50	0.7	0.6
30	60	0.9	0.9

El coeficiente de variación (CV) calculados para este análisis no exceden el 2% ( $CV \leq 2\%$ ), por lo que el método analítico es preciso.

### 5.2.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación.

El límite de detección (LD) de un método representa la mínima concentración de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) establece la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (EURACHEM, 1998; ICH Q2 (R1), 2005). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de curvas de calibración con tres niveles de concentraciones comprendidas entre un rango de 4 y 12 µg/mL del compuesto 29 y entre 2 y 8 µg/mL del compuesto 30.

**Tabla 17.** Límites de Detección y Límites de Cuantificación de los estándares **29** y **30**.

Analito	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LC ( $\mu\text{g/mL}$ )
29	0.3	0.1
30	0.8	0.3

### 5.2.6 Estabilidad.

El objetivo de los estudios de estabilidad, es reportar como la concentración de una muestra varía con el tiempo bajo diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura, luz-obscuridad, etc.) y/o condiciones químicas. Esta concentración debe permanecer constante.

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de cada uno en las muestras preparadas a una concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$ , y sometidas a condiciones de refrigeración, temperatura ambiente y  $37^\circ\text{C}$ . Las muestras se analizaron por triplicado y las mediciones se obtuvieron a las 24,48 y 72 horas.

El resultado de la condición de almacenamiento se expresa como la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial  $|d_i|$ . Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Estabilidad de los estándares bajo condiciones de temperatura.

Temperatura	% $ d_i $ <b>29</b>			% $ d_i $ <b>30</b>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Refrigeración	0.19	0.76	1.79	0.03	0.27	0.30
$37^\circ\text{C}$	0.10	1.07	2.56	0.28	0.35	0.42
Ambiental	0.44	1.65	2.03	0.13	0.32	0.33

Los resultados obtenidos de esta prueba demuestran que la mejor condición de almacenamiento para ambos cromenos (**29** y **30**) es en refrigeración; las variaciones que presenta el  $|d_i|$  del compuesto **29** después de las 24 horas, puede deberse a la precipitación de la muestra, ya que el perfil no mostró la

formación de otros picos y probablemente no sea un proceso de degradación o descomposición.

### 5.2.7 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en la infusión de *B. cavanillesii*.

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar el contenido de los cromenos **29** y **30** en ocho muestras diferentes, para ello se prepararon por triplicado, de manera independiente y bajo las mismas condiciones, sus respectivas infusiones. Luego del reparto con hexano se obtuvieron las correspondientes fracciones orgánicas de la infusión. El rendimiento de esta fracción en cada caso, por gramo de droga cruda, se resume en la Tabla 19 (ver punto 4.1 del desarrollo experimental).

**Tabla 19.** Rendimiento de las fracciones orgánicas.

Lote	Droga vegetal (g)	Fracción orgánica (g)	Rendimiento (%)
2764	8	0.0106	0.132
36059	8	0.0028	0.035
36171	8	0.0132	0.495
TH	8	0.0111	0.138
MS	8	0.0264	0.330
MB	8	0.0305	0.382
PA	8	0.0253	0.317
PM	8	0.0190	0.237

Para la cuantificación de los estándares **29** y **30**, presentes en la droga cruda, se emplearon las ecuaciones de las rectas descritas para la linealidad del sistema:  $y = 206712x - 640270$  para el cromeno **29**;  $y = 190874x - 138782$  para el cromeno **30** (Tabla 20).

**Tabla 20.** Cuantificación de los metabolitos 29 y 30 en ocho muestras de prodigiosa

Lote	Cromeno 29	Cromeno 30
2764	58.04±1.62	40.90±1.10
36059	21.91±1.07	22.74±1.62
36171	7.74±0.89	28.99±1.23
TH	8.46±1.48	5.04±1.28
MS	nd	nd
MB	nd	nd
PA	nd	nd
PM	nd	nd

nd=no detectado

De acuerdo a los resultados, sólo los lotes recolectados de manera silvestre (2764, 36059 y 36171), y la muestra comercial Té Hamula (TH) presentaron ambos cromenos. En las otras cuatro muestras estos cromenos no se detectaron. De estas cuatro muestras solo MB y MS contenían lactonas sesquiterpénicas (compuestos **31** y **32**), vistos a 245 nm.

La diferencia en el contenido de estos metabolitos en los diversos lotes de droga cruda se puede deber a diversos factores, entre ellos los ontogénicos, estacionales, ambientales, y geográficos, por mencionar algunos. En el caso de los lotes silvestres, las muestras fueron recolectadas en el mismo lugar, pero en diferentes épocas y años. Cabe mencionar, además, que la forma en que se cultivó, recolectó y almacenó cada lote, puede incidir en la conservación de los metabolitos, de aquí la importancia de contar con procesos de control de calidad desde estas etapas (Barandanayake, 2006). La variación observada puede deberse también, a la sustitución parcial o total de la droga cruda por otra con una morfología similar (Figura 16).



**Figura 16.** Fotografías de cuatro lotes diferentes de la droga

## 6. CONCLUSIONES

- El estudio químico realizado sobre la droga cruda de *B. cavanillesii* permitió el aislamiento de siete compuestos: la desmetilisoencecalina (**29**), el 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**30**), la rutina (**5**), el ácido clorogénico (**15**), la escoparona (**44**), el carvacrol (**45**) y el flavonoide 4',7-dimetilapigenina (**46**). Los tres últimos se reportan por vez primera en la planta. Los cromenos **29** y **30** son algunos de principios responsables de la actividad hipoglucemiante y antihiperoglucémica de la prodigiosa.
- Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de la fracción hexánica de la infusión por CCD y CLAE, en los cuales se identificó la presencia de los cromenos **29** y **30** y las lactonas sesquiterpénicas **31** y **32**. Estos perfiles constituyen una prueba de identidad para la droga cruda de *B. cavanillesii* y una herramienta fundamental en su control de calidad.
- Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar el contenido de dos de los marcadores activos presentes mayoritariamente en la infusión, los cromenos **29** y **30**. Estos productos fueron seleccionados como marcadores activos por su alto rendimiento, estabilidad química y su actividad hipoglucemiante. El método analítico resultó selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones ensayadas y puede ser aplicado para el control de la calidad de la droga cruda de *B. cavanillesii*.
- Se compararon los perfiles cromatográficos de ocho muestras de la droga cruda de *B. cavanillesii*, tres de las cuales fueron recolectadas en el mismo sitio, aunque en diferentes meses y años; las otras cinco se compraron en diversos mercados de la Ciudad de México.

- Los resultados generados sobre la identidad y la composición de la droga cruda de *B. cavanillesii* aportan información científica para el aseguramiento de la calidad y de utilidad en la generación de su monografía tipo OMS y farmacopéica para su inclusión en la tercera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

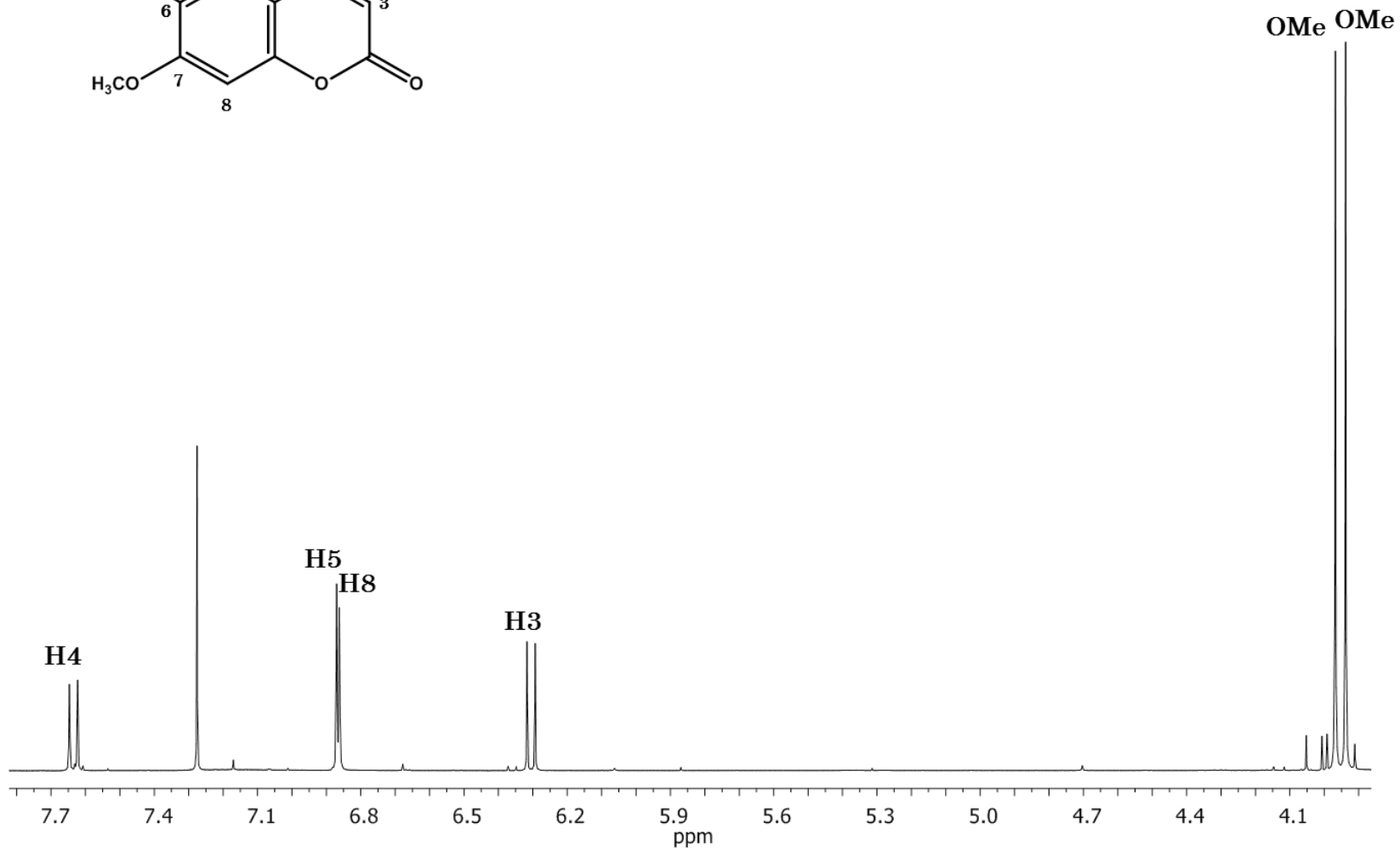
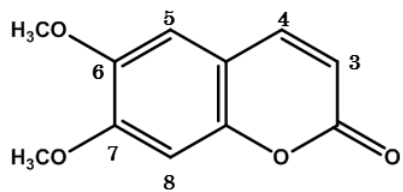
- Aguirre Crespo, F., Castillo España, P., Villalobos Molina, R., López Guerrero, J., Estrada Soto, S. (2005). Vasorelaxant effect of mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmaceutical Biology*. 43, 6, 540–546.
- Anales del Instituto Médico Nacional (1894). Continuación de “El Estudio”. Oficina tipográfica de la secretaría de fomento.
- Anales del Instituto Médico Nacional (1905). Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento. Abril.
- Anales del Instituto Médico Nacional (1907). Tomo VII; Oficina tipográfica de la secretaría de fomento.
- Andrade-Cetto A., Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325-348.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. Acceso en julio 2014. ([www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=ProdigioPr&id=7752](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=ProdigioPr&id=7752) y [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Prodigiosa&id=7753](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Prodigiosa&id=7753)).
- Ashnagar, A., Gharib Naseri, N., Ramazani, M. (2011). Characterization of the major chemical compounds found in *Thymus vulgaris* plant grown wildly in Chahar Mahal and Bakhtiari province of Iran. *International Journal of ChemTech Research*, 3 (1), 455–458.
- Azimova S. S., Saidkhodzhaev A. I. (Ed.). (2013). Physicochemical and Pharmacological Properties of Sesquiterpene Esters-Acyclic en Natural compounds. Natural sesquiterpen esters. Plant sources, structure and properties. Springer. 152–171.
- Bandaranayake, W. M. (2006). Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. En: *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants Into Drugs*. Ahmad, I. Aqil, F., Owais, M., (Editores). Wiley-VCH. Weinheim.

- Bohlmann F., Zdero Ch. (1976). Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 58. Über Inhaltsstoffe der Gattung *Brickellia*. *Chemische Berichte*. 109, 1436–1445.
- Cañigueral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*. 2(2), 101–121.
- Cañigueral, S., Vila, R. (2003). La Fitoterapia racional. En: Vanaclocha B, Cañigueral S. (Eds.). *Fitoterapia: Vademécum de prescripción*. 4<sup>a</sup> Ed. Barcelona: Editorial Masson, pp. 15–27.
- Cañigueral, S., Vila, R. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 6, 43–51.
- Cañigueral, S. (2006). PLO2 Las monografías de calidad seguridad y eficacia en el uso racional de los preparados a base de plantas medicinales. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia. *Revista de Fitoterapia*. 6 (S1), 25–29.
- Cortez Gallardo V., Macedo Ceja, J. P., Hernández Arroyo M., Arteaga Aureoles G., Espinosa Galván D., Rodríguez Landa J. F. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*, 15 (2), 123–136.
- <http://data.gbif.org/species>. *B. cavanillesii*- GBIF Portal.pdf. Acceso en septiembre de 2014.
- Flores S. E., Herrán J. (1958). The structure of pendulin and penduletin: a new flavone glucoside isolated from *Brickellia pendula*. *Tetrahedron*. 2, 308–315.
- Flores S. E., Herrán J. (1960). Atanasin: a new flavone isolated from *Brickellia squarrosa* (Cav.) Robinson. *Chem & Ind*. 12, 291.
- Efferth T., Greten H. J. (2012). Quality control for medicinal plants. *Medicinal & Aromatic Plants*, 1 (7), 1–3.
- Escandón Rivera S., González Andrade M., Bye R., Linares E., Navarrete A., Mata R. (2012).  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from *Brickellia cavanillesii*. *Journal of Natural Products*, 75, 968–974.
- Escandón Rivera S. (2013). Efectos hipoglucemiantes y antihiperglucémicos de preparados y compuestos de la especie *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae). Tesis de doctorado UNAM.

- Eshiet E. R., Jinqiu Z., Anderson T. A., Smith E. E. (2013). Chemical characterization of *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae) using gas chromatographic methods. *Food Science and Nutrition*, 2(2), 105–113.
- Eshiet E. R., Jinqiu Z., Smith E. E. (2014). Lyophilized tea extracts of *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae): In Vitro Characterization of biological activity. *Journal of Food Science*. 79 (7), T1454–T1461.
- EURACHEM (1998). Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados. Segunda Edición. Traducción realizada por el CENAM.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2013. Secretaría de Salud. México DF.
- García Nolck C. E. (2014). Caracterización de los compuestos volátiles de *Brickellia cavanillesii* y actividad antidiabética del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la especie. Tesis de Licenciatura UNAM.
- Gurib Fakim A. (2006). Review. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1–93.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Step 4 version.
- Jinqiu Z, Viñas R, Smith E (2008). In vitro evaluation of human liver cancer cells and the potencial cytotoxicity of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Brickellia cavanillesii* (Asteraceae) both single and in combination. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 90, 4, 801-808.
- Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E., Martinez, A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the Southern United States. *Phytotherapy Research*, 20, 259-255.
- 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.
- Liang, Y. Z., Xie, P., Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*. 812(1-2): 53–70.

- Loaeza A. (1907). Anales del Instituto Médico Nacional. 9, 303–304.
- Martínez M. (1989). Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México, DF.
- Noriega J. (1902). Curso de Historia de drogas.
- Palacios Espinosa F., (2009). Pruebas selectas de identidad, eficacia y composición de *Brickellia cavanillesii* (Cass) A. Gray y *B. veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae). Tesis de doctorado UNAM.
- Poss, J. E., Jezewski, M. A., y González Stuart, A. (2003). Home remedies for Type 2 Diabetes used by Mexican Americans in El paso, Texas. *Clinical Nursing Research*, 12, 304-323.
- Razdan T. K., Qadri B., Harkar S., Waight E. S. (1987). Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, 26 (7), 2063–2069.
- Rodríguez J., Tello H., Quijano L., Calderón J., Gómez F., Romo J., Ríos T. (1974). Flavonoides de plantas mexicanas. Aislamiento y estructura de la santina y de la glucoferida. *Revista Latinoamericana de Química*. 5, 41–53.
- Sahoo, N., Manchikantia, P., Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. 81(6): 462–471.
- Saraswathy A., Vidhya B., Amala K. (2012). Apigenin-4', 7-dimethyl ether from *Aquilaria agallocha* Roxb. *Indian drugs*, 49(10), 30–32.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden.  
<http://www.tropicos.org/Name/2712693>. Acceso en agosto de 2014.
- Quatrocci O. A., De Andrizzi S. A., Laba R. F. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Pp. 106-122.
- WHO (1998). Quality control methods for herbal materials. Updated edition of Quality control methods for medicinal plant materials. Geneve.
- WHO (2003). Guidelines on good agricultural and collection practices for medicinal plants. Geneve.
- WHO (2007). Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneve.

## **ANEXO 1**



**Figura 17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto escoparona (**44**).

[62]

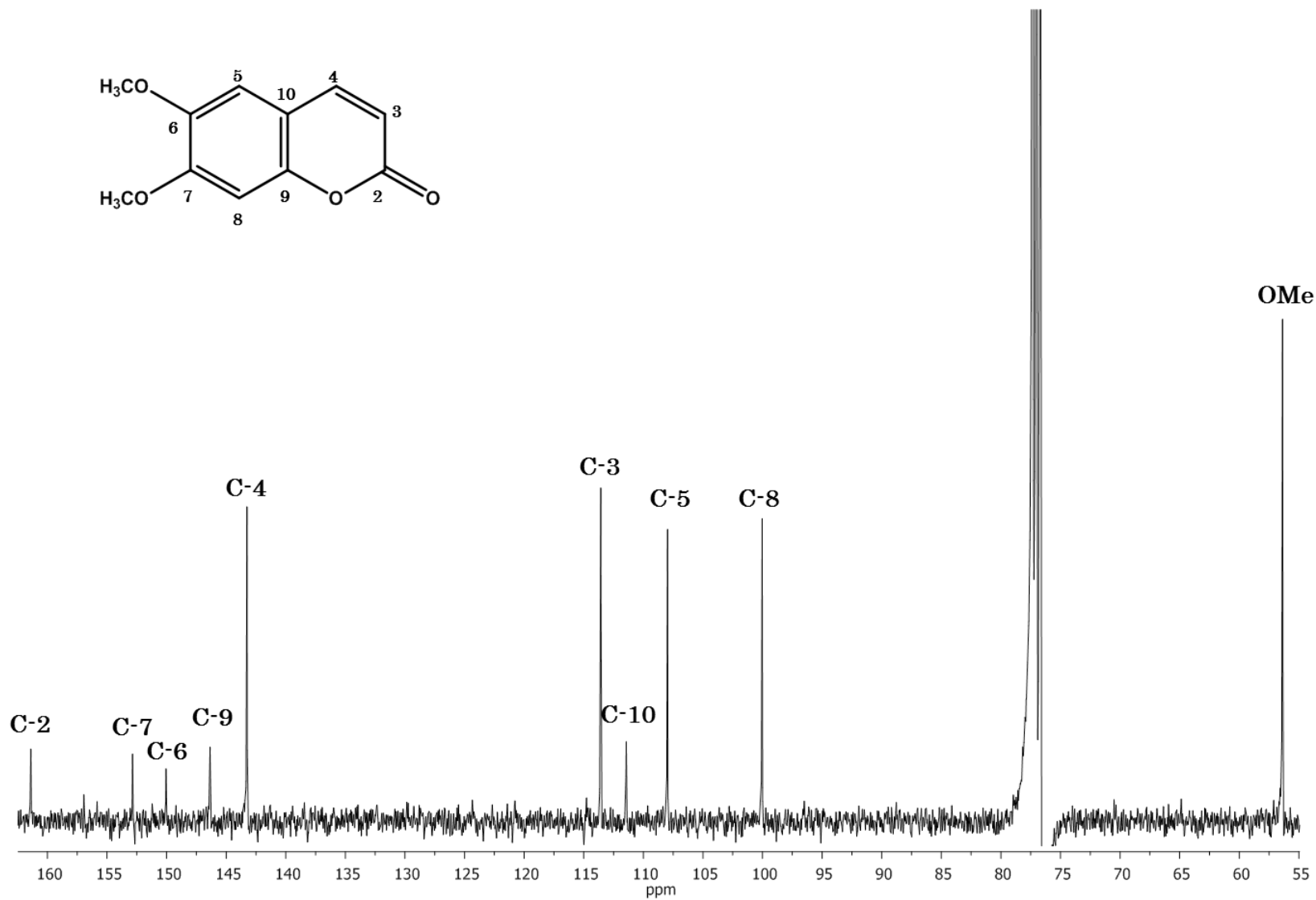
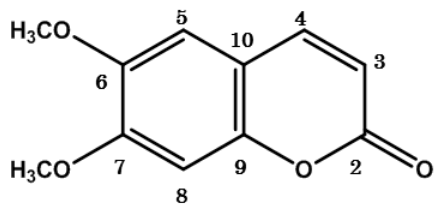


Figura 18. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto escoparona (44).

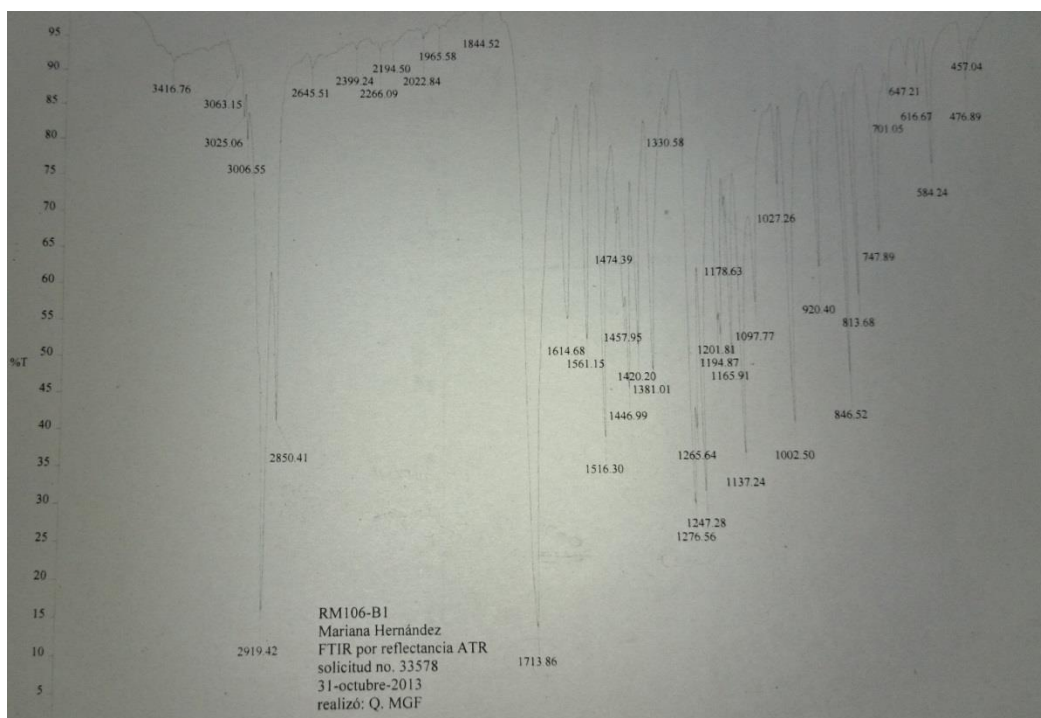


Figura 19. Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto escoparona (44)

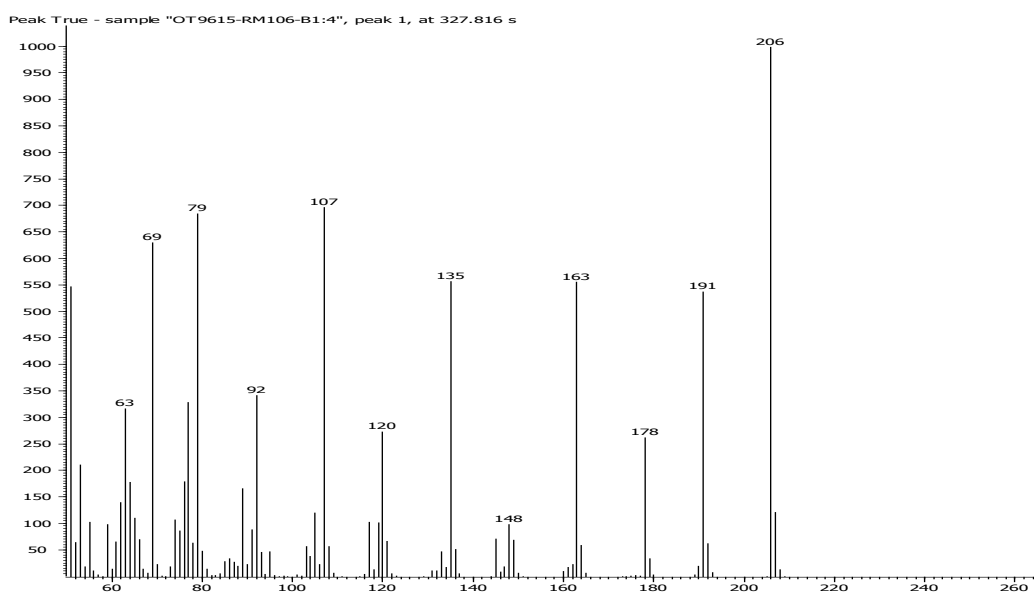
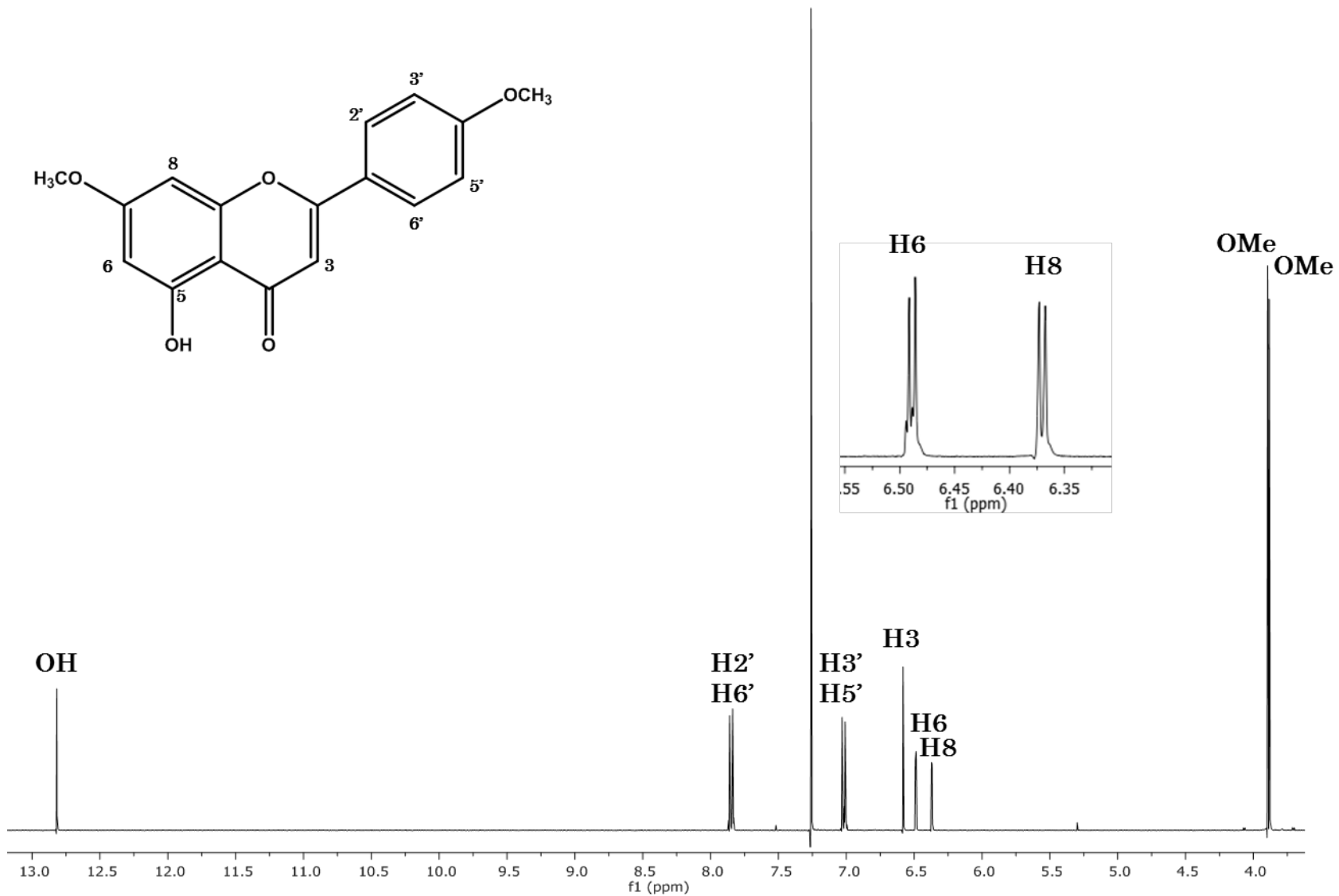


Figura 20. Espectro de masas (IE) del compuesto escoparona (44)



[65]



**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46)

[66]

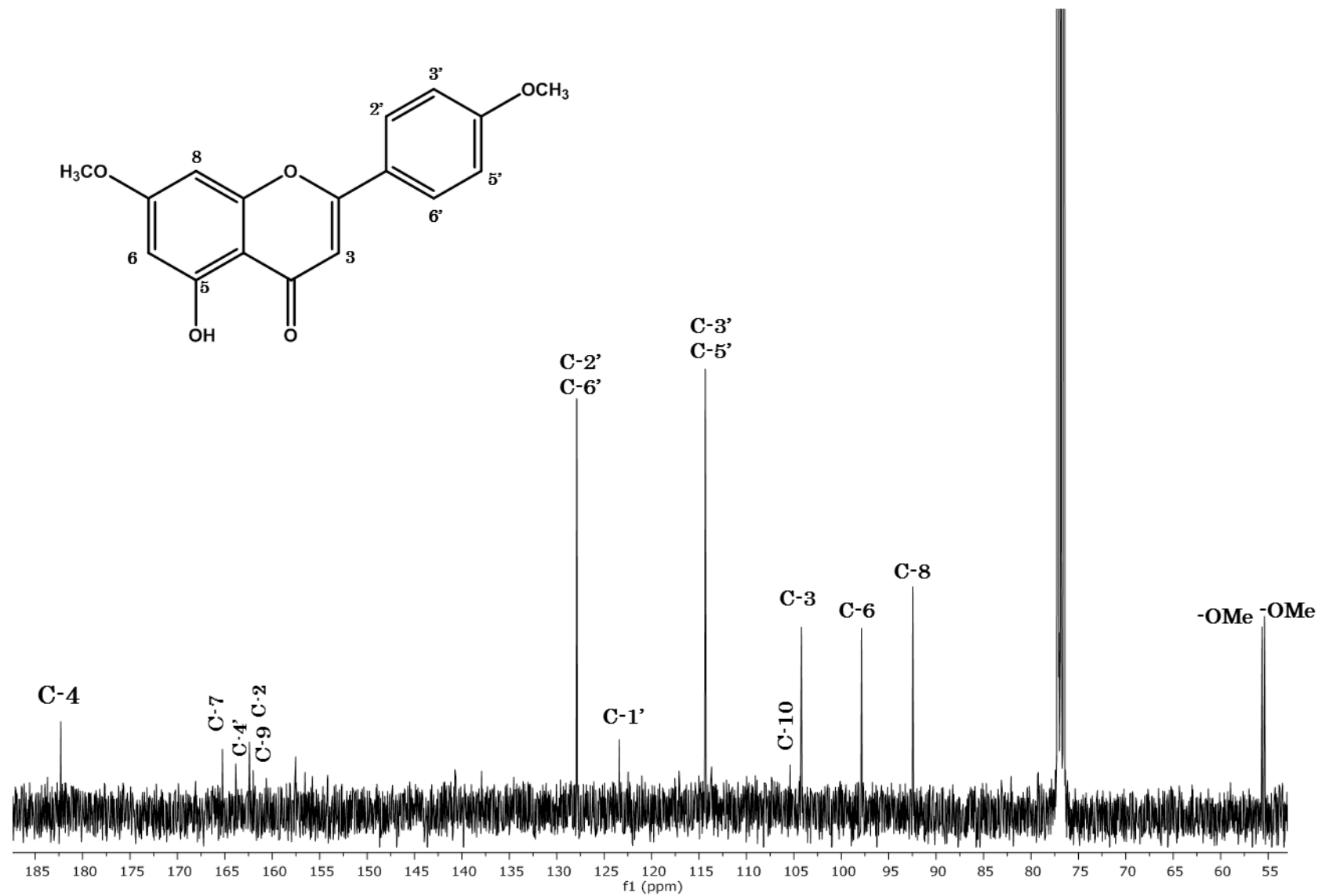


Figura 22. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46)

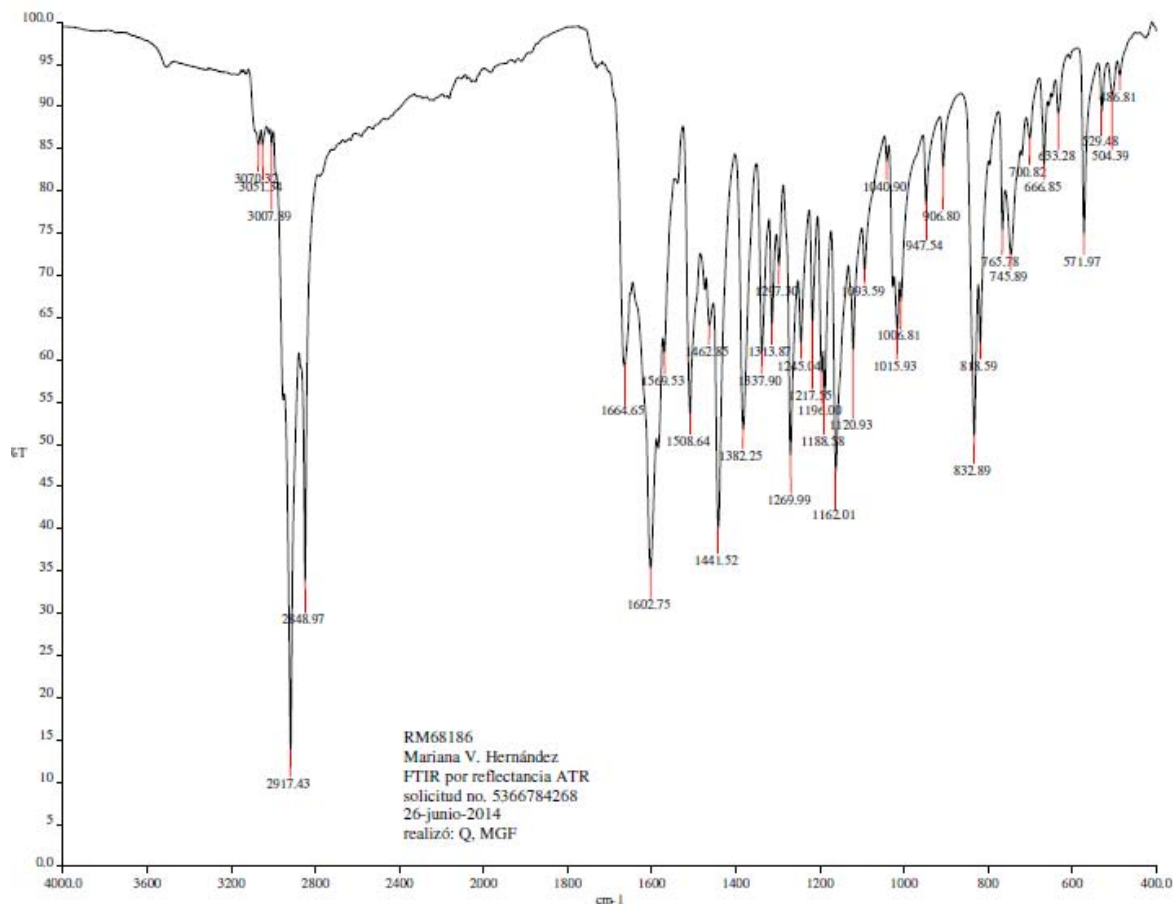


Figura 23. Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46)

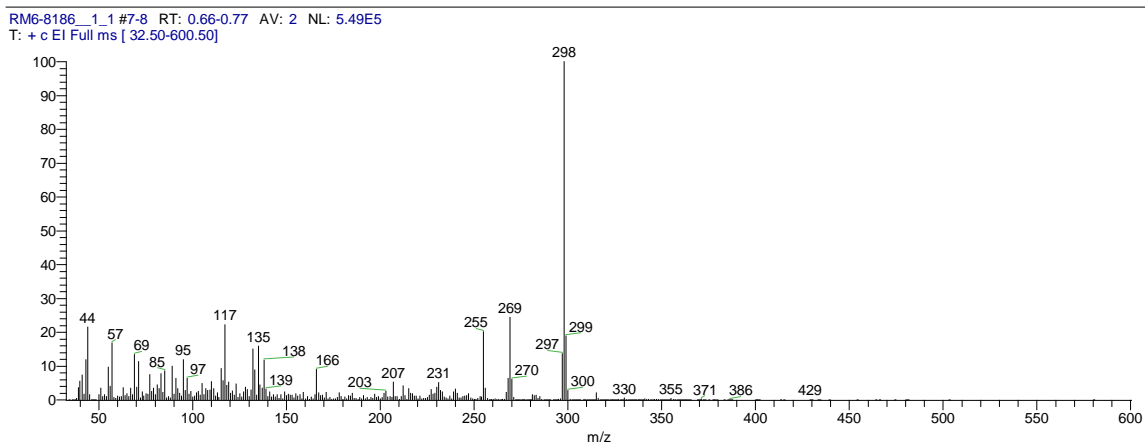


Figura 24. Espectro de masas (IE) del compuesto 4',7-dimetilapigenina (46)

[68]

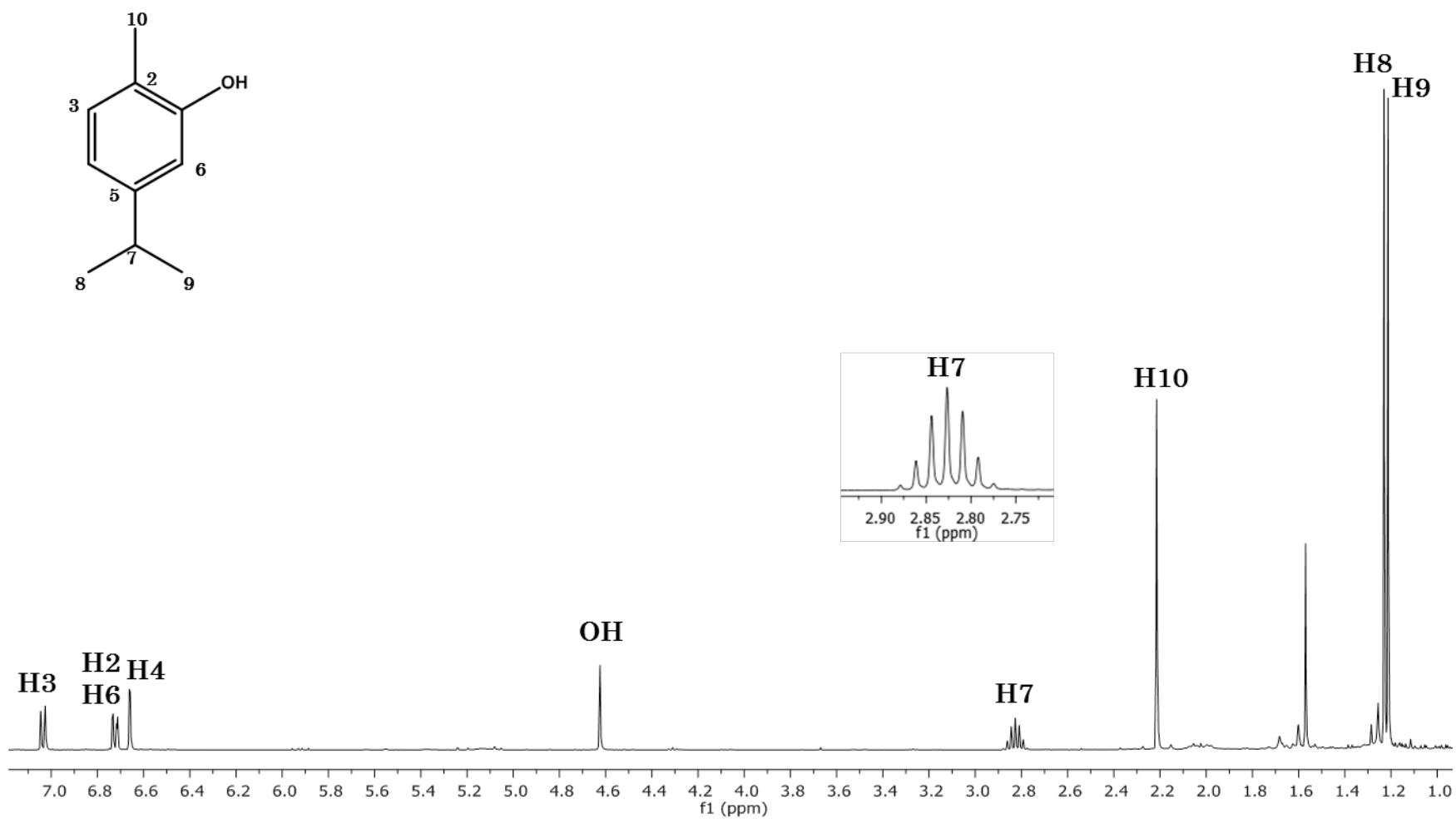


Figura 25. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto carvacrol (45)

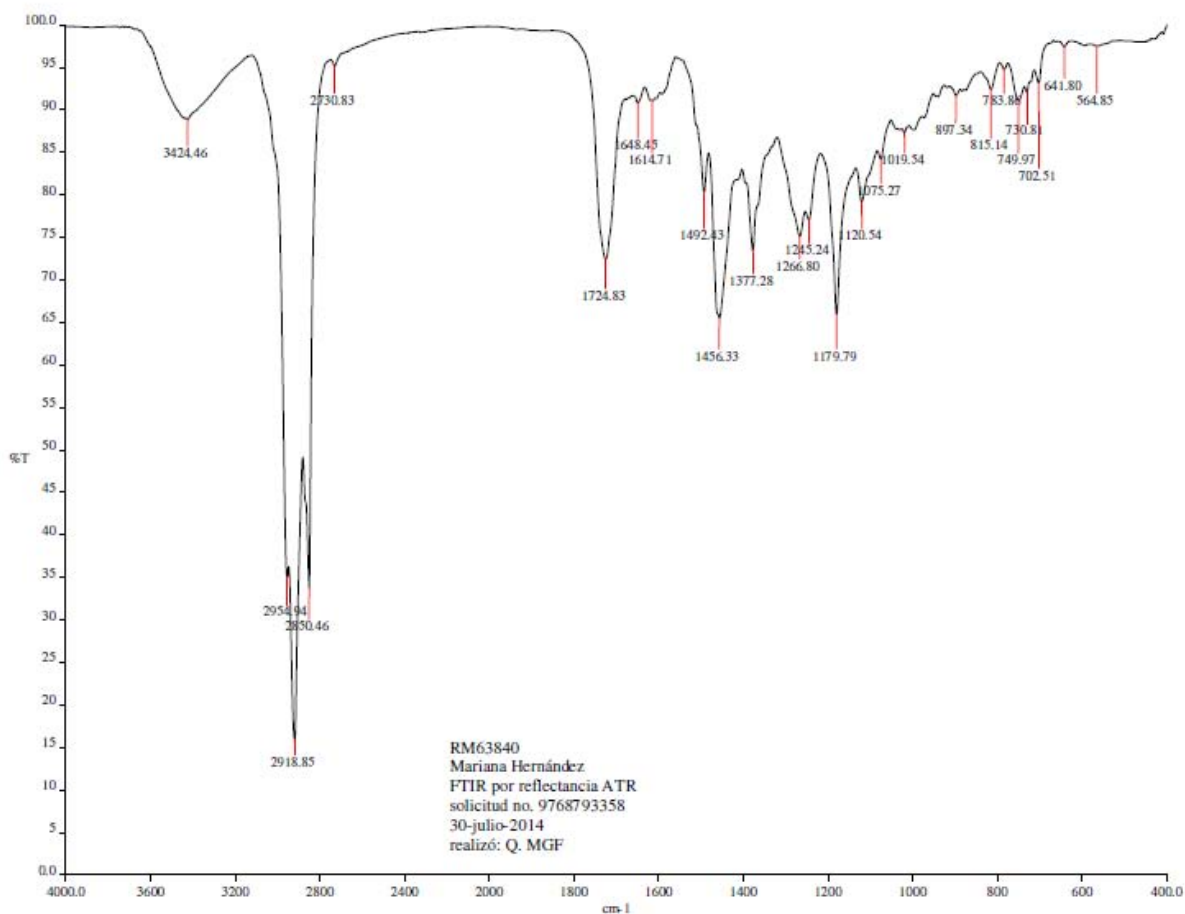


Figura 26. Espectro de IR (FTIR-ATR) del compuesto carvacrol (45)

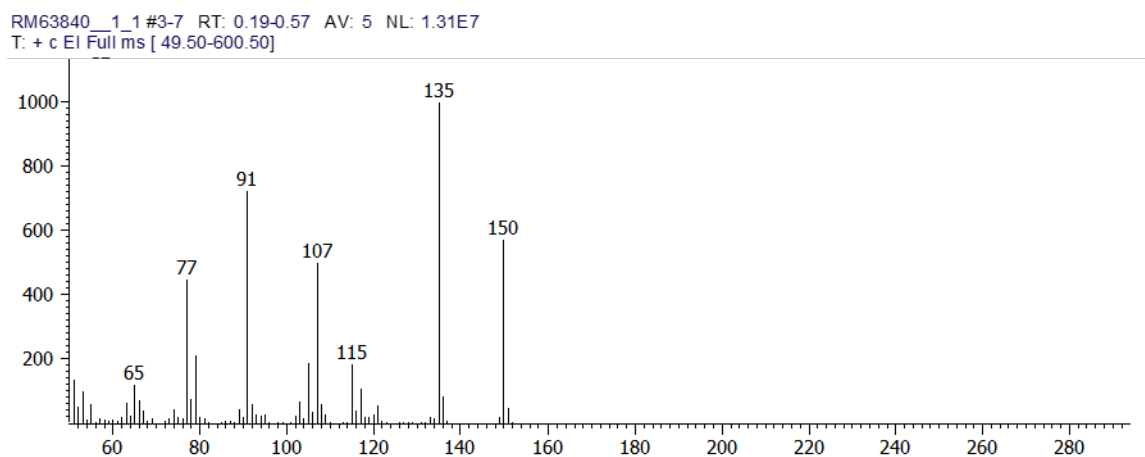


Figura 27. Espectro de masas (IE) del compuesto carvacrol (45)