



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

**Cuantificación de  
(-)-*epi*-catequina en diferentes  
matrices herbolarias**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

**DIANA ALI PÉREZ ESPINOZA**



**México, D. F.**

**2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Jurado Asignado**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
<b>VOCAL:</b>	M en C. Juan Manuel Rodríguez
<b>SECRETARIO:</b>	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz
<b>1er. Suplente:</b>	M. en C. Kenneth Rubio Carrasco
<b>2do. Suplente:</b>	Dra. Mabel Fragoso Serrano

### **Sitio donde se desarrolló el proyecto:**

Laboratorio 113. Edificio E  
Facultad de Química UNAM

#### **Asesor**

---

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

#### **Supervisor técnico**

---

M en C. Diana Alejandra Martínez Chávez

#### **Sustentante**

---

Diana Ali Pérez Espinoza

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	VI
LISTA DE GRÁFICAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
<b>1.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Antioxidantes .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 <i>Prunus serotina</i> Ehrh .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 <i>Cladocolea loniceroides</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 <i>Hippocratea excelsa</i> HBK. ....</b>	<b>16</b>
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Desarrollo del método analítico para cuantificar (-)-<i>epi</i>-catequina por cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Preparaciones de las soluciones stock .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Evaluación de los parámetros de calidad .....</b>	<b>23</b>
3.3.1. Adecuabilidad del sistema.....	23
3.3.2. Selectividad .....	23
3.3.3. Linealidad .....	24
3.3.3.1 Linealidad del sistema .....	24
3.3.3.2. Linealidad del método y exactitud .....	25
3.3.4. Precisión .....	27
3.3.4.1. Precisión del sistema .....	27
3.3.4.2. Precisión el método.....	27
3.3.4.2.1. Repetibilidad .....	27
3.3.4.2.2. Precisión intradía.....	28
3.3.4.2.3. Precisión intermedia .....	28
3.3.5. Robustez .....	28
3.3.6. Tolerancia .....	29
3.3.7. Estabilidad de las muestras de (-)- <i>epi</i> -catequina .....	30
3.3.7.1 Estabilidad de la (-)- <i>epi</i> -catequina a temperatura ambiente .....	30
3.3.7.2 Estabilidad de la (-)- <i>epi</i> -catequina en refrigeración .....	30
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Desarrollo del método analítico .....</b>	<b>32</b>

<b>4.2 Validación del método analítico</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño</b> .....	<b>36</b>
4.2.1.1 Adecuabilidad del sistema.....	36
4.2.1.2. Selectividad .....	37
4.2.1.3. Linealidad .....	40
4.2.1.3.1 Linealidad del sistema .....	41
4.2.1.3.2 Linealidad del método.....	45
4.2.1.4. Exactitud.....	54
4.2.1.5 Precisión .....	57
4.2.1.5.1 Precisión del sistema .....	57
4.2.1.5.2 Precisión del método.....	58
4.2.1.5.2.1. Repetibilidad .....	58
4.2.1.5.2.2 Precisión intradía.....	60
4.2.1.5.2.3 Precisión intermedia .....	61
• 4.2.1.6 Robustez.....	64
4.2.1.6.1. Resolución de la señal cromatográfica de la (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín ..	64
4.2.1.6.2 Resolución de la señal cromatográfica de la (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	68
4.2.1.6.3 Resolución de la señal cromatográfica de la (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de	
muérdago.....	72
4.2.1.7 Tolerancia .....	76
4.2.1.8. Estabilidad del estándar de (-)- <i>epi</i> -catequina .....	79
4.2.1.8.1 Estabilidad de la (-)- <i>epi</i> -catequina a temperatura ambiente .....	79
4.2.1.8.2 Estabilidad de la (-)- <i>epi</i> -catequina en refrigeración .....	80
4.2.1.9 Cuantificación de la (-)- <i>epi</i> -catequina en las matrices herbolarias.....	82
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>84</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>85</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>86</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>91</b>
<b>ANEXO I</b> .....	<b>91</b>
• Factor de capacidad .....	91
• Factor de coleo.....	91
• Número de platos teóricos .....	92
• Resolución .....	92
<b>ANEXO II</b> .....	<b>94</b>
• Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de capulín .....	94
• Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de cancerina .....	97
• Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de muérdago .....	100
<b>ANEXO III</b> .....	<b>103</b>

- Tabla 8.1 Resumen de la validación del método para cuantificar (-)-epi-catequina en diferentes matrices herbolarias ..... 103

## LISTA DE TABLAS

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 2.1</b>	Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie <i>Hippocratea exelsa</i> HBK	19
<b>Tabla 3.1</b>	Condiciones cromatográficas del método analítico	22
<b>Tabla 3.2</b>	Gradiente de elución utilizado en el método analítico	22
<b>Tabla 3.3</b>	Condiciones de degradación de la (-)- <i>epi</i> -catequina	24
<b>Tabla 3.4</b>	Diluciones empleadas en las curvas de calibración para evaluar la linealidad del sistema	25
<b>Tabla 3.5</b>	Diluciones empleadas para evaluar la exactitud y la linealidad del método	26
<b>Tabla 3.6</b>	Robustez: factores evaluados en el diseño experimental 2 <sup>3</sup>	29
<b>Tabla 4.1</b>	Parámetros cromatográficos de la (-)- <i>epi</i> -catequina obtenidos con el método analítico	34
<b>Tabla 4.2</b>	Evaluación del sistema	37
<b>Tabla 4.3</b>	Resultados obtenidos durante la degradación de la (-)- <i>epi</i> -catequina	38
<b>Tabla 4.4</b>	Porcentaje de degradación para cada tratamiento	38
<b>Tabla 4.5</b>	Parámetros estadísticos de la regresión lineal del sistema	42
<b>Tabla 4.6</b>	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema	43
<b>Tabla 4.7</b>	Análisis de varianza con carencia de ajuste de la regresión lineal del sistema	44
<b>Tabla 4.8</b>	Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	46
<b>Tabla 4.9</b>	Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	47
<b>Tabla 4.10</b>	Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de muérdago	48
<b>Tabla 4.11</b>	Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	50
<b>Tabla 4.12</b>	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de capulín	50
<b>Tabla 4.13</b>	Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para	50

	cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	
<b>Tabla 4.14</b>	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de cancerina	51
<b>Tabla 4.15</b>	Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de muérdago	51
<b>Tabla 4.16</b>	Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de muérdago	51
<b>Tabla 4.17</b>	Análisis de varianza del modelo lineal: método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	52
<b>Tabla 4.18</b>	Análisis de varianza del modelo: método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	52
<b>Tabla 4.19</b>	Análisis de varianza del modelo lineal: método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de muérdago	53
<b>Tabla 4.20</b>	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de capulín	55
<b>Tabla 4.21</b>	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de cancerina	55
<b>Tabla 4.22</b>	Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de muérdago	56
<b>Tabla 4.23</b>	Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema	58
<b>Tabla 4.24</b>	Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de capulín	59
<b>Tabla 4.25</b>	Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de cancerina	59
<b>Tabla 4.26</b>	Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de muérdago	60
<b>Tabla 4.27</b>	Datos obtenidos para evaluar la precisión intradía realizado por un solo analista en dos días diferentes	61
<b>Tabla 4.28</b>	Precisión intermedia del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	62
<b>Tabla 4.29</b>	Precisión intermedia del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	63
<b>Tabla 4.30</b>	Precisión intermedia del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de muérdago	63
<b>Tabla 4.31</b>	Resultados obtenidos para evaluar la resolución del pico de la	65

	(-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	
<b>Tabla 4.32</b>	Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de capulín	66
<b>Tabla 4.33</b>	Resultados obtenidos para evaluar la resolución del pico de la (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina	68
<b>Tabla 4.34</b>	Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de cancerina	69
<b>Tabla 4.35</b>	Datos obtenidos para determinar el efecto de los factores evaluados sobre la resolución del pico de la (-)- <i>epi</i> -catequina	72
<b>Tabla 4.36</b>	Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de muérdago	73
<b>Tabla 4.37</b>	Estabilidad de las muestras de (-)- <i>epi</i> -catequina a temperatura ambiente	79
<b>Tabla 4.38</b>	Resultados de la estabilidad de las muestras de (-)- <i>epi</i> -catequina en refrigeración	80
<b>Tabla 4.39</b>	Miligramos de (-)- <i>epi</i> -catequina por grama de extracto presente en las matrices herbolarias de trabajo	83
<b>Tabla 8.1</b>	Resumen de la validación del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en diferentes matrices herbolarias	103

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>Gráfica 4.1</b>	Linealidad del sistema para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina	42
<b>Gráfica 4.2</b>	Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema.	45
<b>Gráfica 4.3</b>	Linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de capulín	46
<b>Gráfica 4.4</b>	Linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de cancerina.	48
<b>Gráfica 4.5</b>	Linealidad del método para cuantificar (-)- <i>epi</i> -catequina en el extracto de muérdago	49
<b>Gráfica 4.6</b>	Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de capulín	53
<b>Gráfica 4.7</b>	Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de cancerina	53

<b>Gráfica 4.8</b>	Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de muérdago	54
<b>Gráfica 4.9</b>	Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada para la resolución de la (-)- <i>epi</i> -catequina fijando el volumen de inyección a 20 µL	67
<b>Gráfica 4.10</b>	Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental	67
<b>Gráfica 4.11</b>	Gráfica de residuos de resolución	68
<b>Gráfica 4.12</b>	Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada para la resolución de la (-)- <i>epi</i> -catequina fijando el volumen de inyección a 20 µL	71
<b>Gráfica 4.13</b>	Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental	71
<b>Gráfica 4.14</b>	Grafica de residuos	71
<b>Gráfica 4.15</b>	Gráfica de contornos de la superficie de respuesta estimada para la resolución de la (-)- <i>epi</i> -catequina fijando el volumen de inyección a 20 µL	75
<b>Gráfica 4.16</b>	Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental	75
<b>Gráfica 4.17</b>	Gráfica de residuos	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>No.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 2.1</b>	Neutralización de radicales libres	8
<b>Figura 2.2</b>	Principales estructuras de las catequinas	10
<b>Figura 2.3</b>	<i>Prunus Serotina</i> Ehrh: A. Flor B. Fruto	11
<b>Figura 2.4</b>	Principales compuestos aislados del capulín	13
<b>Figura 2.5</b>	Imágenes de <i>Loranthaceae</i> ( <i>Muérdago</i> ): <b>A.</b> Fruto <b>B.</b> Muérdago	15

<b>Figura 2.6</b>	<i>Cladocolea loniceroides</i> : <b>A.</b> Fruto <b>B.</b> Flores <b>C.</b> Hojas	16
<b>Figura 2.7</b>	<i>Hippocratea excelsa</i> HBK: <b>A</b> Corteza, <b>B</b> Hojas, <b>C</b> Raíz	17
<b>Figura 2.8</b>	Distribución de <i>cancerina</i> en la República Mexicana	18
<b>Figura 4.1</b>	Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de capulín	33
<b>Figura 4.2</b>	Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de cancerina	33
<b>Figura 4.3</b>	Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de muérdago	33
<b>Figura 4.4</b>	Cromatograma obtenido con una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL)	37
<b>Figura 4.5</b>	Cromatograma generado por una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina antes de someterla a condiciones de degradación forzada	39
<b>Figura 4.6</b>	Cromatograma correspondiente a la degradación ácida de la (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL)	39
<b>Figura 4.7</b>	Cromatograma correspondiente a la degradación básica de la (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL)	40
<b>Figura 4.8</b>	Cromatograma correspondiente a la oxidación de la (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL)	40
<b>Figura 4.9</b>	Cromatograma correspondiente a una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina	79
<b>Figura 4.10</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de cancerina a una concentración de 20 mg/mL	80
<b>Figura 4.11</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de cancerina a una concentración de 20 mg/mL adicionado con (-)- <i>epi</i> -catequina	80
<b>Figura 4.12</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de capulín a una concentración de 1 mg/mL	80
<b>Figura 4.13</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de capulín a una concentración de 5 mg/mL adicionado con (-)- <i>epi</i> -catequina	81
<b>Figura 4.14</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de muérdago a una concentración de 1 mg/mL	81

<b>Figura 4.15</b>	Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de muérdago a una concentración de 1 mg/mL adicionado con (-)- <i>epi</i> -catequina	81
<b>Figura 4.16</b>	Cromatograma correspondiente a una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina almacenada durante un día a temperatura ambiente	84
<b>Figura 4.17</b>	Cromatograma correspondiente a una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina almacenada durante dos semanas a temperatura ambiente	84
<b>Figura 4.18</b>	Cromatograma correspondiente a una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina almacenada durante un día en refrigeración	85
<b>Figura 4.19</b>	Cromatograma correspondiente a una solución de (-)- <i>epi</i> -catequina almacenada durante dos semanas en refrigeración.	85
<b>Cromatogramas generados al evaluar la robustez del método empleando extracto de capulín</b>		
<b>Figura 8.1</b>	Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación	97
<b>Figura 8.2</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	97
<b>Figura 8.3</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	97
<b>Figura 8.4</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	98
<b>Figura 8.5</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	98
<b>Figura 8.6</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	98
<b>Figura 8.7</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	99
<b>Figura 8.8</b>	Cromatograma obtenido con 0.3 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	99
<b>Figura 8.9</b>	Cromatograma obtenido con 0.4 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	99

### **Cromatogramas generados al evaluar la robustez del método empleando extracto de cancerina**

<b>Figura 8.10</b>	Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación	100
<b>Figura 8.11</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	100
<b>Figura 8.12</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	100
<b>Figura 8.13</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	101
<b>Figura 8.14</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	101
<b>Figura 8.15</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	101
<b>Figura 8.16</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	102
<b>Figura 8.17</b>	Cromatograma obtenido con 0.3 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	102
<b>Figura 8.18</b>	Cromatograma obtenido con 0.4 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	102

### **Cromatogramas generados al evaluar la robustez del método empleando extracto de muérdago**

<b>Figura 8.19</b>	Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación	103
<b>Figura 8.20</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	103
<b>Figura 8.21</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15 µL	103
<b>Figura 8.22</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	104
<b>Figura 8.23</b>	Cromatograma obtenido con 0.4% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15 µL	104
<b>Figura 8.24</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	104

<b>Figura 8.25</b>	Cromatograma obtenido con 0.3% de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	105
<b>Figura 8.26</b>	Cromatograma obtenido con 0.4 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25 µL	105
<b>Figura 8.27</b>	Cromatograma obtenido con 0.4 % de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25 µL	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>µg</b>	Microgramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>g</b>	Gramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>min</b>	Minuto
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>DER</b>	Desviación estándar relativa
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>β<sub>0</sub></b>	Ordenada al origen
<b>β<sub>1</sub></b>	Pendiente de la recta
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>gl</b>	Grados de libertad
<b>s</b>	Desviación estándar
<b>R</b>	Resolución
<b>k'</b>	Factor de capacidad
<b>NPT</b>	Número de platos teóricos
<b>T</b>	Factor de coe
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>°C</b>	Grados Celsius

<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos
<b>AHP</b>	Farmacopea Herbolaria Americana
<b>EP</b>	Farmacopea Europea
<b>ESCOP</b>	Cooperativa Científica Europea en Fitoterapia
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamento de Estados Unidos
<b>ODS</b>	Suplementos Alimenticios Oficinales
<b>WHO</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>GPM</b>	Buenas Practicas de Manufactura
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
<b>CG</b>	Cromatografía de Gases
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>DT</b>	Diaforasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GMP</b>	Buenas Prácticas de Manufactura



---

## **1.JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO**

El considerable incremento en el interés del público por el uso de plantas medicinales, en la década pasada, ha estimulado la investigación científica para determinar su verdadero potencial como agentes medicinales modernos en los sistemas de salud. Organizaciones nacionales e internacionales como la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP), la Farmacopea Europea (EP), la Cooperativa Científica Europea en Fitoterapia (ESCOP), la Administración de Alimentos y Medicamento de Estados Unidos (FDA), la ODS (Suplementos Alimenticios Oficinales), la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP) y la Organización Mundial de la Salud (WHO), se encuentran desarrollando especificaciones para asegurar que las preparaciones herbolarias estén sujetas a críticas revisiones científicas (Houghton y Mukherjee, 2009).

Para asegurar su identidad, pureza, calidad, consistencia y reproducibilidad se requiere de una caracterización completa de la droga cruda y del producto herbolario medicinal. Sin este grado de conocimiento, los hallazgos encontrados en cualquier estudio clínico podrían no ser reproducibles. Las metodologías de ensayo que se aplican a los materiales vegetales incluyen la descripción botánica, los análisis microscópicos y macroscópicos y los métodos químicos y moleculares (Houghton,1998; Riddle, 2011).

Cada metodología tiene sus ventajas y desventajas, y su aplicación específica dependerá del aspecto de calidad a evaluar y del tipo de vegetal. Un aspecto clave en la selección del ensayo apropiado es la selectividad del método. Asegurar la calidad de los productos vegetales es un proceso difícil ya que la presencia de un marcador o de un grupo de marcadores depende de las condiciones de la cosecha, del



crecimiento y de la aplicación de las buenas prácticas de manufactura (GMP) en la elaboración del producto final entre otras consideraciones (Kunle *et al.*, 2012).

Los criterios de calidad para estos productos generalmente se encuentran publicados en monografías farmacopeicas. De manera general, los criterios se dividen en ensayos de identidad, pureza y valoración cuantitativa de constituyentes químicos.

En contraste con la medicina alopática, muchos países regulan las **plantas medicinales como "medicina tradicional" aplicando criterios de** aprobación menos estrictos. Esta aprobación se basa en el record histórico de seguridad y eficacia de la especie en las prácticas médicas populares. Económicamente hablando, los costos de aprobación de un medicamento herbolario son menores que los medicamentos convencionales. Desde una perspectiva técnica los medicamentos alopáticos son preparaciones con fármacos cuya composición farmacocinética, farmacología, dosis, seguridad, calidad y eficacia se encuentran bien caracterizados. Por el contrario, para los productos herbolarios esta información es poco conocida o no existe. Aún más, cuando múltiples especies de plantas son empleadas en un mismo preparado, la variabilidad inherente de las drogas crudas solo puede controlarse parcialmente durante el proceso de manufactura (Houghton y Mukherjee, 2009).

La mayoría de los practicantes de la medicina herbolaria emplean combinaciones de plantas (desde 2 hasta 45) con docenas o cientos de constituyentes cuya actividad por grupo o de manera individual no ha sido probada. Las preparaciones herbolarias, en cambio, además de cumplir con los requerimientos de conformidad y ensayo que se aplican



---

a la medicina moderna son seguros y de reconocido uso tradicional.

Caracterizar físicamente a una planta es uno de los medios más eficientes para determinar su identidad y calidad relativa. Si esta determinación se acopla a una técnica de caracterización química, las dos metodologías permiten la identificación completa de una planta. Sin embargo, esta estrategia es inapropiada para evaluar material que ha sido extraído o pulverizado; en este caso, únicamente puede documentarse un análisis organoléptico que no sería concluyente para propósitos de calidad (Riddle, 2011).

Por otra parte, para realizar la identificación botánica de una especie se requiere de personal capacitado (botánico). Este proceso debe realizarse en el hábitat natural o bien en el campo de cultivo. Alternativamente, una muestra representativa de la colecta debe identificarse por comparación con una muestra botánica de referencia que se encuentre almacenado en un herbario. Cabe destacar que actualmente las técnicas macroscópicas y microscópicas, con fines de identificación, se encuentran en declive debido a la carencia de personal entrenado con estas habilidades (Houghton y Mukherjee, 2009).

Para fines comerciales, además de la identificación del género, especie y subespecie, el personal, debe conocer aspectos como la época de colecta, la edad de la planta o procesos particulares inherentes a cada especie. Con frecuencia, un botánico no conoce los cambios a nivel celular, debidos a la edad y que afectan la calidad organoléptica. Finalmente, la falta de una identificación botánica apropiada propicia adulteraciones con especies que incluso pueden ser tóxicas. Parte importante después de la cosecha es el manejo pos-cosecha; este proceso puede incluir lavado, secado y almacenamiento. Este último es



quizás el punto más crítico para asegurar la calidad de la planta (evitando el deterioro y la contaminación) (Houghton y Mukherjee, 2009).

La valoración química es una de las técnicas más importantes para determinar la concentración, en límites estrechos, de un grupo particular de constituyentes; también es de utilidad para establecer la identidad de la especie, y para detectar adulterantes. En la actualidad, las técnicas analíticas permiten diferenciar, con base en la identificación de un conjunto de compuestos, especies estrechamente relacionadas (*Echinaceae*) y partes de una misma planta (*Panax quinquefolium*) (Ma *et al.*, 1996; Khalid *et al.*, 2009; Kunle *et al.* 2012).

El análisis químico es especialmente útil cuando se conocen los compuestos activos o cuando se pretende estandarizar un preparado herbolario a un compuesto en particular con propósitos de control de calidad. Dicho análisis también puede aplicarse para determinar el tiempo óptimo de cosecha, el tiempo de secado; las condiciones del proceso de extracción, la estabilidad y la consistencia lote a lote de un producto (De Smet, 1999).

Cabe destacar que el análisis químico aislado sin la adecuada caracterización botánica carece de valor para determinar la identidad inequívoca de una planta. Especies estrechamente relacionadas o diferentes partes de una planta comparten similitud en los perfiles químicos. Aún más, los perfiles químicos pueden alterarse adicionando compuestos puros que incrementen el rendimiento de un constituyente o un grupo particular de metabolitos.

Diversas técnicas analíticas se han descrito para identificar y cuantificar sustancias específicas en matrices herbolarias. En este sentido, las



técnicas espectrofotométricas y cromatográficas representan los métodos primarios de análisis. La desventaja de emplear métodos espectrofotométricos reside en su falta de especificidad ya que se emplea con frecuencia en el análisis de grupos de constituyentes como las proantocianidinas (*Vaccinium myrtillus*) o hipericinas (*St. John's wort*) (Houghton y Mukherjee, 2009).

Por otra parte, los métodos de análisis cuantitativos, son de particular interés para cuantificar compuestos marcadores (activos o analíticos). La cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y la cromatografía de Gases (GC) son poderosas herramientas de análisis para determinar concentraciones exactas de compuestos y asegurar la consistencia de un producto (Khalid *et al.*, 2009, Kunle *et al.*, 2012).

Finalmente, existe una responsabilidad legal y ética de los fabricantes para asegurar la identidad, la pureza y la calidad relativa de los insumos herbolarios. El proceso termina con la determinación clínica o preclínica que permita correlacionar la eficacia con el contenido de compuestos cuantificados (Kunle *et al.*, 2012).

Con base en estas consideraciones el objetivo del presente trabajo reside en desarrollar y validar un método analítico para cuantificar (-)-*epi*-catequina en los extractos metanólicos de capulín, cancerina y muérdago.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Antioxidantes

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son especies que presentan en su estructura un electrón desapareado o impar en el orbital externo, son inestables, altamente reactivos y tienen una vida media corta. Por lo tanto, actúan cerca del sitio en que se forman (Venéreo- Gutiérrez, 2002).

Los radicales libres más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno; aunque también destacan los derivados del hidrógeno y del carbono, y aquellos formados por metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros. La expresión “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO) es un término que involucra no solo a los radicales libres derivados del oxígeno, sino también a los no radicales derivados de la reducción molecular del oxígeno y que, además, son muy reactivos. Las principales ERO son las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno [oxígeno atómico (O); ozono (O<sub>3</sub>) y singulete de oxígeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)] y las parcialmente reducidas [anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>)] (Sorg, 2004).

Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce un estrés oxidativo capaz de inducir daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo es un desequilibrio en la generación de especies oxidantes (radicales libres y otras especies reactivas) y la capacidad de los sistemas de defensa del organismo para hacer frente a la agresión oxidativa. Este desequilibrio se presenta en diversos estados patológicos que alteran la funcionalidad celular y contribuyen de esta

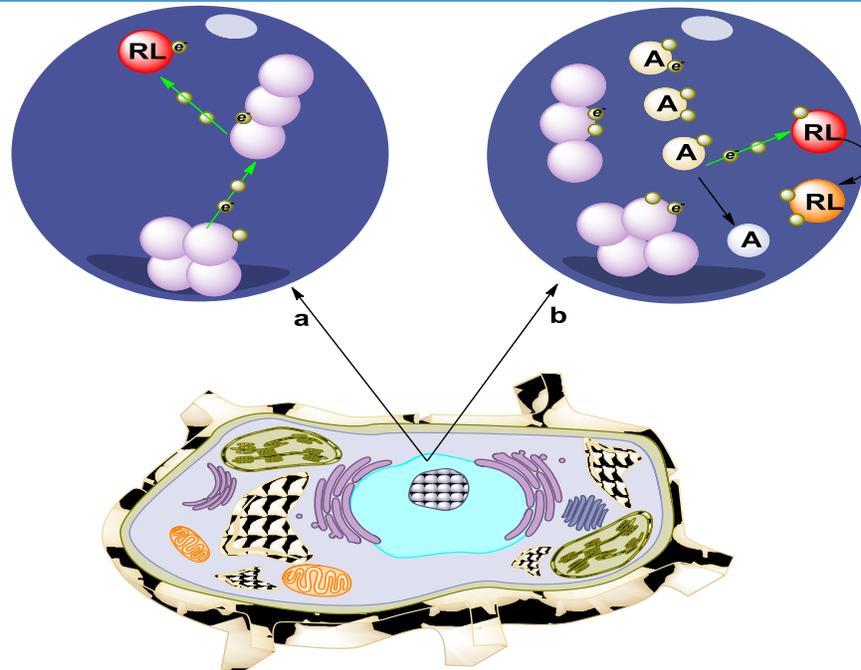


manera al desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la esclerosis múltiple, las cataratas, la retinopatía diabética, el asma, el infarto al miocardio, la hipertensión, la miocardiopatía, la cirrosis hepática, la pancreatitis, la insuficiencia renal, la nefrotoxicidad, la isquemia y el cáncer, entre otras.

Por otra parte, para evitar los efectos tóxicos de las ERO las células cuentan con defensas antioxidantes. Se le conoce como antioxidante a cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente su oxidación (Halliwell y Gutteridge, 1999). Las sustancias antioxidantes se han clasificado en dos principales sistemas: el sistema enzimático y el sistema no enzimático (endógeno y exógeno, respectivamente). Ambos sistemas actúan tanto en el espacio intracelular como en el extracelular (**Figura 2.1**).

El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas está formado por agentes antioxidantes de bajo peso molecular como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la diaforasa (DT) y el glutatión. Algunos sistemas enzimáticos tales como SOD y CAT actúan específicamente contra las ERO mientras que algunos otros reducen tioles.

Cuando la actividad de estos sistemas enzimáticos es insuficiente se produce una sobre producción tanto de iones superóxido como de peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) que es altamente tóxico.



**Figura 2.1.** Neutralización de radicales libres

a) Los radicales libres (RL) buscan estabilizarse, quitando un electrón a las moléculas estables más cercanas; las moléculas agredidas se oxidan y dejan de cumplir su función. Estas moléculas se transforman en un nuevo radical libre desatando una reacción en cadena donde cada nuevo radical libre le quita un electrón a otra molécula incrementando el daño.

b) Los antioxidantes (A) tienen la capacidad de ceder fácilmente un electrón. Cuando estos se encuentran con un radical libre le ceden un electrón estabilizándolo y por lo tanto se detiene la reacción en cadena. El antioxidante se oxida y se convierte en una sustancia inocua. Al evitar que los componentes celulares se oxiden, se protege al organismo.

Por otra parte, el sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno se considera útil cuando el sistema endógeno se satura. Está conformado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres que logran retrasar su producción. Ejemplos de antioxidantes hidrosolubles son la vitamina C o ácido ascórbico y el glutatión reducido



(GSH). Entre los antioxidantes liposolubles se encuentran la vitamina E, los carotenoides y la bilirrubina (Hung *et al.*, 2005).

Por otro lado, el efecto protector de alimentos de origen vegetal se atribuye a nutrientes y metabolitos secundarios con actividad antioxidante. Estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de frutas y verduras disminuyen la incidencia de enfermedades crónicas. Esta situación ha motivado la investigación de alimentos o plantas medicinales que, además de su importancia medicinal presenten un efecto protector para la salud expresado en una disminución de riesgo para determinadas patologías asociadas con los altos niveles de ERO (Roberfroid, 2000).

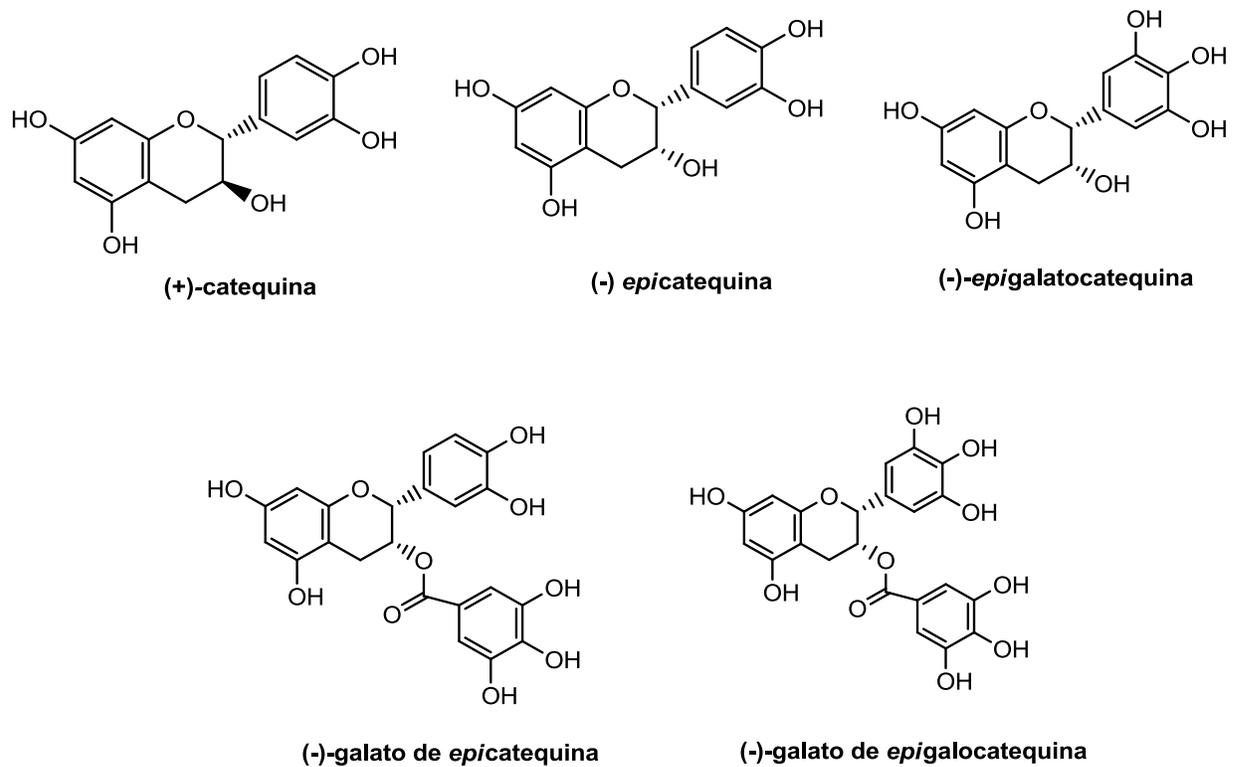
Así, la literatura científica describe el notable potencial antioxidante de los flavonoides para reducir y eliminar la formación de radicales libres. La capacidad de estos metabolitos para actuar como antioxidantes se debe a las propiedades de óxido-reducción atribuidas a sus grupos hidroxifenólicos. Básicamente, los flavonoides neutralizan los radicales hidroxilo, el anión superóxido y las especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

En este contexto, las catequinas se clasifican dentro del grupo de los flavanoles, también llamados proantocianidinas o flavan-3-oles. Este grupo de flavonoides incluye a la (+)-catequina, (-)-*epicatequina*, (-)-*epigaloilcatequina*, (-)-galato de *epicatequina* y (-)-galato de *epigaloilcatequina* (**Figura 2.2**). Estos compuestos están presentes en frutas como las cerezas, las manzanas, las ciruelas y las fresas. También, se encuentran en semillas y granos como la cocoa; en el vino tinto y en el té verde (Yilmaz, 2006).

A continuación, se describen algunos aspectos etnobotánicos de las



especies con potencial antioxidante seleccionadas para realizar este proyecto.



**Figura 2.2.** Principales estructuras de las catequinas

### 2.3 *Prunus serotina* Ehrh

*Prunus serotina* Ehrh (Rosaceae), es un árbol que mide 12 m de altura. Su corteza es rojiza o café; presenta hojas lanceoladas, lustrosas y de bordes aserrados; las flores se agrupan en racimos y son de color blanco; el fruto es globuloso de color rojo oscuro o negro, de 1.5 cm de diámetro, de sabor dulce a astringente, con una sola semilla (**Figura 2.3**) (SIAP, 2014). Florece de enero a marzo y fructifica entre los meses de mayo y agosto (Martínez, 1994; Lara y Márquez, 1996).



*P. serotina* es originario de América boreal, habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Se cultiva en huertos familiares y está asociada a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, de pino y mixto de pino-encino (Argueta, 1994). Se distribuye en las regiones montañosas del Valle de México, Guanajuato y de Jalisco hasta Chiapas.

En México se conoce como capulín (D.F.); capolli o capollin (Estado de México y Puebla); capulín blanco o cerezo (Michoacán, Baja California Sur y Chiapas); shengua o xenhua (lengua purépecha, Michoacán); cusabi (lengua tarahumara, Chihuahua); det-sé (lengua otomí, Hidalgo) y elocapolín (náhuatl) entre otros (Lara y Márquez, 1996). En Estados Unidos de América se conoce como cerezo negro americano o cerezo salvaje; en Venezuela y Colombia lo denominan cerezo criollo y cerezo de los andes, respectivamente (Ordaz *et al.*, 1999).

**A****B**

**Figura 2.3.** *Prunus Serotina* Ehrh: **A.** Flor **B.** Fruto

Las hojas y el fruto del capulín han sido utilizados como alimento y en la medicina tradicional desde tiempos prehispánicos. En Morelos, Hidalgo y



en el Estado de México, se prepara un jarabe a partir del fruto para el tratamiento de la tos. En contraste, en el Distrito Federal, se prepara una infusión con las hojas para tratar el mismo padecimiento.

En casos de diarrea y dolor abdominal se cuecen la raíz, la corteza y las hojas de capulín con miel de abeja hasta formar un jarabe, una vez frío se separa la parte líquida, se agrega limón y finalmente alcohol. En el Estado de Sonora se describe el uso de las hojas y la corteza para tratar además de la diarrea, el catarro, las nubes en los ojos y las fiebres periódicas. También, se utiliza para tratar afecciones respiratorias, la disentería y el insomnio (Argueta *et al.*, 1994).

Por otra parte, los frutos se consumen frescos, en dulce o en conserva y como bebida alcohólica después de su fermentación. Recientemente, se ha reportado que los extractos de *P. serotina* presentan actividad antioxidante significativa (Olszewska, 2007).

Los estudios químicos realizados a la fecha describen a la (-)-*epi*-catequina como uno de los metabolitos representativos de la especie (**Figura 2.4**)(Obregón, 215). También, se ha descrito la presencia de antocianidinas, fenilpropanoides, compuestos aromáticos simples y triterpenoides (Olszewska, 2007; Ordaz *et al.*, 1999; Santamour, 1998).



**Figura.2.4.** Principales compuestos aislados del capulín:

**1** Narcisina, **2** Junqlanina, **3** Hiperina, **4** Astragalina, **5** Rutina, **6**  $\beta$ -D- galactopiranosido de quercetina, **7** 3-O-glucósido de cianidina, **8** Juajaverina, **9** Reynoutrina, **10** Avicularina, **11** Isoquercetina, **12** Ácido clorogénico



## **2.4 *Cladocolea loniceroïdes***

El muérdago es una especie vegetal hemiparasitaria fotosintética de árboles; se nutre a través de órganos invasores llamados haustorios penetrando hasta el xilema para formar interconexiones firmes con el tejido vascular del hospedero. De esta manera, obtiene los nutrientes y el agua y ocasiona la muerte lenta del hospedero (Norton y Carpenter, 1998).

Algunos muérdagos crecen sobre las copas de los árboles y los arbustos de sus hospederos disminuyendo con ello su capacidad fotosintética (Herrera, 2005). El muérdago se puede encontrar en varios ecosistemas incluyendo bosques boreales, selvas tropicales y zonas áridas. Mientras algunas semillas de plantas germinan solo en respuesta a señales químicas del huésped, el muérdago germina en casi cualquier situación.

En general, el muérdago es de apariencia redondeada, tienen un tronco corto, y ramas abundantes que forman ya sea una densa mata que cuelga del árbol parasitado o bien una intrincada enredadera que cubre la copa del árbol; es una planta dioica, es decir, que existen separadamente pies machos y pies hembras. Tanto las flores masculinas como las femeninas son rudimentarias y simples, la polinización se realiza a través de los insectos y el viento durante los meses de febrero a marzo.

Los frutos son carnosos con una capa pegajosa y gruesa de mucílago que rodea a la semilla, esta capa permite su adherencia a los pájaros propiciando su propagación a los distintos árboles (**Figura 2.5**) (Pérez *et al.*, 2006; Radio bup, 2015; ASJAM, 2014).

**A****B**

**Figura 2.5.** Imágenes de *Loranthaceae* (*Muérdago*): **A.** Fruto **B.** Muérdago

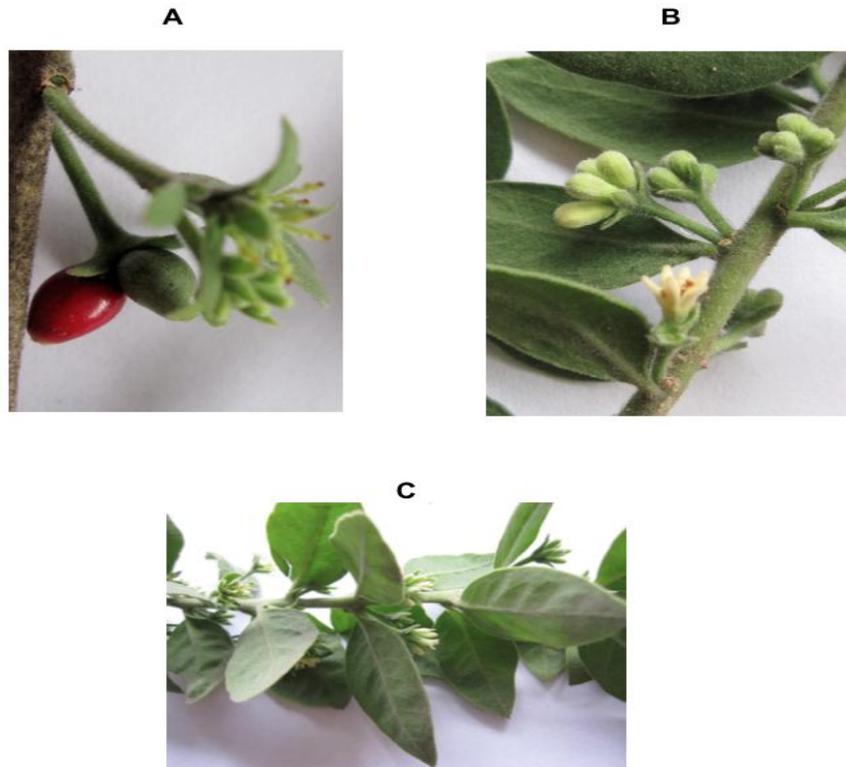
Los muérdagos han sido empleados en la medicina tradicional en pequeñas dosis para aliviar los dolores de cabeza, disminuir la presión arterial y la frecuencia cardiaca, aliviar el nerviosismo e inducir el sueño (Alvarado y Saavedra, 2005). Actualmente, la literatura científica describe sus propiedades antitumorales (Zee Cheng 1997, Park *et al.* 1999), inmunomoduladoras (Fernández *et al.*, 1998), antiinflamatorias, antimicrobianas y antihipertensivas (Amabeoku *et al.*, 1998; Fukunaga *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista químico, los metabolitos secundarios identificados pertenecen a las categorías de los flavonoides, los alcaloides, los fenilpropanoides, los polipéptidos (viscotoxinas), las lecitinas y los mucílagos (Sajner y Veris, 1958; Graziano *et al.*, 1967; Jordan y Wagner, 1986; Fukunaga *et al.*, 1989; Sinha *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999).

*C. Ioniceroides* (Loranthaceae) es una planta que parasita alrededor de 22 especies de árboles distintos. No existen reportes de uso en medicina tradicional para la especie *C. Ioniceroides*, sin embargo, Serrano y



colaboradores determinaron en el 2011, que el potencial efecto antioxidante y citotóxico se debe principalmente a algunos polifenoles y flavonoides tales como la (-)-*epi*-catequina y a su capacidad de quelación del  $\text{Fe}^{2+}$  (Serrano-Maldonado *et al.*, 2011).



**Figura 2.6.** *Cladocolea loniceroides*: **A.** Fruto **B.** Flores **C.** Hojas

### **2.5 *Hippocratea excelsa* HBK.**

La familia *Hippocrateaceae* está integrada por más de 300 especies, distribuidas principalmente en zonas tropicales de ambos hemisferios (Dodson y Robyns, 1965); alrededor de 100 de estas especies pertenecen al género *Hippocratea* y el resto al género *Salacia*.

*Hippocratea excelsa* se conoce popularmente como: cancerina, bejuco



del piojo, matapijos, mata piojo, matapijo, guácharo, palo de rosa, ixcate y chumloop (maya), entre otros.

Cabe mencionar que la cancerina es una especie que ha sido ampliamente explotada en México por las propiedades medicinales e industriales que se le atribuyen. En México, existen numerosas personas dedicadas a la explotación de la cancerina, siendo ésta su principal fuente de ingresos dentro de las comunidades más pobres de Guerrero,

Los individuos de esta especie son bejucos leñosos que llegan a medir hasta 17 metros de largo y poseen una corteza café-rojiza, hojas de color verde olivo en fresco y verde grisáceo cuando están secas. La recolección de la raíz de cancerina puede hacerse durante todo el año, pero en tiempo de lluvias aumenta el riesgo para el recolector por la presencia de víboras y plantas aledañas espinosas (**Figura 2.7**) (Feiertag, 2010).

**A****B****C**

**Figura 2.7.** *Hippocratea excelsa* HBK: **A** Corteza, **B** Hojas, **C** Raíz

La especie se distribuye en México en los estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Michoacán, Estado de México, Oaxaca, Yucatán y Puebla (**Figura 2.8**) (Calzada *et al.*, 1991).



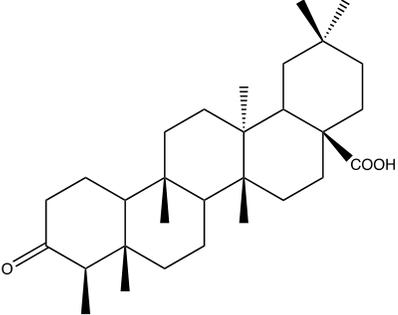
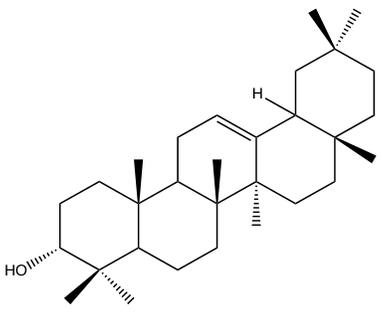
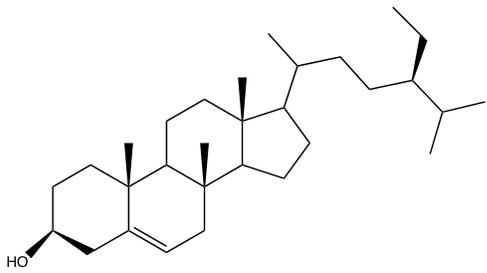
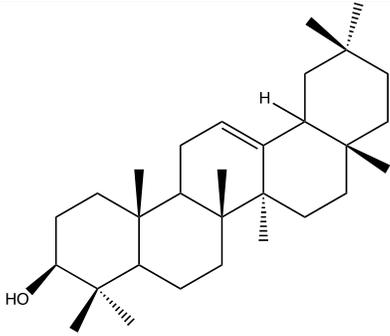
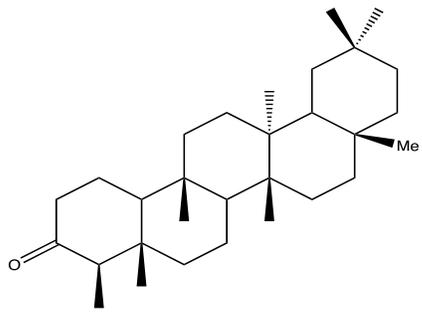
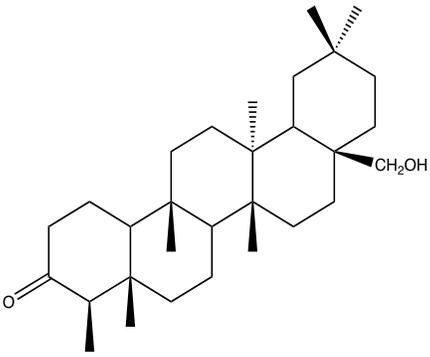
**Figura 2.8.** Distribución de *cancerina* en la República Mexicana

En la medicina tradicional se utiliza principalmente para el tratamiento de las úlceras gástricas, los padecimientos renales, las afecciones de la piel, la amenorrea y algunas infecciones uterinas. Las semillas y las hojas se emplean para el tratamiento de piojos y algunas especies de ácaros, de ahí que en las zonas rurales se le designe como “mata piojo” (Muñoz, 1998).

Los principales metabolitos secundarios de esta especie son los triterpenoides y los alcaloides. También, se ha descrito la presencia de grandes cantidades de un politerpenoide del tipo de la guta, de la (-)-*epi*-catequina en la corteza de la planta y la presencia de flavonoides (rutina). Algunos metabolitos secundarios aislados de *Hippocratea excelsa* K. son: la friedelina, el canofilol, el ácido canofílico, la excelsina, la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, el  $\beta$ -sitosterol, y las hipocrateínas I-III (Tabla 2.1) (Calzada et al., 1991).

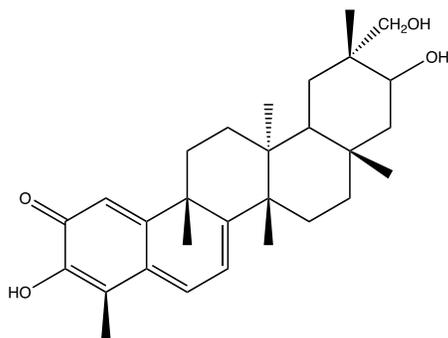


**Tabla 2.1.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea exelsa* HBK

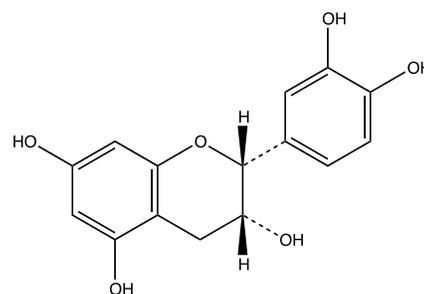
	
<b>Ácido canofilico</b>	<b>α-amirina</b>
	
<b>β- sitosterol</b>	<b>β-amirina</b>
	
<b>Friedelina</b>	<b>Canofilol</b>



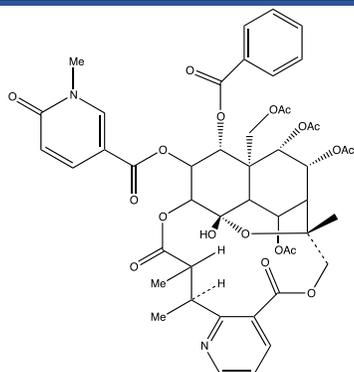
**Tabla 2.1.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hippocratea exelsa* HBK (continuación)



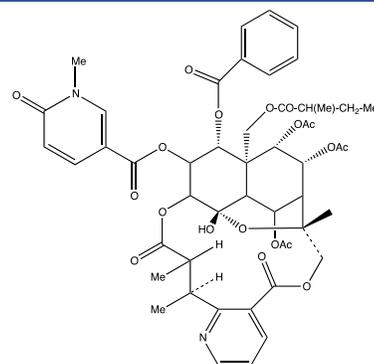
**Excelsina**



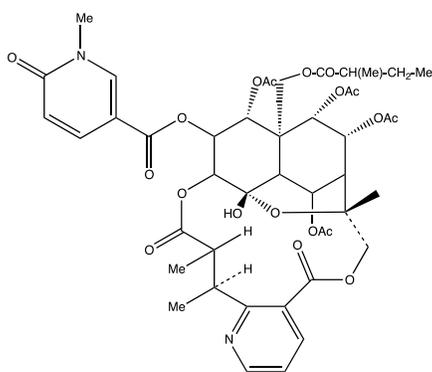
**epi-catequina**



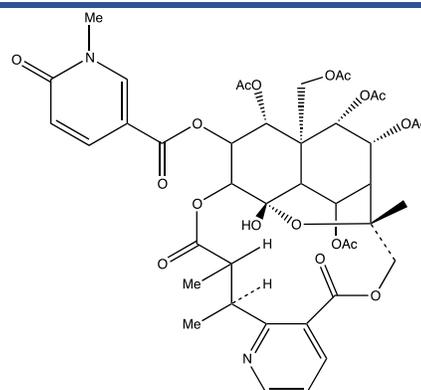
**Hipocrateína I**



**Hipocrateína II**



**Hipocrateína III**



**Emarginatina**



### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Desarrollo del método analítico para cuantificar (-)-*epi*-catequina por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

La identificación de la (-)-*epi*-catequina en las matrices herbolarias se realizó mediante la comparación de su tiempo de retención y la coelución del estándar con los extractos bajo análisis. Para ello, se prepararon las soluciones de los extractos y el estándar a una concentración de 1 mg/mL. Todas las muestras se prepararon utilizando como disolvente una mezcla de H<sub>2</sub>O:MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (946.5:50:3.5). El análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. El desarrollo del método analítico se llevó a cabo empleando una columna C<sub>18</sub> con un tamaño de partícula de 5 μm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno). La fase móvil empleada consistió en una mezcla binaria de disolventes compuesta por CH<sub>3</sub>CN-MeOH (95:5):H<sub>2</sub>O-MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (946.5:50:3.5) utilizando el gradiente descrito en la **Tabla 3.2**. La longitud de onda empleada para la detección fue de 278nm; flujo de 0.8mL/min; volumen de inyección de 20μL.

Las condiciones generales del método analítico desarrollado para la cuantificación de (-)-*epi*-catequina en las matrices herbolarias se resumen en la **Tabla 3.1**.



La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC). También se registraron la resolución; el factor de coe; el factor de capacidad y el número de platos teóricos.

**Tabla 3.1.** Condiciones cromatográficas del método analítico

<b>Fase móvil</b>	<b>Solución A:</b> H <sub>2</sub> O, MeOH, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (946.5: 50: 3.5) <b>Solución B:</b> CH <sub>3</sub> CN: MeOH (95: 5)
<b>Temperatura</b>	Ambiente
<b>Flujo</b>	0.8mL/min
<b>Volumen de inyección</b>	20mL
<b>Longitud de onda</b>	278nm

**Tabla 3. 2.** Gradiente de elución utilizado en el método analítico

<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Solución A (%)</b>	<b>Solución B (%)</b>	<b>Elución</b>
<b>0-20</b>	94	6	Isocrático
<b>20-50</b>	94-78	6-22	Gradiente
<b>50-60</b>	78-38	22-62	Gradiente
<b>60-75</b>	94	6	Isocrático

### 3.2. Preparaciones de las soluciones stock

Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de una solución stock de (-)-*epi*-catequina, disueltas en H<sub>2</sub>O:MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a una concentración de 1000 µg/mL.

A partir de la solución stock se prepararon las curvas de calibración con 7 niveles de concentraciones: 10, 25, 50, 75, 100, 150 y 200 µg/mL.



### 3.3. Evaluación de los parámetros de calidad

#### 3.3.1. Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema se evaluó mediante el análisis por sextuplicado de una solución estándar que contenía 75  $\mu\text{g/mL}$  de (-)-*epi*-catequina preparada por dilución a partir de la solución stock. Los parámetros registrados fueron: el factor de coe (T) y el número de platos teóricos (NPT). El criterio de aceptación establecido en los protocolos de validación establece que el coeficiente de variación (CV), entre réplicas, debe de ser menor del 2.0% para considerar que el sistema es adecuado para la aplicación que se pretende (USP 37).

#### 3.3.2. Selectividad

Para evaluar la especificidad del método se determinó la posible interferencia de los productos de degradación de la (-)-*epi*-catequina obtenidos de la oxidación y las hidrólisis ácida y básica sobre la respuesta cromatográfica. Las muestras se prepararon de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 3.3**. Las soluciones así obtenidas se inyectaron en el sistema cromatográfico (**numeral 3.1**) y se determinó el porcentaje de degradación del analito. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad del método estipula que la respuesta debe corresponder únicamente al analito de interés (USP 37).



**Tabla 3.3.** Condiciones de degradación de la (-)-*epi*-catequina

	<b>(-)-<i>epi</i>-catequina (1000 µg/mL)</b>	<b>Reactivo adicionado</b>	<b>Condiciones de degradación</b>
<b>Hidrolisis ácida</b>	1 mL	1mL HCl 1M	Reflujo por 30 min
<b>Hidrólisis básica</b>	1 mL	1mL NaOH 1M	Reflujo por 30 min
<b>oxidación</b>	1 mL	1mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reflujo por 30 min

### 3.3.3. Linealidad

#### 3.3.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se evaluó mediante la preparación de tres curvas de calibración, con 7 niveles de concentración, preparadas por pesadas independientes. El esquema para realizar las diluciones de trabajo se resume en la **Tabla 3.4**. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables concentración (x) y área bajo la curva (y) y se calculó la **ordenada al origen ( $\beta_0$ )**, la **pendiente de la recta ( $\beta_1$ )**, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación (r).

Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.999$ ; el **intervalo de confianza para la pendiente IC ( $\beta_1$ )** no debe incluir al cero mientras que, el de la **ordenada al origen IC ( $\beta_0$ )** debe incluir al cero (USP 37).



**Tabla 3.4.** Diluciones empleadas en las curvas de calibración para evaluar la linealidad del sistema

Concentración de la solución stock	Nivel de concentración	Alícuota (mL)	Aforo con	Concentración final ( $\mu\text{g/mL}$ )
			$\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}:\text{H}_3\text{PO}_4$ (946.5:50:3.5) (mL)	
<b>(-)-<i>epi</i>-catequina</b> <b>1000 <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	1	0.10	10	10
	2	0.25	10	25
	3	0.50	10	50
	4	0.75	10	75
	5	1.00	10	100
	6	1.50	10	150
	7	2.00	10	200

### 3.3.3.2. Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método y la exactitud se evaluaron preparando, por triplicado, una curva con cinco niveles de concentración en el intervalo de 25-150  $\mu\text{g/mL}$  de (-)-*epi*-catequina. A cada nivel de concentración se adicionó un volumen constante (1.0 mL) de los diferentes extractos; capulín, cancerina y muérdago a una concentración de 1 mg/mL. En la **Tabla 3.5** se resume un ejemplo de las diluciones empleadas para la preparación de las curvas.



**Tabla 3.5.** Diluciones empleadas para evaluar la exactitud y la linealidad del método

Concentración de la solución stock	Nivel de concentración	Alícuota de la disolución stock (mL)	Alícuota de la solución del extracto de capulín (mL)	Aforo con fase móvil A
<b>(-)-epi-catequina</b> <b>1000 µg/mL</b>	1	0.25	1	10
	2	0.50	1	10
	3	0.75	1	10
	4	1.0	1	10
	5	1.5	1	10

Para demostrar la linealidad del método se realizó una regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) y se calcularon los siguientes parámetros:  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ , r y  $r^2$ .

Los criterios de aceptación establecidos para este parámetro son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.999$ ; el intervalo de confianza de la pendiente IC ( $\beta_1$ ) no debe contener el cero pero sí la unidad y el intervalo de confianza para la ordenada al origen IC ( $\beta_0$ ) debe incluir el cero (USP 37).

Por otro lado, para determinar la exactitud de la metodología se calculó el porcentaje de recobro para cada muestra adicionada por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} * 100$$

Finalmente, se calculó para cada nivel el promedio aritmético y la desviación estándar relativa (DER). El método analítico es exacto si los



porcentajes de recuperación se encuentran entre el 98.0%-102.0% y el coeficiente de variación del porcentaje de recobro no es mayor del 2.0% (USP 37).

### **3.3.4. Precisión**

Este parámetro se evaluó por medio de la precisión del sistema y la precisión del método, esta última se realizó por medio de dos parámetros principales: repetibilidad y reproducibilidad.

#### **3.3.4.1. Precisión del sistema**

La precisión del sistema se evaluó mediante el análisis de seis soluciones preparadas a la concentración establecida como el 100% (75 µg/mL). Las soluciones fueron preparadas por diluciones independientes a partir de la misma solución stock. Con los datos obtenidos del análisis cromatográfico se calcularon la desviación estándar (**s**) y el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación establecido para este parámetro indica que el CV no debe exceder del 2.0% para ser considerado como preciso (USP 37).

#### **3.3.4.2. Precisión el método**

##### **3.3.4.2.1. Repetibilidad**

Este parámetro se evaluó mediante la preparación, por sextuplicado, de una muestra del extracto de capulín, de cancerina y del muérdago a una concentración de 75 µg/mL. La respuesta analítica obtenida permitió calcular la desviación estándar (**s**) y el coeficiente de variación (CV). El



criterio de aceptación para esta característica de calidad establece que el coeficiente de variación (CV) no debe ser mayor al 2.0% (USP 37).

#### **3.3.4.2.2. Precisión intradía**

La precisión intradía se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución a 75 µg/mL de (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo; cada muestra se preparó de manera independiente durante dos días. Para determinar el cumplimiento de dicho parámetro se determinó la **media aritmética ( $\hat{y}$ )**, la **desviación estándar ( $s$ )** y el coeficiente de variación (CV). Para cumplir con este parámetro se requiere que el CV sea menor al 2.0% (USP 37).

#### **3.3.4.2.3. Precisión intermedia**

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis, por triplicado, de una solución a 75 µg/mL de (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo preparadas de forma independiente en dos días y por dos analistas diferentes.

Con el área bajo la curva, obtenida como respuesta analítica, se calculó la **media aritmética ( $\hat{y}$ )**, la **desviación estándar ( $s$ )** y el coeficiente de variación (CV). Para cumplir con este parámetro se requiere que el CV sea menor al 2.0% (USP 37).

#### **3.3.5. Robustez**

La robustez del método se evaluó mediante un diseño de experimentos factorial 2<sup>3</sup>. Los factores seleccionados fueron: el pH de la fase móvil, el flujo y el volumen de inyección (**Tabla 3.6**). Para ello, se preparó una solución de las diferentes matrices de herbolarias, adicionada con (-)-*epi*-catequina a una concentración 75 µg/mL. La respuesta medida



en cada experimento fue la resolución del pico correspondiente al analito. El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por duplicado de todas las combinaciones posibles entre los factores. Con los resultados obtenidos se determinó el modelo estadístico.

**Tabla 3.6.** Robustez: factores evaluados en el diseño experimental  $2^3$

<b>Condiciones cromatográficas</b>	<b>Condiciones de operación</b>	<b>Condiciones modificadas (+) 5%</b>	<b>Condiciones modificadas (-) 5%</b>
<b>Proporción de la fase</b>	H <sub>2</sub> O: MeOH: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (94.65: 5: 0.35)	H <sub>2</sub> O: MeOH: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (94.6: 5: 0.4)	H <sub>2</sub> O: MeOH: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (94.7: 5: 0.3)
<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>	0.8	1	0.6
<b>Volumen de inyección (µL)</b>	20	25	15

### 3.3.6. Tolerancia

La tolerancia del método se realizó en un cromatógrafo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV Dual (2487). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower<sup>®</sup> versión 2.0 (Waters). El desarrollo del método analítico se llevó a cabo empleando una columna C<sub>18</sub> con un tamaño de partícula de 5 µm (150 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno) y las condiciones cromatográficas descritas en el numeral 3.1. La respuesta medida en cada experimento fue la resolución del pico correspondiente al analito.



### 3.3.7. Estabilidad de las muestras de (-)-*epi*-catequina

La estabilidad se evaluó mediante el análisis del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en el que la (-)-*epi*-catequina permanecía estable.

El protocolo desarrollado fue el siguiente:

#### 3.3.7.1 Estabilidad de la (-)-*epi*-catequina a temperatura ambiente

Para evaluar este parámetro se preparó una solución a una concentración de 75 µg/mL de la (-)-*epi*-catequina y se conservó a temperatura ambiente durante dos semanas. El análisis se realizó cada 24 h durante los primeros 4 días. Posteriormente, la muestra se analizó cada semana. En todos los casos se analizaron dos réplicas y los resultados se compararon con la respuesta generada por una solución fresca preparada el mismo día del análisis.

#### 3.3.7.2 Estabilidad de la (-)-*epi*-catequina en refrigeración

Para evaluar este parámetro se siguió la metodología descrita en el numeral **3.3.7.1**. En este caso, la muestra se almacenó en refrigeración durante dos semanas.

El criterio de aceptación indica que el porcentaje de DEA (Desviación Estándar Absoluta) entre la muestra recién preparada y las almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración no deberá ser mayor del 2% (USP 37).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo se desarrolló como parte de un proyecto enfocado al control de calidad de especies vegetales de amplio uso en la medicina tradicional. Las especies fueron seleccionadas considerando su potencial como agentes medicinales en la atención primaria de la salud. Con el desarrollo del presente proyecto se pretende establecer una metodología analítica que permita estandarizar formulaciones antes de realizar estudios clínicos para establecer eficacia. La metodología desarrollada permitirá confirmar la identidad de las especies, y determinar el contenido de un marcador para asegurar la consistencia y la reproducibilidad de los productos que se elaboren con ellas (Houghton y Mukherjee, 2009).

En la actualidad no existen normas oficiales con criterios de calidad aplicables a los preparados a base de hierbas. La falta de dichos parámetros ha conducido a una gran variabilidad en los niveles de calidad y eficacia de estos insumos. Por lo tanto, para garantizar la calidad y la eficacia es necesario estandarizar las concentraciones, en límites estrechos, de compuestos marcadores (activos o analíticos) que avalen la reproducibilidad de diferentes lotes (Houghton y Mukherjee, 2009).

El uso de algunas sustancias naturales, en específico estructuras polifenólicas como las catequinas, ha demostrado ser una fuente de protección para el organismo. Las catequinas han recibido mucha atención debido a sus amplias actividades fisiológicas potenciales. Se ha encontrado que algunas catequinas tienen efectos antibacterianos, antifúngicos y antivirales. Otros estudios han demostrado que las catequinas tienen actividad antioxidante y pueden prevenir el daño



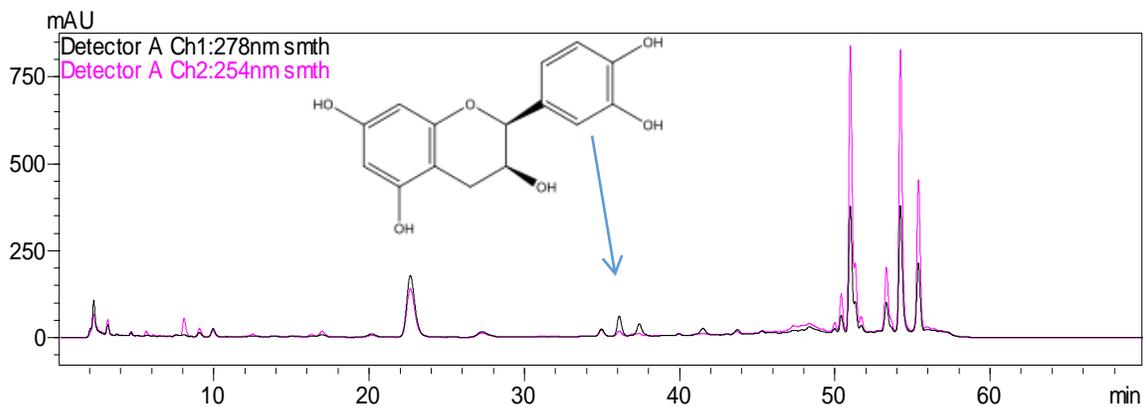
oxidativo en muchos órganos (Bauman *et al.*, 2001). Con base en estas consideraciones en el presente trabajo se desarrolló y validó una metodología conducente a cuantificar a la (-)-*epi*-catequina en tres fuentes naturales con actividad antioxidante.

#### 4.1 Desarrollo del método analítico

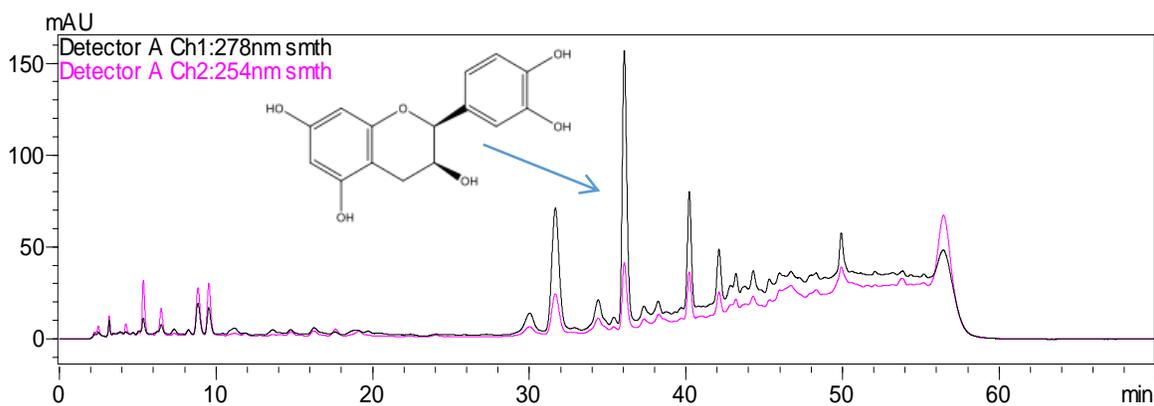
Para el desarrollo del método analítico se revisó, en primer lugar, los métodos publicados para determinar la presencia de (-)-*epi*-catequina en diferentes matrices herbolarias. Para poder encontrar las mejores condiciones de separación en los extractos de capulín, cancerina y muérdago, se comenzó utilizando la metodología descrita en la USP 37 para la cuantificación de polifenoles en té verde. Posteriormente, este método fue modificado con el fin de obtener una mejor resolución en la señal del analito presente en los tres extractos de interés.

Con base en estas consideraciones, se probaron diversos sistemas de elución y flujo hasta encontrar las siguientes condiciones cromatográficas: una columna C<sub>18</sub>, un sistema binario de disolventes compuesto por CH<sub>3</sub>CN: MeOH (95:5); H<sub>2</sub>O: MeOH: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (946.5: 50: 3.5) y una longitud de onda de detección de 278nm.

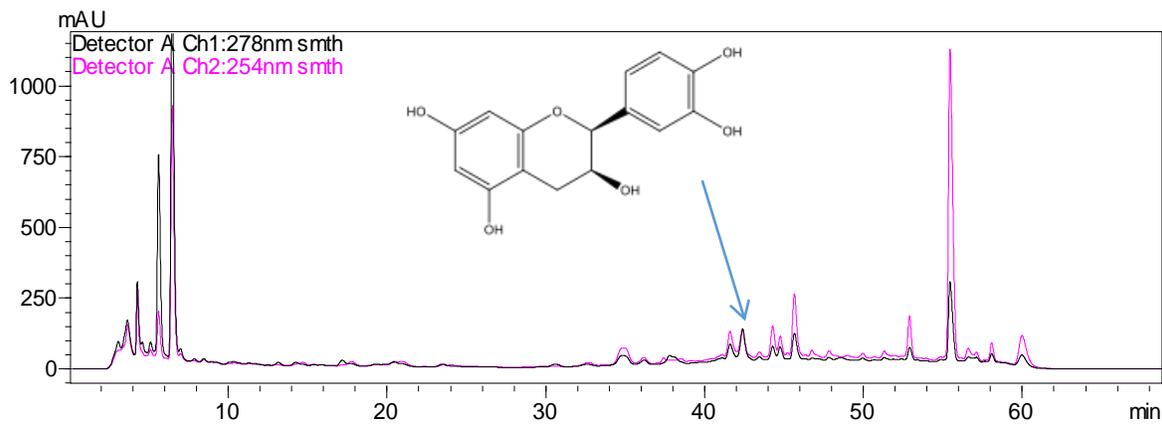
En las **Figuras 4.1-4.3** se ilustran los perfiles cromatográficos generados con las diferentes matrices de trabajo utilizadas.



**Figura 4.1.** Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de capulín (1000 µg/mL)



**Figura 4.2.** Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de cancerina (1000 µg/mL).



**Figura 4.3.** Cromatograma correspondiente al extracto metanólico de muérdago (1000 µg/mL).



Una vez establecidas las condiciones cromatográficas del método de cuantificación, se registraron los parámetros cromatográficos que se resumen en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** Parámetros cromatográficos de la (-)-*epi*-catequina obtenidos con el método analítico

	<b>(-)-<i>epi</i>-catequina</b>
Factor de capacidad ( $k'$ )	1.142
Factor de coeio (T)	1.125
Número de platos teóricos	74506.392
Resolución (R) con respecto a la señal anterior	32.108

## 4.2 Validación del método analítico

La validación de un método de análisis es un proceso que se genera, por medio de estudios de laboratorio, una serie de datos que demuestran científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas, es decir, para cumplir con su propósito. El objetivo de la validación es demostrar que el método de análisis es conveniente para los fines previstos (FEUM, 2014; USP, 37).

Un método de análisis debe de ser validado cuando es necesario verificar que el desempeño de sus parámetros es adecuado para su uso particular en un problema analítico (Eurachem, 1998).

Por otra parte, los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos, están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, así como con otros documentos



normativos nacionales e internacionales. La Secretaría de Salud, a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), establece que los métodos analíticos que no estén publicados en la FEUM deben ser validados.

Para validar los métodos analíticos la FEUM y la USP dividen las metodologías en cuatro categorías:

- CATEGORÍA I. Método analítico para cuantificar un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.
- CATEGORÍA II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.
- CATEGORÍA III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra con el objetivo de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
- CATEGORÍA IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés (FEUM, 2014; USP, 2014).

Los parámetros de desempeño recomendados para validar métodos pertenecientes a la categoría I son la precisión y la linealidad del sistema, la especificidad/selectividad, la exactitud, la linealidad y la precisión del método, mientras que la adecuabilidad del sistema, la



tolerancia y la robustez pueden ser evaluadas opcionalmente, dependiendo de la naturaleza del método.

Por lo tanto, para validar el método analítico propuesto se evaluaron todos los parámetros de desempeño mencionados anteriormente. Los criterios de aceptación para cada parámetro de desempeño fueron los descritos en la USP 37.

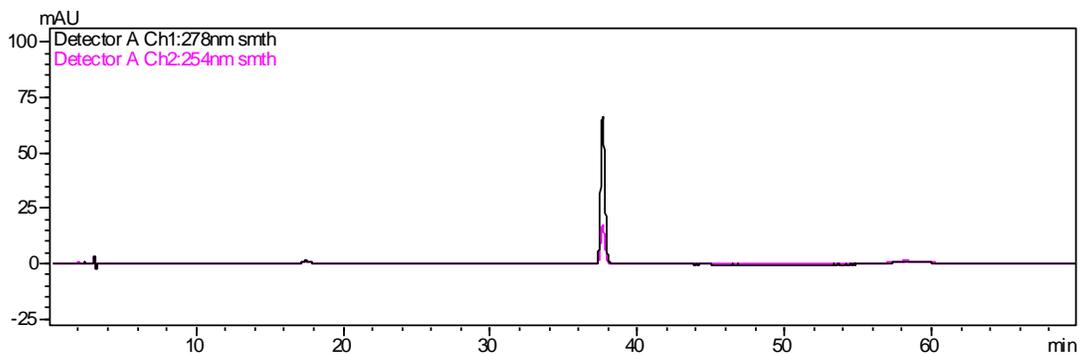
## 4.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño

### 4.2.1.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos entre ellos, los cromatográficos. Esta prueba se basa en el concepto de que: el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras que van a ser analizadas constituyen un sistema integral, que puede ser evaluado como tal. La adecuabilidad del sistema permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método (FEUM, 2014).

Este criterio de calidad se determinó mediante el análisis por sextuplicado de una solución de (-)-*epi*-catequina a una concentración de 75  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos permitieron estimar que la resolución, entre las señales, es mayor a 2.0 y el coeficiente de variación entre las réplicas es menor a 2.0%. Por lo tanto, el sistema en general, es adecuado para la aplicación que se pretende.

En la **Figura 4.4** y en la **Tabla 4.2** se resumen los datos obtenidos para una corrida analítica.



**Figura 4.4** Cromatograma obtenido con una solución de (-)-*epi*-catequina (75 µg/mL)

**Tabla 4.2.** Evaluación del sistema

Concentración de (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL)	$t_R$ (min)	Área bajo la curva (ABC)
<b>Réplica 1</b>	37.544	1369072
<b>Réplica 2</b>	37.756	1369092
<b>Réplica 3</b>	37.63	1362510
<b>Réplica 4</b>	37.64	1346115
<b>Réplica 5</b>	37.59	1367923
<b>Réplica 6</b>	37.559	1352947
$\bar{y}$		1361276.5
$s$		9662.3
<b>CV (%)</b>		0.71

#### 4.2.1.2. Selectividad

La especificidad se refiere a la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés en presencia de otros compuestos que pueden estar presentes, tales como



impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra (FEUM, 2014).

La especificidad del método se evaluó determinando el efecto de 3 diferentes condiciones de degradación. El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que no deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés.

En los **Tabla 4.3 y 4.4** se resumen los resultados obtenidos para cada condición evaluada así como los porcentajes de degradación calculados.

**Tabla 4.3.** Resultados obtenidos durante la degradación de la (-)-*epi*-catequina

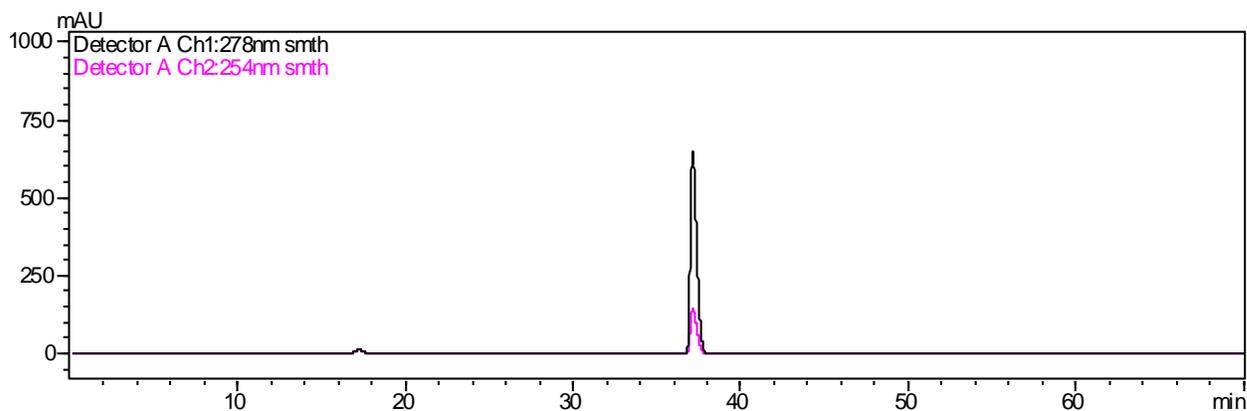
Factor a evaluar	Replica (-)- <i>epi</i> -catequina (75 µg/mL.	Tiempo de retención ( $t_R$ )	Área bajo la curva (ABC)
<b>Estándar</b>	1	37.256	16886049
	2	37.137	16812344
<b>Degradación ácida</b>	1	37.358	2241399
	2	37.272	2270275
<b>Degradación Básica</b>	1	—	—
	2	—	—
<b>Oxidación</b>	1	37.066	2686847
	2	36.895	2674272

**Tabla 4.4.** Porcentaje de degradación para cada tratamiento

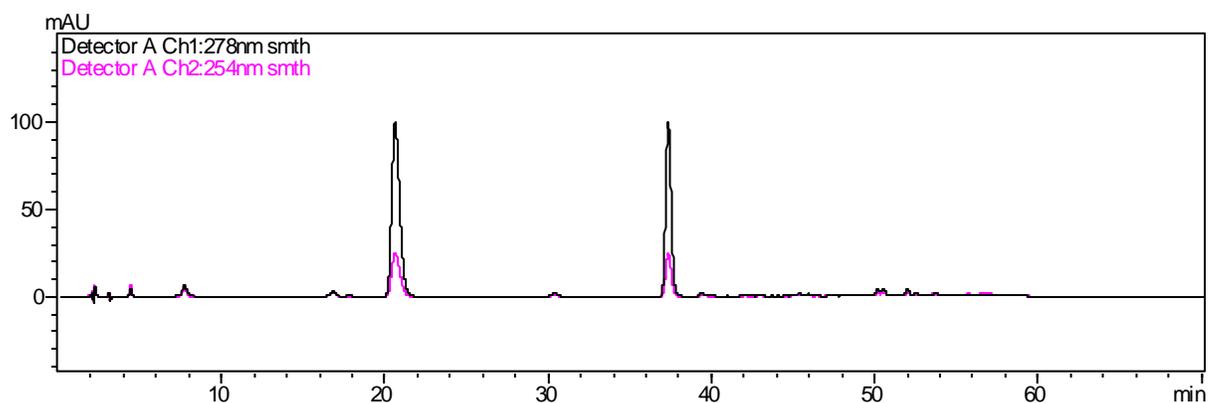
	% de degradación	CV (%)
<b>Hidrólisis ácida</b>	86.6	0.9
<b>Hidrólisis básica</b>	100	
<b>Oxidación</b>	84.1	0.3



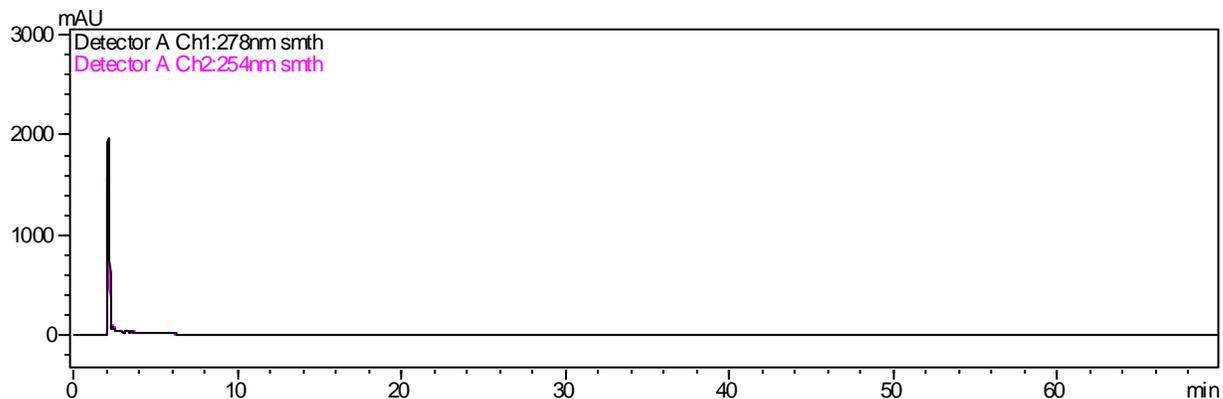
Como se observa en las **Figuras 4.5-4.8**, los productos de degradación generados bajo las condiciones experimentales no interfieren con la señal del metabolito de interés. Con base en los resultados obtenidos se concluye que la respuesta obtenida en las condiciones cromatográficas utilizadas se debe exclusivamente a la presencia de la (-)-*epi*-catequina. Por lo tanto, el método analítico propuesto es selectivo.



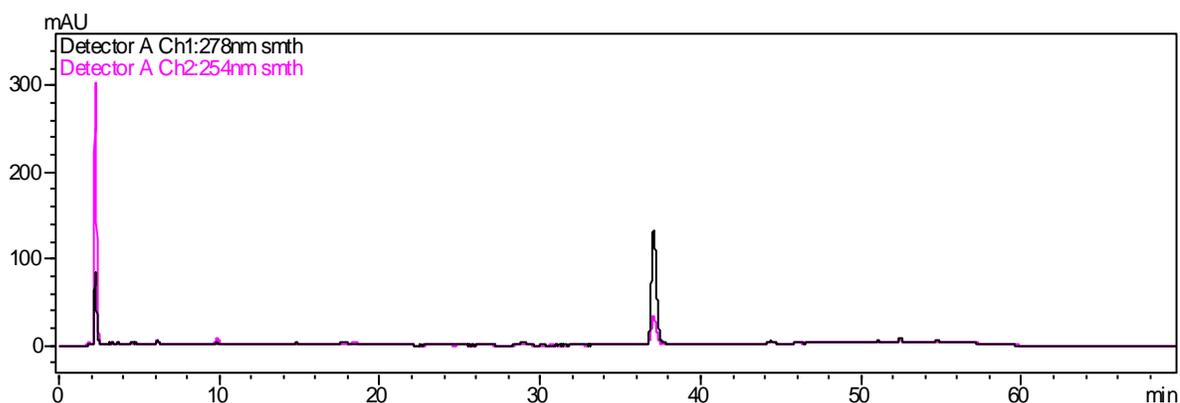
**Figura 4.5.** Cromatograma generado por una solución de (-)-*epi*-catequina antes de someterla a condiciones de degradación forzada



**Figura 4.6** Cromatograma correspondiente a la degradación ácida de la (-)-*epi*-catequina (75  $\mu\text{g/mL}$ )



**Figura 4.7** Cromatograma correspondiente a la degradación básica de la (-)-*epi*-catequina (75  $\mu\text{g/mL}$ )



**Figura 4.8.** Cromatograma correspondiente a la oxidación de la (-)-*epi*-catequina (75  $\mu\text{g/mL}$ )

#### 4.2.1.3. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentraciones pertinentes con la aplicación analítica (FEUM, 2014).



#### 4.2.1.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad de un sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan a un modelo matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica (FEUM, 2014).

El rango de concentraciones para la (-)-*epi*-catequina se estableció mediante el cálculo aproximado de la concentración en las matrices de trabajo; este valor fue asignado como la concentración al 100%. El cálculo se realizó analizando soluciones de concentraciones conocidas del estándar y de los extractos metanólicos derivados del capulín, la cacerina y el muérdago. Una vez establecida esta concentración (denominada como 100%), el intervalo de concentraciones se estableció en un rango del 25% al 200% debido a la gran variabilidad en contenido que pueden presentar estos extractos.

Este parámetro de desempeño se evaluó mediante el análisis, por triplicado, de una curva con siete niveles de concentración de (-)-*epi*-catequina. Los datos obtenidos para la linealidad del sistema permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado:

$$\text{Área} = 32657.3 + 17740.2 * \text{Concentración}$$

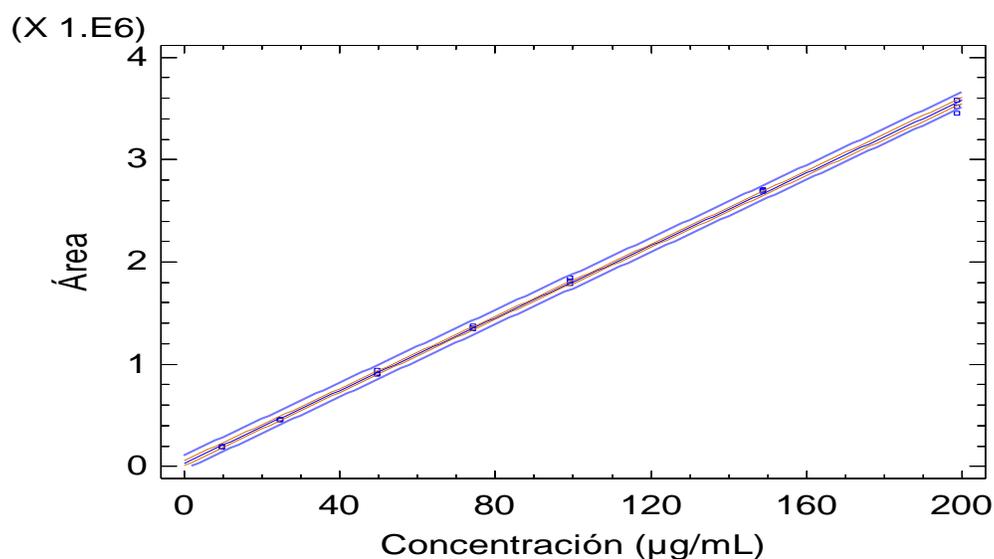
Los resultados obtenidos para la respuesta analítica se resumen en la **Tabla 4.5**. Como se deduce del análisis estadístico el valor del coeficiente de correlación sugiere una relación lineal entre el área y la concentración (**Gráfica 4.1**).



Por otro lado, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) permite establecer que el 99.9% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo. Finalmente, en la **Tabla 4.6** se observa que con un nivel de confianza del 95% la ordenada al origen no incluye el cero. Este hallazgo posiblemente se deba a un error sistemático relacionado con el sistema en conjunto o bien, a interferencias de diversa índole. No obstante, los datos obtenidos fueron analizados para evaluar la falta de ajuste al modelo (**Tabla 4.7**).

**Tabla 4.5.** Parámetros estadísticos de la regresión lineal del sistema

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	32657
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	17740
<b>Coeficiente de correlación (<math>r</math>)</b>	0.9996
<b>Coeficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9992





**Tabla 4.6** Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del sistema

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	32657.3136	12086.3124	2.7020	0.0141	7360.3711	57954.2561
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	17740.1749	113.01952	156.965582	4.805E-31	17503.6223	17976.7274

La prueba de Falta de Ajuste está diseñada para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, o si se debería utilizar un modelo más complicado. La prueba se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre observaciones hechas en valores repetidos de la variable independiente X. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, el modelo parece ser adecuado para los datos observados con un nivel de confianza del 95.0%.



**Tabla 4.7.** Análisis de varianza con carencia de ajuste de la regresión lineal del sistema

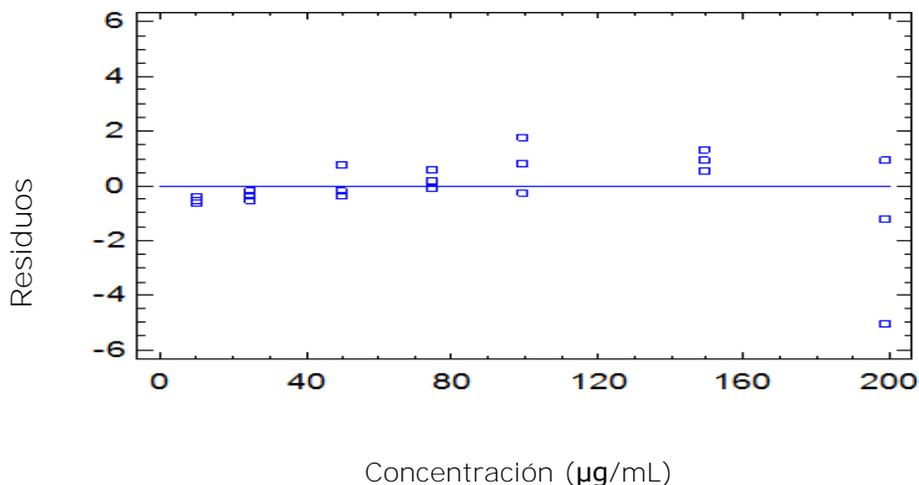
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA CON CARENCIA DE AJUTES</b>					
	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor P
<b>Regresión</b>	2.62E+13	1	2.62E+13	24638.19	<0.05
<b>Residuos</b>	2.02E+10	19	1.06E+09		
<b>Carencia de Ajuste</b>	9.28E+09	5	1.86E+09	2.38	
<b>Error Puro</b>	1.09E+10	14	7.80E+08		
<b>Total</b>	2.62E+13	20			

Por otra parte, la distribución de los datos en la gráfica de residuales (**Gráfica 4.2**) sugiere que la varianza de los errores es constante por lo tanto, el modelo de regresión lineal es adecuado para la aplicación que se pretende.

Con base en el análisis estadístico realizado se establece que el sistema es lineal para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el intervalo de concentraciones establecido.



**Gráfica 4.2.** Gráfica de residuales para el modelo de linealidad del sistema



#### 4.2.1.3.2 Linealidad del método

Para evaluar este parámetro de desempeño se construyó una curva con la concentración adicionada y la concentración recuperada en las matrices herbolarias seleccionadas (Gráfica 4.3-4.5). Los datos empleados para este propósito obtenidos de las muestras de capulín, cancerina y muérdago se resumen en las Tablas 4.8, 4.9 y 4.10, respectivamente. Como se observa en las Gráficas 4.3-4.5 los resultados siguen una tendencia lineal. El análisis estadístico de los datos permitió calcular las siguientes ecuaciones para la (-)-epi-catequina en las diferentes matrices vegetales:

##### **Linealidad del método utilizando el extracto de capulín:**

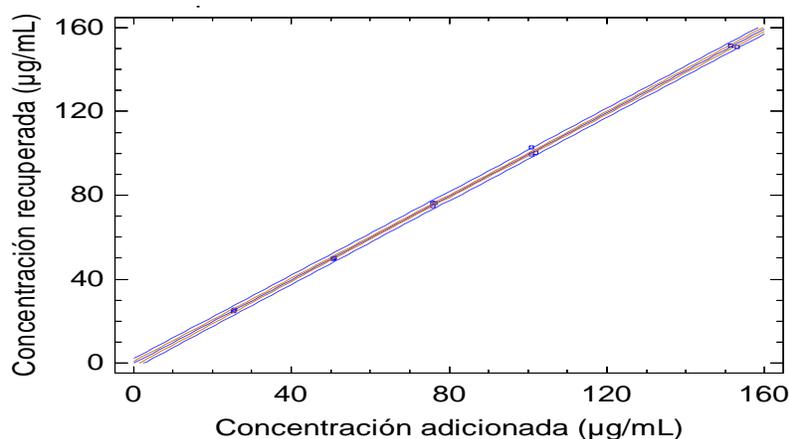
$$\text{Concentración recuperada} = -0.20463 + 0.996768 * \text{concentración}$$



**Tabla 4.8.** Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

Concentración de (-)- <i>epi</i> -catequina	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
25	466630	25.3	25.2
25	461449	25.3	24.9
25	476798	25.5	25.4
50	885644	50.5	49.9
50	881988	50.5	49.7
50	1062360	51.0	50.2
75	1414136	75.8	76.2
75	1391467	75.8	75.0
75	1471808	76.5	76.4
100	1856218	101.0	102.8
100	1798371	101.0	99.6
100	1936070	102.0	100.2
150	2580814	151.5	151.5
150	2578814	151.5	151.4
150	2807859	153	150.8

**Gráfica 4.3.** Linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín





### Linealidad del método utilizando el extracto de cancerina:

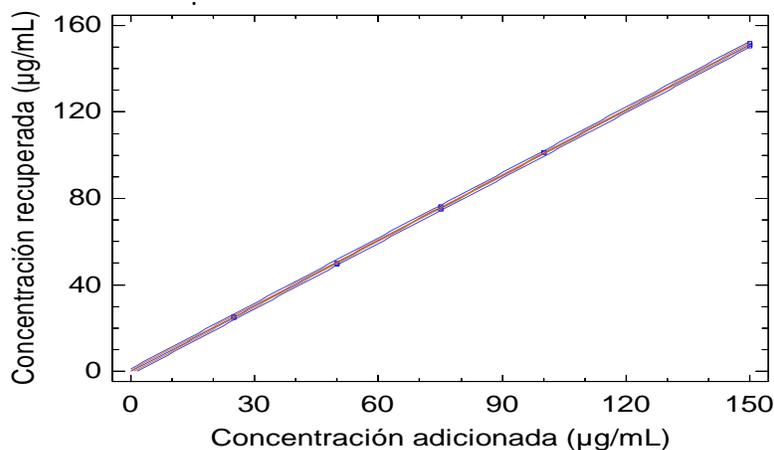
Concentración recuperada =  $-0.103604 + 1.00905 * \text{Concentración}$

**Tabla 4.9.** Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

Concentración de (-)- <i>epi</i> -catequina	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)
<b>25</b>	497698	25	25.2
<b>25</b>	492889	25	24.9
<b>25</b>	455858	25	25.6
<b>50</b>	901799	50	49.6
<b>50</b>	906591	50	49.9
<b>50</b>	911463	50	50.2
<b>75</b>	1333296	75	75.0
<b>75</b>	1344810	75	75.7
<b>75</b>	1358089	75	76.4
<b>100</b>	1787119	100	100.9
<b>100</b>	1798090	100	101.5
<b>100</b>	1761983	100	101.3
<b>150</b>	2580681	150	150.3
<b>150</b>	2590934	150	150.9
<b>150</b>	2607957	150	151.9



**Gráfica 4.4.** Linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina



#### Linealidad del método utilizando el extracto de muérdago:

$$\text{Concentración recuperada} = 0.137838 + 1.00102 * \text{Concentración}$$

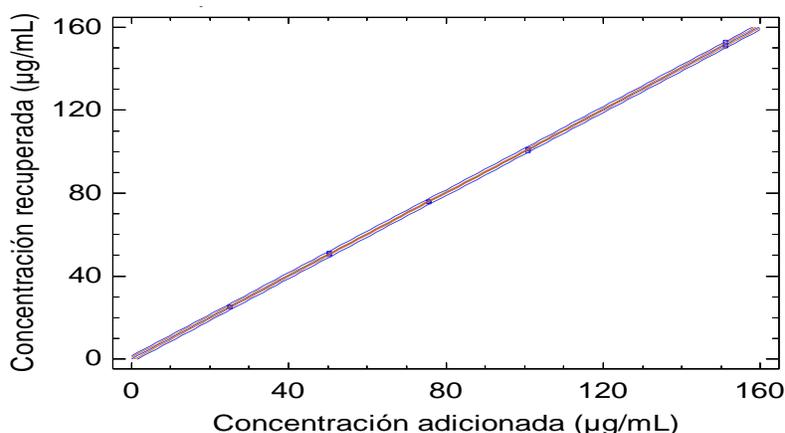
**Tabla 4.10.** Datos obtenidos para evaluar la linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago

Concentración de (-)- <i>epi</i> -catequina	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)
<b>25</b>	453778	25.2	25.0
<b>25</b>	465915	25.2	25.6
<b>25</b>	459137	25.2	25.3
<b>50</b>	874950	50.4	50.2
<b>50</b>	888893	50.4	51.0
<b>50</b>	895644	50.4	51.4
<b>75</b>	1368760	75.6	75.9
<b>75</b>	1367249	75.6	75.8
<b>75</b>	1361714	75.6	75.5
<b>100</b>	1823763	100.8	101.3



<b>100</b>	1817333	100.8	100.9
<b>100</b>	1802801	100.8	100.1
<b>150</b>	2677295	151.2	151.3
<b>150</b>	2664574	151.2	150.6
<b>150</b>	2706288	151.2	153.0

**Gráfica 4.5.** Linealidad del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago



En las **Tablas 4.11, 4.13 y 4.15** se describen los parámetros estadísticos calculados para los modelos de las tres matrices empleadas. En todos los casos, los coeficientes de correlación son mayores a 0.999 mientras que, los coeficientes de determinación superan un valor de 0.98.

Por otra parte, los intervalos de confianza (**Tablas 4.12, 4.14 y 4.16**) para la ordenada al origen incluyen el cero, mientras que para la pendiente incluyen la unidad en los tres modelos estimados. Con base en estos hallazgos se concluye que el método cumple con los criterios de linealidad establecidos para validar este parámetro de desempeño.



**Tabla 4.11.** Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-0.1283
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	0.9961
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	0.9998
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9996

**Tabla 4.12.** Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de capulín

	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico T</b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	0.2406	0.5322	0.4521	0.6587	-0.9091	1.3902
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.0028	0.0058	172.5607	3.1323E-23	0.98	1.0

**Tabla 4.13.** Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-0.102
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.009
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	0.9999
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9998



**Tabla 4.14.** Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de cancerina

	<b>Coefficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico <i>t</i></b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-0.1036	0.3134	-0.3306	0.7462	-0.7806	0.5734
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.0090	0.0034	292.4814	3.293E-26	1.0016	1.0

**Tabla 4.15.** Parámetros estadísticos de la regresión lineal: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago

<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	0.1357
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.001
<b>Coefficiente de correlación (<i>r</i>)</b>	0.9999
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9998

**Tabla 4.16.** Intervalos de confianza al 95% para la ordenada al origen y la pendiente del modelo para evaluar la linealidad del método empleando extracto de muérdago

	<b>Coefficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico <i>t</i></b>	<b>Probabilidad</b>	<b>Inferior 95%</b>	<b>Superior 95%</b>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	0.1378	0.3499	0.3939	0.7000	-0.6182	0.8938
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.0010	0.0038	261.9010	1.38E-25	0.9928	1.0



El análisis de varianza del modelo permitió calcular un valor-P menor a 0.005 en todos los casos, corroborando, con ello que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración (**Tablas 4.17-4.19**). Enseguida, se realizó un análisis de varianza para probar el significado de la regresión (**Tablas 4.17-4.19**). En todos los casos se obtuvo un valor de F observado mayor al crítico; por ende, la pendiente es estadísticamente distinta de cero y los modelos de regresión lineal calculados para el método son adecuados.

**Tabla 4.17.** Análisis de varianza del modelo lineal: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Regresión</b>	1	28301.64	28301.64	29777.19	<0.05
<b>Residuos</b>	13	12.36	0.95		
<b>Total</b>	14	28314			

**Tabla 4.18.** Análisis de varianza del modelo: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

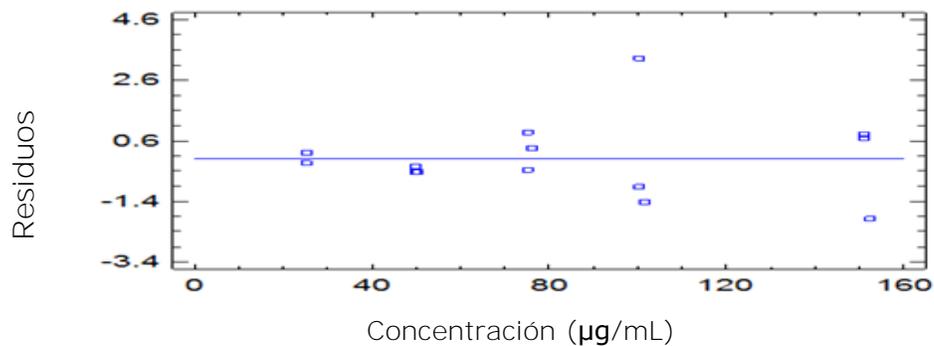
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA</b>					
	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Regresión</b>	1	28254.27	28254.27	85545.35	<0.05
<b>Residuos</b>	13	4.29	0.33		
<b>Total</b>	14	28258.56			



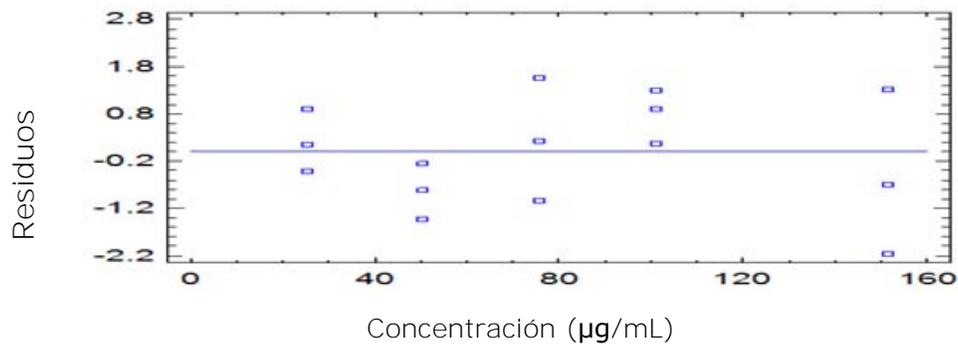
**Tabla 4.19.** Análisis de varianza del modelo lineal: método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>Regresión</b>	1	28253.26	28253.26	68592.14	<0.05
<b>Residuos</b>	13	5.35	0.41		
<b>Total</b>	14	28258.62			

**Gráfica 4.6.** Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de capulín

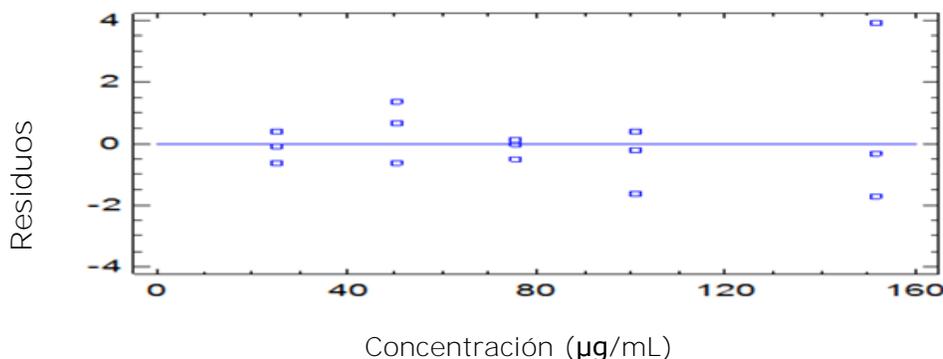


**Gráfica 4.7** Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de cancerina





**Gráfica 4.8.** Residuales del modelo de linealidad del método empleando extracto de muérdago



Finalmente, las gráficas de residuos (**Gráficas 4.6-4.8**) indicaron que la varianza de los errores es constante. Con base en el análisis estadístico realizado, se determinó que el método analítico es lineal en el rango de concentraciones establecido para la cuantificación de (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo.

#### 4.2.1.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra a una cantidad fija (FEUM, 2014). En las **Tablas 4.20, 4.21 y 4.22** se resumen los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método para la cuantificar a la (-)-*epi*-catequina en los extractos de capulín, cancerina y muérdago.



**Tabla 4.20.** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de capulín

Nivel de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recobro	$\bar{y}$ % Recobro	S	CV (%)
25	466630	25.3	25.2	99.9			
25	461449	25.3	24.9	98.8	99.5	0.6	0.6
25	476798	25.5	25.4	99.8			
50	885644	50.5	49.9	98.9			
50	881988	50.5	49.7	98.5	98.6	0.2	0.2
50	1062360	51.0	50.2	98.5			
75	1414136	75.8	76.2	100.6			
75	1391467	75.8	75.0	99.0	99.8	0.8	0.8
75	1471808	76.5	76.4	99.8			
100	1856218	101.0	102.8	101.8			
100	1798371	101.0	99.6	98.6	99.5	2.0	2.0
100	1936070	102.0	100.2	98.2			
150	2580814	151.5	151.5	100.0			
150	2578814	151.5	151.4	99.9			
150	2807859	153.0	150.8	98.6	99.5	0.8	0.8

**Tabla 4.21.** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de cancerina

Nivel de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recobro	$\bar{y}$ % Recobro	S	CV (%)
25	497698	25	25.2	100.6			
25	492889	25	24.9	99.6	100.9	1.5	1.5
25	455858	25	25.6	102.5			
50	901799	50	49.6	99.3	99.8	0.9	0.9



<b>50</b>	906591	50	49.9	99.8			
<b>50</b>	911463	50	50.2	100.3			
<b>75</b>	1333296	75	75.0	100.0			
<b>75</b>	1344810	75	75.7	100.9	100.9	0.9	0.9
<b>75</b>	1358089	75	76.4	101.9			
<b>100</b>	1787119	100	100.9	100.9			
<b>100</b>	1798090	100	101.5	101.5	101.3	0.3	0.3
<b>100</b>	1761983	100	101.3	101.3			
<b>150</b>	2580681	150	150.3	100.2			
<b>150</b>	2590934	150	150.9	100.6	100.7	0.5	0.5
<b>150</b>	2607957	150	151.9	101.3			

**Tabla 4.22.** Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método empleando extracto de muérdago

Nivel de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recobro	$\bar{y}$ % Recobro	S	CV (%)
<b>25</b>	453778	25.2	25.0	99.1			
<b>25</b>	465915	25.2	25.6	101.8	100.4	1.3	1.3
<b>25</b>	459137	25.2	25.3	100.3			
<b>50</b>	874950	50.4	50.2	99.6			
<b>50</b>	888893	50.4	51.0	101.2	100.9	1.2	1.2
<b>50</b>	895644	50.4	51.4	102.0			
<b>75</b>	1368760	75.6	75.9	100.4			
<b>75</b>	1367249	75.6	75.8	100.3	100.2	0.3	0.3
<b>75</b>	1361714	75.6	75.5	99.9			
<b>100</b>	1823763	100.8	101.3	100.5			
<b>100</b>	1817333	100.8	100.9	100.1	100.0	0.6	0.6
<b>100</b>	1802801	100.8	100.1	99.3			
<b>150</b>	2677295	151.2	151.3	100.1	100.3	0.8	0.8



<b>150</b>	2664574	151.2	150.6	99.6
<b>150</b>	453778	151.2	153.0	101.2

Los porcentajes de recobro obtenidos de la (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo para cada nivel de concentración ensayado se encuentran dentro de los límites establecidos por USP 37 para métodos cromatográficos (98.0-102.0%). Asimismo, la desviación estándar relativa obtenida para cada nivel es menor al 2.0%. Por lo tanto, el método analítico es exacto para cuantificar el metabolito secundario en los tres extractos estudiados.

#### 4.2.1.5 Precisión

La precisión de un método analítico expresa la concordancia entre una serie de mediciones independientes. La precisión puede ser evaluada a través de los siguientes niveles: precisión del sistema, precisión del método y precisión intermedia (FEUM, 2014).

##### 4.2.1.5.1 Precisión del sistema

La precisión del sistema se refiere a la variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica, que puede ser originada por el analista, equipo o instrumentos de medición (FEUM, 2014).

La precisión del sistema se evaluó mediante el análisis de seis soluciones preparadas, en metanol, una concentración de 75 µg/mL de (-)-*epi*-catequina. En la **Tabla 4.23** se resume la respuesta analítica obtenida. Con base en el valor del coeficiente de variación se deduce que el sistema es preciso.



**Tabla 4.23.** Datos obtenidos para evaluar la precisión del sistema

Concentración de (-)- <i>epi</i> -catequina (75µg/mL)	Área bajo la curva (ABC)
<b>Inyección 1</b>	1348325
<b>Inyección 2</b>	1357849
<b>Inyección 3</b>	1348142
<b>Inyección 4</b>	1348277
<b>Inyección 5</b>	1377361
<b>Inyección 6</b>	1368760
$\bar{y}$	1358119
$S$	12457.0163
CV (%)	0.91722568

#### 4.2.1.5.2 Precisión del método

La precisión se evaluó aplicando el método analítico a una muestra homogénea empleando las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bien diferentes (reproducibilidad). La precisión de un método analítico generalmente se expresa en términos de desviación estándar relativa o coeficiente de variación (FEUM, 2014).

##### 4.2.1.5.2.1. Repetibilidad

La repetibilidad es una medida de la variabilidad que se presenta entre los resultados generados del análisis de muestras durante una corrida analítica (rutina de trabajo) (FEUM, 2014).

En las Tablas **4.24-4.26** se resumen las respuestas medidas para cada uno de los extractos. Como se deduce de la información presentada, el método es preciso para cuantificar el marcador en las matrices vegetales.



**Tabla 4.24.** Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de capulín

Muestra	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Réplica 1</b>	1565607	75.4	74.8
<b>Réplica 2</b>	1579064	75.4	75.5
<b>Réplica 3</b>	1564159	75.4	74.8
<b>Réplica 4</b>	1561506	75.4	74.6
<b>Réplica 5</b>	1581376	75.4	75.6
<b>Réplica 6</b>	1558492	75.4	74.5
$\bar{y}$			75.0
$s$			0.5
<b>CV (%)</b>			0.6

**Tabla 4.25.** Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de cancerina

Muestra	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Réplica 1</b>	1381551	75	74.9
<b>Réplica 2</b>	1385906	75	75.2
<b>Réplica 3</b>	1358089	75	73.6
<b>Réplica 4</b>	1389658	75	75.4
<b>Réplica 5</b>	1408627	75	76.4
<b>Réplica 6</b>	1387728	75	75.3
$\bar{y}$			75.1
$s$			0.9
<b>CV (%)</b>			1.2



**Tabla 4.26.** Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de muérdago

Muestra	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Réplica 1</b>	1344033	74.3	73.7
<b>Réplica 2</b>	1364537	74.3	74.8
<b>Réplica 3</b>	1361069	74.3	74.6
<b>Réplica 4</b>	1328113	74.3	72.8
<b>Réplica 5</b>	1344014	74.3	73.7
<b>Réplica 6</b>	1349301	74.3	74
$\bar{y}$			73.9
$s$			0.7
<b>CV (%)</b>			1.0

#### 4.2.1.5.2.2 Precisión intradía

La **Tabla 4.27** sintetiza los resultados obtenidos para cuantificar la (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo por un solo analista en dos días diferentes. Considerando que el coeficiente de variación en todos los casos es menor al 2.0% se deduce que el método analítico es preciso bajo las condiciones de análisis.



**Tabla 4.27.** Datos obtenidos evaluar la precisión intradía realizado por un solo analista en dos días diferentes

Muestra	Día	Área	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{y}$	s	CV (%)
Capulín	1.0	1384857.0	75.8	75.5	75.5	0.2	0.2
		1387936.0	75.8	75.7			
		1381545.0	75.8	75.3			
	2.0	1378522.0	75.8	75.4			
		1378951.0	75.8	75.4			
		1384330.0	75.8	75.7			
Cancerina	1.0	1376445.0	75.8	74.6	75.1	0.9	1.2
		1377100.0	75.8	74.6			
		1419714.0	75.8	76.9			
	2.0	1374664.0	75.8	75.1			
		1370875.0	75.8	74.9			
		1361076.0	75.8	74.4			
Muérdago	1.0	1371313.0	75.8	74.8	75.4	0.7	0.9
		1397437.0	75.8	76.2			
		1391363.0	75.8	75.9			
	2.0	1378039.0	75.8	75.3			
		1362180.0	75.8	74.5			
		1387307.0	75.8	75.8			

#### 4.2.1.5.2.3 Precisión intermedia

La precisión intermedia es una estimación de la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas (FEUM, 2014).



En las **Tablas 4.28-4.30** se resumen los resultados obtenidos para cuantificar la concentración de (-)-*epi*-catequina en las matrices de trabajo. De nueva cuenta, el coeficiente de variación para cada extracto es menor al 2.0%. Con base en estos resultados se concluye que el método analítico es preciso bajo las condiciones de análisis en el laboratorio.

**Tabla 4.28.** Precisión intermedia del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

Día	Analista	Área	Concentración	Concentración	$\bar{y}$	<i>s</i>	CV (%)
			adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )			
1	A	1371844	74.25	74.9	74.8	0.5	0.6
		1381822	74.25	75.4			
		1379250	74.25	75.3			
	B	1358163	74.63	74.5			
		1352059	74.63	74.2			
		1362307	74.63	74.7			
2	A	1400886	75	75.2	74.5	0.7	0.6
		1392427	75	74.8			
		1381200	75	74.2			
	B	1379585	75.3	75.3			
		1361877	75.3	74.3			
		1344172	75.3	73.4			



**Tabla 4.29.** Precisión intermedia del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

Día	Analista	Área	Concentración	Concentración	$\bar{y}$	S	CV (%)
			adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )			
1	A	1354507	74.3	74.3	76.1	1.3	1.0
		1378351	74.3	75.6			
		1370150	74.3	75.1			
	B	1403733	76.5	77.3			
		1409853	76.5	77.7			
		1385984	76.5	76.4			
2	A	1387895	75	75.2	75.2	0.3	
		1382765	75	75			
		1380226	75	74.8			
	B	1386365	75	75.5			
		1379325	75	75.1			
		1383831	75	75.4			

**Tabla 4.30.** Precisión intermedia del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago

Día	Analista	Área	Concentración	Concentración	$\bar{y}$	S	CV (%)
			adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )			
1	A	1364537	74.3	74.8	75.1	0.8	
		1378045	74.3	75.6			
		1344014	74.3	73.7			
	B	1375919	76.5	75.8			
		1364943	76.5	75.2			



		1374671	76.5	75.7			1.1
		1376918	75	75.7			
	A	1347328	75	74.1			
		1346142	75	74			
2		1385449	75	75.5	74.9	0.8	
	B	1365785	75	74.4			
		1383959	75	75.4			

#### • 4.2.1.6 Robustez

Es la capacidad de un método analítico para mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en las características normales de operación del método (FEUM, 2014; USP, 2014). En métodos cromatográficos, las variaciones típicas que se evalúan para este parámetro de desempeño son: el pH de la fase móvil, la proporción de disolventes en la fase móvil, la temperatura y el flujo, entre otros (FEUM, 2014; USP, 2014).

Para evaluar la robustez del método se empleó un diseño factorial  $2^3$ . Los factores evaluados fueron la composición de la fase móvil (factor A), el flujo (factor B) y el volumen de inyección (factor C) sobre la resolución de la señal correspondientes a la (-)-*epi*-catequina. Cada factor se evaluó en dos niveles, permitiendo ocho combinaciones posibles.

##### 4.2.1.6.1. Resolución de la señal cromatográfica de la (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

Los resultados obtenidos para este diseño se encuentran resumidos en la **Tabla 4.31**. Para calcular el modelo factorial se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:



**Resolución** =  $0.73075 + 9.3975 \cdot \text{Composición de H}_3\text{PO}_4 \text{ en la fase móvil} + 7.26625 \cdot \text{Flujo} + 0.0432 \cdot \text{Volumen de inyección} - 22.9125 \cdot \text{Composición de H}_3\text{PO}_4 \text{ en la fase móvil} \cdot \text{Flujo} - 0.0925 \cdot \text{Composición de H}_3\text{PO}_4 \text{ en la fase móvil} \cdot \text{Volumen de inyección} - 0.032625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Volumen de inyección}$

La **Tabla 4.32** sintetiza el análisis de varianza calculado para el modelo. Como se deduce de esta información la proporción de ácido fosfórico, el flujo y la interacción AB tienen un efecto significativo (95.0% de nivel de confianza) en la resolución debido a que su valor P es menor a 0.05. En contraste, las interacciones AC y BC no presentan un efecto significativo en la resolución de las señales. Cabe mencionar que en la **Gráfica 4.10** se observa que ninguno de los factores presenta interacción.

**Tabla 4.31.** Resultados obtenidos para evaluar la resolución del pico de la (-)-*epi*-catequina en el extracto de capulín

Factores				Respuesta
Bloque	Composición de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> fase móvil	Flujo	Volumen de inyección	Resolución
1	0.4	0.6	25	2.928
1	0.4	0.6	15	3.005
1	0.3	0.6	15	3.688
1	0.4	1.0	15	2.255
1	0.4	1.0	25	2.024
1	0.3	1.0	25	3.499
1	0.3	0.6	25	3.617
1	0.3	1.0	15	3.502
2	0.4	1.0	25	1.795
2	0.3	1.0	15	3.826
2	0.3	1.0	25	3.569
2	0.4	1	15	2.176
2	0.4	0.6	25	3.146
2	0.3	0.6	25	3.706



2	0.3	0.6	15	3.801
2	0.4	0.6	15	3.253

**Tabla 4.32.** Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de capulín

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>A:</b> Composición de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en fase móvil	4.65049	1	4.65049	308.55	0
<b>B:</b> Flujo	1.2645	1	1.2645	83.9	0
<b>C:</b> Volumen de inyección	0.0933302	1	0.0933302	6.19	0.0376
<b>AB</b>	0.839972	1	0.839972	55.73	0.0001
<b>AC</b>	0.00855625	1	0.00855625	0.57	0.4728
<b>BC</b>	0.0170302	1	0.0170302	1.13	0.3188
<b>bloques</b>	0.0355322	1	0.0355322	2.36	0.1632
<b>Error total</b>	0.120578	8	0.0150722		
<b>Total (corr.)</b>	7.02999	15			

R-cuadrada = 98.3 %

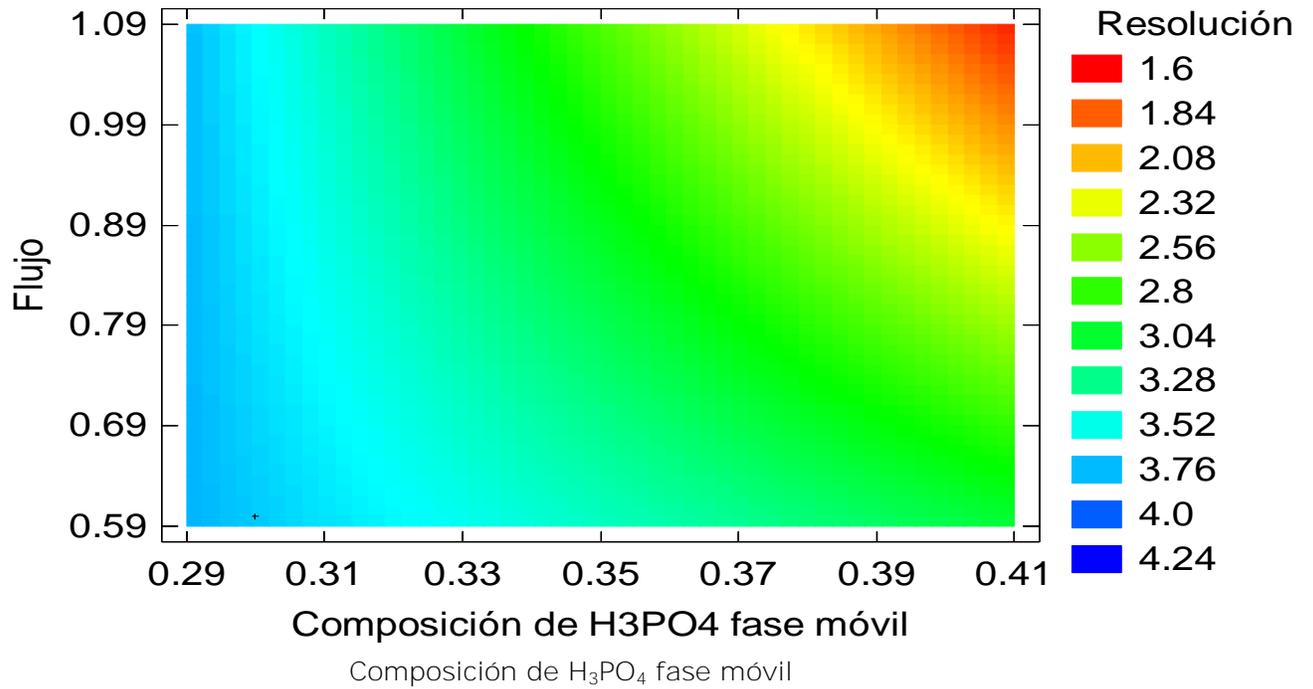
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97.1%

En la gráfica de contornos de superficie de respuesta estimada (**Gráfica 4.9**) se ilustra que, de acuerdo con el modelo establecido la mayor resolución se obtiene empleando un volumen de inyección de 20  $\mu$ L, 0.3% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en la fase móvil y un flujo de 0.6mL/min. En contraste, con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L, 0.4% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en la fase móvil y un flujo de 1.0 mL/min la resolución calculada es de 1.0.

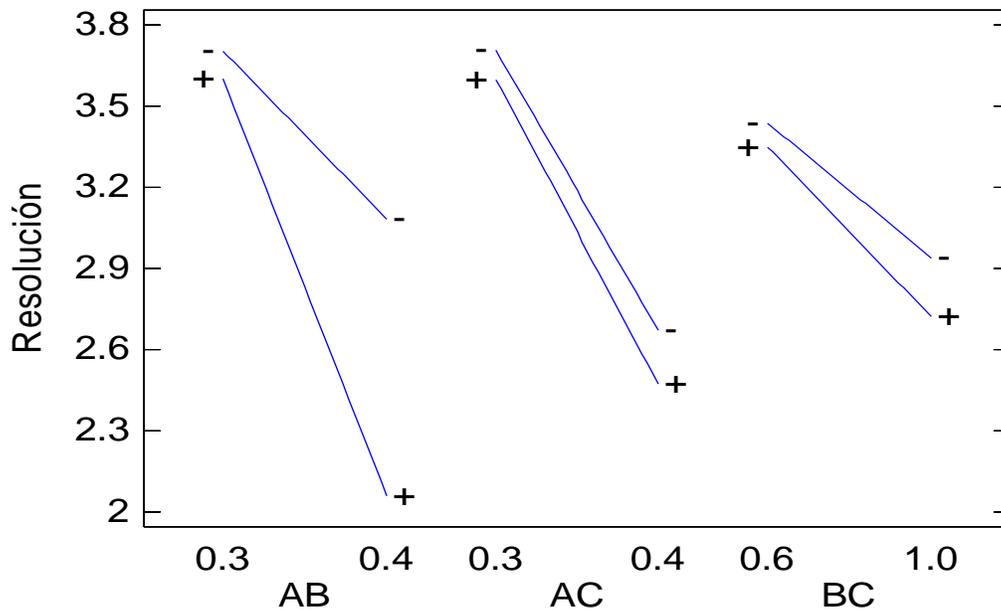
La **Gráfica 4.11** ilustra la varianza homogénea del modelo debido a la distribución paralela de los puntos. De lo anterior se deduce que el modelo no presenta datos atípicos y puede ser empleado con fines de estimación y predicción de la respuesta.



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada  
Volumen de inyección=20.0

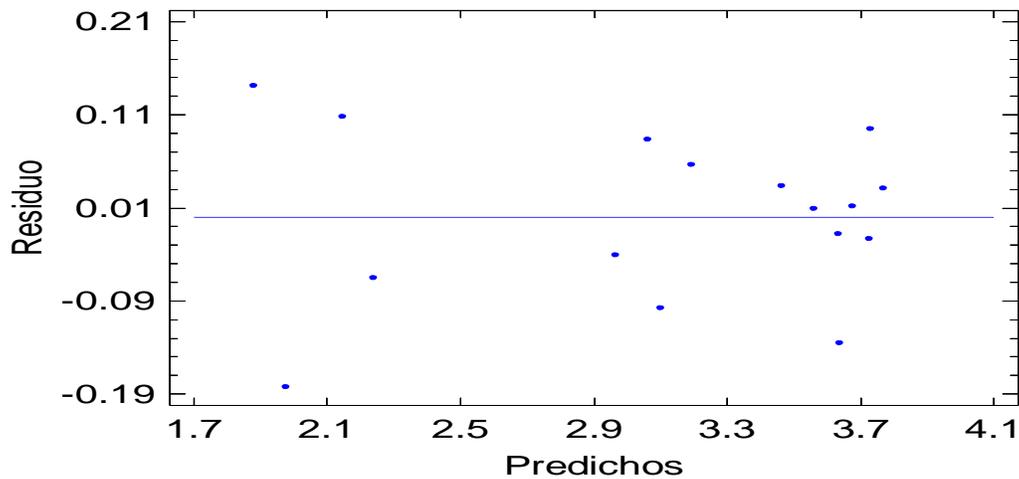


Gráfica 4.10. Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental





**Gráfica 4.11.** Gráfica de residuos de resolución



#### 4.2.1.6.2 Resolución de la señal cromatográfica de la (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

De nueva cuenta, se empleó el procedimiento señalado en el inciso **4.2.1.6.1** para calcular el modelo correspondiente al extracto de cancerina. En las **Tablas 4.33** y **4.34** se resumen los resultados correspondientes a la resolución de la (-)-*epi*-catequina en dicho extracto. Por otra parte, en las **Gráficas 4.12-4.14** se ilustran los contornos de superficie, las interacciones entre los factores y gráfica de residuos.

**Tabla 4.33.** Resultados obtenidos para evaluar la resolución del pico de la (-)-*epi*-catequina en el extracto de cancerina

Bloque	Factores			Respuesta
	Composición $H_3PO_4$ fase móvil	Flujo	Volumen de inyección	Resolución
1	0.3	1.0	25	2.939
1	0.3	0.6	15	2.892
1	0.4	0.6	15	3.203



1	0.3	0.6	25	1.011
1	0.4	0.6	25	2.462
1	0.4	1.0	15	2.802
1	0.3	1.0	15	1.108
1	0.4	1.0	25	2.638
2	0.4	1.0	25	2.512
2	0.4	0.6	15	3.415
2	0.3	0.6	25	0.757
2	0.3	1.0	15	1.216
2	0.4	1.0	15	2.653
2	0.4	0.6	25	2.257
2	0.3	0.6	15	1.304
2	0.3	1.0	25	2.823

**Tabla 4.34.** Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de cancerina

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:</b> Composición de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en fase móvil	3.89273	1	3.89273	13.97	0.0057
<b>B:</b> Flujo	0.120756	1	0.120756	0.43	0.5288
<b>C:</b> Volumen de inyección	0.0891022	1	0.0891022	0.32	0.5872
<b>AB</b>	0.509082	1	0.509082	1.83	0.2134
<b>AC</b>	0.645612	1	0.645612	2.32	0.1664
<b>BC</b>	3.47823	1	3.47823	12.49	0.0077
<b>bloques</b>	0.28037	1	0.28037	1.01	0.3451
<b>Error total</b>	2.22847	8	0.278558		
<b>Total (corr.)</b>	11.2443	15			

R-cuadrada = 80.1814 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 66.9691%



Como se puede apreciar en la **Tabla 4.34** el valor-P obtenido para la interacción BC y para el factor composición de la fase móvil es menor a 0.05 indicando que ejercen un efecto significativo en la resolución con un nivel de confianza de 95.0%, en este caso las interacciones AB y AC no tienen un efecto significativo. Sin embargo en la **Gráfica 4.13** se puede observar que presentan interacción AB, AC y BC.

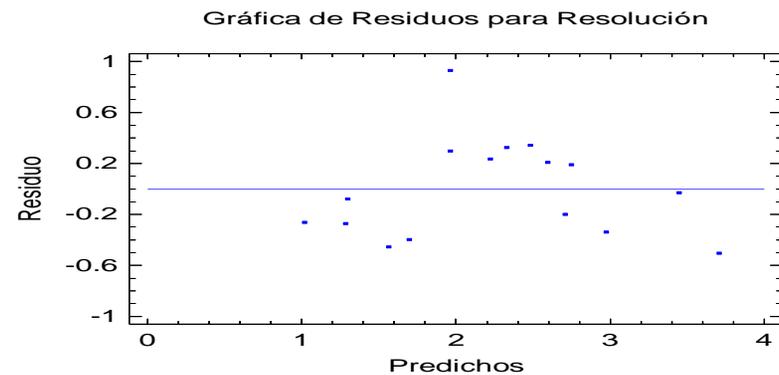
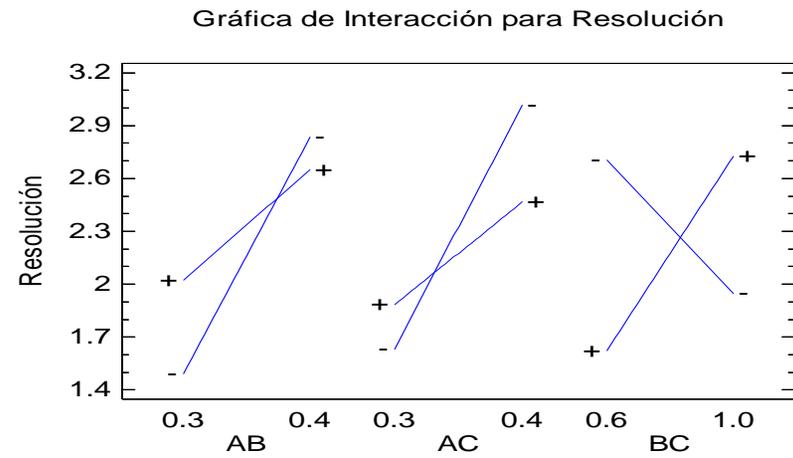
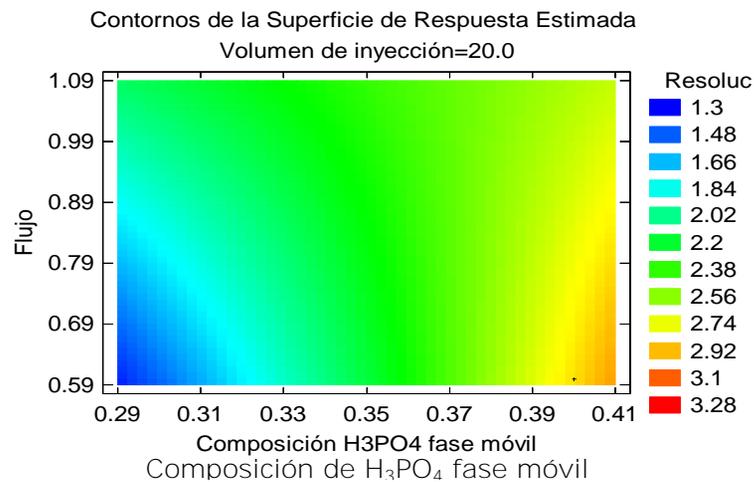
En la gráfica de contornos de superficie (**Gráfica 4.12**) se puede observar que de acuerdo al modelo establecido, con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , se obtiene una mayor resolución cuando se utiliza 0.4% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en la fase móvil y un flujo de 0.6mL/min. Por otra parte, en la **Gráficas 4.14** de residuales se observa que los datos no siguen ninguna tendencia, por lo que el modelo calculado es adecuado.



### Ecuación que describe el Modelo Factorial (cancerina):

**Resolución** =  $-4.41125 + 40.205 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} - 2.6475 \cdot \text{Flujo} - 0.1067 \cdot \text{Volumen de inyección} - 8375 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} \cdot \text{Flujo} - 0.8035 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} \cdot \text{Volumen de inyección} + 0.46625 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Volumen de inyección}$

**Gráfica 4.12.** Gráfica de contornos de la superficie de respuesta





#### 4.2.1.6.3 Resolución de la señal cromatográfica de la (-)-*epi*-catequina en el extracto de muérdago

**Tabla 4.35.** Datos obtenidos para determinar el efecto de los factores evaluados sobre la resolución del pico de la (-)-*epi*-catequina

Bloque	Factores			Respuesta
	Composición H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> fase móvil	Flujo	Volumen de inyección	Resolución
<b>1</b>	0.4	0.6	25	1.821
<b>1</b>	0.3	0.6	25	1.702
<b>1</b>	0.4	1	15	2.671
<b>1</b>	0.4	0.6	15	2.047
<b>1</b>	0.3	0.6	15	2.01
<b>1</b>	0.3	1	15	2.55
<b>1</b>	0.4	1	25	2.654
<b>1</b>	0.3	1	25	2.576
<b>2</b>	0.4	0.6	15	2.188
<b>2</b>	0.3	1	25	2.816
<b>2</b>	0.3	0.6	25	1.745
<b>2</b>	0.3	0.6	15	1.879
<b>2</b>	0.4	0.6	25	1.956
<b>2</b>	0.3	1	15	2.583
<b>2</b>	0.4	1	25	2.694
<b>2</b>	0.4	1	15	2.639

**Tabla 4.36.** Análisis de Varianza del modelo empleando extracto de muérdago

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>A:</b> Composición de H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> en fase móvil	0.0409051	1	0.0409051	6.8	0.0312
<b>B:</b> Flujo	2.12795	1	2.12795	353.97	0
<b>C:</b> Volumen de inyección	0.0227256	1	0.0227256	3.78	0.0878
<b>AB</b>	0.0184281	1	0.0184281	3.07	0.1181
<b>AC</b>	0.00351056	1	0.00351056	0.58	0.4667
<b>BC</b>	0.0895506	1	0.0895506	14.9	0.0048
<b>bloques</b>	0.0137476	1	0.0137476	2.29	0.1689
<b>Error total</b>	0.0480935	8	0.00601169		
<b>Total (corr.)</b>	2.36491	15			

R-cuadrada = 97.97 %

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96.6 %

De nueva cuenta en la **Tabla 4.36** se observan los valores de P obtenidos para cada factor y sus interacciones indicando en ello que el porcentaje de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en la fase móvil, el flujo y la interacción BC presentan un efecto significativo sobre la resolución. La gráfica de interacciones (**Gráfica 4.16**) corresponde a lo predicho por el análisis de varianza, en donde BC presentan interacción, mientras que AB y BC no la presentan. El estadístico R-cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica el 97.97% de la variabilidad en resolución.

En la gráfica de contornos de la superficie estimada (**Gráfica 4.15**) se muestra el valor estimado de la resolución, cuando se fija el volumen de inyección a 20 µL y se modifican las condiciones de flujo y la



composición de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en la fase móvil. De esta manera, la mayor resolución se obtiene a un flujo de 1.0 mL/min y una composición de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en la fase móvil de 0.4%.

Por otra parte en la **Gráficas 4.16** de residuos para resolución se observa que los datos no siguen ninguna tendencia, por lo que el modelo calculado es adecuado.

De acuerdo con el estudio de robustez realizado, se concluye que el flujo y la proporción de ácido fosfórico en la fase móvil son factores que influyen significativamente en la resolución de los extractos. Por la tanto, no se pueden modificar los parámetros cromatográficos del método.

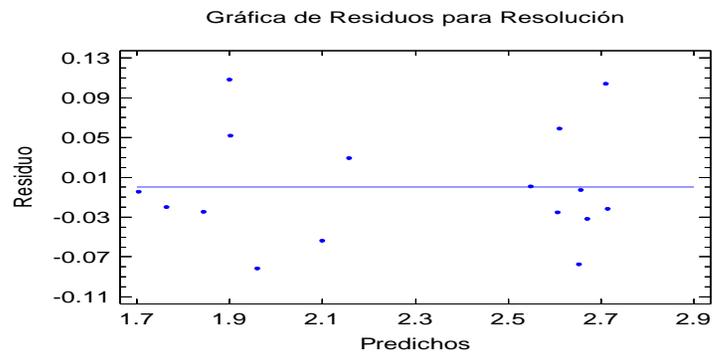
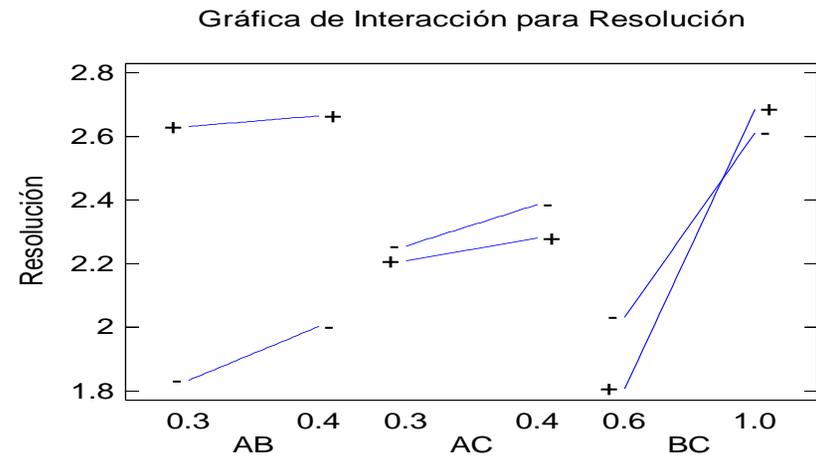
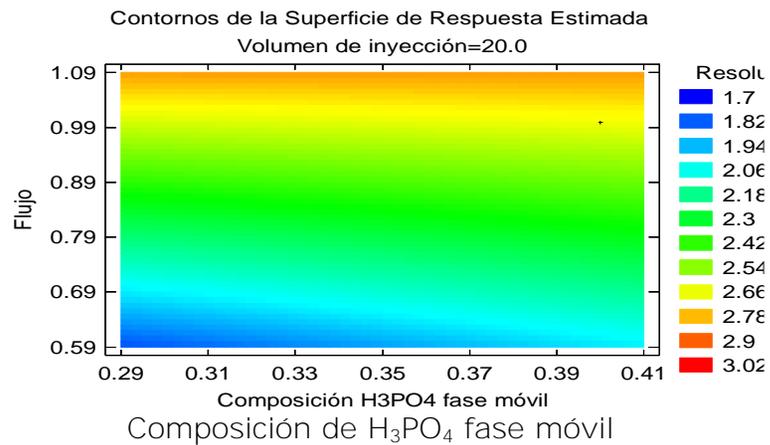
En el **Anexo II** se pueden apreciar los cromatogramas correspondientes de este parámetro de desempeño.



### Ecuación que describe el Modelo Factorial (muérdago):

$$\text{Resolución} = 0.45325 + 4.91125 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} + 1.515 \cdot \text{Flujo} - 0.04665 \cdot \text{Volumen de inyección} - 3.39375 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} \cdot \text{Flujo} - 0.05925 \cdot \text{Composición H}_3\text{PO}_4 \text{ fase móvil} \cdot \text{Volumen de inyección} + 0.0748125 \cdot \text{Flujo} \cdot \text{Volumen de inyección}$$

**Gráfica 4.15.** Gráfica de contornos de la superficie de respu

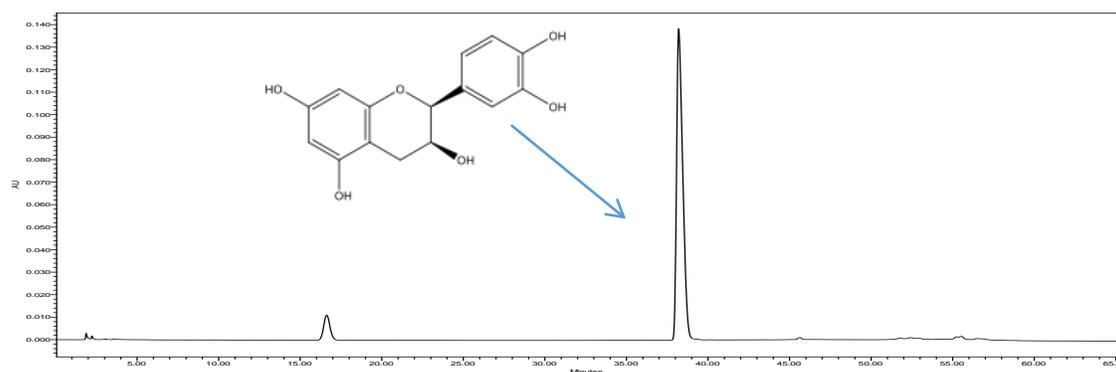




### 4.2.1.7 Tolerancia

Los resultados de los métodos analíticos pueden variar por una serie de factores relacionados con diferentes condiciones externas o inherentes al método. Es por ello, que la tolerancia se define como el grado de reproducibilidad, entre los resultados obtenidos, del análisis de una misma muestra bajo condiciones variables como: diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos y días entre otros (FEUM, 2014; USP, 2014).

Para evaluar este parámetro de calidad se prepararon las tres matrices vegetales y se analizaron en un cromatógrafo de líquidos marca Waters®. La respuesta medida en cada experimento fue la resolución del pico correspondiente a la (-)-*epi*-catequina. En las **Figuras 4.9-4.15** se ilustran los cromatogramas correspondientes. De manera general, el perfil cromatográfico para cada matriz vegetal se reproduce y la resolución de la señal para la (-)-*epi*-catequina es mayor a 2.0. Con base en estos hallazgos se concluye que el método es reproducible empleando dos sistemas cromatográficos diferentes.



**Figura 4.9.** Cromatograma correspondiente a una solución de (-)-*epi*-catequina (75 µg/mL)

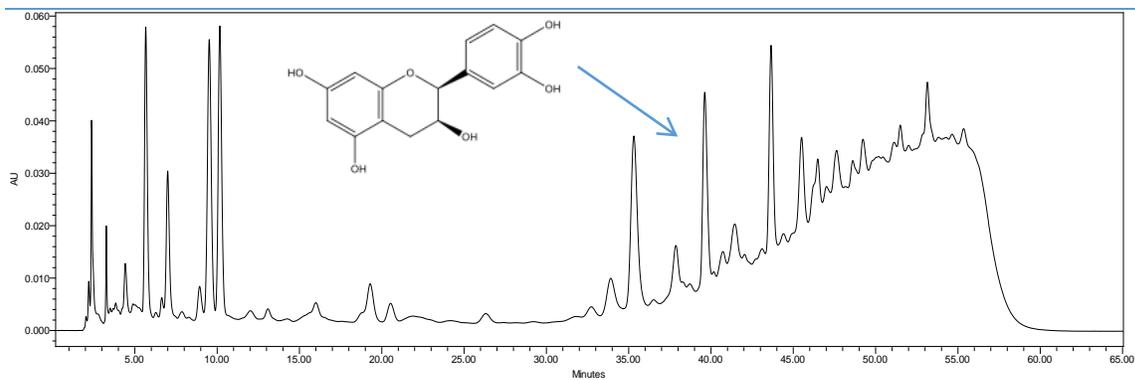


Figura 4.10. Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de cancerina a una concentración de 20 mg/mL

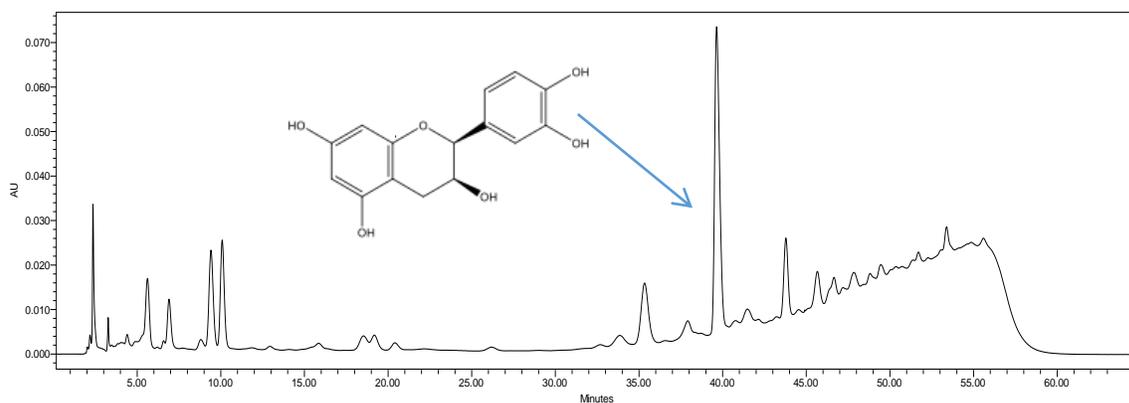


Figura 4.11. Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de cancerina a una concentración de 20 mg/mL adicionado con (-)-*epi*-catequina

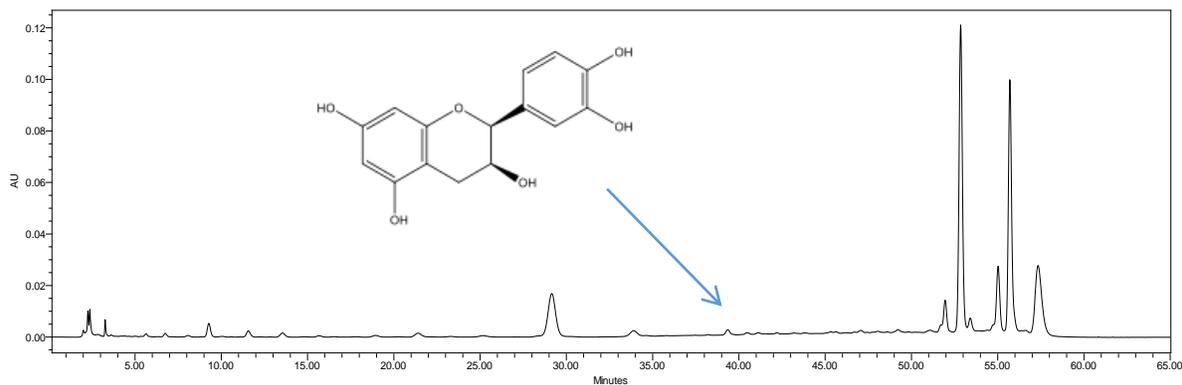


Figura 4.12 Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de capulín a una concentración de 1 mg/mL

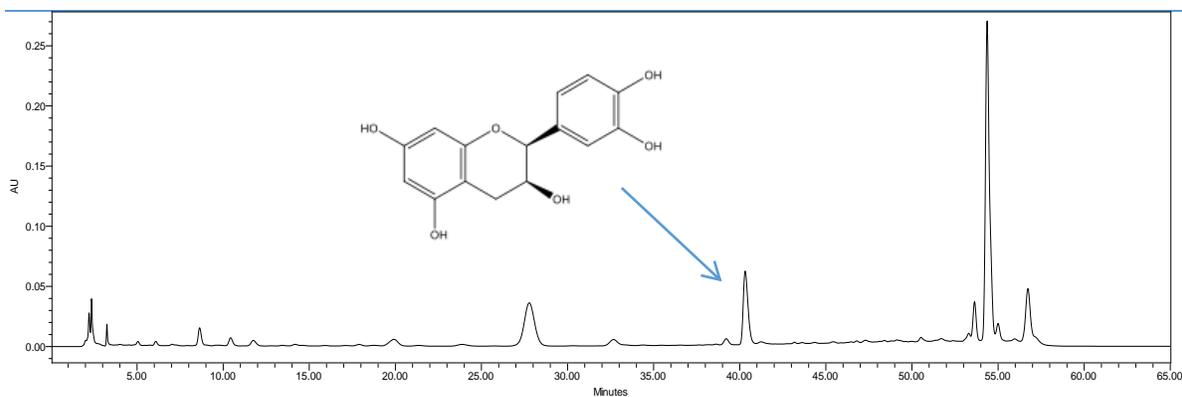


Figura 4.13. Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de capulín a una concentración de 5 mg/mL adicionado con (-)-*epi*-catequina

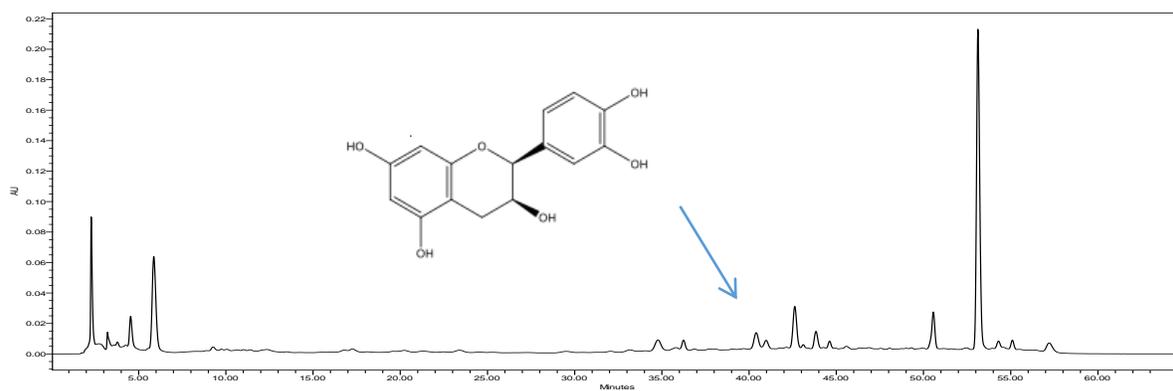


Figura 4.14. Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de muérdago a una concentración de 1 mg/mL

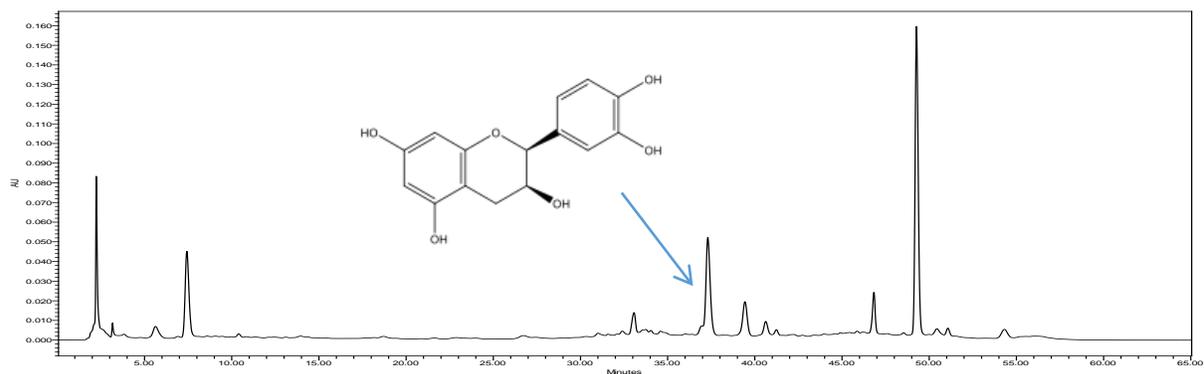


Figura 4.15. Cromatograma correspondiente a una solución del extracto de muérdago a una concentración de 1 mg/mL adicionado con (-)-*epi*-catequina



#### 4.2.1.8. Estabilidad del estándar de (-)-*epi*-catequina

La estabilidad es la propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo en condiciones determinadas (USP 37).

##### 4.2.1.8.1 Estabilidad de la (-)-*epi*-catequina a temperatura ambiente

Para evaluar este parámetro se preparó una solución a una concentración de 75 µg/mL de (-)-*epi*-catequina y se almacenó a temperatura ambiente durante dos semanas. Para asegurarse de que el metabolito secundario fuera estable a la condición ensayada se verificó, además, la ausencia de señales correspondientes a productos de degradación del producto de interés. Los cálculos se realizaron comparando la concentración de una solución de referencia recién preparada con la concentración de la solución de trabajo almacenada por un tiempo mayor al utilizado durante el análisis.

Como se deduce de la Tabla **4.37** la solución de (-)-*epi*-catequina es estable durante dos semanas de almacenamiento, a temperatura ambiente, en un recipiente ámbar.

**Tabla 4.37.** Estabilidad de las muestras de (-)-*epi*-catequina a temperatura ambiente

Tiempo de almacenamiento	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración de la muestra (µg/mL)	% de degradación
<b>Al instante</b>	74.25	74.34	
<b>Día 1</b>	74.25	73.69	0.87
<b>Día 2</b>	74.25	74.05	0.39
<b>Día 3</b>	74.25	73.85	0.66



<b>Día 4</b>	74.25	73.85	0.66
<b>Semana 1</b>	74.25	74.82	0.00
<b>Semana 2</b>	74.25	73.71	0.85
$\bar{y}$		74	
$s$		0.42	
<b>CV (%)</b>		0.6	

#### 4.2.1.8.2 Estabilidad de la (-)-*epi*-catequina en refrigeración

Para evaluar esta condición se siguió la estrategia descrita en el numeral **4.2.1.8.2.1** conservando la solución en refrigeración (4°C) durante dos semanas.

De acuerdo con los resultados resumidos en el **Tabla 4.38** se deduce que la solución es estable en refrigeración durante un período de almacenamiento de dos semanas en un recipiente ámbar.

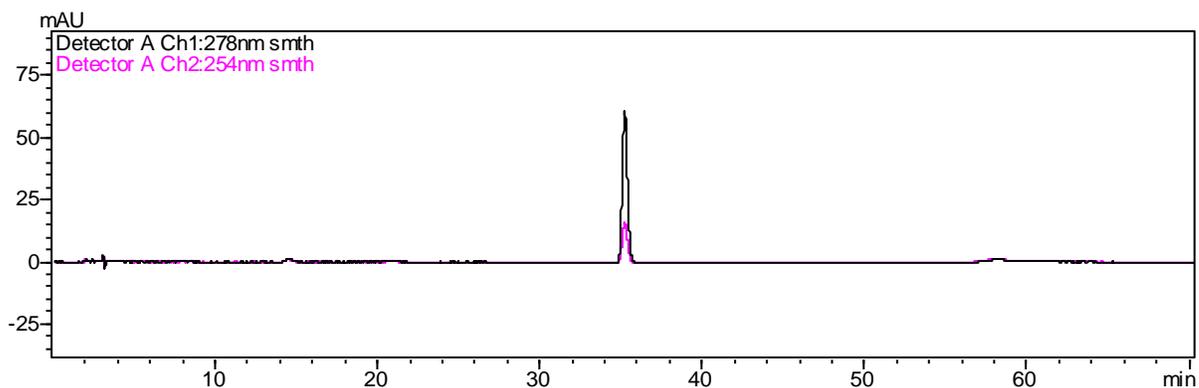
**Tabla 4.38.** Resultados de la estabilidad de las muestras de (-)-*epi*-catequina en refrigeración

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>Concentración teórica (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Concentración de la muestra (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>% de degradación</b>
<b>Al instante</b>	74.25	74.34	
<b>Día 1</b>	74.25	74.09	0.34
<b>Día 2</b>	74.25	73.24	1.48
<b>Día 3</b>	74.25	74.15	0.26
<b>Día 4</b>	74.25	73.96	0.51
<b>Semana 1</b>	74.25	73.45	1.20
<b>Semana 2</b>	74.25	74.25	0.12
$\bar{y}$		73.86	

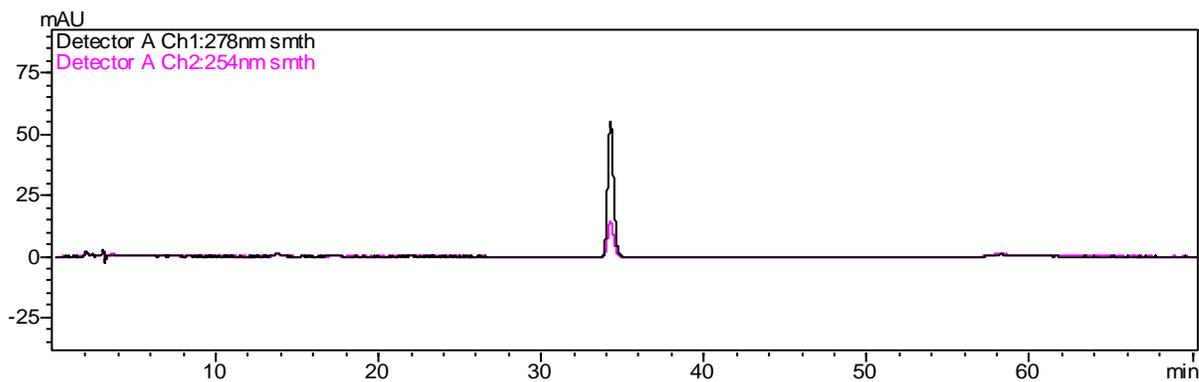


<b>s</b>	0.41
<b>CV (%)</b>	0.6

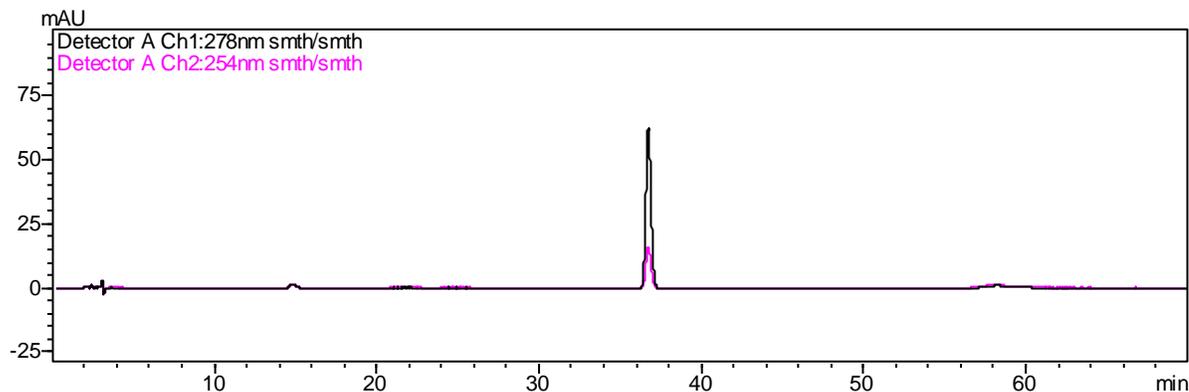
En las **Figuras 4.16-4.19** se ilustran los cromatogramas obtenidos de la condición inicial y final de análisis de las muestras. En todos los casos no se observan señales adicionales correspondientes a productos de degradación.



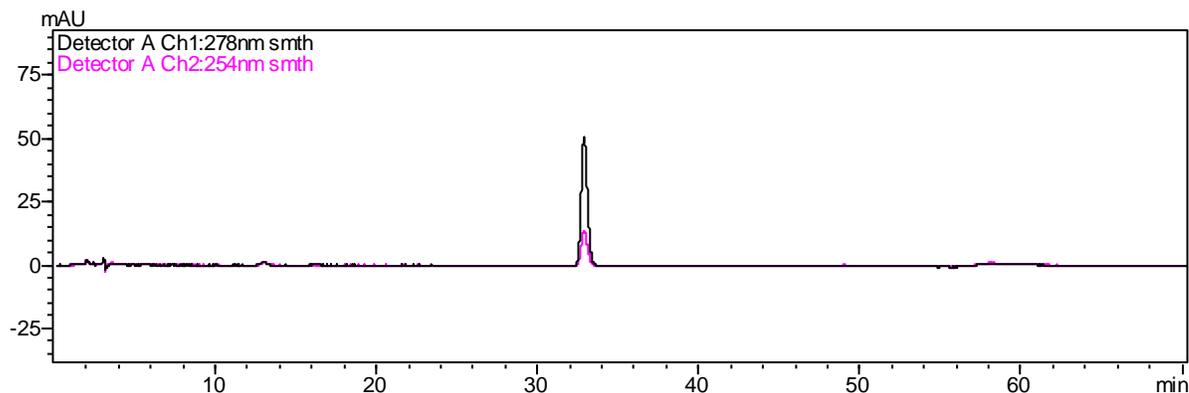
**Figura 4.16.** Cromatograma correspondiente a una solución de (-)-*epi*-catequina almacenada durante un día a temperatura ambiente



**Figura 4.17.** Cromatograma correspondiente a una solución de (-)-*epi*-catequina almacenada durante dos semanas a temperatura ambiente



**Figura 4.18.** Cromatograma correspondiente a una solución de (-)-*epi*-catequina almacenada durante un día en refrigeración



**Figura 4.19.** Cromatograma correspondiente a una solución de (-)-*epi*-catequina almacenada durante dos semanas en refrigeración.

#### 4.2.1.9 Cuantificación de la (-)-*epi*-catequina en las matrices herbolarias

En la **Tabla 4.39** se observa la cantidad de (-)-*epi*-catequina presente en las matrices de trabajo por gramo de extracto.



**Tabla 4.39.** Miligramos de (-)-*epi*-catequina por gramo de extracto en las matrices herbolarias de trabajo

<b>Muestra</b>	<b>mg de (-)-<i>epi</i>-catequina/g de extracto</b>
<b>Extracto de capulín</b>	3.86
<b>Extracto de cancerina</b>	9.83
<b>Extracto de muérdago</b>	3.45



---

## 5. CONCLUSIONES

- El método analítico desarrollado por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, para evaluar el contenido de (-)-*epi*-catequina en el extracto metanólico de *Capulín, Cancerina y Muérdago* es lineal, preciso, específico y exacto, en el intervalo de concentraciones establecidas.
- El estudio de robustez indicó que la proporción de  $H_3PO_4$  en la fase móvil, el flujo y el volumen de inyección son factores que influyen significativamente en la resolución de las señales correspondientes a los metabolitos de interés, por lo que el método no es robusto.
- El estudio de tolerancia indicó que método es reproducible en dos sistemas cromatográficos diferentes, bajo las mismas condiciones de análisis.
- Finalmente, el estudio de estabilidad nos indica que la (-)-*epi*-catequina permanece estable durante 2 semanas en solución, bajo condiciones de refrigeración y temperatura ambiente.



---

## 6. PERSPECTIVAS

- Aplicar el método analítico para evaluar la calidad de los preparados farmacéuticos que contengan (-)-*epi*-catequina como ingrediente activo.
- Optimizar el método analítico para identificar y cuantificar los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos de capulín, cancerina y muérdago.



## 7. REFERENCIAS

1. Alvarado, D. y Saavedra L. (2005) El Género *Cladocolea* (*Loranthaceae*) en México: Muérdago Verdadero o Injerto. *Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, **11**, 5-9.
2. Amabeoku, G., Leng M. y Syce J. (1998) Antimicrobial and anticonvulsant activities of *Viscum capense*. *Journal of Ethopharmacology*, **61**, 237-241.
3. Argueta, V. A. (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. In Instituto Nacional Indigenista. México. pp 319-320.
4. ASJAM. *Muérdago* [en línea]. 2014. [fecha de consulta: 20 julio 2015]. Disponible en < <http://asjamadrid.com/muerdago/> >
5. Bauman, D., Adler, S., Hamburger, M. (2001) A simple isolation method for the major catechins in Green tea using high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Natural Products*, **64**, 353-355.
6. Calzada, F., Mata R., Lopez R., Linares E., Bye R., V. M. Barreto y Del Rio F. (1991) Friedelanes and triterpenoid quinone methides from *Hippocratea excelsa*. *Planta Med*, **57**, 194-5.
7. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1994) Guidance Validation of Chromatographic Methods. CMC 3.
8. De Smet, P. A. G. M. (1999) Overview of Herbal Quality Control. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, **33**, 717-724.
9. Dodson C. H. y Robyns A. (1965) Flora of Panama. *Hippocrateaceae*. *Ann. Miss. Bot. Garden*, **52**(1), 81-98.
10. Eurachem. (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1<sup>st</sup> digital edition.



11. Farmacopea de los Estados Unidos de América (**2014**) Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. USP **37** – NF 32, pp 1440-1447.
12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (**2014**) Comisión Permanente de la Farmacopea. Tomo II. 11<sup>a</sup> Edición. Secretaría de Salud. México, pp 2427-2435.
13. Feiertag Simon. *Plantas medicinales* [en línea]. 2010. [fecha de consulta: 23 julio 2015]. Disponible en <http://www.plantas-medicinales.org/cancerina/>
14. Fernández, T., Wagner M., Varela B. G., Ricco R. A., Hajos S. E., Gurni A. A. y Alvarez E. (**1998**) Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (*Loranthaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, **61** 25-34.
15. Fukunaga, T., Nishiya K., Kajikawa I., Takeya K. y Itokawa H. (**1989**) Studies on the constituents of Japanese mistletoes from different host trees, and their antimicrobial and hypotensive properties. . *Chemical Pharmacology Bulletin (Tokio)*, **37**, 1534-1546.
16. Graziano, M., Widmer G. y Coussio J. (**1967**) Flavonoids from the Argentine *mistletoe*, *Psittacanthus cuneifolius*. *Phytochemistry*, **6**, 1709-1711.
17. Grotewold, E. (**2006**) The science of flavonoids. USA. Springer.
18. Halliwell, B y Gutteridge, J. M. (**1999**) *Free radicals in biology and medicine*. 3a ed. s.l.:Oxford University Press.
19. Herrera, F., (**2005**). Principales Loranthaceas que afectan las plantaciones de naranjas en Costa Rica. *Revista de Agricultura Tropical*, **35**, 27- 38.
20. Houghton, P., y Mukherjee P. K. (**2009**). Evaluation of Herbal Medicinal Products. Pharmaceutical Press. Londres. pp 369-425.



21. Houghton, P. J. (1998) Establishing identification criteria for botanicals. *Drug Inform J*, **32**, 461-469.
22. Huang, D., Ou, B y Prior, R. L. (2005 *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**,1841-1856.
23. Jordan, E. y Wagner H. (1986) Structures and properties of polyssacharides form *Viscum album (L.)*. *Oncology*, **42**, 8-15.
24. Kunle, O. F., Egharevba, H. O. y Ahmadu P. O. (2012) Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, **4.3**, 101-112.
25. Khalid, H., Muhammad T. M., Zhari I., Amirin S. y Pazilah B. (2009) Traditional and complementary medicines: Quality assessment strategies and safe usage. *Southern Med Review*, **2**, 19-23.
26. Lara, O. F. y Márquez A. C. (1996) Plantas medicinales de Mexico: Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autonoma de México. **27**.
27. Ma, Y., Luo M., Lynn M. y Monique D. (1996) Distribution and Proportion of Major Ginsenosides and Quality Control of Ginseng Products. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, **6**, 11-20.
28. Martinez, M. (1994). Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. pp 156-158.
29. Muñoz L.F.(1998) Plantas medicinales y aromáticas. 4a ed. Mundi- prensa. México. pág. 125-126.
30. Norton, D. y Carpenter, M. (1998) Mistletoes as parasites: Host specificity and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, **13**, 101-105.



31. Obregón Jorge. *55 ingredientes... ¡una gran diferencia!* [en línea]. 2015. [fecha de consulta: 13 julio 2015]. Disponible en <<http://guanajuatodigital.mx/55-ingredientes-una-gran-diferencia/>>
32. Olszewska, M. (2007) Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves and Inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica*, **19**, 253-269.
33. Ordaz, G. A., Wesche E. P., Wrolstad R. E., Rodriguez S. L. y Argaiz J. A. (1999) Purification and identification of Capulín (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*. **65**, 201-206.
34. Park, J., Hyun C. y Shin H. (1999) Cytotoxic effects of the components in heart-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, **139**, 207-213.
35. Pérez, C., Ceja J. y Vela G. (2006) Árboles y muérdagos: una relación que mata. *ContactoS (UAM-I)*, **59**, 28-34.
36. Radio bup. *La trágica verdad del muérdago en México* [en línea]. 2015. [fecha de consulta: 20 julio 2015]. Disponible en <http://radiobuap.com/2015/06/la-tragica-verdad-del-muerdago-en-mexico/>
37. Riddle, J. M. (2011) In *Dioscorides on Pharmacy and Medicine*. University of Texas Press. pp 298.
38. Roberfroid, M. B. (2000) Concepts and strategy of function food science: The European perspective *Am J Clin Nutr*, **71**.
39. Sajner, J. y Veris O. (1958) Ocurrence of histamin in *Viscum album*. *Pharmazie*, **13**, 170.
40. Santamour, J. (1998). Amygdalin in Prunus Leaves Phytochemistry. *Phytochemistry*, **47**, 1537-1538.
41. Serrano-Maldonado, M. J., Guerrero-Legarreta I., Pérez-Olvera C. y Soriano-Santos J. (2011) Actividad antioxidante y efecto citotóxico



- de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kujit *Loranthaceae*. *Revista mexicana de ingeniería química*, **10**, (2).
42. SIAP. *capulín* [en línea]. 2014 [fecha de consulta: 3 Mayo 2015]. Disponible en < <http://www.siap.gob.mx/capulin/> >
43. Sinha, A., Taylor W. H., Khan I. H., McDaniel S. T. y Esko J. D. (1999) Glycoside primers of *Psittacanthus cucullaris*. *Journal of Natural Products*, **62**, 1036-1038.
44. Sorg, O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies*, **327** (7), 649-662
45. Skoog, D., James, F., y Nieman, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental. 5ª Edición. Mc Graw Hill. España. pp 730-735, 785-824.
46. SMA, 2007. *Secretaría del Medio Ambiente*. [en línea]. Disponible en <http://www.sma.df.gob.mx/drupc/index.php?opcion=15> [fecha de consulta: 08 mayo 2015].
47. Venéreo Gutiérrez, Justo R. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*, **31**, 126-133.
48. Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 64-71.
49. Zee Cheng, R. (1997) Anticancer research on Loranthaceae plants. *Drugs of the Future*, **22**, 519-530.



## 8. ANEXOS

### ANEXO I

- **Factor de capacidad**

El **factor de capacidad (k')** es una medida del grado de interacción del analito con la fase estacionaria y, su valor puede ajustarse modificando la fuerza de elución de la fase móvil hasta que, el valor del factor de capacidad (k') se encuentre dentro del intervalo comprendido entre 2 y 10. El factor de capacidad se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación de los analitos. La ecuación que describe el factor de capacidad es:

$$k' = \frac{\textit{Tiempo de la sustancia en la fase estacionaria}}{\textit{Tiempo de la sustancia en la fase móvil}}$$

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Cuando se utiliza fase reversa, k' disminuye al aumentar la proporción del disolvente orgánico (MeOH, ACN, THF) y aumenta al incrementar la proporción de agua. En contraste, cuando se emplea fase normal, k' disminuye al aumentar la proporción del disolvente polar y aumenta al incrementar la proporción del disolvente no polar (Skoog, 2001).

- **Factor de coleo**

El **factor de coleo (T)** es una medida del coleo del pico. Cuando se incrementa el coleo de un pico cromatográfico la exactitud para la cuantificación de un analito disminuye. Como consecuencia, se dificulta el cálculo del área bajo la curva del pico debido a que el programa de



integración no es capaz de distinguir dónde y cuándo termina el pico, aún cuando las variables de integración sean programadas por el analista. El factor de coleo se describe como:

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

donde  $W$  es el ancho del pico medido al 5% de altura y  $f$  es la distancia entre el máximo del pico y el frente al 5% de altura respecto al máximo. Se recomienda un valor de  $T < 2$  (CDER, 1994).

- **Número de platos teóricos**

El **número de platos teóricos** es una medida de la eficiencia de la columna. Los factores que pueden afectar el número de platos teóricos incluyen el tamaño de partícula, el flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase móvil y el peso molecular del analito. Se recomienda un valor de  $N > 2000$  (Skoog, 2001).

- **Resolución**

La **resolución (R)** es una medida relacionada con el grado de separación entre dos picos cromatográficos adyacentes. La resolución es una función de la eficiencia de la columna y se calcula para asegurar que los compuestos que eluyen cerca, se resuelvan unos de otros. Este es un parámetro muy útil cuando los cromatogramas presentan señales que pueden llegar a causar interferencia en la determinación del analito. Es deseable una resolución mayor a 2 entre el pico de interés y la señal más cercana (CDER, 1994). La ecuación que describe a la resolución es:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2}$$



---

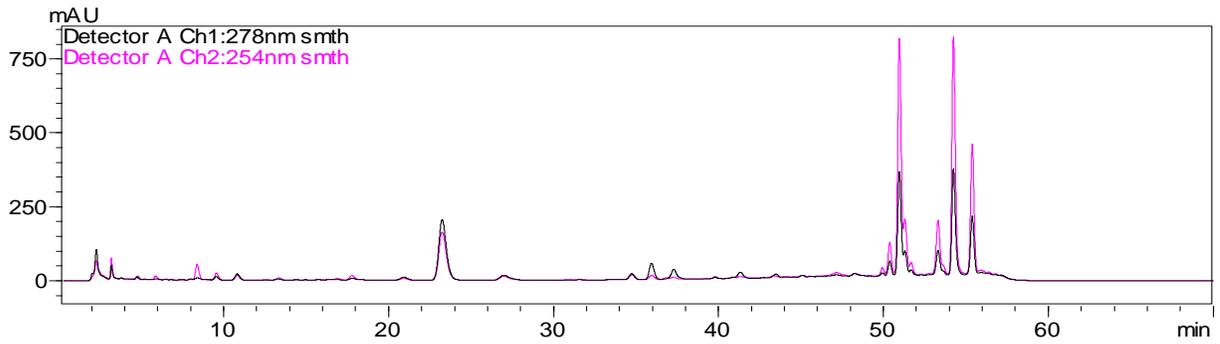
donde,  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de retención de los analitos y  $W_1$  y  $W_2$ , el ancho del pico medido por extrapolación de los lados relativamente rectos en la línea base.

De acuerdo con los resultados obtenidos de los parámetros cromatográficos calculados para el método analítico desarrollado, el factor de coeio es de 1.125 y la resolución entre las señales supera el valor recomendado de separación.

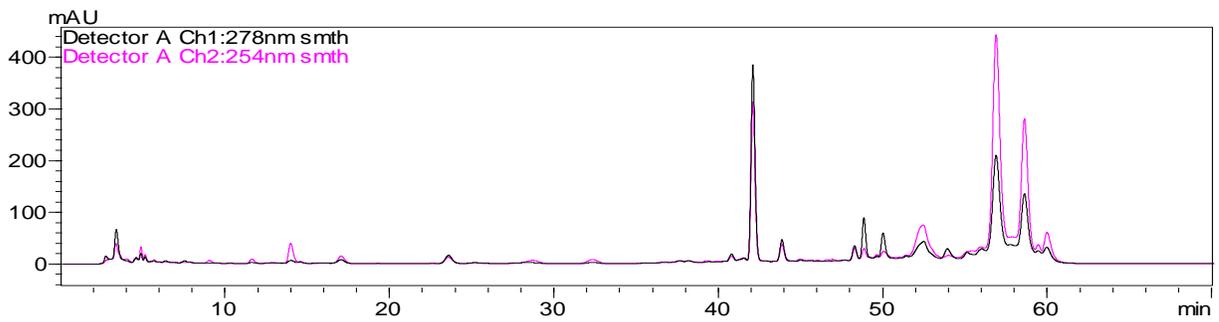


## ANEXO II

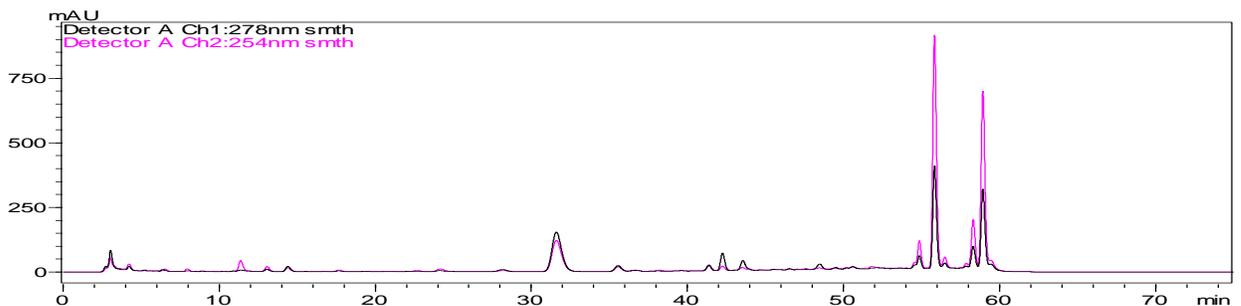
### Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de capulín



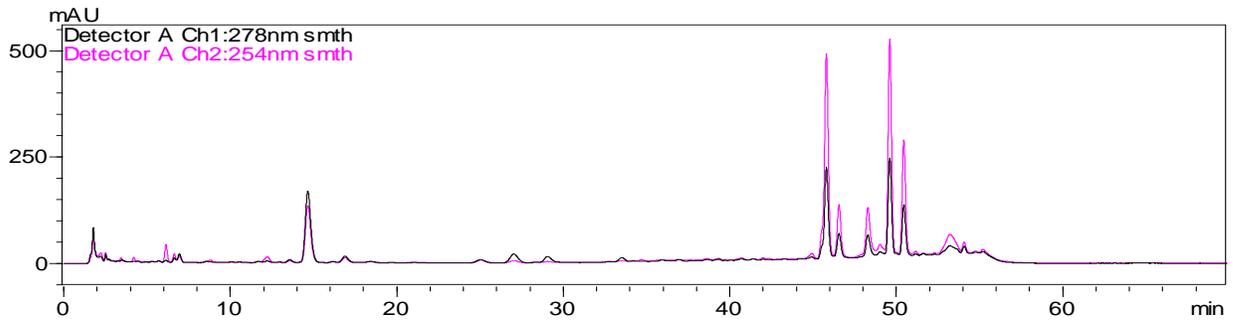
**Figura 8.1.** Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación.



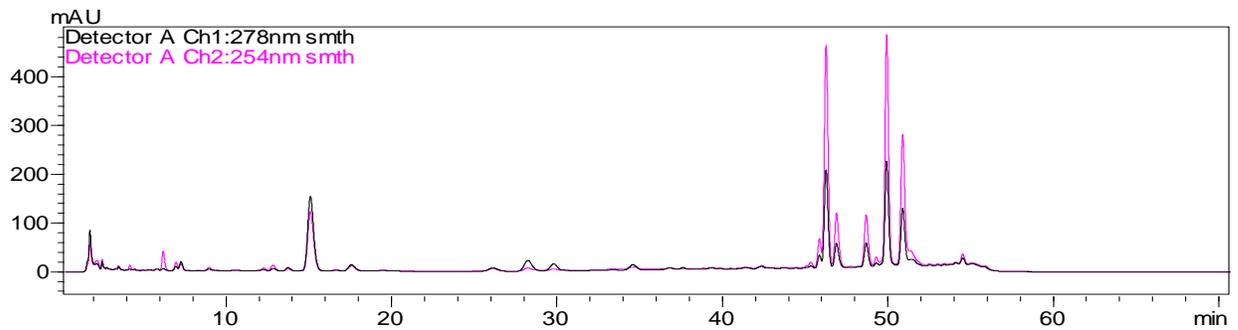
**Figura 8.2.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu L$



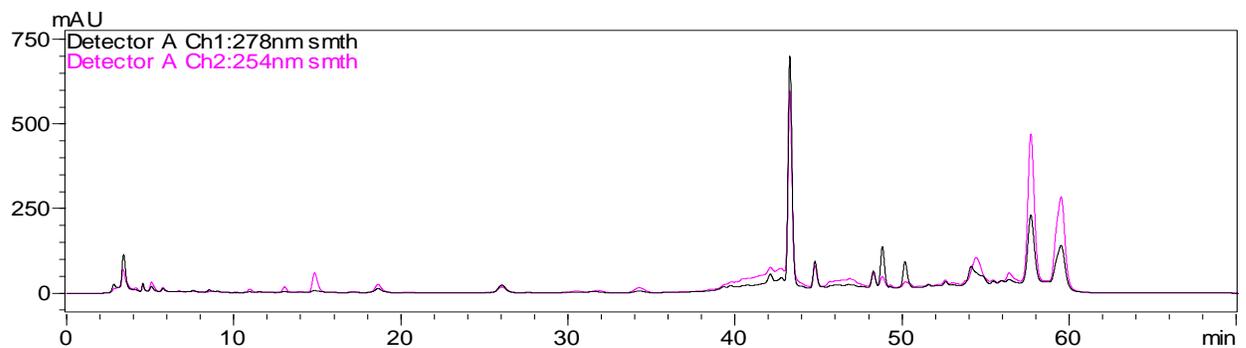
**Figura 8.3.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu L$



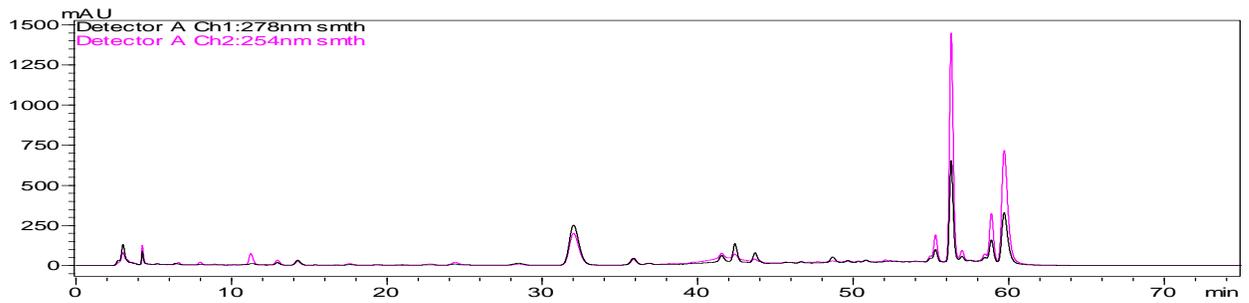
**Figura 8.4.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu\text{L}$



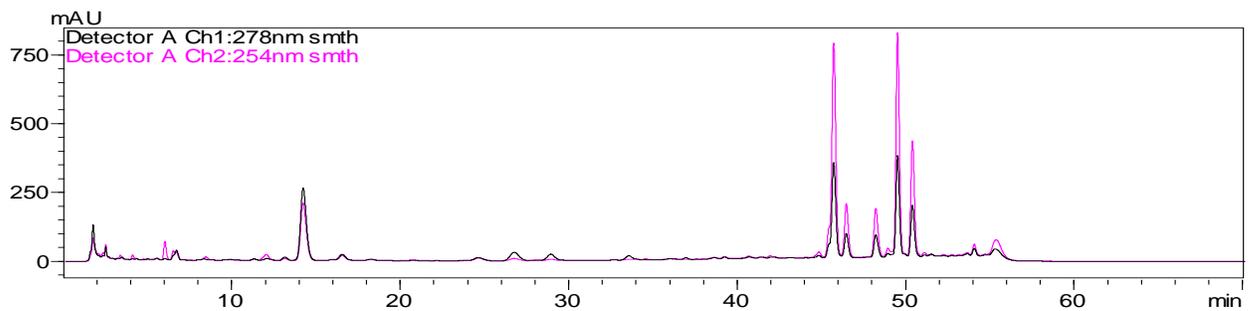
**Figura 8.5.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu\text{L}$



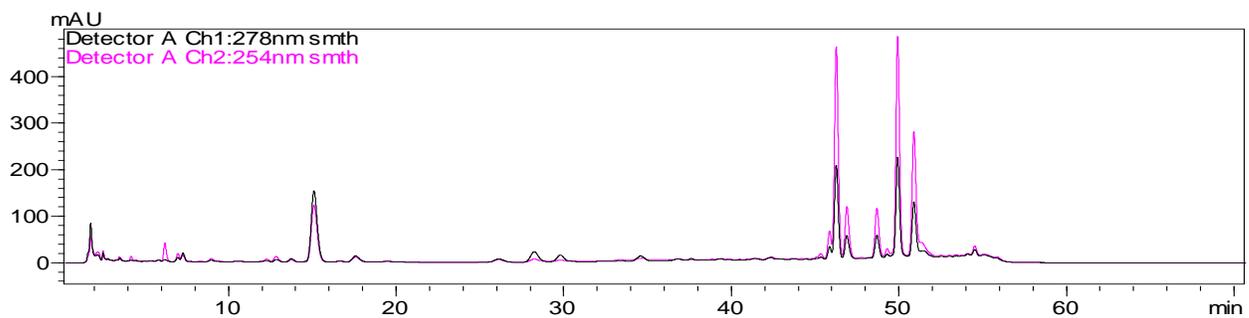
**Figura 8.6.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu\text{L}$



**Figura 8.7.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu\text{L}$



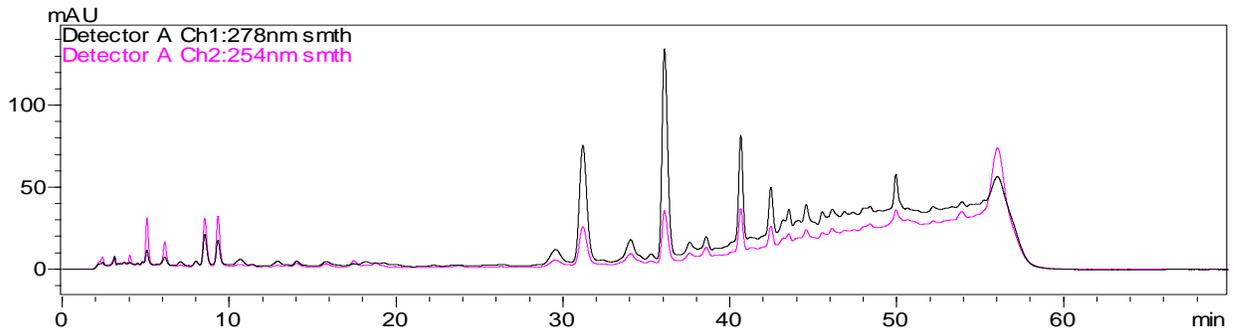
**Figura 8.8.** Cromatograma obtenido con 0.3 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu\text{L}$



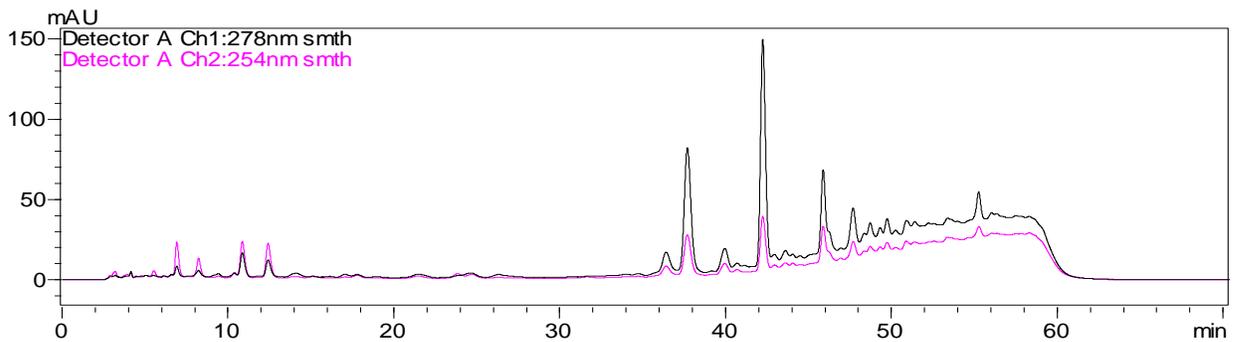
**Figura 8.9.** Cromatograma obtenido con 0.4 % de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu\text{L}$



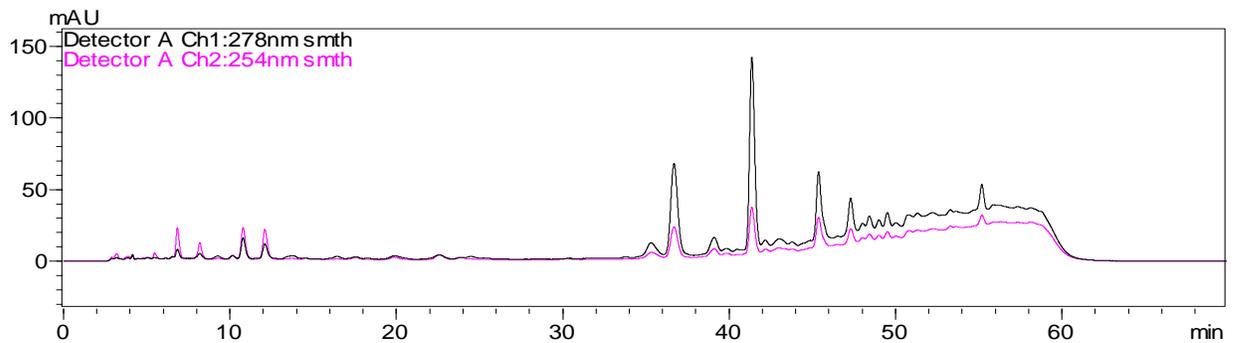
- **Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de cancerina**



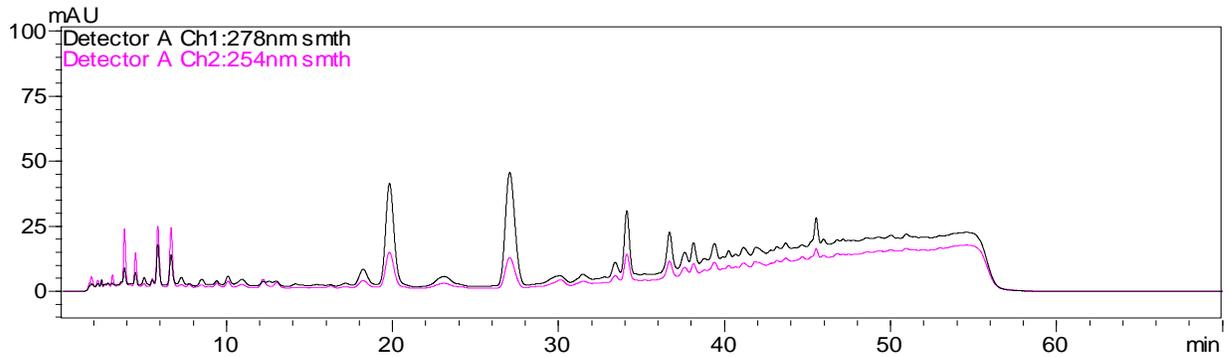
**Figura 8.10.** Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación



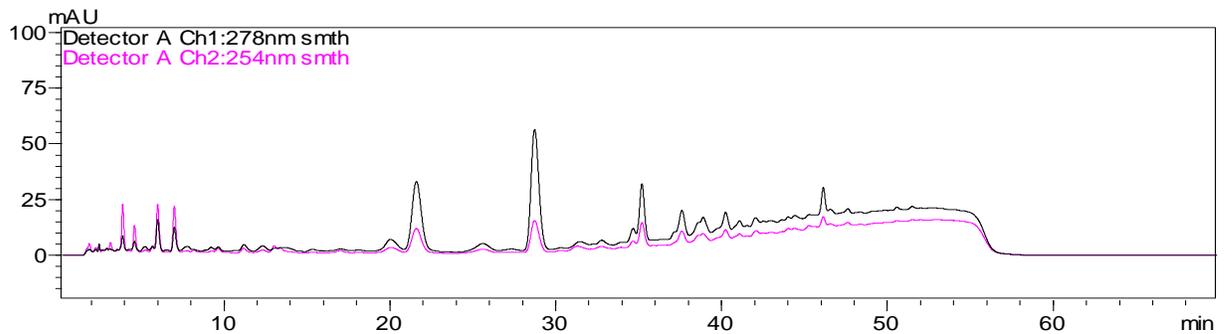
**Figura 8.11.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu$ L



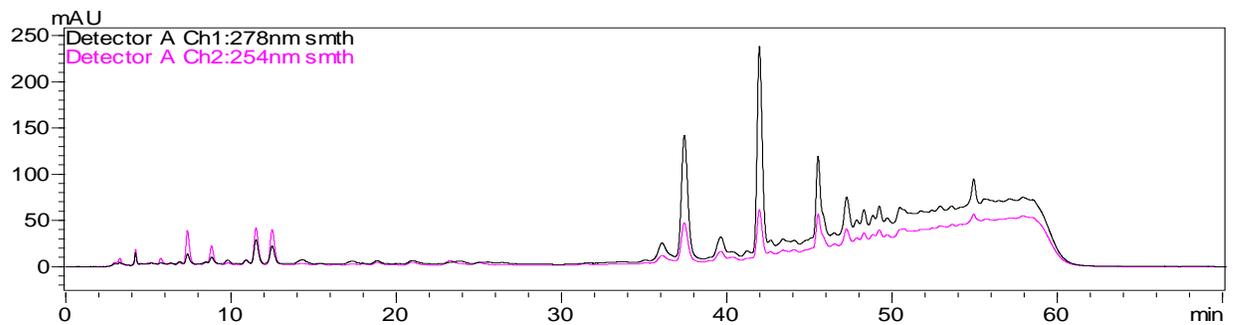
**Figura 8.12.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu$ L



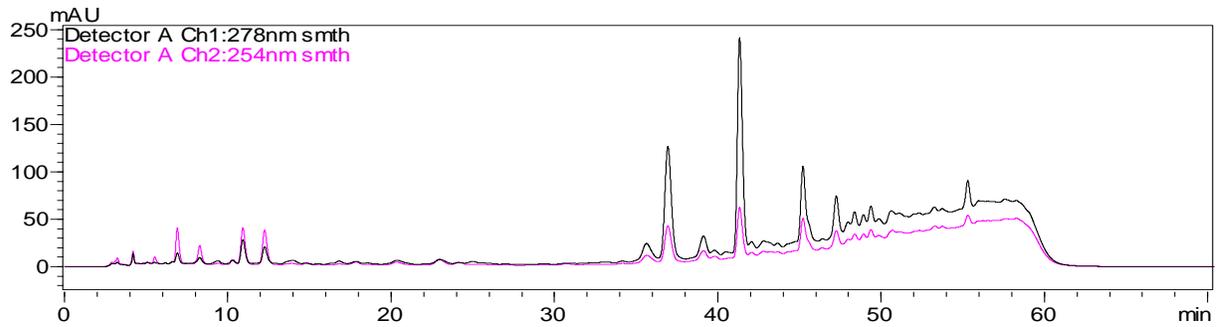
**Figura 8.13.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu L$



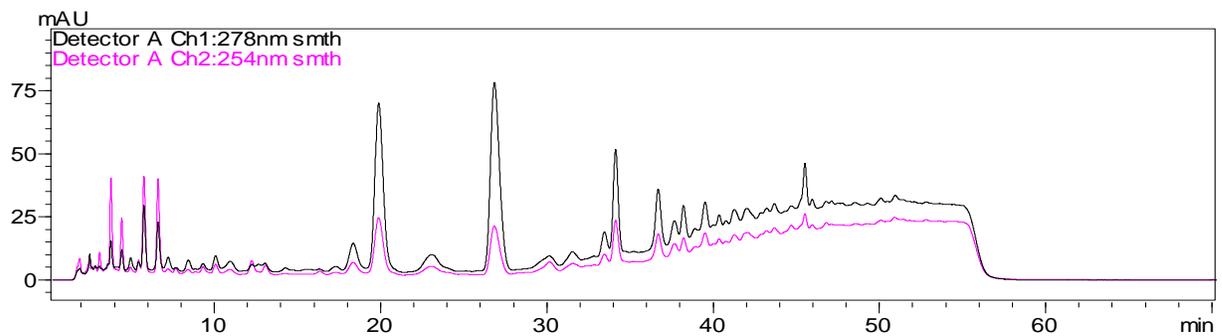
**Figura 8.14.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu L$



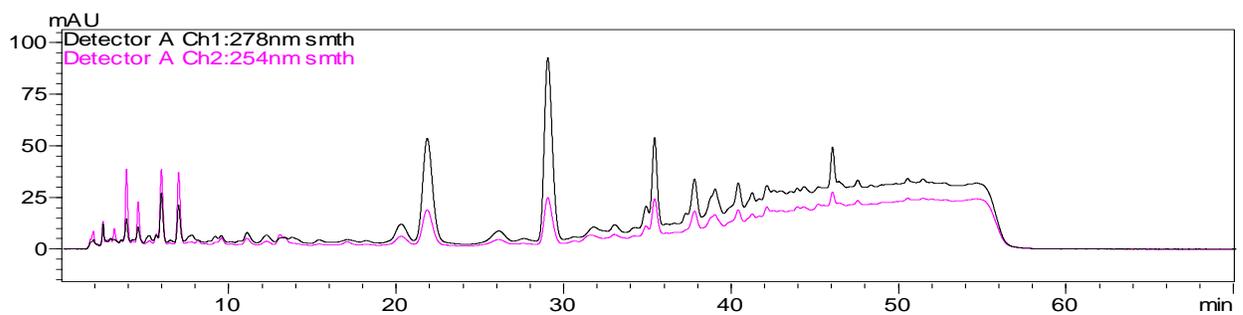
**Figura 8.15.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



**Figura 8.16.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



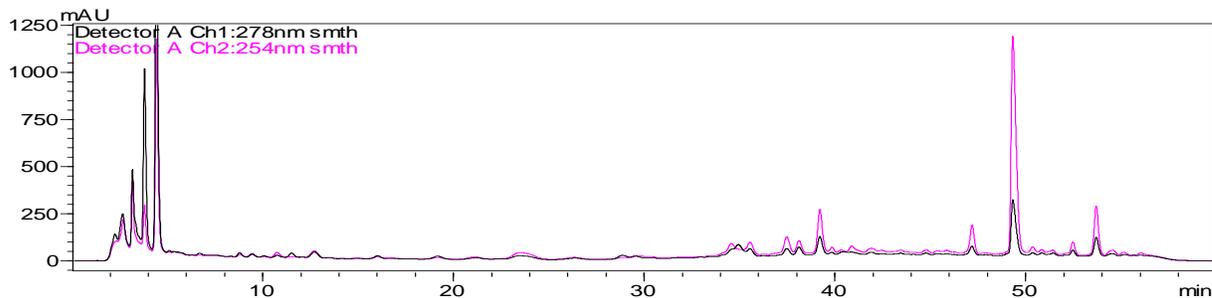
**Figura 8.17.** Cromatograma obtenido con 0.3 % de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



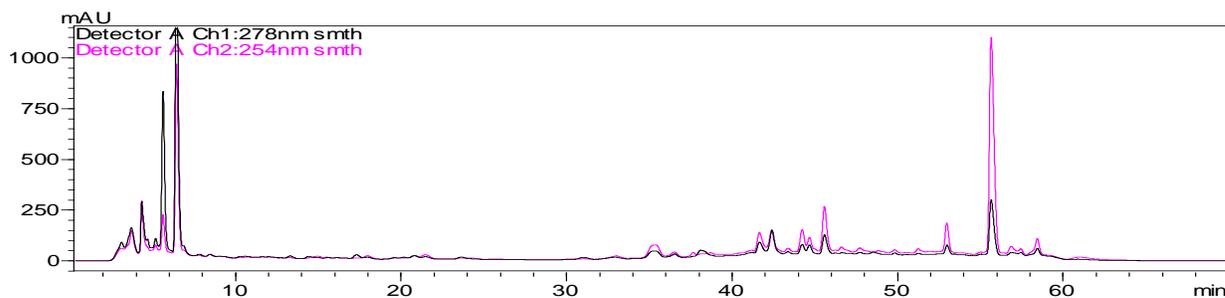
**Figura 8.18.** Cromatograma obtenido con 0.4 % de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



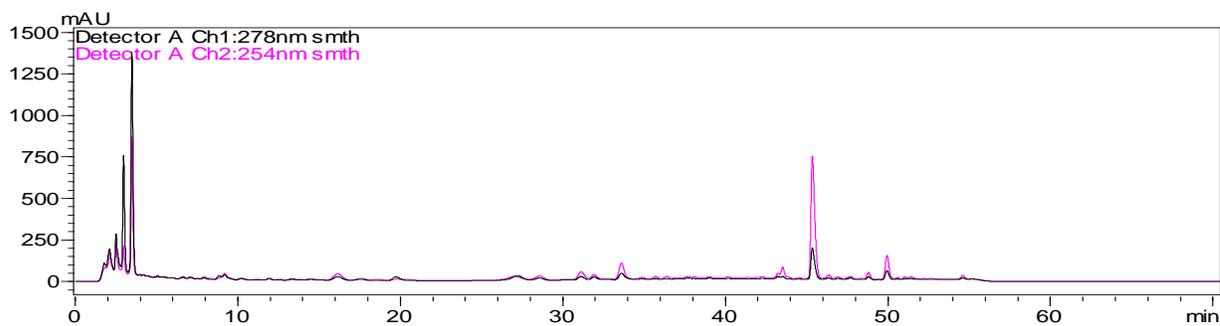
- **Cromatogramas generados para evaluar la robustez del método empleando extracto de muérdago**



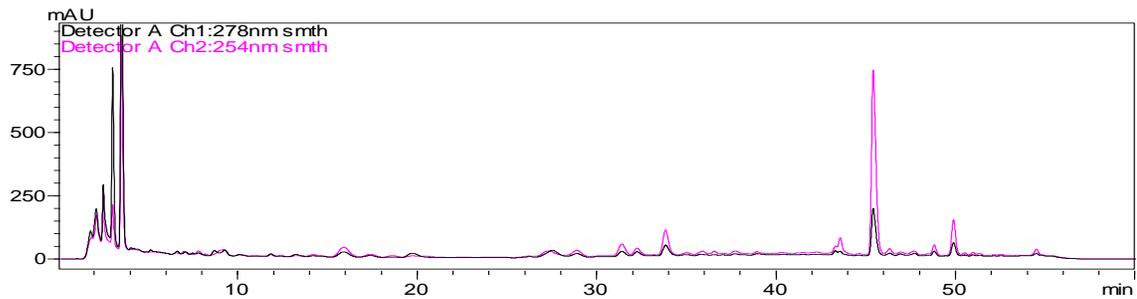
**Figura 8.19.** Cromatograma obtenido bajo condiciones normales de operación



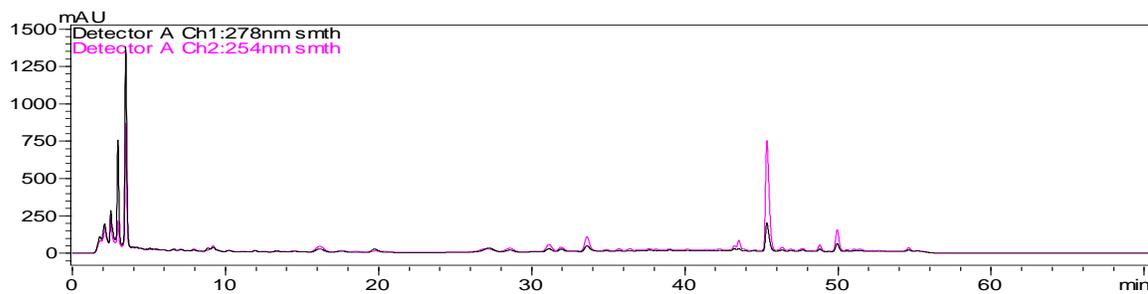
**Figura 8.20.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu$ L



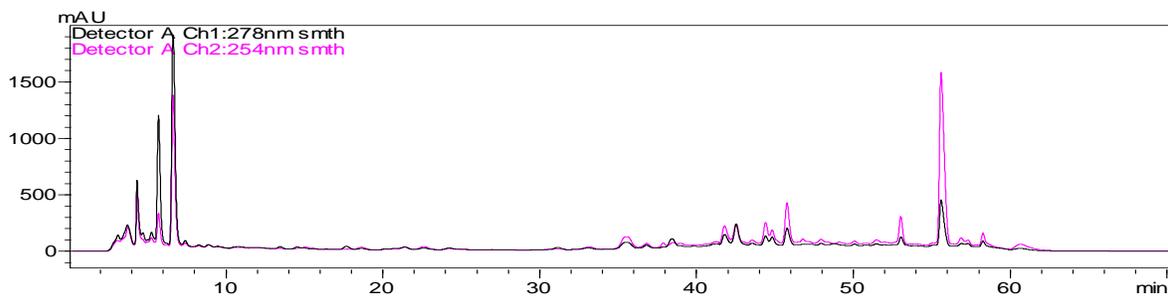
**Figura 8.21.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu$ L



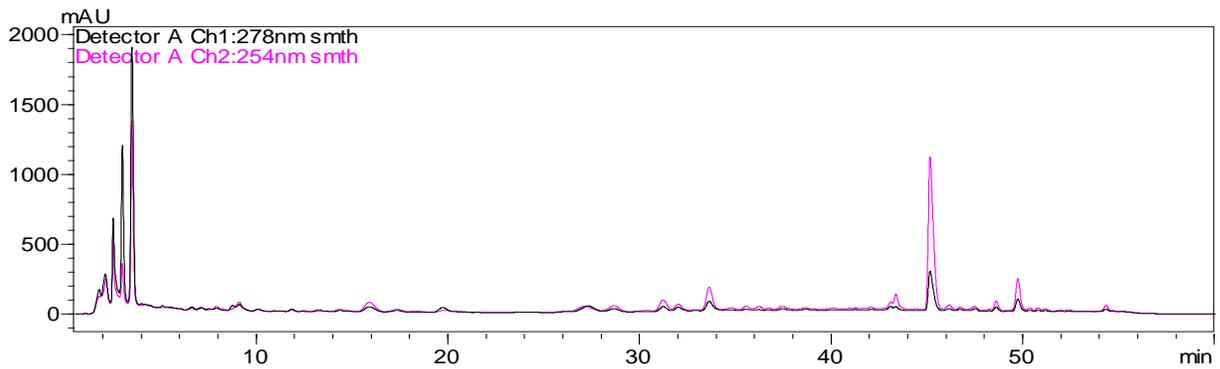
**Figura 8.22.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu\text{L}$



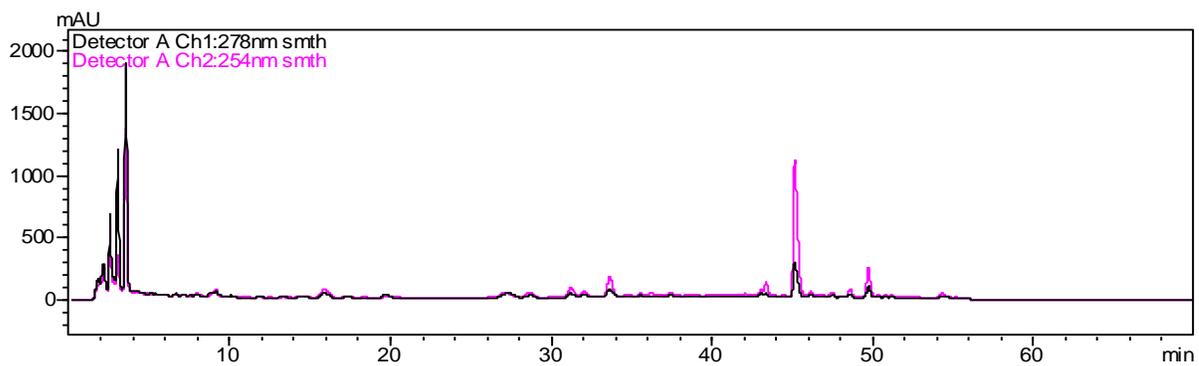
**Figura 8.23.** Cromatograma obtenido con 0.4% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu\text{L}$



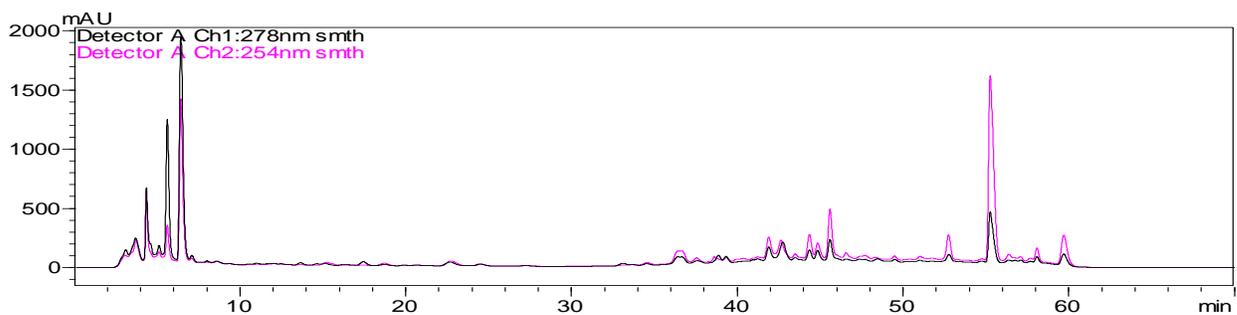
**Figura 8.24.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu\text{L}$



**Figura 8.25.** Cromatograma obtenido con 0.3% de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



**Figura 8.26.** Cromatograma obtenido con 0.4 % de  $H_3PO_4$ , flujo de 1.0 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



**Figura 8.27.** Cromatograma obtenido con 0.4 % de  $H_3PO_4$ , flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección 25  $\mu L$



## ANEXO III

- **Tabla 8.1** Resumen de la validación del método para cuantificar (-)-epi-catequina en diferentes matrices herbolarias

Parámetro	Especificación	Resultado obtenido			Conclusión	
Adecuabilidad del sistema	CV < 2.0%	CV < 0.71%			Cumple	
Selectividad	Ninguna señal del producto de degradación interfiere con la señal del analito		<b>% degradado</b>	<b>CV (%)</b>	Cumple	
			<b>Hidrólisis ácida</b>	86.6		0.9
			<b>Hidrólisis básica</b>	100.0		--
			<b>oxidación</b>	84.1		0.3
Linealidad del Sistema	$r \geq 0.999$ $r^2 > 0.98$ IC $\beta_0 = \{0\}$ IC $\beta_1 \neq 0$	$\text{Área} = 32657.3 + 17740.2 * \text{Concentración}$			Cumple	
		Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	32657			
		Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	17740			
		Coeficiente de correlación (r)	0.9996			
		Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9992			
<b>ANÁLISIS DE VARIANZA CON CARENCIA DE AJUTES</b>						
		<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Promedio de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor P</b>
		<b>Regresión</b>	2.62E+13	1	2.62E+13	38.246 <0.0519
		<b>Residuos</b>	2.02E+10	19	1.06E+09	
		<b>Carencia de Ajuste</b>	9.28E+09	5	1.86E+09	2.38
		<b>Error Puro</b>	1.09E+10	14	7.80E+08	
		<b>Total</b>	2.62E+13	20		



- **Tabla 8.1** Resumen de la validación del método para cuantificar (-)-epi-catequina en diferentes matrices herbolarias (continuación)

Linealidad del método para el extracto de capulín	$r \geq 0.999$ $r^2 > 0.98$ IC $\beta_0 = \{0\}$ IC $\beta_1 \neq 0$	Concentración recuperada = $-0.20463 + 0.996768^*$ Concentración <table border="1" data-bbox="667 537 1252 768"> <tbody> <tr> <td>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</td> <td>-0.1283</td> </tr> <tr> <td>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</td> <td>0.9961</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de correlación (r)</td> <td>0.9998</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</td> <td>0.9996</td> </tr> </tbody> </table>	Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-0.1283	Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	0.9961	Coefficiente de correlación (r)	0.9998	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9996	Cumple
Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-0.1283										
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	0.9961										
Coefficiente de correlación (r)	0.9998										
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9996										
Linealidad del método para el extracto de cancerina	$r \geq 0.999$ $r^2 > 0.98$ IC $\beta_0 = \{0\}$ IC $\beta_1 \neq 0$	Concentración recuperada = $-0.103604 + 1.00905^*$ Concentración <table border="1" data-bbox="667 940 1252 1171"> <tbody> <tr> <td>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</td> <td>-0.102</td> </tr> <tr> <td>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</td> <td>1.009</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de correlación (r)</td> <td>0.9999</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</td> <td>0.9998</td> </tr> </tbody> </table>	Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-0.102	Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	1.009	Coefficiente de correlación (r)	0.9999	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9998	Cumple
Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	-0.102										
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	1.009										
Coefficiente de correlación (r)	0.9999										
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9998										
Linealidad del método para el extracto de muérdago	$r \geq 0.999$ $r^2 > 0.98$ IC $\beta_0 = \{0\}$ IC $\beta_1 \neq 0$	Concentración recuperada = $0.137838 + 1.00102^*$ Concentración <table border="1" data-bbox="667 1333 1252 1564"> <tbody> <tr> <td>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</td> <td>0.1357</td> </tr> <tr> <td>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</td> <td>1.001</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de correlación (r)</td> <td>0.9999</td> </tr> <tr> <td>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</td> <td>0.9998</td> </tr> </tbody> </table>	Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	0.1357	Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	1.001	Coefficiente de correlación (r)	0.9999	Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9998	Cumple
Ordenada al origen ( $\beta_0$ )	0.1357										
Pendiente de la recta ( $\beta_1$ )	1.001										
Coefficiente de correlación (r)	0.9999										
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9998										



- **Tabla 8.1** Resumen de la validación del método para cuantificar (-)-epi-catequina en diferentes matrices herbolarias (continuación)

Exactitud del extracto de capulín	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th><math>\bar{y}</math> % Recobro</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>25</td> <td>99.5</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>98.6</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>75</td> <td>99.8</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>99.5</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>99.5</td> <td>0.8</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)	25	99.5	0.6	50	98.6	0.2	75	99.8	0.8	100	99.5	2.0	150	99.5	0.8	Cumple
		Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)																	
		25	99.5	0.6																	
		50	98.6	0.2																	
		75	99.8	0.8																	
		100	99.5	2.0																	
150	99.5	0.8																			
Exactitud del extracto de cancerina	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th><math>\bar{y}</math> % Recobro</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>25</td> <td>100.9</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>99.8</td> <td>0.9</td> </tr> <tr> <td>75</td> <td>100.9</td> <td>0.9</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>101.3</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>100.7</td> <td>0.5</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)	25	100.9	1.5	50	99.8	0.9	75	100.9	0.9	100	101.3	0.3	150	100.7	0.5	Cumple
		Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)																	
		25	100.9	1.5																	
		50	99.8	0.9																	
		75	100.9	0.9																	
		100	101.3	0.3																	
150	100.7	0.5																			
Exactitud del extracto de muérdago	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th><math>\bar{y}</math> % Recobro</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>25</td> <td>100.4</td> <td>1.3</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>100.9</td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>75</td> <td>100.2</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>100.0</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>100.3</td> <td>0.8</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)	25	100.4	1.3	50	100.9	1.2	75	100.2	0.3	100	100.0	0.6	150	100.3	0.8	Cumple
		Muestra	$\bar{y}$ % Recobro	CV (%)																	
		25	100.4	1.3																	
		50	100.9	1.2																	
		75	100.2	0.3																	
		100	100.0	0.6																	
150	100.3	0.8																			
Precisión del sistema	CV < 2.0%	CV (Área) = 0.9172	Cumple																		



- **Tabla 8.1** Resumen de la validación del método para cuantificar (-)-*epi*-catequina en diferentes matrices herbolarias (continuación)

Repetibilidad	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extracto de capulín</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>Extracto de cancerina</td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>Extracto de muérdago</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	CV (%)	Extracto de capulín	0.6	Extracto de cancerina	1.2	Extracto de muérdago	1.0	Cumple	
		Muestra	CV (%)									
Extracto de capulín	0.6											
Extracto de cancerina	1.2											
Extracto de muérdago	1.0											
Precisión intradía	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extracto de capulín</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Extracto de cancerina</td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>Extracto de muérdago</td> <td>0.9</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	CV (%)	Extracto de capulín	0.2	Extracto de cancerina	1.2	Extracto de muérdago	0.9	Cumple	
		Muestra	CV (%)									
Extracto de capulín	0.2											
Extracto de cancerina	1.2											
Extracto de muérdago	0.9											
Precisión intermedia	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Muestra</th> <th>CV (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extracto de capulín</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>Extracto de cancerina</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>Extracto de muérdago</td> <td>1.1</td> </tr> </tbody> </table>	Muestra	CV (%)	Extracto de capulín	0.6	Extracto de cancerina	1.0	Extracto de muérdago	1.1	Cumple	
		Muestra	CV (%)									
Extracto de capulín	0.6											
Extracto de cancerina	1.0											
Extracto de muérdago	1.1											
Estabilidad	CV < 2.0%	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th></th> <th>(-)-<i>epi</i>-catequina</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Temperatura ambiente</td> <td>CV (%)</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>Temperatura de refrigeración</td> <td>CV (%)</td> <td>0.6</td> </tr> </tbody> </table>			(-)- <i>epi</i> -catequina	Temperatura ambiente	CV (%)	0.6	Temperatura de refrigeración	CV (%)	0.6	Cumple
				(-)- <i>epi</i> -catequina								
Temperatura ambiente	CV (%)	0.6										
Temperatura de refrigeración	CV (%)	0.6										