



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

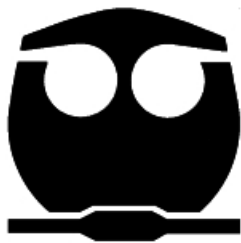
“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA VALORACIÓN DEL 5-*O*-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina EN LA INFUSIÓN DE *Hintonia latiflora* (Rubiaceae)”

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARÍA DE LOURDES JULIÁN DE LA CRUZ



México, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	Prof. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS
<b>VOCAL</b>	Prof. JUAN MANUEL RODRIGUEZ
<b>SECRETARIO</b>	Prof. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ
<b>1er SUPLENTE</b>	Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ
<b>2do SUPLENTE</b>	Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ

### **SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS:**

Laboratorio 124 del departamento de Farmacia, Edificio E. Facultad de  
Química. UNAM.

### **ASESOR**

---

Dra. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

### **SUSTENTANTE**

---

MARÍA DE LOURDES JULIÁN DE LA CRUZ

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos: CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) CO1-018 y DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM) IN 208907.

Agradezco también a las siguientes personas que contribuyeron de manera importante al desarrollo del presente trabajo:

A la **Dra Blanca Estela Rivero Cruz**, por su paciencia, su tutoría y dirección en el presente trabajo.

A la **Dra. Rachel Mata de Essayag**, por permitirme trabajar en uno de sus proyectos.

A la **M en C Isabel Rivero Cruz**, por su apoyo técnico durante la realización de las pruebas analíticas.

Al **M en C Juan Manuel Rodríguez**, por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas de temperatura en el cromatógrafo de líquidos.

A todos los que trabajan en el laboratorio 124, por hacer que mi corta estancia en el laboratorio fuera agradable.

A los miembros del jurado asignado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Mi más profundo agradecimiento a todos.

## DEDICATORIAS

A Dios por dejarme vivir y por todo lo que me da.

A la UNAM por dejarme formar parte de esta gran institución, a sus profesores por todo lo que me enseñaron.

Amis padres ~~Carmen~~ y ~~Manuel~~, por darme la vida, por apoyarme, quererme, por estar siempre conmigo y por creer en mí. Los quiero mucho.

Amis hermanos ~~Sonia~~, ~~Manuel~~, ~~Sergio~~, ~~Carlos~~ y ~~Laura~~, por todo lo que hemos pasado juntos, por que los quiero mucho.

Ami sobrino Josué, por que desde que llegó ilumino la casa y la vida de todos.

A ~~Hraccio~~, por hacer que mi vida cambiara completamente, por hacerme feliz, por estar conmigo y por apoyarme en todo. Amor, te quiero mucho.

Amis amigos ~~Diana~~, ~~Edgar~~, ~~Gabriel~~, ~~Cecily~~, ~~Pada~~, ~~Lili~~, ~~Edith~~, ~~Alfredo~~, ~~Milena~~, ~~America~~, ~~Oscar~~, ~~Hyobé~~, ~~Monse~~, ~~Isabe~~, ~~Oga~~, ~~Rodrigo~~, ~~Adriana~~, ~~Jorge~~, ~~Tere~~, ~~Lalo~~, ~~Daniela~~, ~~Baty~~ y ~~Brenda~~; por darme su amistad, por compartir una parte de su vida conmigo y por estar siempre cuando los necesito. A todos los que he conocido en algún momento de mi vida. Y a todos mis compañeros de la facultad.

**Cuantos hombres se precipitan hacia la luz,**

**no para ver mejor sino para brillar.**

**Nietzche**

---

---

**ÍNDICE GENERAL**

1	Justificación y Objetivos.....	1
2	Antecedentes de la especie <i>Hintonia latiflora</i> .....	10
2.1	Generalidades sobre cromatografía.....	19
2.2	Validación de métodos analíticos.....	24
3	Parte Experimental	
3.1	Material vegetal.....	27
3.2	Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	27
3.3	Determinación del contenido de 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (1) en la droga cruda	
3.3.1	Preparación de la solución estándar.....	28
3.3.2	Preparación de la muestra/infusión de trabajo.....	28
3.4	Desarrollo y validación del método analítico	
3.4.1	Obtención de la muestra.....	28
3.4.2	Efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.....	29
3.4.3	Especificidad del método analítico.....	29
3.4.4	Linealidad.....	30
3.4.5	Exactitud.....	30
3.4.6	Precisión.....	31
3.5	Análisis por cromatografía en Capa Fina.....	31

---

---

---

3.6	Determinación de fenoles totales.....	32
4	Resultados y discusión	
4.1	Desarrollo y optimización del método analítico.....	33
4.2	Validación del método analítico.....	35
4.2.1	Adecuabilidad del sistema.....	36
4.2.2	Especificidad del método analítico.....	37
4.2.3	Linealidad	
4.2.3.1	Linealidad del sistema.....	40
4.2.3.2	Linealidad del método.....	43
4.2.4	Límite de detección y límite de cuantificación.....	44
4.2.5	Exactitud.....	46
4.2.6	Precisión del método y del sistema.....	46
4.3	Determinación del contenido de fenoles totales.....	48
5	Conclusiones.....	51
6	Definiciones.....	52
7	Referencias.....	54

---



---

**INDICE DE FIGURAS**

---

Figura 1	<i>Hintonia latiflora</i> .....	10
Figura 2	Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia.....	22
Figura 3	Muestreo representativo.....	29
Figura 4	Intervalos de confianza para evaluar el efecto de la temperatura.....	35
Figura 5	Cromatograma del compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.....	36
Figura 6	Cromatograma en condiciones normales.....	38
Figura 7	Cromatograma después del tratamiento térmico.....	38
Figura 8	Cromatograma después de la hidrólisis ácida.....	39
Figura 9	Cromatograma después de la hidrólisis básica.....	39
Figura 10	Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables.....	40
Figura 11	Relación lineal entre la variable X (concentración adicionada) y la variable Y (área bajo la curva).....	44
Figura 12	Gráfica de linealidad para la determinación del LD y LC.....	45
Figura 13	Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando ácido gálico.....	49
Figura 14	Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.....	50

---

---

**INDICE DE CUADROS**

Cuadro 1	Frecuencia y uso de las plantas medicinales utilizadas por los pacientes diabéticos Tipo II en Hermosillo, Sonora.....	9
Cuadro 2	Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie <i>Hintonia latiflora</i> .....	11
Cuadro 3	Clasificación de los métodos cromatográficos en columna.....	21
Cuadro 4	Resultados experimentales para evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.....	34
Cuadro 5	Resumen del análisis de varianza para evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.....	34
Cuadro 6	Adecuabilidad del sistema para la señal del compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.....	37
Cuadro 7	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del sistema.....	41
Cuadro 8	Resumen de la regresión lineal.....	42
Cuadro 9	Análisis de Varianza para el modelo de regresión lineal.....	42
Cuadro 10	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.....	43
Cuadro 11	Límite de Detección y de Cuantificación.....	45
Cuadro 12	Datos experimentales para determinar la exactitud del método.....	46
Cuadro 13	Datos experimentales para evaluar la precisión del método.....	47
Cuadro 14	Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema (repetibilidad).....	47
Cuadro 15	Datos experimentales para evaluar la precisión intermedia (reproducibilidad).....	48
Cuadro 16	Resultados experimentales para determinar el contenido de fenoles totales. Utilizando ácido gálico.....	49
Cuadro 17	Resultados experimentales para determinar el contenido de fenoles totales. Utilizando el compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.....	50

---

## **1 Justificación y Objetivos**

Durante los últimos decenios el interés del público por el consumo de hierbas medicinales y productos derivados de ellas ha aumentado considerablemente. Actualmente, existe un marcado interés por regular el comercio y garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los productos derivados de plantas medicinales. El trabajo de la Organización Mundial de la Salud para elaborar las normas modelo en este campo, ha sido útil para fortalecer el reconocimiento de la función de las plantas medicinales en la atención de la salud. Asegurar la inocuidad y la eficacia de estos productos son desafíos planteados para establecer una regulación sanitaria adecuada y con ello el registro de tales productos. Desafortunadamente, los criterios para la autorización, el expendio, la fabricación, la comercialización y los criterios para evaluar la calidad, seguridad y eficacia varían en las distintas regiones del mundo. Por este motivo, la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) ha emitido varias resoluciones considerando que un gran sector de la población de los países en desarrollo depende todavía de la medicina tradicional como un recurso importante para la atención primaria de la salud. Así, en 1991, las políticas de la Organización Mundial de la Salud referentes a la medicina tradicional fueron presentadas en la cuadragésima cuarta Asamblea Mundial de la Salud. Dichas políticas establecían la colaboración de la OMS con sus estados miembro para el análisis de las políticas nacionales, la legislación y las decisiones sobre la naturaleza y el grado de uso de la medicina tradicional en sus sistemas de salud. En la resolución WHA42.43, se planteó la necesidad de: efectuar una evaluación completa de los sistemas de medicina tradicional; realizar un inventario sistemático y un estudio científico detallado de las plantas medicinales más utilizadas en las prácticas médicas tradicionales; implantar medidas con la finalidad de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales; establecer y mantener estándares adecuados de los productos; identificar plantas medicinales o medicamentos derivados de ellas que tengan una relación eficacia-efecto secundario satisfactorio y que por lo tanto puedan incluirse en los formularios o farmacopeas nacionales y, por

último, realizar estudios clínicos y preclínicos (OMS, 2002; Mitscher *et al.*, 2000; WHO, 1999).

La regulación de medicamentos herbolarios también ha sido tema de discusión en la Conferencia Internacional sobre Autoridades Regulatoras de Medicamentos (ICDRA). Durante la cuarta y quinta conferencia de la ICDRA (1986 y 1989, respectivamente), se realizaron talleres sobre la reglamentación de los medicamentos herbolarios de intercambio comercial internacional. La conclusión más relevante de estas reuniones fue que la OMS debería establecer las directrices modelo, con los elementos básicos de la legislación para el registro de los productos herbolarios. Con base en estos antecedentes la OMS, redactó las normas para la evaluación de los medicamentos herbolarios, en octubre de 1991. El objetivo de estas directrices (OMS-TRM-91.4), es definir los criterios básicos para la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de los productos herbolarios y así ayudar a las autoridades normativas, a las organizaciones científicas y los fabricantes para llevar a cabo una evaluación de la documentación requerida (dossier) para regular dichos productos. Como regla general en esta evaluación se debe considerar la experiencia tradicional en el uso de tales productos así como, los antecedentes médicos, históricos y etnológico documentados en la literatura farmacéutica o fuentes similares. Las directrices publicadas contienen además de los criterios básicos para evaluar la calidad, seguridad y eficacia de los productos herbolarios los requisitos más importantes para su etiquetado y la información para los consumidores. Las normas de la OMS tienen el propósito de facilitar el trabajo de las autoridades reguladoras, los organismos científicos y la industria para el desarrollo, evaluación y registro de los medicamentos herbolarios. Además, los resultados científicos que podrían ser la base para la clasificación futura de tales medicamentos también permitirían la transferencia transcultural de los conocimientos sobre las medicinas tradicionales entre los diferentes países (OMS, 2002; Mitscher *et al.*, 2000; WHO, 1999).

Debido a que la mayoría de la población mundial acude a los consultorios médicos tradicionales en busca de tratamientos alternativos (en especial de medicina herbolaria) para curar trastornos digestivos, malestares de las vías respiratorias superiores y urinarias y enfermedades de la piel, entre otras, es necesario formular las políticas nacionales sobre las medicinas

---

tradicionales y promover la cooperación entre los estados miembros. Por esta razón, en 1994, la Oficina Regional de la OMS para el Mediterráneo Oriental publicó las normas para la formulación de una política nacional sobre medicamentos herbolarios. Los objetivos principales de estas políticas comprenden entonces: el reconocimiento de la medicina tradicional como parte integral de los sistemas nacionales para la atención de la salud; la cooperación entre la medicina moderna y la tradicional; la promoción del uso racional de los productos; la introducción de los sistemas de garantía de calidad; la garantía de suministros regulares; la promoción de la investigación y la elaboración de medidas normativas (OMS, 2002; WHO, 1999).

Posterior a la publicación de estas normas, la OMS recomendó a los países miembros establecer un Comité Nacional de Expertos con la autoridad apropiada para identificar las medidas y los planes necesarios para formular las políticas nacionales, dirigirlas y vigilar las diferentes fases de su ejecución. Entre las funciones y las actividades del Comité se encuentran: formular una lista nacional de los medicamentos herbolarios esenciales; preparar las normas para su registro; asesorar sobre un sistema nacional de concesión de licencias; asesorar a los medios sobre reacciones adversas y, proponer métodos adecuados de comunicación y cooperación con el Ministerio de Salud. Uno de los criterios para seleccionar las plantas medicinales utilizadas en la elaboración de medicamentos es la disponibilidad o suministro continuo, por lo tanto, en la lista aprobada para cada país la política debe indicar claramente la forma de asegurar el suministro de dichas plantas. De manera general, el procedimiento de suministro comprende el cultivo, la recolección, las importaciones y la preservación de la flora medicinal (OMS, 2002; WHO, 1999). Finalmente, las recomendaciones establecidas durante la sexta reunión de la ICDRA, impulsaron a la OMS, a elaborar las monografías farmacopéicas de los medicamentos herbolarios más utilizados. En respuesta a la solicitud de los estados miembro, el programa de medicina tradicional de la OMS publicó, en 1991, las primeras 28 monografías de plantas. La finalidad de este documento es proporcionar la información científica sobre la calidad, seguridad y eficacia de las plantas medicinales seleccionadas facilitando el uso adecuado de los medicamentos herbolarios; suministrar modelos adecuados para que los estados miembros elaboren las monografías de sus productos nacionales y,

facilitar el intercambio de información con otros países. Cada monografía consta de dos partes: la primera contiene la información para identificar y asegurar la calidad de las plantas (aspectos botánicos, distribución geográfica, ensayos de identidad, ensayos de pureza, análisis químicos y metabolitos secundarios mayoritarios). La segunda parte, contiene una recopilación de los trabajos científicos, usos tradicionales, información farmacológica y clínica, posibles contraindicaciones, precauciones, efectos secundarios y posología. En el 2002, la OMS publicó un segundo volumen con 32 monografías adicionales de plantas medicinales (OMS, 2002; WHO, 1999).

Debido al incremento general que tiene el consumo de productos herbolarios en el México actual, en el mes de febrero de 1997, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Reglamento de Insumos para la Salud (RIS). Dicho reglamento consideró por primera vez en sus artículos 66-71, 88-98 y 129-130 las condiciones que para su registro, autorización y venta debían cumplir dichos productos. Asimismo, en el mes de diciembre de 1999, se publicó en el mismo documento una lista de plantas prohibidas para la elaboración de tisanas, infusiones y aceites vegetales comestibles. En el año 2001, la Secretaría de Salud, a través de su Comisión Permanente de la Farmacopea, publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, como una respuesta ante la creciente necesidad de referentes respecto a los recursos herbolarios y como una repercusión de la propuesta de la OMS. Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria de nuestro país, las monografías de especies autóctonas o introducidas pero de uso médico tradicional resultaron muy limitadas en cantidad y calidad, por el simple hecho de que no se dispone de la información suficiente para integrarlas. Finalmente, en enero de 2008, el Diario Oficial de la Federación publicó un decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones del RIS. Ninguno de los artículos relacionados con productos herbolarios fue modificado.

De acuerdo con el RIS los productos herbolarios se clasifican en remedios y medicamentos herbolarios.

Para obtener la autorización de una clave alfanumérica para un remedio herbolario se requiere:

- a. Presentar una solicitud de autorización de clave alfanumérica de remedios herbolarios.
- b. Número de aviso de funcionamiento con el giro de fábrica o laboratorio de remedios herbolarios para uso humano, que cuente con laboratorio de control interno o externo.
- c. Número de aviso o de autorización de responsable sanitario.
- d. Notificación por producto, especificando cada uno de los ingredientes de su composición o fórmula.
- e. Certificado de análisis microbiológico y ausencia de residuos tóxicos.
- f. Descripción del proceso de manufactura, mismo que debe cumplir con las buenas prácticas de fabricación.
- g. Información sobre la identidad de los componentes.
- h. Denominación científica y popular de la(s) planta(s) empleadas.
- i. Indicaciones y tiempo para su uso.
- j. Proyectos de marbete o etiqueta
- k. Fórmula.

En caso de que el producto sea de fabricación extranjera, además de todo lo mencionado anteriormente, debe incluirse:

- a. Certificado de libre venta expedido por la autoridad sanitaria del país de origen.
- b. Certificado de análisis emitido por la empresa que fabrica el remedio herbolario, con el membrete de su razón social y avalado por los químicos responsables de la empresa extranjera y nacional.
- c. Certificado de buenas prácticas de fabricación.
- d. Carta de representación (si el producto es fabricado por la casa matriz o filial del laboratorio solicitante en México, no se requerirá de la carta de representación).
- e. Proyectos de etiqueta en español y de contraetiqueta si es el caso.

Por otra parte, para obtener el registro de medicamentos herbolarios de fabricación nacional es necesario presentar:

- a. Información técnica y científica que demuestre la identidad y pureza de sus componentes de acuerdo con lo que establezcan las Farmacopeas especiales, o en su defecto, las fuentes de información científica internacional.
- b. Certificado de análisis de las materias primas, justificando si es el caso la presencia de aditivos.
- c. Certificado de análisis de producto terminado.
- d. Descripción del envase primario y secundario.
- e. Método de identificación del principio o principios activos.
- f. Estabilidad del producto terminado.
- g. Identificación taxonómica.
- h. Indicaciones terapéuticas.
- i. Proyectos de etiqueta.
- j. Instructivo para su uso.
- k. Descripción del proceso de fabricación del medicamento por registrar.
- l. Información para prescribir en sus versiones amplia y reducida.

Para medicamentos herbolarios de fabricación extranjera, además de todo lo descrito anteriormente deberá presentarse:

- a. Certificado de libre venta expedido por la autoridad competente del país de origen (en original).
- b. Certificado de análisis emitido por el fabricante del medicamento en papel membretado y avalado por los responsables sanitarios de la empresa nacional y extranjera (original).
- c. Certificado de buenas prácticas de fabricación
- d. Carta de representación del fabricante, autenticada por el procedimiento legal que exista en el país de origen, con su respectiva traducción al español por perito traductor, cuando el laboratorio que lo fabrique en el extranjero no sea filial o casa matriz del laboratorio solicitante del registro sanitario (original).

En este marco de referencia, es importante señalar que la posibilidad de registrar un producto herbolario, como medicamento en nuestro país es escasa debido principalmente a que la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos

---



Mexicanos no contiene los métodos de análisis y las especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas medicinales mexicanas y los derivados de ellas, que se utilicen en la elaboración de medicamentos o remedios herbolarios. Aún más, no se dispone actualmente de los estándares primarios que permitan realizar los ensayos de control de calidad de los insumos.

Las preparaciones vegetales comprenden materiales vegetales enteros o triturados, extractos, tinturas, jugos, gomas, resinas, y aceites esenciales estabilizados o no. El control de calidad de estos productos incluye desde la identificación del material y sus componentes (pruebas de identidad), hasta la cuantificación del contenido de principios activos o compuestos marcadores (pruebas de composición).

Asegurar la calidad de los preparados herbolarios es un proceso difícil debido a que los mismos están constituidos por mezclas complejas de compuestos químicos, incluyendo los principios activos. En algunos casos, los principios activos pertenecen a una sola categoría de productos naturales, sin embargo, en otros son de diversa naturaleza, dificultando por lo tanto, el establecimiento de las estrategias para su identificación y cuantificación. Además, el contenido de metabolitos secundarios en las plantas, está sujeto a variaciones dependiendo de su distribución y ontogenia, por lo tanto, la calidad de diferentes lotes de una droga cruda, es variable (Liang *et al.*, 2004; Wagner, 2005).

Cuando se conocen los principios activos, las pruebas de composición enmarcadas en el proceso de control de calidad, se basan en la determinación cuantitativa de los mismos. Sin embargo, en la mayoría de los casos los componentes activos son desconocidos, ya que son pocas las plantas medicinales que han cursado por las diferentes etapas del proceso de investigación que permiten atribuir la actividad terapéutica de la misma a un producto en particular o a un grupo de constituyentes definidos. Aún más, la experiencia señala que el uso de plantas medicinales enteras y sus extractos tienen beneficios reales a largo plazo, ya que los componentes de las mismas actúan conjuntamente unos con otros. No obstante, hay muy poca investigación sobre las plantas enteras porque el proceso de aprobación de medicamentos no da cabida a mezclas indiferenciadas de productos químicos naturales, por lo tanto la función colectiva de los mismos es incierta.

De lo anterior se desprende que cuando los principios activos son desconocidos las pruebas de composición se establecen con base en el contenido de compuestos marcadores. Los compuestos marcadores son poderosas herramientas para asegurar la calidad y la reproducibilidad lote a lote de productos derivados de plantas medicinales. De acuerdo con la legislación europea los compuestos marcadores poseen las siguientes características: son productos característicos del metabolismo secundario; están presentes en cantidad suficiente tanto en la materia prima como en el producto terminado; la identificación y cuantificación de los mismos debe ser posible mediante el empleo de técnicas analíticas convencionales (CG, CLAE y HPTLC); deben de ser estables bajo las condiciones de almacenamiento y disponibles comercialmente; sí este último no fuese el caso, los marcadores deben ser de fácil separación a partir de sus fuentes naturales (Li et al., 2008; Bone, 2001; Flaster y Lassiter, 2004; Reif *et al.*, 2004; Sharpless *et al.*, 2004; WHO, 2000).

Con base en lo antes expuesto el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial desarrollar y validar un método analítico para la identificación y cuantificación de uno de los principios activos más potentes presentes en la especie medicinal *Hintonia latiflora* (Rubiaceae). De manera adicional, también se determinará el contenido de fenoles totales en el extracto acuoso de la especie. La información obtenida sentará las bases para el desarrollo y la aplicación de los procedimientos analíticos apropiados para el control de calidad de la especie en estudio. Los resultados generados también serán de utilidad para los practicantes de la medicina alternativa, los industriales, los médicos, los farmacéuticos y otros profesionistas de la salud.

La selección de la especie medicinal se realizó considerando que es una de las especies medicinales más comercializadas en México para el tratamiento de la diabetes. En el Cuadro 1 se resumen los resultados de las 15 especies vegetales (Saucedo, 2006; Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001).

**Cuadro 1.** Frecuencia y uso de las plantas medicinales utilizadas por los pacientes diabéticos Tipo II en Hermosillo, Sonora.

Nombre común	Nombre científico	Familia	Estructura o sustancia vegetal útil	Forma de preparación	Formas de aplicación	Frecuencia
Nopal	<i>Opuntia sp.</i>	<i>Cactaceae</i>	Ramas (peneas), resina	Licuado, cocido	Bebida fresca, té	33%
Chaya	<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Hojas	Cocido	Té, agua de uso	6%
Piña	<i>Ananas sativus</i>	<i>Bromeliaceae</i>	Fruto	Licuado	Bebida fresca, Té	6%
Warequi	<i>Iberillea sonora</i>	<i>Cucurbitaceae</i>	Raíz	Molida, cocido	Té, agua de uso	6%
<b>Copalquín</b>	<b><i>Hintonia latiflora</i></b>	<b><i>Rubiaceae</i></b>	<b>Corteza</b>	<b>Cocido</b>	<b>Té</b>	<b>5%</b>
Naranja	<i>Citrus aurantium L.</i>	<i>Rutaceae</i>	Fruto, jugo	Licuado	Bebida fresca	5%
Apio	<i>Apium graveolens L.</i>	<i>Umbelíferae</i>	Tallo	Licuado	Bebida fresca	3%
Bebelema	<i>Sideroxylon sp.</i>	<i>Sapotaceae</i>	Hojas y tallo	Cocido	Té, agua de uso	3%
Cosahui	<i>Krameria sonora</i>	<i>Krameriaceae</i>	N.D.	Cocido	Té	3%
Higuera	<i>Ficus carica L.</i>	<i>Moraceae</i>	Hojas	Cocido	Agua de uso	3%
Limón	<i>Citrus limon L.</i>	<i>Rutaceae</i>	Fruto, jugo	Licuado	Bebida fresca	3%
Aguacate	<i>Persea americana</i>	<i>Lauraceae</i>	N.D.	Cocido	Té	2%
Alas de angel	ND	ND	Hojas	Cocido	Agua de uso	2%
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus Labill</i>	<i>Mirtaceae</i>	Hojas	Cocido	Té	2%
Oreja de burro	ND	ND	N.D.	Cocido	Té	2%

## **2 Antecedentes de la especie *Hintonia laiflora*.**

*Hintonia latiflora* (Sessé and Muciño ex D.C., Bullock; Rubiaceae) (Figura 1) es un árbol de 8 metros de altura. Presenta, hojas pecioladas, ovales u oval-oblongas de 4 a 12 cm de largo, obtusas o acuminadas, redondeadas o agudas en la base y vellosas en el reverso; las flores son olorosas, en forma de embudo y su corola es blanca; las cápsulas son ovales y miden 2 cm (Martínez, 1989).



**Figura 1. *Hintonia latiflora*.**

La especie se distribuye en el sureste de Chihuahua y en los estados de Guerrero, Guanajuato, Puebla, Morelos, Michoacán y Estado de México (Argueta *et al.*, 1994).

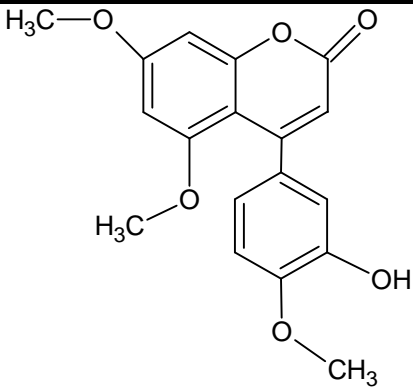
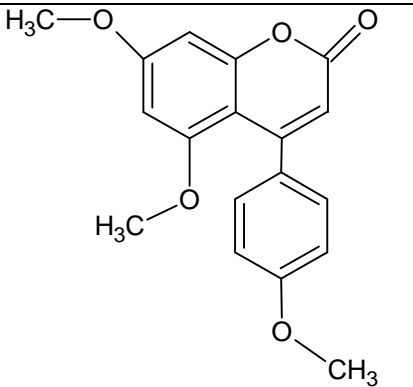
En México se conoce popularmente con los nombres de quina, campanilla (Jalisco), palo amargo (Sinaloa), quina de Michoacán, corteza de jojutla, campanillo (Chiapas), copalchie, palo de copalche, palo amargoso, copalchi y cáscara sagrada. La especie se utiliza para tratar la diabetes, el paludismo, la malaria y el dengue. También se emplea para tratar las úlceras, las afecciones del riñón, contra la bilis y para curar heridas (Argueta *et. al.*, 1994).

*H. latiflora* se consume sola o en combinación con otras plantas medicinales como *Lophocerus schotti*, *Guazuma ulmifolia* y *Opuntia fulgida* (Saucedo, 2006). Entre los preparados comerciales el Copangel es quizás el más popular y se utiliza ampliamente para el tratamiento de la diabetes. Estos preparados, al igual que muchos otros, corroboran el hecho de que la mayoría

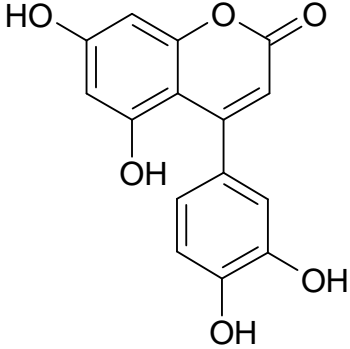
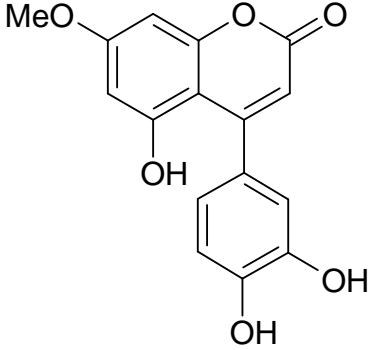
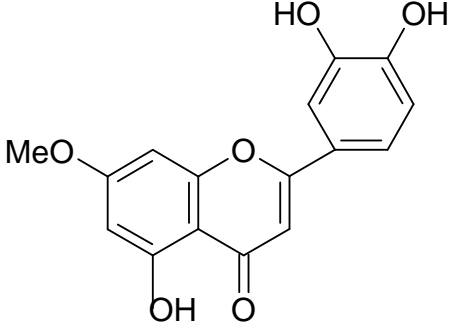
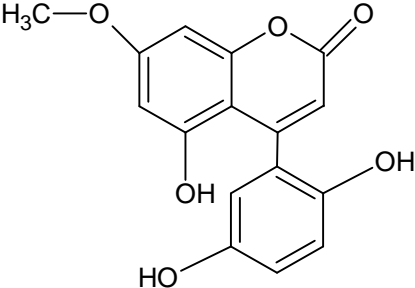
de los productos herbolarios comercializados a nivel industrial provienen de plantas de reconocido uso en la medicina popular.

Desde el punto de vista químico *H. latiflora* ha sido objeto de numerosas investigaciones. Los principales metabolitos secundarios aislados y caracterizados en estos estudios pertenecen a las categorías de las 4-fenilcumarinas (Sánchez-Viesca *et. al.*, 1969; Reher y Kraus, 1984; Mata *et.al.*, 1987, 1988, 1990a, 1990b, 1992; Aquino *et. al.*, 1988; Soto *et.al.*, 1988; Argotte-Ramos *et.al.*, 2006) y las cucurbitacinas (Reguero *et.al.*, 1987; Mata *et.al.*, 1990a, 1990b.). También se ha descrito la presencia de un fenilestireno (Mata *et.al.*, 1992), una flavona (Camacho *et.al.*, 1990) y manitol (Sánchez-Viesca *et.al.*, 1987,1988; Camacho *et.al.*, 1990). En el Cuadro 2 se ilustran las estructuras químicas de los principales constituyentes presentes en la especie.

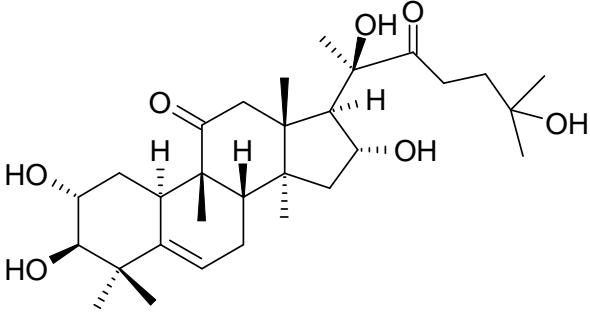
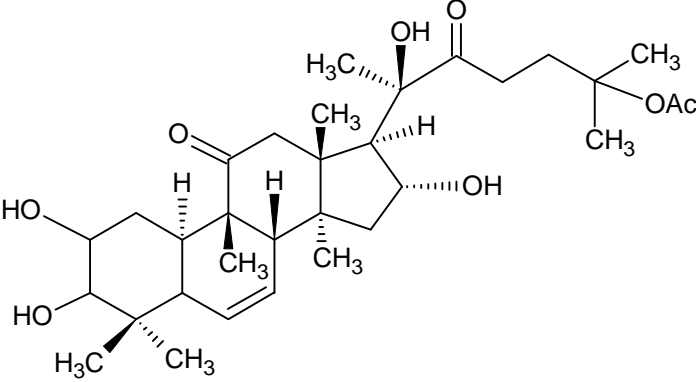
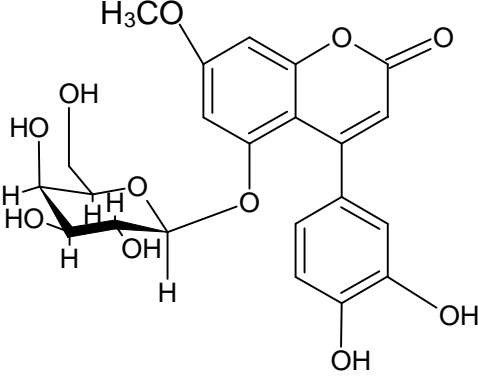
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora*.

Metabolito	Referencia
 <p>3'-hidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina (1)</p>	<p>Delle Monache <i>et al.</i>, 1983</p>
 <p>5, 7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina (2)</p>	<p>Delle Monache <i>et al.</i>, 1983 Mata <i>et al.</i>, 1987 Mata <i>et al.</i>, 1988</p>

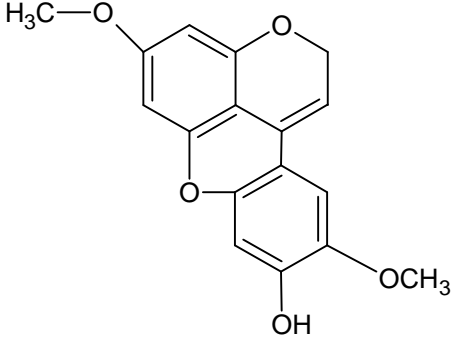
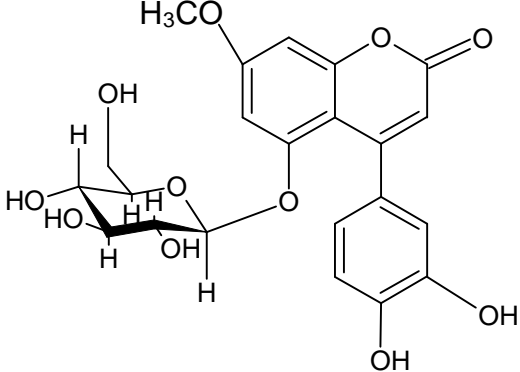
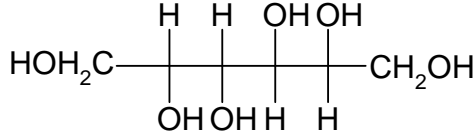
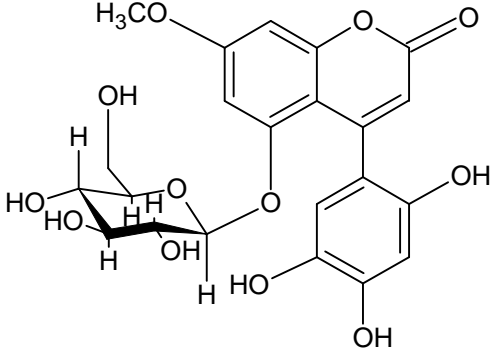
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

Metabolito	Referencia
 <p>5,7,3',4'-tetrahydroxi-4-fenilcumarina (3)</p>	<p>Delle Monache <i>et al.</i>, 1983; 1984; 1985.</p>
 <p>7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-fenilcumarina (4)</p>	<p>Delle Monache <i>et al.</i>, 1983; 1984; 1985.</p>
 <p>Flavona (5)</p>	<p>Reher y Kraus, 1984.</p>
 <p>2',5',5'-tridroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (6)</p>	<p>Reher y Kraus <i>et al.</i>, 1984</p>

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

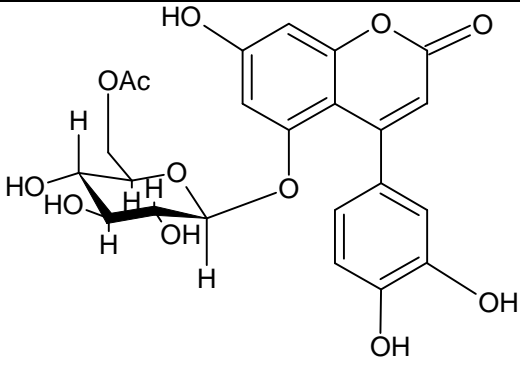
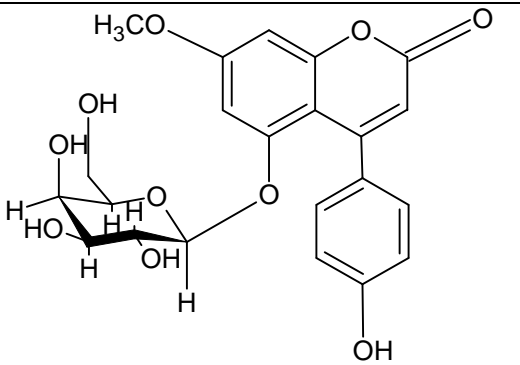
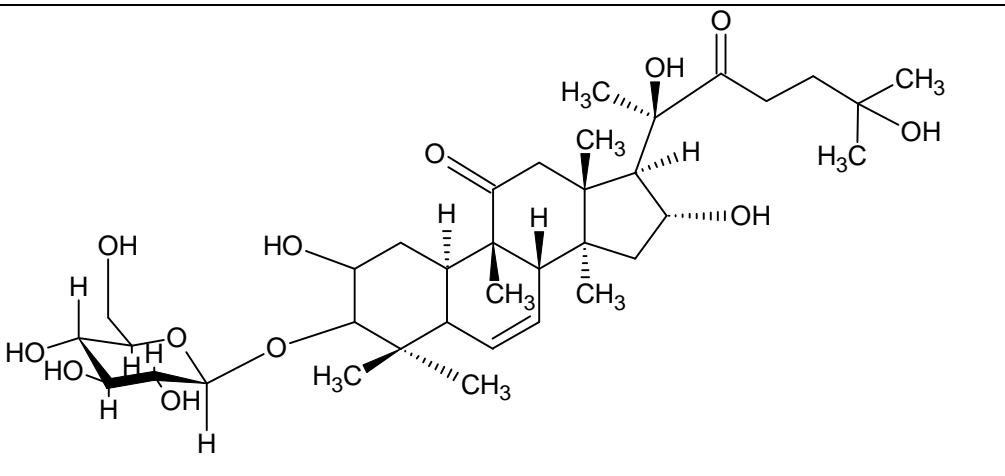
Metabolito	Referencia
 <p>23,24-dihidrocurbitacina F (7)</p>	<p>Reguero <i>et al.</i>, 1987</p>
 <p>25-acetil-23,24-dihidrocurbitacina F (8)</p>	<p>Reguero <i>et al.</i>, 1987</p>
 <p>5-O-β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (9)</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1987 Mata <i>et al.</i>, 1990</p>

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

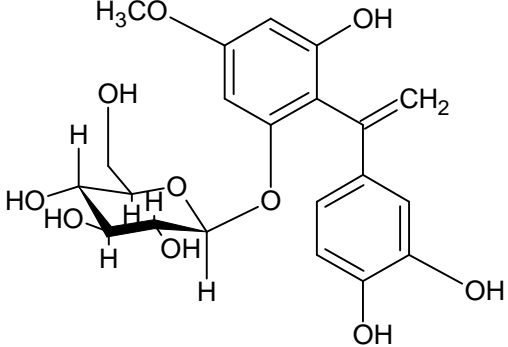
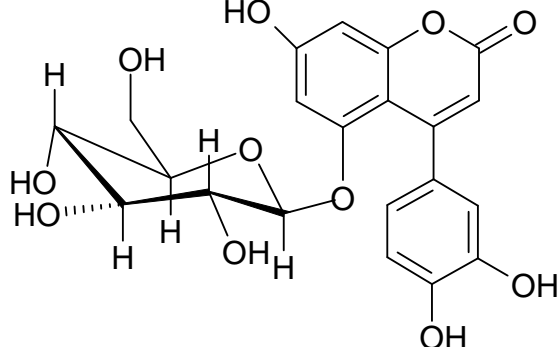
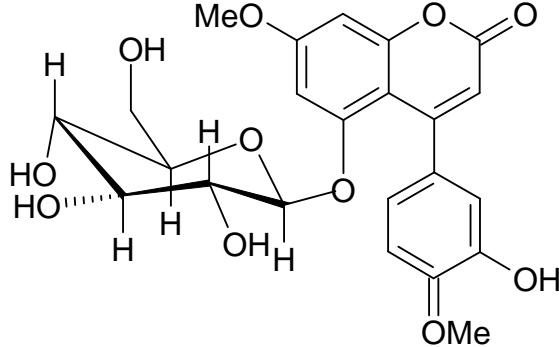
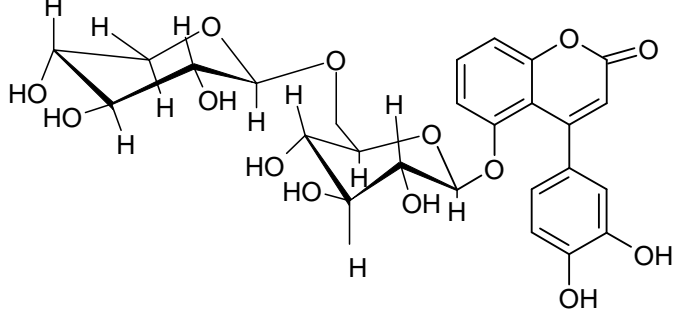
Metabolito	Referencia
 <p>7,5'-dimetoxi-4'-hidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina (10)</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1987 Mata <i>et al.</i>, 1990</p>
 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (11)</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1987 Soto <i>et al.</i>, 1988</p>
 <p>Manitol (12)</p>	<p>Mata <i>et al.</i>, 1987; 1988; Camacho, 1990,</p>
 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-2',4',5'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina(13)</p>	<p>Soto <i>et al.</i>, 1988</p>



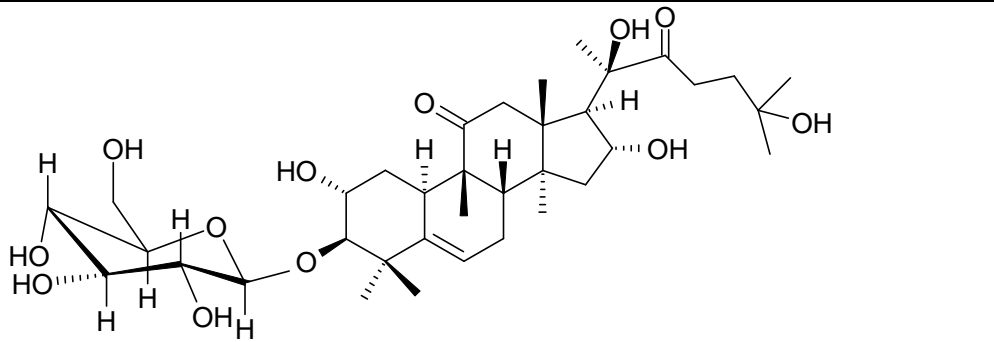
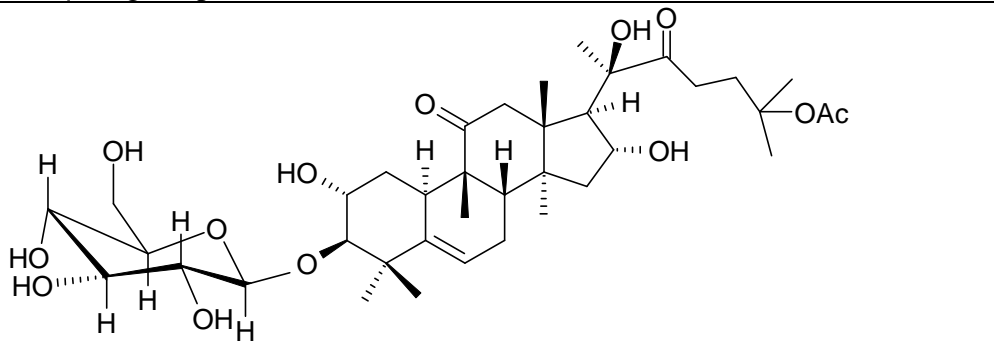
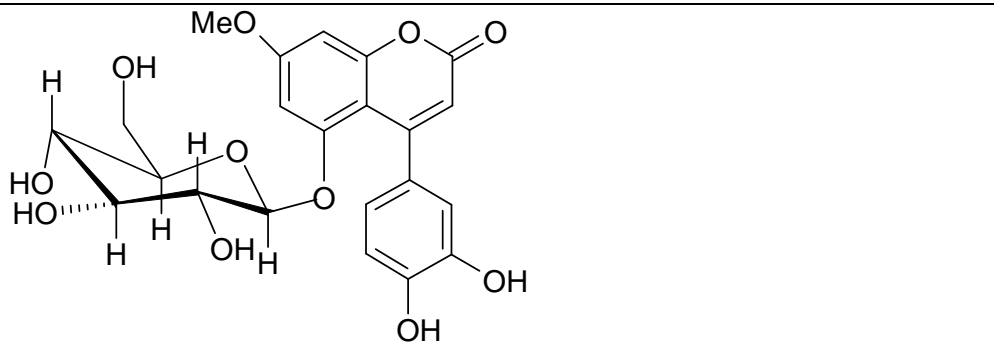
**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

Metabolito	Referencia
 <p>5-O-(6''-acetil-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina <b>(14)</b></p>	Mata <i>et al.</i> , 1992
 <p>5-O-<math>\beta</math>-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina <b>(15)</b></p>	Mata <i>et al.</i> , 1992
 <p>3-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F <b>(16)</b></p>	Mata <i>et al.</i> , 1992

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

Metabolito	Referencia
 <p>6-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-2,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-<math>\alpha</math>-fenilestireno (<b>17</b>)</p>	Mata <i>et al.</i> , 1992
 <p>5-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (<b>18</b>)</p>	Argotte-Ramos <i>et al.</i> , 2006
 <p>5-O-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-7,4'-dimetoxi-3'-hidroxi-4-fenilcumarina (<b>19</b>)</p>	Argotte-Ramos <i>et al.</i> , 2006
 <p>5-O-[<math>\beta</math>-D-xilopiranosil-(1<math>\rightarrow</math>6)-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (<b>20</b>)</p>	Guerrero <i>et al.</i> , 2007

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios aislados a partir de la especie *Hintonia latiflora* (Continuación).

Metabolito	Referencia
 <p>3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (21)</p>	Guerrero <i>et al.</i> , 2007
 <p>25-O-Acetil-3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F (22)</p>	Guerrero <i>et al.</i> , 2007
 <p>5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (23)</p>	Guerrero <i>et al.</i> , 2007

Desde el punto de vista biológico, la especie ha sido objeto de varias investigaciones. En 1993 se investigaron las propiedades antipalúdicas de los extractos orgánicos de la corteza, preparados con etanol o acetato de etilo. De estos estudios, los investigadores encontraron que los extractos presentaron una moderada actividad anti-*Plasmodium falciparum in vitro* (Noster, *et al.*, 1993). Posteriormente, se describió también la actividad antipalúdica de un extracto preparado con acetato de etilo. Dicho extracto suprimió de manera significativa la parasitemia y el número de esquizontes de *Plasmodium borghei* (Argotte-Ramos *et al.*, 2006). Finalmente, Camacho y colaboradores demostraron la actividad anti *Leishmania* a partir de un extracto preparado de metanol (Camacho *et al.*, 1990).

En 1992, Rojas y colaboradores evaluaron el potencial antibacteriano de extractos obtenidos a partir de la especie *H. latiflora*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto orgánico ensayado fue inactivo contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans*). No obstante, el glicósido 5-O-β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina presentó una actividad antibacteriana contra *Candida albicans*. En este mismo trabajo se demostró que los glicósidos 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina; 5-O-(6''-acetil)-β-D-galactopiranosil -3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina; 5-O-(6''-acetil)-β-D-glucopiranosil-7,3,4'-trihidroxi-4-fenilcumarina y 5-O-β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina y las cucurbitacinas carecen de actividad antibiótica.

Recientemente, Guerrero y colaboradores, realizaron estudios para determinar las propiedades hipoglicemiantes y antihiperlipidémicas del extracto de la corteza de la especie *H. latiflora*. Durante el desarrollo del estudio se comprobó que el efecto farmacológico fue dependiente de la dosis del tratamiento (Guerrero, 2007).

## **2.1 Generalidades sobre cromatografía.**

La cromatografía es un conjunto de técnicas analíticas ampliamente utilizadas para separar, identificar y determinar los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía (Skoog, 2004).

Es difícil definir de manera rigurosa el término “cromatografía”, debido a la variedad de sistemas y técnicas a que se aplica. La principal característica, que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación es la interacción de dos fases mutuamente inmiscibles: una fase estacionaria y una móvil. Así, la muestra disuelta en una fase móvil es transportada a lo largo de una columna o una superficie plana que contiene una fase estacionaria distribuida uniformemente. Los componentes de la muestra experimentan entonces, diversas interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas emergiendo en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. Es decir, el componente menos retardado emerge primero y el retenido más fuerte eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. Los componentes adyacentes (picos) se separan cuando el pico que sale después es retardado lo suficiente para impedir la sobreposición con el pico que emergió antes. Actualmente, existe una amplia gama de materiales para preparar las fases móvil y estacionaria permitiendo con ello la separación de moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión de tipo London. (Romero, 2002). En síntesis, la separación de los componentes presentes en las muestras se basa en las diferentes velocidades de migración.

De manera general, dependiendo de la fase estacionaria los métodos cromatográficos se clasifican en dos categorías:

- Cromatografía plana. La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son: Cromatografía en papel y Cromatografía en Capa Fina (CCF).
- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil la cromatografía puede ser: Cromatografía de líquidos, Cromatografía de gases (CG) y Cromatografía de Fluidos Supercríticos (Cuadro 3)

En la cromatografía en columna, la fase estacionaria está retenida en un tubo estrecho y la fase móvil se hace pasar a través del mismo por presión o por gravedad. En la cromatografía en capa fina, la fase estacionaria se encuentra cubriendo la superficie de una placa que puede ser de vidrio, aluminio o acrílico. En este caso la fase móvil migra a través de la fase estacionaria por capilaridad separando de esta forma los componentes presentes en la muestra (Skoog, 2004).

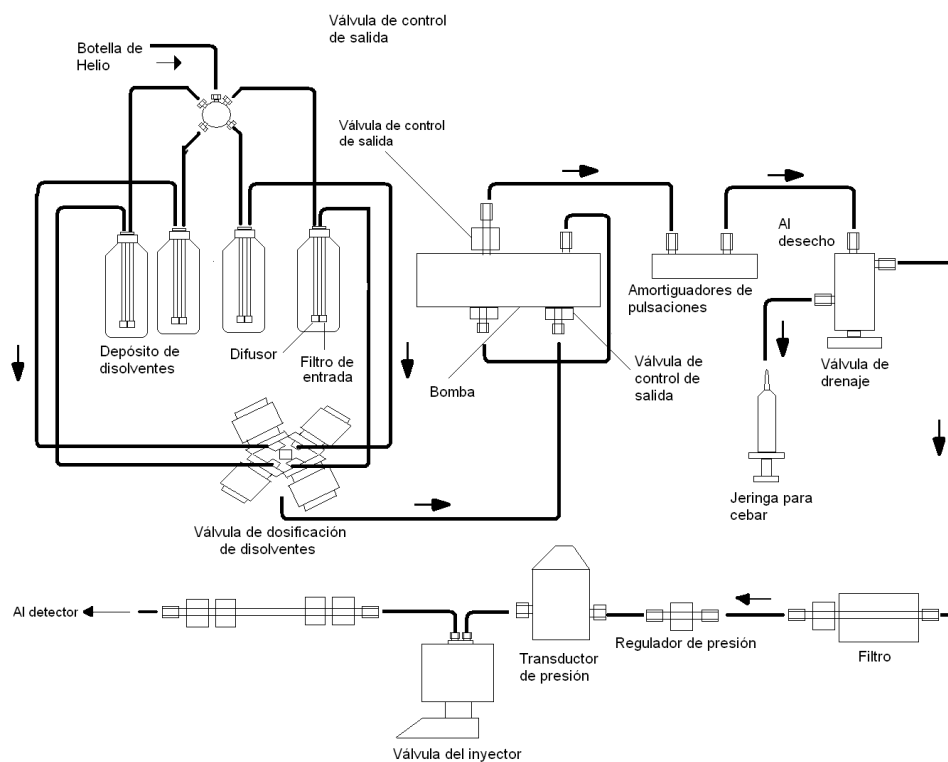
La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Esta técnica tiene la ventaja de no estar limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. La CLAE, es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de componentes polifuncionales de alto peso molecular. La separación cromatográfica es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases. Entre las ventajas que ofrece esta técnica destacan:

- Las fracciones separadas se recolectan en forma sencilla
- El recobro es usualmente cuantitativo
- Los componentes separados son fácilmente aislados del disolvente de la fase móvil (Skoog, 2004).

Cuadro 3. Clasificación de los métodos cromatográficos en columna

<b>Clasificación</b>			
<b>general</b>	<b>Método específico</b>	<b>Fase estacionaria</b>	<b>Tipo de equilibrio</b>
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquido)	Líquido-líquido, o de reparto	Líquido adsorbido en un sólido	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase enlazada	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre líquido y superficie química modificada
	Líquido-sólido, o de adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un polímero sólido	Reparto/tamizado
Cromatografía de gases (GC) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido en un sólido	Reparto entre un gas y un líquido
	Gas-fase enlazada	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre gas y superficie químicamente modificada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluidos supercríticos)		Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre fluido supercrítico y superficie químicamente modificada

Dependiendo del método cromatográfico empleado es posible, además, identificar el compuesto de interés, cuantificar su contenido y determinar su pureza. Como se observa en la Figura 2, la columna se encuentra acoplada a un detector que registra una determinada respuesta en función de la concentración del soluto. El resultado de este proceso es un gráfico denominado cromatograma, en el cual se registra una respuesta (picos) en función del tiempo. Las posiciones de dichos picos con respecto al tiempo se pueden utilizar para identificar los componentes en la muestra y el área bajo la curva de los picos, por ser una medida cuantitativa, proporciona la cantidad de cada constituyente.



**Figura 2.** Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (Skoog, 2004).

La cromatografía cuantitativa se basa en la comparación de la altura o área del pico del analito con uno o más patrones. El área de los picos es independiente de los efectos de ensanchamiento provocadas por variables como: la temperatura de la columna, la velocidad de flujo, la velocidad de inyección y el pH; además de la sobrecarga de la columna. La única restricción



que se tiene al realizar un análisis cuantitativo basándose en el área del cromatograma, es el hecho de que, los picos deben estar perfectamente definidos y separados. Por lo tanto el área de un pico es un parámetro analítico más satisfactorio que su correspondiente altura. Sin embargo, en el caso particular de picos estrechos las alturas se determinan con mayor exactitud. Así, sí se controlan adecuadamente las condiciones, cualquiera de estos dos parámetros varía linealmente con respecto a la concentración (Skoog, 2004).

Para obtener la máxima precisión en una cromatografía cuantitativa se usan patrones internos, evitando con ello, la incertidumbre propia de la inyección de la muestra. En este procedimiento, se introduce una cantidad de estándar interno cuidadosamente medida en cada estándar y muestra, y como parámetro analítico se utiliza la relación entre el área de pico del analito y el área de pico del estándar interno. Para que este método sea válido, es necesario que el pico del estándar interno este bien separado del resto de los picos de la muestra, pero debe aparecer cerca del pico del analito (Skoog, 2004).

En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, se requieren presiones de varios centenares de atmósferas para conseguir caudales razonables con los modernos empaquetados de cromatografía de líquidos, que constan de partículas de diámetro igual o inferior a 10 $\mu$ m. A consecuencia de estas grandes presiones, el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución tiene que ser considerablemente más elaborado que el de otros tipos de cromatografía. La figura 2 muestra los componentes básicos de un cromatógrafo líquido de alta resolución (Skoog, 2004).

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por el reparto de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como fase normal, mientras que, por el contrario, cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa (Skoog, 2004).

El mecanismo de separación en la cromatografía de fase reversa depende de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en la fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. La

naturaleza actual de las interacciones de unión hidrofóbica asume que la interacción de unión es el resultado de un efecto entrópico favorable. Las condiciones iniciales de unión de la fase móvil usadas en la cromatografía de fase reversa son acuosas lo cual indica un grado alto de estructuras de agua organizadas alrededor de las moléculas de soluto y el ligando inmovilizado. A medida que el soluto se une al ligando hidrofóbico inmovilizado disminuye el área hidrofóbica expuesta hacia el disolvente. Así, el grado de organización de la estructura de agua disminuye con un favorable aumento de entropía en el sistema (Romero, 2002).

## **2.2 Validación de métodos analíticos**

La validación de métodos analíticos es una parte fundamental en el desarrollo de las técnicas de análisis para el control de calidad de formas farmacéuticas. Durante la secuencia de pruebas y análisis que se realizan, el analista puede establecer si el estudio cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado (García, 2002).

De acuerdo con lo establecido en las Buenas Prácticas de Fabricación y, de Laboratorio todos los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos deben estar validados (PROY-NOM-059). De acuerdo con estos documentos un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra (analito). Por otra parte, la validación de métodos analíticos se define como el proceso mediante el cual queda establecido, con estudios de laboratorio, que las características del método satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas; es decir, cumple con el propósito establecido.

En general, las características del método que deben considerarse en y durante un proceso de validación son:

- Exactitud
- Precisión
- Especificidad
- Límite de detección

- Límite de Cuantificación
- Linealidad
- Intervalo

En las Farmacopeas, los procedimientos analíticos conducentes a cuantificar la concentración de los insumos en general varían desde valoraciones analíticas muy específicas hasta evaluaciones subjetivas y por atributos. Considerando esta variedad resulta evidente, que los diferentes métodos de prueba requieren diferentes esquemas de validación. Es por ello, que la USP 31 clasifica a los métodos analíticos en las siguientes categorías:

**Categoría 1:** Métodos analíticos para la cuantificación de los de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

**Categoría 2:** Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o bien, productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos métodos incluyen análisis cuantitativos y pruebas límite.

**Categoría 3:** Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución y liberación del fármaco, por tan sólo mencionar algunos).

**Categoría 4:** Pruebas de identificación (USP 31)

Durante la validación de métodos analíticos la evaluación cuantitativa de las características de interés están relacionadas directamente con la confianza que probablemente ofrecerá el resultado. Por lo tanto, validar los métodos analíticos equivale también, a estimar la incertidumbre de las mediciones. De manera general, para validar un método analítico, debe desarrollarse un protocolo definido conducente a determinar un analito específico en un rango de concentraciones. Por lo tanto, estas características, junto con todos los criterios inherentes al propósito del método deben especificarse en su totalidad antes de realizar la validación.

El profesional químico es el responsable de los procesos farmacéuticos y por lo tanto de la calidad de estos. Todo producto farmacéutico (materias

primas, producto intermedio, producto a granel y producto terminado) debe satisfacer los requisitos establecidos. Para ello, se requieren diversos métodos destinados a medir uno o más componentes específicos en el producto. De lo anterior se desprende que los métodos analíticos representan un sistema crítico para asegurar la calidad del producto en una empresa farmacéutica. La carrera de muchas empresas farmacéuticas por alcanzar una productividad elevada a menor costo, está determinada, entre otros factores, al dictamen del producto en un menor tiempo. Para lograr este objetivo deben utilizarse métodos de prueba de bajo costos (García, 2002).

Por otra parte, los errores en las mediciones analíticas surgen de diferentes fuentes y en distintos niveles de la organización. Una manera práctica de representar estas fuentes de variación (para una concentración de analito específica) es la siguiente:

- Error aleatorio de medición (repetibilidad)
- Sesgo en la ejecución
- Sesgo del laboratorio
- Sesgo del método
- Efecto de variación de la matriz

Cabe mencionar que en muchas ocasiones las fuentes de variación no son independientes, sin embargo, su correcta identificación sirve para comprobar hasta qué punto un estudio de validación consideró las fuentes de error.

### 3 Parte Experimental

#### 3.1 Material vegetal.

La corteza de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae), se recolectó en la región de Batopilas, Municipio de Batopilas, Chihuahua, en Junio de 2005. La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Una muestra de herbario (Voucher: Bye 34448) fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

#### 3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, M.A., USA) equipado con un detector de UV. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó utilizando el programa Empower versión 2 (Waters). Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. También, se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Agilent equipado con un detector UV. De nueva cuenta, el control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó utilizando el programa Chem Station.

Los análisis se realizaron en una columna Symetry® empacada con C8, con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  y un tamaño de poro de 100 Å, a diferentes temperaturas (20, 25 y 30° C). El diámetro interno de la columna es de 3.9 mm y la longitud de 150 mm. La concentración de las muestras oscila entre 300 y 354  $\mu\text{g/mL}$  en un volumen inyectado de 20  $\mu\text{L}$ . La elución se realizó con un sistema isocrático y la fase móvil consistió en una mezcla binaria constituida por ACN: Agua-TFA (0.1%) en las proporciones 19:81. La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 327 nm.

### **3.3 Determinación del contenido de 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3', 4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (20) en la droga cruda.**

#### **3.3.1 Preparación de la solución estándar.**

25 mg del producto natural se disolvieron en 5 mL de agua desionizada. A partir de la solución anterior se preparó una dilución adicional para que 20 µL de la misma contenga aproximadamente 300 µg/mL. Esta concentración representa el 100% del compuesto mayoritario presente en el compuesto (20).

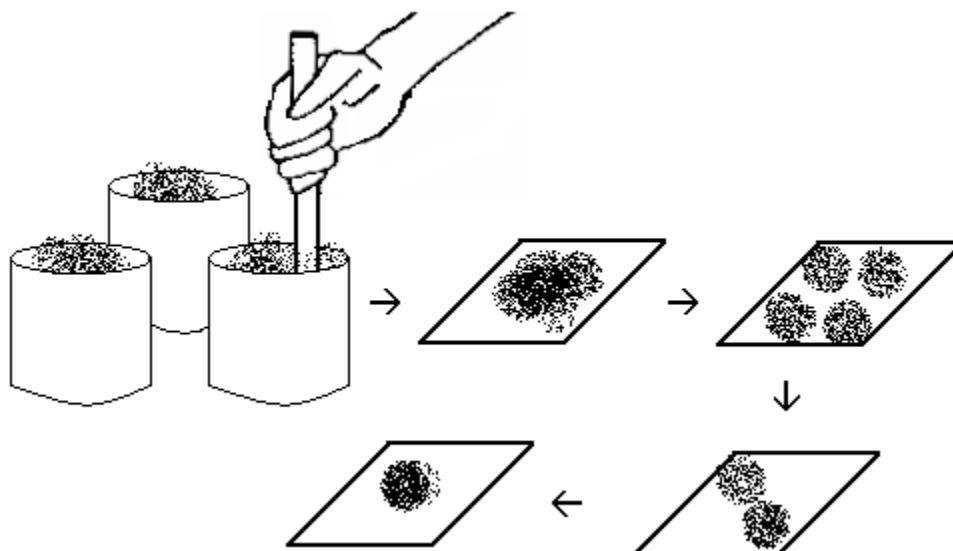
#### **3.3.2 Preparación de la muestra/infusión de trabajo.**

1.5 g de la droga pulverizada se extrajeron con 200 mL de agua hirviendo durante 30 minutos en un vaso de precipitados de 500 mL. La solución resultante se filtró rápidamente con ayuda de un embudo y el vaso se enjuagó perfectamente con 40 mL adicionales de agua fría; la solución se vertió en el embudo y se reunió con la solución anterior. El filtrado obtenido se llevó a un volumen de 250 mL con agua desionizada.

### **3.4 Desarrollo y validación del método analítico.**

#### **3.4.1 Obtención de la muestra.**

La muestra por analizar se seleccionó utilizando un método de muestreo representativo. Para ello, una porción del contenedor mayoritario se extendió sobre una superficie formando una capa delgada. Posteriormente, se homogeneizó por secciones (Figura 3) hasta obtener una muestra representativa.



**Figura 3.** Muestreo representativo

### 3.4.2 Efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica se realizaron una serie de experimentos modificando la temperatura de la columna analítica. Para tal fin, se utilizó un cromatógrafo marca Agilent equipado con un detector UV y un termostato para mantener constante la temperatura de la columna. Las determinaciones se realizaron a 20, 25 y 30°C. En todos los casos se analizaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución con una concentración de 301.2  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos, se analizaron, por medio del programa Stadgraphics Centurión XV.

### 3.4.3 Especificidad del método analítico.

Preparación de la muestra: 25 mg del compuesto **(20)** se disolvieron en 5 mL de agua. La solución resultante constituye la matriz de trabajo. Para evaluar la especificidad del método analítico es necesario, en primer lugar, generar información acerca de la estabilidad química de la muestra. Para ello, se registraron los cromatogramas de la solución estándar antes y después de haberla sometido a las siguientes condiciones experimentales.

- Efecto de la temperatura: 20 mL de la solución estándar se calentaron a 40°C durante 4 semanas en una estufa.
- Hidrólisis ácida: 5 mg del compuesto se calentaron a reflujo con 10 mL de HCl 1.0 N durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla de

reacción se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 5 mL). Posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua desionizada (3 x 5 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Este proceso permitió obtener la parte aglicona de la molécula. Por otra parte, el análisis por cromatografía en capa fina de la fase acuosa permitió la detección de los carbohidratos glucosa y xilosa.

- c) Hidrólisis básica: 5 mg de la muestra se procesaron con 10 mL de NaOH 1.0 N de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso anterior.

#### 3.4.4 Linealidad

- a) Linealidad del sistema. La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs área bajo la curva) de acuerdo al siguiente procedimiento: 2.5 mg del compuesto se disolvieron en 5 mL de agua. A partir de la solución anterior se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 150 y 450  $\mu\text{g/mL}$ . Para el cálculo de la ordenada al origen (b), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) se utilizó un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos así obtenidos, se comparan con los siguientes criterios:  $b=0$ ;  $m \neq 0$ ;  $r \geq 0.99$  y  $r^2 \geq 0.99$ .
- b) Linealidad del método. Para evaluar la linealidad del método se preparó una serie de soluciones estándar mediante la adición de diferentes concentraciones del compuesto a evaluar en 1 mL de la matriz de trabajo. Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se analizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y se calcularon los parámetros estadísticos b, m, r y  $r^2$ .

#### 3.4.5 Exactitud

La exactitud del método analítico se determinó utilizando la misma metodología descrita en el inciso 3.4.4 b. Los resultados obtenidos se expresan en términos de porcentaje de la cantidad recuperada (% de recobro). Para que el método analítico sea exacto, el porcentaje de recuperación deberá encontrarse entre 98 y 102% y la Desviación Estándar Relativa (DER) deberá ser menor del 2%.



### 3.4.6 Precisión

- a) Precisión del sistema. Se evaluó a partir del análisis de una solución estándar compuesta por: 2.5 mg del compuesto a evaluar (en 5 mL de agua). Se trabajaron seis réplicas independientes y los resultados se expresan en términos de DER. La DER deberá ser menor del 2% para considerar que el método es preciso.
- b) Precisión del método (evaluada como repetibilidad). La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describió anteriormente (ver inciso 3.4.6 a).
- c) Precisión del método (evaluada como reproducibilidad). La reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución estándar que contiene 6.024  $\mu\text{g}$  del compuesto a evaluar. El análisis se realizó en dos diferentes días y por dos diferentes analistas. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante la prueba estadística ANDEVA.

### 3.5 Análisis por Cromatografía en Capa Fina

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina se emplearon placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 G<sub>254</sub> Merck). El proceso de elución se llevó a cabo con *n*-propanol:acetato de etilo:agua 83:11:6; como agente cromógeno se utilizó una solución de anisaldehído en ácido sulfúrico; para el desarrollo de color fue necesario calentar por dos minutos a 100°C aproximadamente. Antes de revelar con el reactivo anterior, se procedió a visualizar la placa con luz UV (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm).

La muestra se preparó de la siguiente forma: 5 g del material vegetal finamente dividido, se extrajeron con 50 mL de una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1:1) por 24 horas. Al término de la extracción, la solución resultante se filtró y se concentró a presión reducida. El extracto resultante se reconstituyó en exactamente 15 mL de la mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (1:1). La aplicación de la

muestra (20  $\mu$ L) se realizó con una micropipeta en forma de banda. Como estándares se utilizaron: glucosa y xilosa.

### 3.6 Determinación del contenido de fenoles totales

Preparación de la muestra: 1.5 g de la droga cruda se extrajeron con 100 mL de agua hirviendo durante 30 minutos. La solución resultante se filtró rápidamente con ayuda de un embudo y el recipiente se enjuagó con 30 mL adicionales de agua caliente; la solución se vertió en el embudo y se reunió con la solución anterior. El filtrado anterior se llevó a un volumen de 250 mL con agua destilada.

Procedimiento: A 100  $\mu$ L de la solución a analizar, se adicionaron 3.4 mL de agua; 500  $\mu$ L de etanol y 250  $\mu$ L de reactivo de Folin (50%). Después de dos horas de reposo en la oscuridad se cuantificó el contenido de fenoles totales midiendo la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro marca Beckman Du Modelo 600.

Los resultados se expresan como equivalentes de fenol a partir de una curva estándar preparada bajo las mismas condiciones de análisis con ácido gálico o 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**).

Curva de calibración: La linealidad del método se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs densidad óptica) de acuerdo al siguiente procedimiento: 500 mg de ácido gálico o 251 mg del compuesto (**20**), se disolvieron en 100 mL de agua. A partir de la solución anterior se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL contenga entre 5 y 500  $\mu$ g/mL. Posteriormente, se cuantificó el contenido de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico o de 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina. De acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Para el cálculo de la ordenada al origen (b), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), se utilizó un análisis de regresión lineal simple.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Desarrollo y optimización del método analítico

Como se indicó anteriormente, el estudio fitoquímico biodirigido de la especie *H. latiflora* permitió establecer que el producto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**) es uno de los responsables de las propiedades antidiabéticas atribuidas a *H. latiflora*. Con base en estas consideraciones, y con la finalidad de establecer un método para la valoración de los principios activos presentes en la infusión de *H. latiflora*, se diseñó un procedimiento analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución conducente a la cuantificación del contenido del compuesto (**20**). Las condiciones analíticas se desarrollaron de manera empírica realizando pruebas en diferentes columnas tanto, de fase normal como de fase reversa y utilizando para ello diferentes sistemas de elución.

La concentración de la infusión se ajustó experimentalmente hasta obtener una respuesta en el detector de 1.5 unidades de absorbancia. La señal correspondiente al compuesto (**20**) se identificó por coelución de una muestra estándar junto con la infusión recién preparada. El método analítico seleccionado fue aquel que presentó una separación óptima del compuesto, es decir, una resolución mayor a 2.0 y un tiempo de análisis total de 25 minutos. Una vez establecidas las condiciones óptimas de separación, se decidió evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica (área bajo la curva) realizando para ello, una serie de experimentos modificando la temperatura de la columna analítica. Las temperaturas evaluadas fueron 20, 25 y 30°C. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

Ha (hipótesis alterna): la temperatura no afecta la respuesta analítica.

Ho (hipótesis nula): la temperatura afecta la respuesta analítica.

Los resultados obtenidos y cálculos realizados se resumen en los Cuadros 4 y 5. Como se desprende de estos resultados, el valor del estadístico F calculado (368.80) supera su valor crítico [F 0.05 (1,34) = 4.13], por lo tanto,

se rechaza la hipótesis nula y se concluye que la temperatura no afecta la respuesta analítica en los diferentes niveles de temperatura evaluados.

**Cuadro 4.** Resultados experimentales para evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.

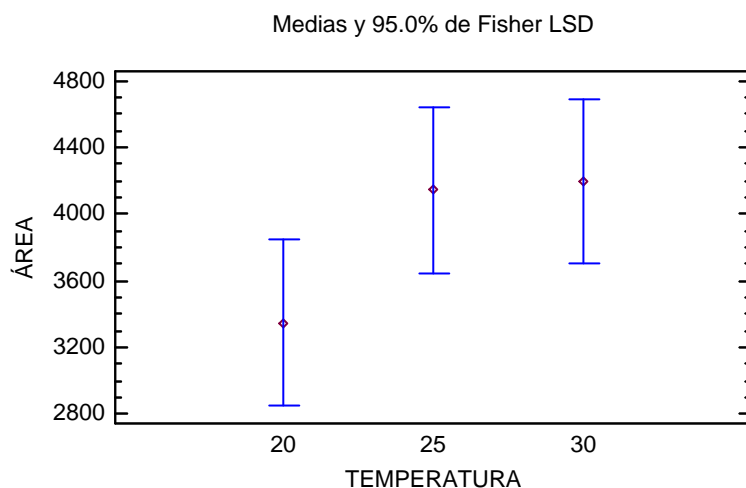
TEMPERATURA (°C)	ÁREA
20	4185.68506
20	4288.23633
20	2134.90674
20	1084.7522
20	4174.75684
20	4225.38623
25	4178.6982
25	4270.68652
25	3925.43262
25	4086.83252
25	4175.34424
25	4225.18506
30	4172.1084
30	4268.27002
30	4211.12061
30	4095.69824
30	4190.17578
30	4248.55078

**Cuadro 5.** Resumen del análisis de varianza para evaluar el efecto de la temperatura sobre la respuesta analítica.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	134915296	1	134915296	368.8095014	7.9341E-20	4.1300177
Dentro de los grupos	12437640.7	34	365812.962			
Total	147352937	35				

Con la finalidad de corroborar esta conclusión, se construyó la gráfica de intervalos de confianza (Figura 4) en la cual se puede observar que a las diferentes temperaturas, la respuesta obtenida es semejante dentro de un

intervalo, es decir, las graficas entre sí, coinciden en algunos de los puntos. Esto nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias (de las temperaturas estudiadas: 20, 25 y 30 °C), con un 95.0% de confianza.



**Figura 4.** Intervalos de confianza para evaluar el efecto de la temperatura

#### 4.2 Validación del método analítico

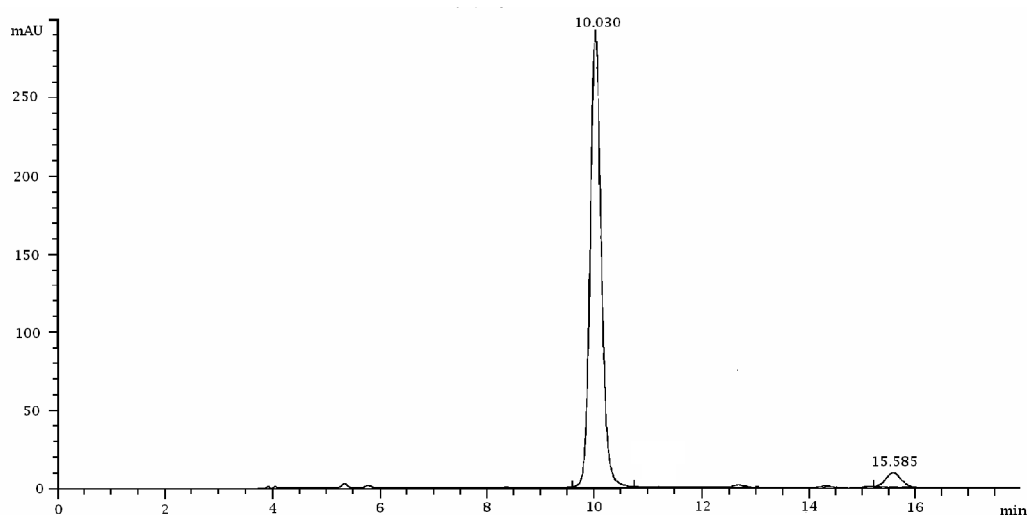
Parte integral en el desarrollo de cualquier método analítico y en particular el conducente a cuantificar ingredientes activos es la validación de éste. La validación de un método analítico puede definirse como el proceso mediante el cual queda establecido, por estudios experimentales, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende.

Las características o parámetros de calidad que integran un método analítico validado han recibido una atención considerada por parte de las agencias regulatorias. De tal manera que en 1997, la agencia oficial Food and Drug Administration (FDA) publicó una guía para la validación de métodos analíticos bajo el título de "Validation of Analytical Procedures: Methodology" (ICH, FDA, 1997). En general, el documento presenta una amplia discusión con relación a las características o parámetros de calidad que deben considerarse durante la validación de procedimientos analíticos.

Dentro de este panorama, las características de calidad que se evaluaron para validar el método analítico propuesto comprenden: adecuabilidad, especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación. A continuación se resumen los resultados obtenidos para cada característica de calidad evaluada.

#### 4.2.1 Adecuabilidad del sistema.

La adecuabilidad del sistema es la verificación de que dicho sistema funciona con base en los criterios preestablecidos, de tal manera que los resultados obtenidos son confiables. Este parámetro de calidad se determinó mediante la inyección directa de una solución estándar en el cromatógrafo de líquidos a 25°C, de acuerdo con el protocolo experimental. Los resultados obtenidos mediante estos experimentos permitieron estimar los siguientes parámetros: factor de capacidad ( $K'$ ) = 1.7, resolución ( $R_s$ ) = 2.6, simetría ( $S$ ) = 0.848 (Cuadro 6). A manera de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos se ilustra en la Figura 5.



**Figura 5.** Cromatograma del compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**).

El factor de capacidad ( $K'$ ) relaciona directamente el equilibrio entre la distribución de la muestra dentro de la columna y las propiedades

termodinámicas de la misma. Para un determinado conjunto de parámetros de operación,  $K'$ , es una medida del tiempo requerido para que una banda de soluto eluya de la columna. Dicho valor se compara con el obtenido cuando el soluto no es retenido ( $K' = 0$ ). El análisis de los datos obtenidos permitió estimar un valor de 1.7 para el factor de capacidad. Aún cuando el valor óptimo de  $K'$  es de 2.0, este parámetro no se logró optimizar debido a la naturaleza de la muestra. A pesar de esto, y con base en los resultados experimentales obtenidos se determinó que la columna analítica utilizada separa de manera adecuada las fases, por lo tanto, el método analítico propuesto es apropiado para cuantificar el contenido del compuesto **(20)** en la infusión.

**Cuadro 6.** Adecuabilidad del sistema para la señal del compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (20).

Inyección	Tr	Área	$K'$	Simetría	N	Resolución	Selectividad
1	10.325	4178.6982	1.76	0.84	11959	2.53	1.15
2	10.046	4270.68652	1.69	0.85	11788	2.58	1.16
3	10.032	4086.83252	1.68	0.85	12000	2.61	1.16
4	10.029	4175.34424	1.68	0.85	11993	2.59	1.16
5	10.03	4225.18506	1.68	0.85	11994	2.61	1.16
<b>PROMEDIO</b>	<b>10.0924</b>	<b>4187.349308</b>	<b>1.7</b>	<b>0.848</b>	<b>11946.8</b>	<b>2.584</b>	<b>1.158</b>
<b>DESV. ESTANDAR</b>	0.1302	68.3725512	0.0349285	0.00447214	90.220286	0.03286335	0.00447214
<b>C.V. %</b>	1.2	1.6	2.0	0.5273	0.755	1.27	0.386

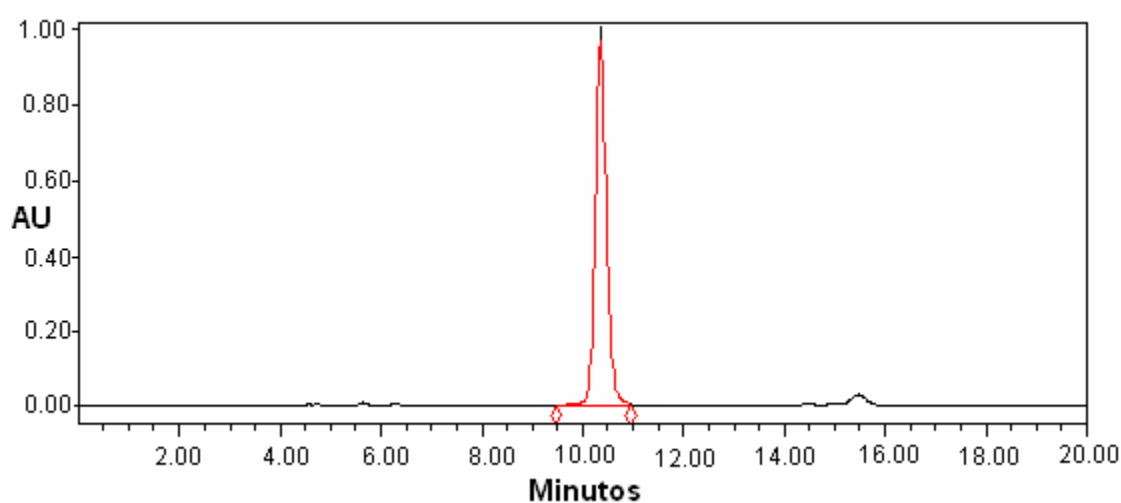
Criterio de aceptación: C.V. < 2.0 %; Factor de capacidad ( $K'$ ) > 2.0; Resolución ( $R_s$ ) > 2.0; Tiempo de retención (Tr): aproximadamente constante; Número de platos teóricos (N): determinados de acuerdo a las condiciones de la columna.

#### 4.2.2 Especificidad del método analítico

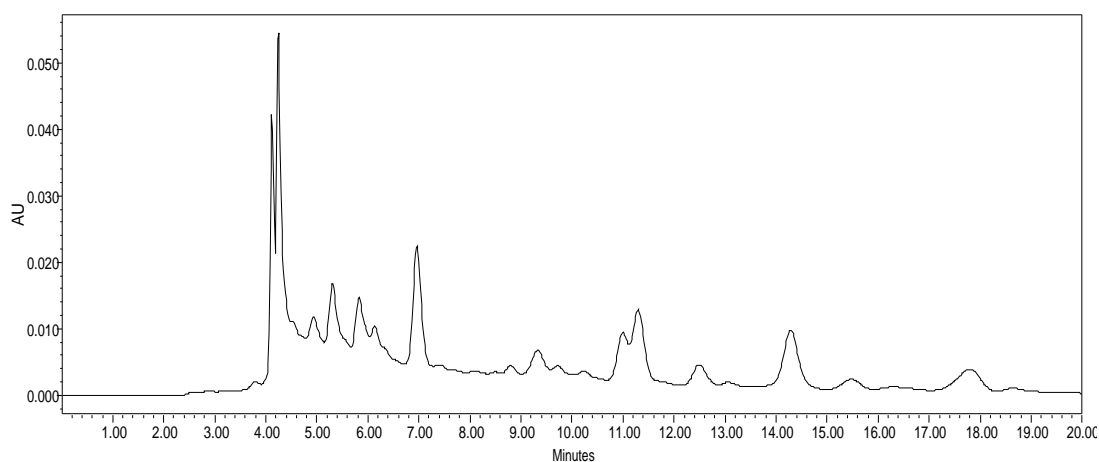
La especificidad de un método analítico se define como su capacidad para medir con exactitud y de manera inequívoca un analito en presencia de interferencias como excipientes, enantiómeros y productos de degradación, entre otros. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios que pueden ser: extracciones orgánicas, derivatizaciones, y separaciones por cromatografía en columna o en capa fina, entre otras. La especificidad del método propuesto se demostró mediante la evaluación del efecto de diferentes

factores sobre la muestra como la temperatura, el grado de acidez y basicidad. Los cromatogramas resultantes al inicio y al término de los experimentos se ilustran en las Figuras 6-9.

Como se observa en la Figura 7 la muestra es susceptible a cambios bajo las condiciones de temperatura evaluadas (40°C / 4 semanas). De lo anterior se desprende que la infusión por analizar no puede ser almacenada a temperaturas mayores o iguales a 40°C y durante periodos mayores de una semana, ya que, bajo estas condiciones los componentes de la muestra sufren alteraciones tales que, evitan la posibilidad de cuantificar el analito de interés.

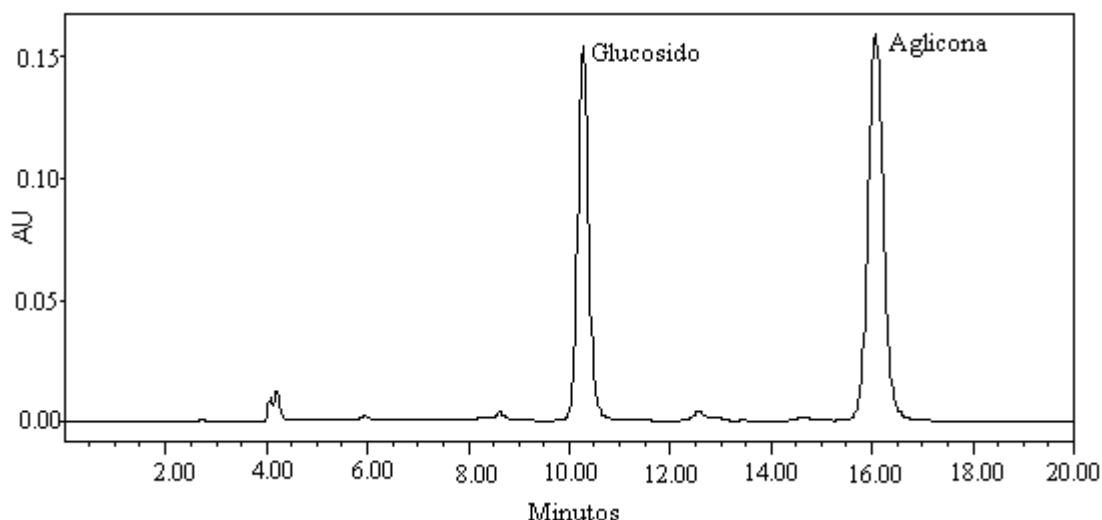


**Figura 6.** Cromatograma en condiciones normales.

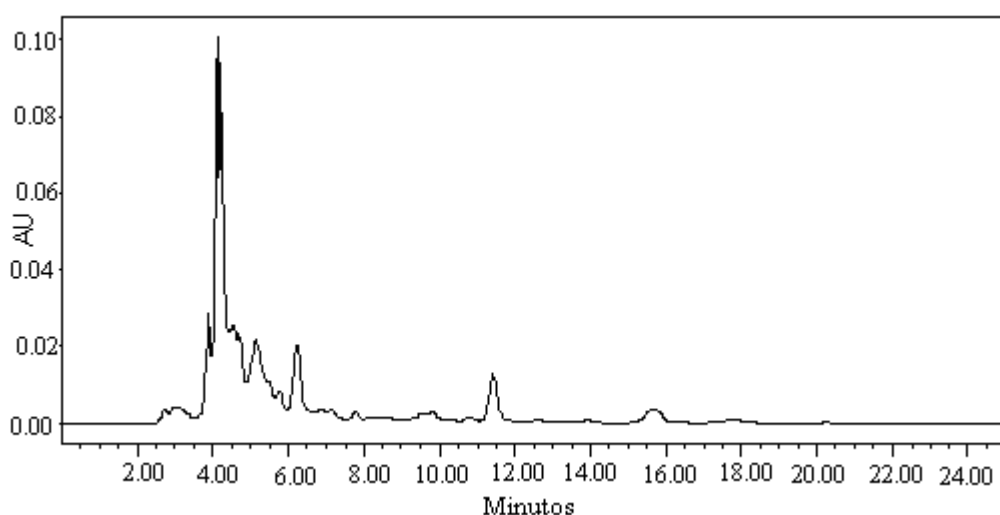


**Figura 7.** Cromatograma después del tratamiento térmico.





**Figura 8.** Cromatograma después de la hidrólisis ácida.



**Figura 9.** Cromatograma después de la hidrólisis básica.

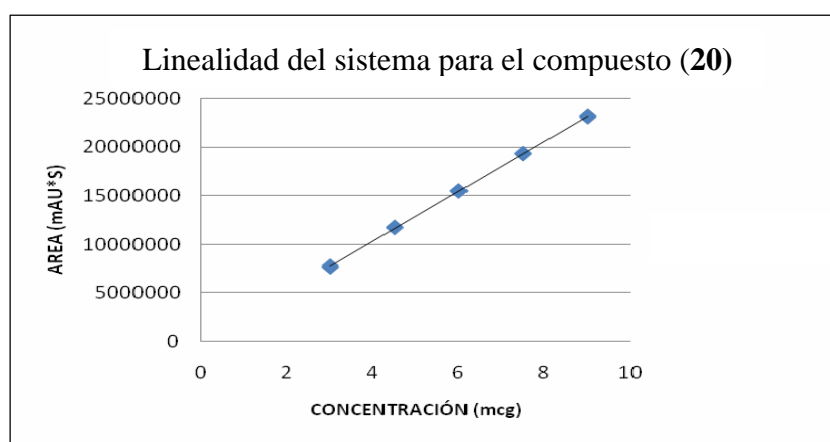
Por otro lado las condiciones ácidas de experimentación (Figura 8) hidrolizan el compuesto de interés en sus partes glicona y aglicona. El análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de los productos de la hidrólisis permitieron la detección de los compuestos presentes en la molécula: la glucosa y la aglicona ( $R_f$  de 0.7 y 0.82). Finalmente, la hidrólisis básica de la muestra provoca que exista un ataque en el carbono 4 del anillo de la  $\alpha$ -pirona provocando la apertura de la misma. Las pironas no resisten el ataque de los álcalis; en las reacciones de este tipo, los iones hidróxilo transforman las cromonas en compuestos  $\beta$ -dicarbonílicos y las cumarinas reversiblemente en sales de ácidos cumarínicos, provocando la degradación del compuesto **(20)** (Figura 9).

En síntesis, el efecto de la temperatura, la acidez y la basicidad fue evaluado mediante el cálculo del por ciento de degradación de la muestra. Así, la temperatura ocasionó un 100% de degradación y las condiciones de hidrólisis ácida y básica provocaron un 78.14 y 94.6% de degradación, respectivamente. Estos resultados indican que los tiempos de retención de los productos de degradación no interfieren con la señal del metabolito de interés. Con base en estos resultados es posible concluir que la respuesta obtenida en la matriz de trabajo se debe exclusivamente a la presencia del compuesto **(20)**. Por lo tanto el método analítico propuesto es específico.

### 4.2.3 Linealidad

#### 4.2.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad de un método analítico es su capacidad de obtener resultados que sean directamente proporcionales a las concentraciones de analitos en las muestras dentro de un determinado rango. La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con diferentes niveles de concentración. El rango de trabajo comprende del 50 al 150% de la concentración encontrada como 100%, mediante la realización de ensayos preliminares a la muestra de material vegetal objeto de estudio. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 7 y en la Figura 10.



**Figura 10.** Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables.

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal (Cuadro 8). Para el cálculo de los coeficientes de regresión se utilizó el programa de análisis estadístico Statgraphics Centurión XV. Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar la siguiente ecuación:

$$\text{Área bajo la curva} = 127152 + 50888.2 \cdot \text{Concentración}$$

**Cuadro 7.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del sistema.

Nivel de concentración	Replica	Concentración (µg/mL)	Respuesta Área bajo la curva	Factor de espuesta Área/Concentración
50%	1	150.6	7607799	50516.5936
50%	1	150.6	7668210	50917.7291
50%	1	150.6	7833565	52015.7039
75%	2	225.9	11679314	51701.2572
75%	2	225.9	11733854	51942.6915
75%	2	225.9	11784016	52164.7455
100%	3	301.2	15494948	51444.0505
100%	3	301.2	15490972	51430.8499
100%	3	301.2	15416128	51182.3639
125%	4	376.5	19346223	51384.3904
125%	4	376.5	19256390	51145.7902
125%	4	376.5	19247589	51122.4143
150%	5	451.8	23082889	51090.9451
150%	5	451.8	23000895	50909.4622
150%	5	451.8	23177543	51300.4493
<b>PROMEDIO</b>			51351.2958	
<b>DESV. ESTANDAR</b>			452.361871	
<b>C.V. %</b>			0.88	

**Cuadro 8.** Resumen de la regresión lineal.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	127152.	74703.9	1.70209	0.1125
Pendiente	50888.2	233.836	217.623	0.0000

Para evaluar si la ecuación de regresión describe adecuadamente la relación entre las dos variables y si puede utilizarse convenientemente con fines de predicción y estimación, se realizó en primer lugar un análisis de varianza, con la finalidad de probar la hipótesis nula ( $H_0$ ), es decir, que el modelo propuesto no describe la relación lineal entre las variables, contra la hipótesis alterna ( $H_a$ ), que el modelo propuesto describe dicha relación. Los cálculos realizados se resumen en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** Análisis de Varianza para el modelo de regresión lineal.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Valor-P
Modelo	4.405E14	1	4.405E14	47359.94	0.0000
Residuo	1.20914E11	13	9.30111E9		
Total	4.40621E14	14			

Como se desprende de los resultados indicados en el Cuadro 9, el valor del estadístico F calculado (47359.9) supera su valor crítico [ $F_{0.05}(1,13) = 4.67$ ], por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se concluye que la variación en la respuesta, se encuentra explicada por el modelo propuesto, es decir, el modelo estadístico es adecuado.

Posteriormente, se realizaron las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión. Estas pruebas de hipótesis demostraron que la pendiente de la recta de regresión es diferente de cero y la ordenada al origen tiene un valor de 127152.

Finalmente, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) calculado es igual a 0.999863, lo cual indica que aproximadamente el 99.9% de la variación total de

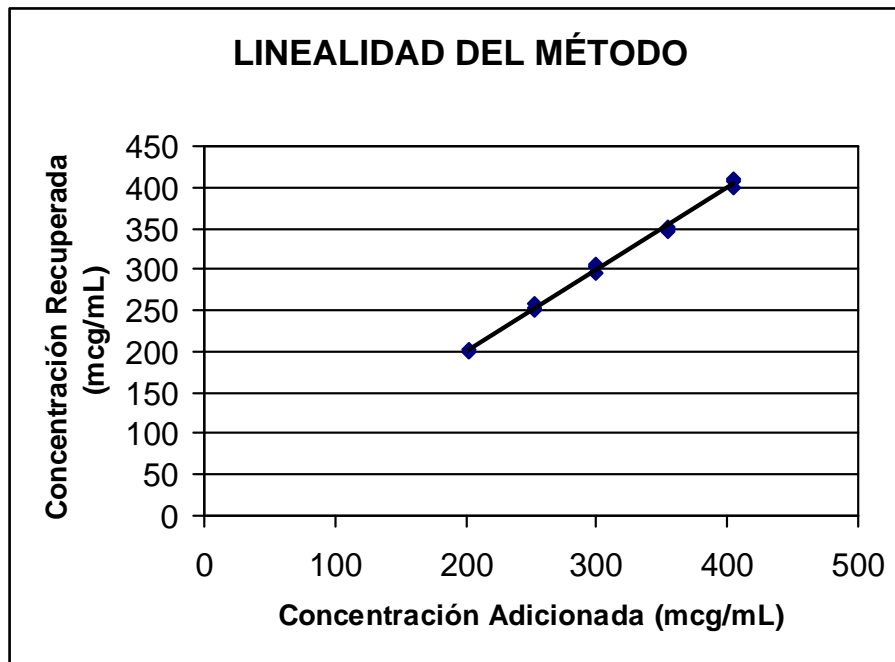
las variables se encuentra explicada por un modelo de regresión lineal. Con base en las evidencias presentadas anteriormente, se establece que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

#### 4.2.3.2 Linealidad del método

La linealidad del método se determinó preparando una serie de muestras que contenían cinco diferentes concentraciones del compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**) en la matriz de trabajo (202-404  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 10 y en Figura 11.

**Cuadro 10.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Area bajo la curva	Concentración recuperada	% Recobro
202	16723011	199.5271997	98.7758414
202	16785920	200.887952	99.4494812
202	16826171	201.7586008	99.8804954
253	19065671	250.2000776	98.8933113
253	19482308	259.2121391	102.455391
253	19188605	252.859200	99.9443478
300	21633410	305.7415241	101.913841
300	21561686	304.190099	101.396700
300	21521036	303.3108197	101.103607
300	21585541	304.7060943	101.568698
300	21200875	296.3855812	98.7951937
300	21212626	296.6397611	98.8799204
354	23651414	349.3919345	98.6982866
354	23697684	350.3927772	98.9810105
354	23446890	344.9679807	97.4485821
404	26348944	407.7408236	100.925946
404	26485322	410.6907463	101.656125
404	26009417	400.3966891	99.1080914
<b>PROMEDIO</b>			<b>99.9930483</b>
<b>DESV ESTANDAR</b>			<b>1.42887172</b>
<b>CV</b>			<b>1.42897105</b>



**Figura 11.** Relación lineal entre la variable X (concentración adicionada) y la variable Y (área bajo la curva)

De nueva cuenta, el ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal. Los coeficientes de regresión calculados mediante dicho análisis permitieron estimar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración recuperada} = 1.69735\text{E-}8 + 1 \cdot \text{Concentración mcg por mL}$$

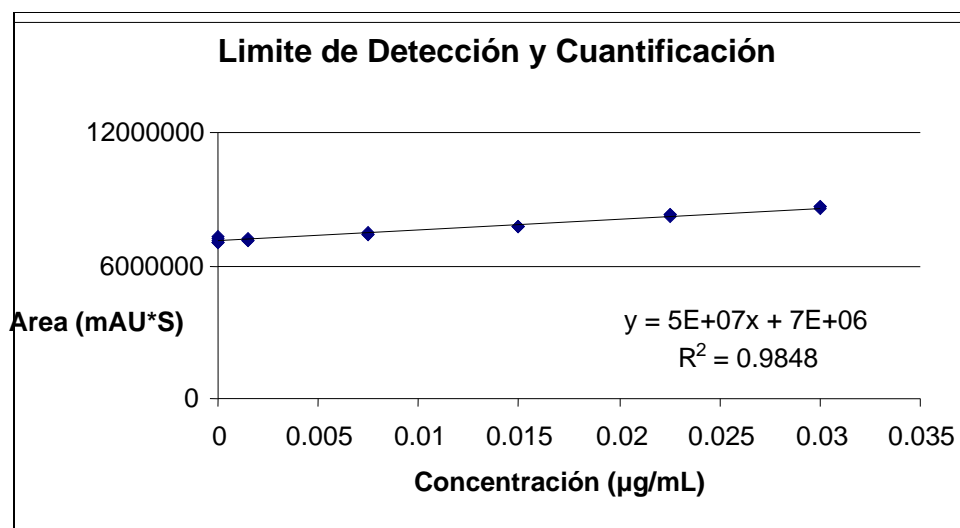
Con base en estas evidencias, se establece que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentración establecida.

#### **4.2.4. Limite de detección y limite de cuantificación.**

El límite de detección de un método analítico es la concentración mínima de un analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación se define como la mínima concentración del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud. Los límites de detección y cuantificación se determinaron, construyendo una curva de calibración con cinco niveles de concentración (0-0.03  $\mu\text{g/mL}$ ). Estos se determinaron mediante el uso de las siguientes ecuaciones:

$$LC = \frac{10 \times Sb}{b1} \qquad LD = \frac{3.3 \times Sb}{b1}$$

Los datos para calcular los límites LD y LC se muestran en el Cuadro 11 y en la Figura 12. El análisis estadístico de los datos permitió estimar los valores de 0.100201258 y 0.303640175  $\mu\text{g/mL}$ , para los límites de detección y cuantificación, respectivamente.



**Figura 12.** Gráfica de linealidad para la determinación del LD y LC

**Cuadro 11.** Límite de Detección y de Cuantificación

MUESTRA	Concentración( $\mu\text{g/mL}$ )	Area bajo la curva
1	0	7284724
1	0	7194427
1	0	7074835
1	0	7063504
1	0	7158225
2	0.0015	7202929
2	0.0015	7150414
2	0.0015	7162814
3	0.0075	7459796
3	0.0075	7441413
3	0.0075	7419136
4	0.015	7768228
4	0.015	7771274
4	0.015	7761504
5	0.0225	8257723
5	0.0225	8310969
5	0.0225	8241414
6	0.03	8639074
6	0.03	8548214
6	0.03	8674875

#### 4.2.5 Exactitud

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés. Los resultados de este parámetro de calidad del método, se resumen en el Cuadro 12. De estas evaluaciones se infiere que el método analítico es exacto ya que, el porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo 98-102% y el CV es de 1.3%.

**Cuadro 12.** Datos experimentales para determinar la exactitud del método

REPLICA	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}$ )	% de Recobro
1	6.07075235	101.1792058
2	6.040047078	100.6674513
3	6.022644685	100.3774114
4	6.050259479	100.837658
5	5.885582746	98.09304576
6	5.890613386	98.17688977
<b>PROMEDIO</b>		99.8886103
<b>DESV ESTANDAR</b>		1.38317658
<b>CV%</b>		1.38471902

#### 4.2.6 Precisión del método y del sistema

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación. Para evaluar esta característica de calidad se realizaron diferentes experimentos conducentes a determinar la precisión del sistema (repetibilidad), del método e intermedia (reproducibilidad). Los



resultados de estas determinaciones se resumen en los Cuadros 13 y 14 respectivamente.

**Cuadro 13.** Datos experimentales para evaluar la precisión del método.

No. de muestra	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g}$ )	Area bajo la Curva	Concentración real ( $\mu\text{g}$ )	% Cantidad recuperada
1	4	16723011	3.968594975	99.21487438
1	4	16785920	3.995526518	99.88816294
1	4	16826171	4.012758098	100.3189525
2	5	19065671	4.971495146	99.42990292
2	5	19482308	5.149858766	102.9971753
2	5	19188605	5.024123581	100.4824716
3	6	21633410	6.070752350	101.1792058
3	6	21561686	6.040047078	100.6674513
3	6	21521036	6.022644685	100.3774114
4	6	21585541	6.050259479	100.8376580
4	6	21200875	5.885582746	98.09304576
4	6	21212626	5.890613386	98.17688977
5	7	23651414	6.934666258	99.06666083
5	7	23697684	6.954474592	99.34963703
5	7	23446890	6.847108886	97.81584122
6	8	26348944	8.089487401	101.1185925
6	8	26485322	8.147871255	101.8483907
6	8	26009417	7.944134816	99.3016852
<b>PROMEDIO</b>			100.0091116	
<b>DESVIACION ESTANDAR</b>			1.353219109	
<b>CV</b>			1.35309582	

**Cuadro 14.** Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema (repetibilidad).

MUESTRA Estándar 6.024mcg	AREA BAJO LA CURVA
1	15300422
2	15498411
3	15628607
4	15536672
5	15527917
6	15588926
<b>PROMEDIO</b>	15513492.5
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>	114292.0873
<b>CV</b>	0.736726996

Criterio de aceptación  $CV \leq 1.5$

De acuerdo con los resultados indicados en el cuadro 15 el método analítico es preciso ( $CV \geq 2.0$ ). Por lo tanto, se concluye, que el método analítico es reproducible por los analistas en diferentes días.

**Cuadro 15.** Datos experimentales para evaluar la precisión intermedia (reproducibilidad).

		ANALISTA				
		1	2			
DIA	1	14123256	13609782	PROMEDIO	13820351.33	
		13893324	13805806	DESV	214133.226	
		13940256	13549684	CV	1.549405083	
	2	13967769	13926020	PROMEDIO	13693416.33	
		13640446	13661415	DESV	224185.5172	
		13361891	13602957	CV	1.637177398	
	PROMEDIO		13756883.83			
	DESV EST		219275.3366			
	CV		1.593931731			

### 4.3 Determinación del contenido de fenoles totales

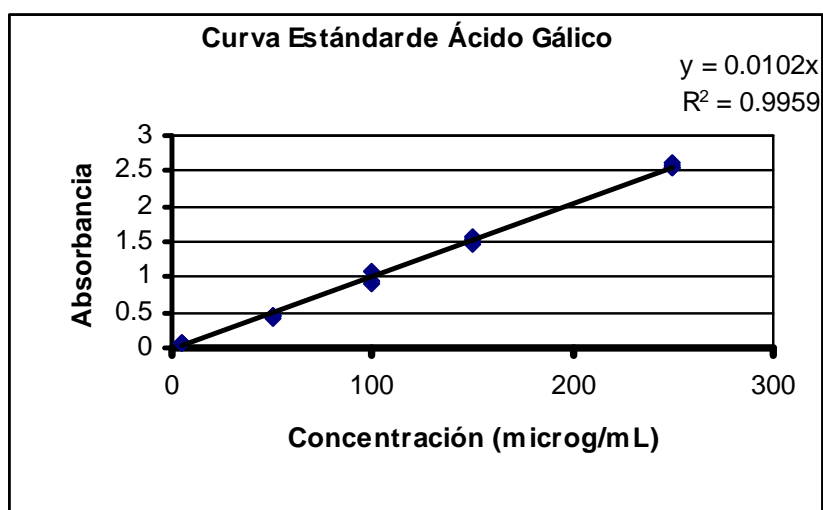
El método tiene como fundamento una reacción de óxido-reducción, en la cual tiene lugar de manera simultánea la oxidación de los iones fenolato y la reducción del complejo fosmolíbido-fosfotúngstico, en condiciones alcalinas.

Con la finalidad de poder expresar en términos de fenoles totales el contenido de 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**) en la infusión de trabajo se construyó una curva de calibración utilizando como estándar ácido gálico (Figura 13) y el compuesto (**20**) (Figura 14) y el La linealidad de este método se evaluó utilizando una serie de diluciones que contenían una concentración que comprendía el rango de 5-250  $\mu\text{g/mL}$  de ácido gálico o del compuesto (**20**). Después de llevar a cabo la reacción de Folin, se determinó la absorbancia. Los resultados obtenidos para esta característica de calidad evaluada se incluyen en el Cuadro 16. Una vez demostrada la linealidad del método analítico, se procedió a cuantificar el contenido de fenoles totales en las muestras de prueba. Los

resultados de estas determinaciones indicaron que las muestras contienen 63.75  $\mu\text{g}$  de fenoles totales utilizando la curva del ácido gálico y 175  $\mu\text{g}$  de fenoles totales utilizando la curva del compuesto **(20)**.

**Cuadro 16.** Resultados experimentales para determinar el contenido de fenoles totales. Utilizando ácido gálico

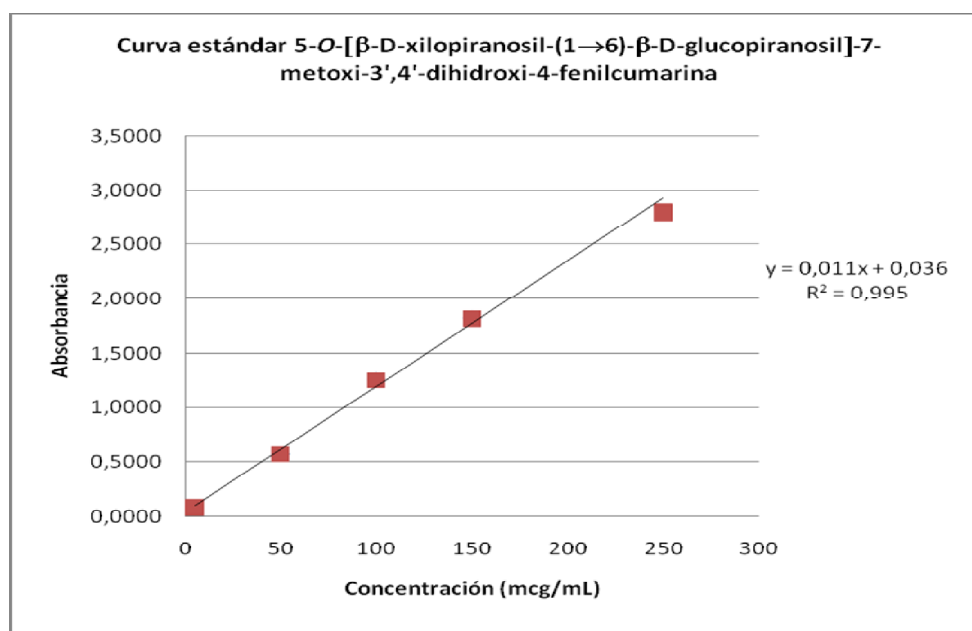
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
5	0.0664
5	0.0528
5	0.0567
5	0.0634
50	0.4312
50	0.4446
50	0.4389
50	0.4413
100	0.9087
100	0.9446
100	0.9404
100	1.0878
150	1.5582
150	1.5111
150	1.5515
150	1.4486
250	2.5941
250	2.5527
250	2.5312
250	2.6161



**Figura 13.** Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando ácido gálico.

**Cuadro 17.** Resultados experimentales para determinar el contenido de fenoles totales. Utilizando el compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**)

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia
5	0,0705
5	0,0711
5	0,0790
50	0,5715
50	0,5690
50	0,5710
100	1,2569
100	1,2513
100	1,2570
150	1,8216
150	1,8112
150	1,8220
250	2,7994
250	2,8100
250	2,7901



**Figura 14.** Gráfica de linealidad en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**20**).

## CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado para valorar el contenido de 5-O-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en la infusión de *Hintonia latiflora* es específico, exacto, lineal y preciso.

El método analítico implementado en el presente trabajo de investigación será de utilidad para determinar el contenido del principio activo tanto en la infusión como en productos herbolarios elaborados con la planta. Asimismo, este método podría ser incorporado en la monografía de tipo farmacopeico de la especie *H. latiflora*.

## DEFINICIONES

5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcu- marina (1). Compuesto utilizado para el desarrollo y la validación del método analítico.

**Adecuabilidad del sistema.** Es la verificación de que un sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a los criterios preestablecidos, de tal manera que, permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

**Analito.** Es un componente específico en una muestra que se cuantifica durante un análisis.

**Documentación.** Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.

**Especificidad.** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a los otros componentes de la muestra.

**Exactitud.** Concordancia entre el valor de referencia y el valor obtenido utilizando un método analítico.

**Estabilidad analítica de la muestra.** Es la propiedad de una muestra, que fue preparada para su cuantificación de conservar la concentración del analito y su integridad fisicoquímica después de haber sido almacenada durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

**Intervalo del método analítico.** Es la amplitud entre la concentración superior e inferior del analito, en el cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad de acuerdo con el método analítico propuesto.

**Limite de cuantificación.** Es la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud bajo las condiciones de análisis establecidas.

**Linealidad.** Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática definida, a la concentración del analito en una muestra y en un intervalo dado.

**Método analítico.** Es una descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.

**Muestra adicionada.** Es una porción representativa del material a evaluar, a la cual se adicionan cantidades conocidas del analito de interés.

**Precisión.** Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas analíticas individuales, cuando se aplica el procedimiento repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

**Precisión intermedia.** Es la precisión del método analítico, expresada como la concordancia entre las diferentes determinaciones realizadas de manera independiente en un mismo laboratorio por diferentes analistas y en distintos días.

**Protocolo de validación.** Es una descripción de las pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de forma consistente.

**Recobro.** Es la cantidad del analito adicionado que se determina en una muestra placebo empleando el método analítico.

**Repetibilidad.** Es el grado de concordancia entre las determinaciones analíticas independientes realizadas durante un periodo de tiempo corto por un solo analista usando el mismo equipo.

**Reproducibilidad.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre las determinaciones analíticas independientes efectuadas por diferentes laboratorios.

**Robustez.** Es una medida de la capacidad del método analítico para mantener su desempeño cuando se presentan variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método.

**Sustancia de referencia.** Es una sustancia útil para comprobaciones analíticas de tipo físico, químico o microbiológico. Durante el transcurso del análisis sus propiedades son comparadas con la sustancia a evaluar.

**Sustancia de referencia primaria.** Es una sustancia que posee una elevada calidad metrológica y cuyas propiedades se aceptan sin hacer referencia a otras sustancias.

**Sustancia de referencia secundaria.** Es una sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando se certifica mediante un procedimiento científicamente reconocido.

**Tolerancia.** Es la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones de operación (equipos y columnas). La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes ya que, el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que el segundo se refiere a los factores externos al método analítico.

**Validación de método analítico.** Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

---

**Referencias**

1. American Diabetes Association (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-97.
2. Agrotte-Ramos, R., Ramírez-Avila, G., Rodríguez-Gutierrez, M., Muñoz, M., Lanz, H., Rodríguez, M., Gonzáles, M. y Alvarez, L., (2006). Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *J. Nat. Prod.* **69**, 1442-1444.
3. Aquino, R., D' Agostino, M., De Simone, Francesco., y Pizza, C. (1988). 4-aryl coumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry.* **27**, 1827-1830.
4. Argueta, A., Gallardo, V., (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *Instituto Nacional Indigenista*.
5. Bone, K. (2001). Standardized extracts: Neither: Neither poison nor panacea. *HerbalGram*, **53**, 50-55.
6. Campos, R., Torres, D., Afganis, E., y Sabido, C., (2001). Autoterapias complementarias de adultos mayores con enfermedades crónicas degenerativas. *Revista Medica IMSS.* **39**, 15-19.
7. Camacho, M. R. (1990). Nuevos metabolitos secundarios de la *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex D.C.) y aislamiento de compuestos bioactivos del *Teloxys graveolens* (Wild) W. A. Weber. Tesis de maestría (Facultad de Química-Farmacéutica), Facultad de Química, U.N.A.M. México, D.F.
8. Déciga, M., Guerrero, J., Quijano, L., Mata, R. (2006). Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23, 24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* **83**, 342-348.
9. Déciga, M., Rivero, I., Arriaga, M., Castañeda, G., Angeles, G., Navarrete and Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* **110**, 334-342.
10. Déciga, M., Rivero, I., Arriaga, M., Castañeda, G., Angeles, G., Navarrete, A. and Mata, R. (2006). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* **92**, 1-9.
11. Delle Monache, G., Botta, B., Alves de Lima, R., y Serafim, N. A. (1983). 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry.* **22**, 1657-1658.



- 
12. Delle Monache, G., Botta, B., y Alves de Lima, R., (1984). 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **23**, 1813.
  13. Delle Monache, G., Botta, B., Delle Monache, F., y Botta, M., (1985). Synthesis of 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **24**, 1355-1357.
  14. Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 29). Versión en español (2006).
  15. FHEUM (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos). (2001). Secretaria de Salud. 1ª Edición. México, D.F.
  16. Flaster, T. y Lassiter, J. (2004). Quality control herbal preparations: using botanical references standards for proper identification. *HerbalGram*, **63**, 32-37.
  17. Gacía, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara A., Charvél, A., Mota, R. y Garzón A. (2002). Métodos analíticos. *Guía de Validación*. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.
  18. Guerrero, J., Hersch, P., Pedraza, J., Navarrete, A., Mata, R. (2005). Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Medica*. **71**, 1099-1105.
  19. Guerrero, J., Medina, O., Brindis, F., Bye, R., Predraza, J., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*, **68**, 2087-2095.
  20. Harmonized Tripartite Guideli. ICH Q2V, Text on Validation on Analytical Procedures: Methodology, 1997.
  21. Hers, P (1996). En destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.
  22. Katzung, Bertram G. (2004). Farmacología Básica y Clínica 9ª edición. Editorial El Manual Moderno, México, 691-700.
  23. Liang, Y., Xie, P. y Chang, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography*. **15**, 812, 53-70.
  24. Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Lung, C. y Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, **3**, 1-16.
-

- 
25. Lozoya, X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: La investigación Científica de la Herbolaria medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaria de Salud, México, 255-270.
26. Martínez, M. (1989). Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. 6ª. Ed.
27. Mata, R., Calzada, F., y García, M. (1988). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, IV Additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **50**, 851-856.
28. Mata, R., Albort, C., Pereda, R. y McLaughlin, J. (1989) Cytotoxic Constituents of *Exostema mexicanum*. *Phytochemical Notes*, 241.
29. Mata, R., Camacho, M., Cercera, E., Bye, Robert. and Linares, E. (1989). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*, **26** (6), 2037-2040.
30. Mata, R., Camacho, M., Mendoza, S. and Cruz, M. (1992). A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **31**(9), 3199-3201.
31. Mata, R., Calzada, F., García, M. y Reguero, M. (1987). Chemical studies on mexican plants used in tradicional medicine, III: new 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*, **50** (5), 866-871.
32. Mata, R., Albor C., Pereda-Miranda, R., y Mc Laughlin, L., (1990a). Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*. **56**, 241.
33. Mata, R., Camacho, M., Cervera, E., Bye, R., y Linares, E. (1990b). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-2040.
34. Mitscher, L.A., Pillai, S. y Shankel, D. (2000). Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. *Journal of Food and Drug Analysis*, **8**, 229-234.
35. Nora, E. (2005). La autoatención en un grupo de ancianos con diabetes residentes en Iztapalapa D.F. *Redalyc, Cuicuilco*, **12** (33), 11-25.
36. Noster, S. y Kraus, L. (1993) In Vitro Antimalarial Activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* Extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*, **56**, 63-65.
37. Organización Panamericana de la salud.
-

- 
38. Organización Mundial de la Salud (2000). Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
39. Organización Mundial de la Salud (2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
40. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. PROY-NOM-059-SSA1-2004, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
41. Reglamento de Insumos para la Salud (RIS).
42. Reif, K., Sievers, H. y Stetlen, J. P. (2004). The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials a European perspective, *HerbalGram*, **63**, 38-43.
43. Rojas, A., Hernández, L., Rereda, R. and Mata, R. (1992). Screening from antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 275-283.
44. Reguero, M., Bye, R., Linares, E. y Delgado, G. (1987). Chemical studies on Mexican Plants used in traditional medicine, II: cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*, **50** (2), 315-316.
45. Reher, G., Kraus, L. (1984). New Neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. *Journal of Natural Products*, **47**, 172-174.
46. Romero, G., Cromatografía, curso de métodos (2002). Instituto de Biotecnología, UNAM.
47. Rubinson, J., Rubinson, K. (2000). Química Analítica Contemporánea. 1ª edición. Editorial Prentice Hall, México, p.p. 404-434.
48. Sharpless, K.E., Sander, L., Wise, NguyenPho, A., Lyon, R., Ziobro, G. y Betz, J. (2004). Development of standard reference materials for the analysis of dietary supplements. *HerbalGram*, **63**, 44-47
49. Sánchez-Viesca, F. (1969). Th estructura of exostemin, a new 4-phenyl coumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry*. **8**, 1821-1823.
50. Saucedo, M., Bañuelos, N., Cabrera, R., Ballesteros, M., (2006). La práctica de la medicina alternativa una realidad en el paciente diabético en hermosillo, son., México. *Respyn*, **7**.
-

51. Skoog, D., West, D. 8ª edición (2004) Fundamentos de Química Analítica, Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. p.p. 663-708.
52. Soto, R., Díaz, C., Yañez, R., Collera, C., García, F. (1988). *Spectroscopy An Internacional Journal*.
53. Vázquez, J., Gómez,H.,Fernández, S., (2006). Encuesta Nacional de Salud 2000. *Revista Médica IMSS*, **44** (1); 13-26.
54. Wagner, H (2005). Natural products chemistry and phytomedicina in the 21<sup>st</sup> century: new development and challenges. *Pure end Applied Chemistry*, **77**, 1-6.
55. World Health Organization. (1999). *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
56. WHO-TRM (World Health Organization-Traditional Medicine). (1999). WHO Monographs on selected medicinal plants. Volume I. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
57. World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and clasification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation. Geneva, Switzerland. 66.
58. [http://www.cofepris.gob.mx/RevistaRED/portada2005oct-nov/num3\\_art\\_4sec7.htm](http://www.cofepris.gob.mx/RevistaRED/portada2005oct-nov/num3_art_4sec7.htm)

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.