



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRUEBAS DE COMPOSICIÓN E IDENTIDAD DE LA DROGA CRUDA
Exostema caribaeum (RUBIACEAE)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. ERIKA VIVANI CASTILLEJOS RAMÍREZ

TUTORA:

DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
FACULTAD DE QUIMICA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal: Dra. Martha Patricia García Camacho
Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis
Vocal: Dr. Martín González Andrade
Secretario: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

Q.F.B. Erika Vivani Castillejos Ramírez
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

Agradecimientos

Al Posgrado de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, que me permitió continuar mi formación académica.

Al financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (99395) y a DGAPA-UNAM (IN-212913).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (Número de becario 257969).

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosos comentarios que enriquecieron y mejoraron el contenido de esta tesis.

Al M. en C. Sol Cristians Niizawa de la Facultad de Ciencias, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en este estudio.

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

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

A la M. en C. Rosa Isela de Villar (USAI; Facultad de Química, UNAM) por la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz, de la facultad de Química, por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, de la Facultad de Química, por su apoyo técnico, su paciencia y dedicación incondicional a este proyecto.

De manera especial a la Dra. Rachel Mata Essayag, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Por su tiempo, presencia incondicional y sus relevantes aportes, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. ANTECEDENTES	5
1.1 <i>Exostema caribaeum</i> y el Complejo “copalchi”	5
1.2 Etnobotánica de <i>Exostema caribaeum</i>	8
1.3 Antecedentes químicos y farmacológicos de <i>Exostema caribaeum</i>	12
1.4 Control de calidad de plantas medicinales.....	16
1.4.1 Pruebas de identidad.....	17
1.4.2 Pruebas de pureza.....	19
1.4.3 Pruebas de composición.....	20
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
3.1 Material vegetal	23
3.2 Procedimientos generales.....	23
3.2.1 Análisis cromatográficos.....	23
3.2.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	24
3.3 Obtención de estándares a partir del extracto acuoso obtenido de la corteza de <i>Exostema caribaeum</i> recolectada en Temalac	25
3.3.1 Preparación del extracto acuoso.....	25
3.3.2 Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica del extracto acuoso	26
3.3.3 Obtención de 5- <i>O</i> -(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8) y 5- <i>O</i> -(6"-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14) de la fracción F6	26

3.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F8: Obtención de 5- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7) y 5- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13)	28
3.3.5 Obtención de 5- <i>O</i> - β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5)	29
3.3.6 Aislamiento de 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) y 5- <i>O</i> -[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (16)	30
3.4 Establecimiento del perfil cromatográfico por CCD del extracto acuso de <i>Exostema caribaeum</i>	32
3.5 Establecimiento del perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de <i>Exostema caribaeum</i>	32
3.6. Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes del extracto acuoso de <i>Exostema caribaeum</i>	33
3.6.1 Preparación de la solución de referencia de los estándares	33
3.6.2 Preparación de la matriz de trabajo	33
3.6.3 Selectividad	33
3.6.4 Linealidad del sistema	33
3.6.5 Linealidad del método y exactitud	34
3.6.6 Precisión	35
3.6.7 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	35
3.6.8 Estabilidad	35
3.6.9 Optimización del tiempo de extracción	36
3.6.10 Cuantificación de los compuestos presentes en el extracto acuoso de <i>Exostema caribaeum</i>	36
3.7 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de <i>Exostema caribaeum</i> , <i>Hintonia standleyana</i> , <i>H. latiflora</i> y dos muestras comerciales de quina amarilla	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1 Obtención y caracterización de marcadores activos a partir del extracto acuoso obtenido de la corteza de <i>Exostema caribaeum</i>	38
4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos	44
4.2.1 Perfil cromatográfico por CCD del extracto acuoso de <i>Exostema caribaeum</i>	44
4.2.2 Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de <i>Exostema caribaeum</i> ..	45

4.3. Validación del método analítico	47
4.3.1 Selectividad	48
4.3.2 Linealidad del sistema	51
4.3.3 Linealidad del método y exactitud	55
4.3.4 Precisión	60
4.3.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación	61
4.3.6 Estabilidad	62
4.3.7 Optimización del tiempo de extracción	63
4.3.8 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en los extractos acuosos de <i>Exostema caribaeum</i>	63
4.4 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de <i>E. caribaeum</i> , <i>Hintonia standleyana</i> , <i>H. latiflora</i> y dos muestras comerciales de quina amarilla	64
5. CONCLUSIONES	68
6. BIBLIOGRAFÍA	70
7. ANEXOS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Exostemma axiflora</i> sinonimia de <i>Exostemma caribaeum</i> .	6
2	Árbol de <i>E. caribaeum</i> (tomada por S. Cristians).	9
3	Flor de <i>E. caribaeum</i> (tomada por A. Madariaga).	9
4	Corteza de <i>E. caribaeum</i> (tomada por S. Cristians).	9
5	Droga cruda de <i>E. caribaeum</i> (tomada por E. Castillejos).	10
6	Distribución mundial de <i>Exostema caribaeum</i> (Obtenido de © Discover Life).	11
7	Obtención del extracto acuoso a partir de la corteza de <i>E. caribaeum</i> .	25
8	Obtención de estándares a partir de la corteza de <i>E. caribaeum</i> .	31
9	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 15 (CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ , 500 MHz).	43
10	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 15 (CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ , 125 MHz).	43
11	Vista parcial del espectro COSY del compuesto 15 .	44
12	Perfil cromatográfico por CCD (gel de sílice) del extracto acuoso y compuestos aislados utilizando.	45
13	Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de <i>E. caribaeum</i> .	47
14	Espectros de UV del estándar 11 en tres diferentes muestras.	49
15	Espectros de UV del estándar 13 en tres diferentes muestras.	49
16	Espectros de UV del estándar 14 en tres diferentes muestras.	50
17	Espectros de UV del estándar 16 en tres diferentes muestras.	50
18	Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 11 .	53
19	Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 13 .	53
20	Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 14 .	54
21	Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto 16 .	54
22	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 11 .	56
23	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 13 .	57
24	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 14 .	58
25	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto 16 .	59
26	Variación del contenido de principios activos en función del tiempo de extracción.	63
27	Cromatograma del extracto acuoso de la corteza <i>Exostema caribaeum</i> .	65
28	Cromatograma del extracto acuoso de la corteza <i>Hintonia standleyana</i> .	68
29	Cromatograma del extracto acuoso de la corteza <i>Hintonia latiflora</i> .	68

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
30	Cromatograma del extracto acuoso de la corteza quina amarilla 1.	67
31	Cromatograma del extracto acuoso de la corteza quina amarilla 2.	67
32	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5).	77
33	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5).	78
34	Espectro de masas (FAB positivo) de la 5- <i>O</i> -β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5).	79
35	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5).	80
36	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7).	81
37	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7).	82
38	Espectro de masas (FAB positivo) de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (7).	83
39	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (7).	84
40	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -(6"-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).	85
41	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -(6"-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).	86
42	Espectro de masas (FAB positivo) de la 5- <i>O</i> -(6"-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).	87
43	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -(6"-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).	88
44	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).	89
45	Espectro de RMN- ¹³ C (400 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).	90
46	Espectro de masas (FAB positivo) de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).	91
47	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).	92

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
48	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -(6''acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).	93
49	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -(6''acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).	94
50	Espectro de masas (FAB positivo) de la 5- <i>O</i> -(6''acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).	95
51	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -(6''acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).	96
52	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	97
53	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	98
54	Espectro COSY de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	99
55	Espectro HSQC de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	100
56	Espectro HMBC de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	101
57	Espectro de masas (ESI) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	102
58	Espectro de IR de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).	103
59	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16).	104
60	Espectro de RMN- ¹³ C (125 MHz, CH ₃ OH- <i>d</i> ₄) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16).	105
61	Espectro de masas (ESI) de la 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16).	106
62	Espectro de IR de La 5- <i>O</i> -[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16).	107
63	Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de <i>E. caribaeum</i> .	108

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Metabolitos secundarios aislados de <i>E. caribaeum</i> .	15
2	Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica del extracto acuoso de <i>E. caribaeum</i> .	26
3	Fraccionamiento cuaternario de la fracción F6-M de <i>E. caribaeum</i> .	27
4	Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE para el establecimiento del perfil cromatográfico de <i>E. caribaeum</i> .	32
5	Rango de concentración para la determinación de la linealidad.	34
6	Rango de concentración para la evaluación de la linealidad y exactitud del método.	34
7	Concentración de los estándares para la evaluación de la precisión.	35
8	Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de la corteza de <i>E. caribaeum</i> .	39
9	Datos de RMN- ¹³ C (100 MHz) y ¹ H (400 MHz) en CH ₃ OH- <i>d</i> ₄ del compuesto 15 .	42
10	Resultados experimentales de las curvas de calibración de los compuestos 11, 13, 14 y 16 .	52
11	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema de los compuestos 11, 13, 14 y 16 .	52
12	Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto 11 para evaluar la linealidad y exactitud del método.	56
13	Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto 13 para evaluar la linealidad y exactitud del método.	57
14	Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto 14 para evaluar la linealidad y exactitud del método.	58
15	Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto 16 para evaluar la linealidad y exactitud del método.	59
16	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método.	60
17	Evaluación de la precisión.	61
18	Límites de Detección y Límites de Cuantificación de los estándares.	61
19	Estabilidad de los estándares bajo condiciones de temperatura y almacenamiento.	62
20	Cuantificación de los compuestos 11,13, 14 y 16 .en dos muestras de <i>E. caribaeum</i> (EC-1 y EC-2).	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ANADEVA	Análisis de varianza
ANB	Alcohol nitrobencílico
b₀	Ordenada al origen
b₁	Pendiente
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃OH	Metanol
CH₃OH-<i>d</i>₄	Metanol deuterado
CHCl₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CLUE	Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia
cm	Centímetro
COSY	Correlation Spectroscopy
CV	Coefficiente de variación
d	Doblete
da	Doblete ancho
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometría de masas
g	Gramo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOAc	Ácido acético
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
INAH	<i>Instituto Nacional de Antropología e Historia.</i>

IR	Infrarrojo
KBr	Bromuro de potasio
Kg	Kilogramo
mL	Mililitros
OMS	Organización Mundial de la Salud
R	Coefficiente de correlación
R²	Coefficiente de determinación
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protónica
S_b	Varianza de la pendiente
TMS	Tetrametilsilano
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization

RESUMEN

El presente trabajo describe la investigación realizada para el establecimiento de las pruebas de identidad y composición de la droga cruda de *Exostema caribaeum* (Rubiaceae), especie perteneciente al “complejo copalchi”, y ampliamente utilizada en la medicina tradicional de nuestro país para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los que destacan las fiebres palúdicas y la diabetes.

Para el desarrollo de esta investigación se propuso como estrategia metodológica, el aislamiento de los metabolitos presentes en la infusión de la corteza de *E. caribaeum*. Posteriormente, se establecieron los perfiles cromatográficos del preparado y se validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia (CLUE) para la cuantificación de las 4-fenilcumarinas y del ácido clorogénico, los cuales son los principios activos antidiabéticos mayoritarios. Estos se proponen como los compuestos marcadores activos.

El estudio químico del extracto acuoso preparado a partir de las cortezas secas de *E. caribaeum* permitió el aislamiento y la caracterización de siete 4-fenilcumarinas: 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**5**), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), 5-*O*-(6''-acetil- β -D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**8**), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**), 5-*O*-(6''-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**14**), 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**15**) y 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**16**). Las 4-fenilcumarinas **13**, **14** y **16** se reportan por primera vez en la especie, en tanto que **15** es un análogo nuevo de este tipo de compuestos.

El perfil cromatográfico desarrollado permitió identificar a las 4-fenilcumarinas aisladas en el estudio químico como los compuestos mayoritarios en la infusión, así como la presencia de ácido clorogénico (**11**). Como fase estacionaria se empleó un columna de fase reversa [BEH Shield RP18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm)] y como fase móvil un gradiente de CH₃CN-H₂O (0.1% ácido fórmico). Finalmente, se validó un método analítico por

CLUE que permitió cuantificar las 4-fenilcumarinas y el ácido clorogénico (**11**) en el extracto acuoso de *E. caribaeum*. Este método resultó ser selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones evaluado y constituye una prueba de composición para la droga cruda de la planta.

La información generada en esta investigación será de utilidad para la integración de su monografía tipo OMS y Farmacopéica.

ABSTRACT

This work was undertaken in order to establish identity and composition tests useful for quality control of the crude drug obtained from *Exostema caribaeum*, a plant of the Rubiaceae family that belongs to the Copalchi complex. The stem bark of the plant is widely used in Mexican traditional medicine for the treatment of diabetes and malaria. The general strategy used to accomplish this work was the following: First the aqueous extract was subjected to conventional phytochemical analysis in order to isolate the active marker compounds. Then, a suitable chromatographic profile for the infusion of the stem bark was developed using Ultra Performance Chromatography Liquid (UPLC); the method was fully validated for the quantification of the major 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in the crude drug.

The chemical study of the aqueous extract prepared from the bark of *E. caribaeum* led to the isolation and characterization of seven 4-phenylcoumarins, namely, 5-*O*- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**5**), 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**7**), 5-*O*-(6''-acetyl- β -D-galactopyranosyl)-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**8**), 5-*O*- β -D-glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**13**), 5-*O*-(6''-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**14**), 5-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcoumarin (**15**) y 5-*O*-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin (**16**). Compounds **13**, **14** y **16** are new to the plant, while **15** it is a new natural product.

A chromatographic profile displaying the 4-phenylcoumarins active markers of the stem-bark was developed. The column employed was a BEH Shield RP18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm) and the mobile phase was a gradient of CH₃CN-H₂O (0.1% formic acid). Finally the UPLC method was validated to quantify the major 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in the aqueous extract of the crude drug. This method was selective, linear, precise and accurate in the concentration range evaluated and can be regarded as a composition test for the drug.

Altogether, the information generated in this work will be useful for generating the WHO and pharmacopeic monographs of *E. caribaeum*.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Exostema caribaeum* y el Complejo “copalchi”

El término “copalchi” se utiliza para designar a 11 especies de árboles o arbustos que pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae. *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roemer & Schultes junto con *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex DC.) Bullock, *Exostema mexicanum* Gray y *Hintonia standleyana* Bullock son las especies de la familia Rubiaceae que conforman el complejo, las cuales se caracterizan por sus cortezas extremadamente amargas y útiles en el tratamiento del paludismo y la diabetes (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007).

Los primeros reportes sobre los copalchis se remontan al siglo XVI, cuando Fray Bernardino de Sagún en su obra “Historia general de las cosas de la Nueva España” en el libro 11, menciona el uso de la corteza *Hintonia latiflora* en infusión bajo el nombre de *chichiccuáhuil* (árbol amargo) o *chichicpatli* (medicina amarga) como eupéptico, purgante y diurético. En el mismo siglo Francisco Hernández en su obra “Historia Natural de Nueva España” en el tomo II, libro cuarto, menciona un arbusto denominado *copalxihuilt* utilizado para alejar las fiebres periódicas.

En el año 1803 finalizada “La Real Expedición Botánica a Nueva España” Mariano Mociño enlista una serie de plantas fundamentales para conformar la materia médica mexicana, que permitiera aprovechar los recursos naturales locales en beneficio de los habitantes, entre estas plantas se encontraba *Exostema caribaeum* (Figura 1) (Mociño, 2010).

Croton niveus, también conocida como copalchi, comenzó a comercializarse en Europa en el año de 1817, donde se utilizaba contra las fiebres palúdicas como sustituto de la corteza de la quina (Arévalo, 1987). En 1868, por razones desconocidas las cortezas de *Hintonia* y *Exostema* comenzaron a usarse en lugar de las de *Croton*. Las especies más importantes de acuerdo a la obra de Samuel Hahnemann “Apothederlexicon” (1793-

1798) fueron *E. caribaeum* (árbol de quina caribeño) y *E. floribundum* (árbol de quina de Lucien) (Noster, 1992).



Figura 1. *Exostemma axilliflora* sinonimia de *Exostema caribaeum*. Ilustración realizada durante las expediciones de Sessé y Mociño por Nueva España. (Tomado de “La Real Expedición Botánica a Nueva España” Vol. X, 2010).

La reputación del copalchi como febrífugo hizo que se mandaran muestras de la corteza a España. En este país por sus usos y buena fama llegó a compararse con la actividad de la quina peruana *Cinchona succirubra* (Lozoya 1984). A partir de este momento comienzan a utilizarse indistintamente los copalchis y quinas para tratar las fiebres palúdicas. Posiblemente por esta razón el uso y comercialización de estas plantas han estado marcados por una serie de confusiones que a la postre han conducido a la sustitución de una planta por otra.

En Francia, el uso de *Exostema caribaeum* se encuentra documentado desde 1886 en la obra de Lanessan “Les plantes utiles des colonies françaises” en la cual describen las características botánicas de la planta y sus usos como febrífugo y emético (Lanessan, 1886). Tres años más tarde en el año 1889 en otra publicación titulada “Les plantes médicinales indigènes et exotiques, leurs usages thérapeutiques, pharmaceutiques et industriels” se corroboran los usos descritos por Lanessan (Dujardin-Beaumetz, 1889).

Paralelamente en México el 15 de Julio de 1893 en un artículo publicado por el diario “La Farmacia” el Prof. Velasco Quirós describe la planta como un sustituto de la quina, posiblemente por sus propiedades febrífugas y su sabor amargo.

Con la creación del Instituto Médico Nacional (IMN) en 1890, comienza un programa importante para el estudio de la plantas medicinales mexicanas con miras a generar la Materia Médica Nacional (AIMN, 1894). Los resultados de estas investigaciones se publicaron en los Anales del Instituto Médico Nacional (AIMN). En varios de estos anales se menciona el término “copalchi” para describir varias rubiáceas y euforbiáceas medicinales. La primera mención de *E. caribaeum* se encuentra en el tomo I (Loeza, 1894), en el cual se enlistan las plantas que formaran la primera parte de la Materia Médica Nacional. Más adelante en el tomo IV se describe la administración del extracto fluido de copalche de Jojutla a un enfermo de paludismo; este extracto provocó la mejoría del paciente tras su administración por 11 días. Se menciona también que la droga se le dio al paciente en cápsulas gelatinosas, debido al sabor extremadamente amargo de la misma (Loeza, 1904). A lo largo del siglo XX muchos autores describen

estos mismos usos y otros para las distintas especies de copalchi. En el inciso siguiente se describen los usos contemporáneos de *Exostema caribaeum*.

1.2 Etnobotánica de *Exostema caribaeum*

Exostema caribaeum (sinonimias: *Cinchona caribaea* Jacq. y *Exostema longicuspe* Oerst.) es un arbusto o árbol hermafrodita, glabrescente de hasta 8 m de altura (Figura 2). Las hojas son elípticas u ovaladas, de 4-11 cm de largo y 1.5-5 cm de ancho, ápice acuminado, base aguda, papiráceas, nervios secundarios de 4 a 5 pares, pecíolos 6-12 mm de largo, estípulas de 1-5 mm de largo, angostamente. Sus flores son blancas y en forma de campana con 5 pétalos largos que al secarse se tornan café rojizo (Figura 3), crecen solitarias en las axilas de las hojas, con pedúnculos de 4-10 mm de largo; limbo calicino de 0.5-1 mm de largo, corola blanca tornando en violáceo-rosada con la edad, el tubo de 3-5 cm, lóbulos lineares, del largo del tubo, estambre exertos, anteras de 2 cm. Los frutos son cápsulas de 7-15 mm de largo y 6-14 mm de ancho que no se abren; semillas de 3-6 mm de largo. La corteza (Figuras 4 y 5) es de color grisáceo y desarrolla fisuras horizontales con la edad (Argueta, *et al.*, 1994; Borhidi, 2006).

En las distintas regiones del Caribe se conoce popularmente con los nombres palo de jazmín, teilla, cuerpo de zapo, quina, palo de quina (Puerto Rico); yellow-torch (Islas Vírgenes), piñí-piñí, quina criolla (República Dominicana); cerillo, lirio santana, carey de costa (Cuba), hestio (Nicaragua); “caribbean princewood”, “princewood” (Bahamas); “caribbee barktree”, “jesuitbark” (Jamaica); “chandelle anglaise”, “quiquina pays” (Hatí), y “quiquina piton” (Martinica). En México se le denomina copalti (Estado de México); copalchi (Guerrero); chakiis, sabakche’ (Quintana Roo); copalchi de Michoacán (Michoacán); cascara sagrada roja, (mercados de Cuatla, Cuernavaca, Axochiapan Jojutla y Puente de Ixtla); copalche, copalchi de Jojutla (mercados de Cuautla) (Argueta, *et al.*, 1994; Little, 2001; Anderson, 2005; Borhidi, 2006; Monrroy, 2007).



Figura 2. Árbol de *E. caribaeum* (tomada por S. Cristians).



Figura 3. Flor de *E. caribaeum* (tomada por A. Madariaga).



Figura 4. Corteza de *E. caribaeum* (tomada por S. Cristians).



Figura 5. Droga cruda de *E. caribaeum* (tomada por E. Castillejos).

Exostema caribaeum es originaria de República Dominicana y Cuba, crece en clima cálido, semicálido y templado entre los 800 y los 100 m. Está asociada al bosque tropical caducifolio y subcaducifolio; bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino. Se distribuye desde sur de Florida incluyendo los Cayos y a lo largo de las Antillas desde las Bahamas y Cuba hasta Granada, y también en centro América, desde México hasta Costa Rica (Figura 6). En nuestro país se encuentra en los estados de Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas y Yucatán (Argueta, *et al.*, 1994; Borhidi, 2006; Monroy, 2007; MEXU 2013).

En México *E. caribaeum* de manera general se emplea contra las fiebres palúdicas, el reumatismo, padecimientos gastrointestinales como amibiasis, otras parasitosis, gastritis y úlceras (Díaz, 1976; Martínez, 1989; Aguilar 1194; Argueta, *et al.*, 1994). En el Estado de Michoacán se utiliza para clarificar la sangre, para ello se prepara un cocimiento con la planta y se le da a beber al enfermo; este remedio también sirve para la gastritis y las úlceras. En Guerrero, las ramas hervidas, se aplican a manera de fomentos en granos, llagas y manchas. En veterinaria se ocupa como antiséptico y cicatrizante. También se ha utilizado como agente antidiabético (Argueta, *et al.*, 1994).



Figura 6. Distribución mundial de *Exostema caribaeum* (Obtenido de © Discover Life).

De acuerdo a Monroy, en el Estado de Morelos se asocia con otras hierbas para el tratamiento de varios padecimientos. Así, una mezcla de guayacán (*Conzattia multiflora*), cáscara sagrada roja (*Simira rhodoclada*, *Exostema caribaeum* y/o *Croton rzedowskii*) y cuasia (*Quassia amara*) se hiere en un litro de agua y se bebe como agua de tiempo para la vesícula e hígado. Para la sangre, se remojan dos o tres cascaritas en un cuarto de litro de agua, la que se bebe como agua de uso. Se puede combinar con quina blanca. Si se necesita un tónico para la sangre se hierven dos o tres cascaras en un litro de agua de la que se bebe una tacita antes de cada alimento. Cuando se sufre paludismo se hierven dos rajadas de corteza en medio litro de agua, se beben en ayunas. Para enfermedades del cabello se hierven dos cascaritas en dos litros de agua y se hacen enjuagues. Para evitar la caída del pelo, curar la caspa, la tiña, la seborrea y la orzuela se usan: la corteza de encino (*Quercus rugosa*) y la cáscara sagrada roja, la hoja y la rama de espinosilla (*Loeselia mexicana*), la hoja de nogal (*Juglans regia*), la rama de romero (*Rosmarinus officinalis*), el tallo de la hierba de San Francisco (*Heimia salicifolia*), la corteza y las semillas de

zopilote (*Swietenia humilis*). Se hierven dos cucharadas de la mezcla en un litro de agua y se lava o enjuaga el cabello cada tercer día, hasta eliminar el mal (Monroy, 2007).

Exostema caribaeum se utiliza también como recurso forestal. Un estudio antropológico realizado por Manzanilla en Coba, Quintana Roo aportó información sobre las unidades habitacionales de los mayas y los materiales utilizados para la construcción, entre ellos como parte estructural del techo se encuentra la madera de *E. caribaeum* por ser delgada y flexible; sobre esta se apoyaba el zacate (Manzanilla, 1988). En la actualidad la madera de *E. caribaeum* sigue siendo utilizada para la construcción de casas, como leña y carbón en los estados de Quintana Roo y Yucatán (Anderson, 2005). En el estado de Michoacán es utilizada como especie forrajera y es parte de la dieta del Venado Cola Blanca (Ramírez, 2012).

Por último, cabe mencionar que durante la EXPO 92, *E. caribaeum* se introdujo en España como planta ornamental (López, 2001).

1.3 Antecedentes químicos y farmacológicos de *Exostema caribaeum*

Los distintos estudios químicos realizados sobre la corteza del tallo han permitido el aislamiento de compuestos de tipo 4-fenilcumarinas (Tabla 1). Así, en 1969 Sánchez-Viesca aisló a partir de un extracto bencénico la exostemina (1). Posteriormente Mata y colaboradores (Mata, *et al.*, 1987; 1988) reportaron por primera vez el aislamiento de otras nueve 4-fenilcumarinas a partir de un extracto elaborado con metanol; estos compuestos se caracterizaron como 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina (2), 7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina (3), 7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina (4), 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5), 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7,4',dimetoxi-4-fenilcumarina (6), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7), 5-*O*-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8), 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina (9), 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina (10).

También se ha reportado la presencia de ácido clorogénico (**11**) y manitol (**12**) en la planta; este último fue identificado por cromatografía en papel (Krebs y Griesinger, 1960). Nassar y colaboradores reportaron que los extractos de hoja de *E. caribaeum* analizados por cromatografía en capa delgada reaccionaron positivamente frente a reactivos comúnmente utilizados para la detección de alcaloides; estos resultados permitieron inferir la presencia de este tipo de productos en la especie (Nassar, *et al.*, 1980).

Con relación a los estudios farmacológicos Noster y Krauss en 1990 encontraron que los productos de hidrólisis ácida de los extractos orgánicos preparados con acetato de etilo de las cortezas de *Hintonia latiflora* y *E. caribaeum*, presentaban actividad anti-*Plasmodium falciparum* moderada en pruebas *in vitro*. La actividad biológica en ninguno de los casos fue mejor que la observada por los controles positivos (cloroquina y/o quinina).

En un estudio realizado en Italia, Pinto y colaboradores evaluaron el efecto hipoglucemiante crónico en ratas normoglicémicas de un preparado herbolario alemán que se comercializa con el nombre de Sucontral®. De acuerdo a los autores el preparado era a base de las mezclas de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum* (Pinto, *et al.*, 1997).

Posteriormente, Guerrero-Analco y colaboradores realizaron un estudio sobre la actividad antidiabética de copalchis mexicanos pertenecientes a la familia Rubiaceae. En este estudio demostraron el efecto hipoglucemiante de los extractos orgánicos de *H. latiflora*, *E. caribaeum* y de una mezcla comercial de *E. caribaeum* y *H. latiflora*. Estos extractos disminuyeron significativamente los niveles de glucosa sanguínea en ratas normoglicémicas y diabetizadas con estreptozotocina (STZ). En ese estudio se evaluó también la actividad hipoglucemiante de las 4-fenilcumarinas, incluyendo los compuestos **5**, **7** y **13**, y de varias cucurbitacinas aisladas de *H. latiflora*. La fenilcumarina 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**) fue el compuesto más activo (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007).

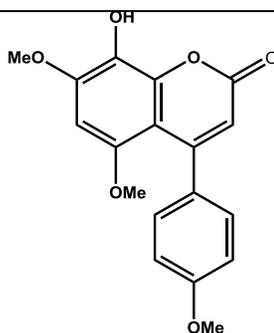
En los estudios de toxicidad aguda utilizando el método de Lorke, el extracto orgánico de la corteza de *E. caribaeum* presentó una toxicidad moderada en roedores ($DL_{50} = 700$ mg/kg), pero no fue tóxico para *Artemia salina* ($CL_{50} > 1000$ μ g/mL), ni presentó efectos mutagénicos en la prueba de Ames (Déciga-Campos, *et al.*, 2007).

Los compuestos presentes en la planta también han sido objeto de otros estudios biológicos. De tal forma que Calera y colaboradores encontraron que el compuesto **6** actúa como un inhibidor de la transferencia de energía en cloroplastos de espinacas, mientras que el compuesto **7** actúa como un agente desacoplante inhibiendo la síntesis de ATP y la captación de protones (Calera, *et al.*, 1995; 1996).

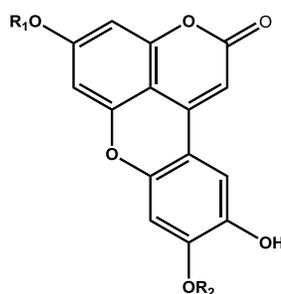
Los compuestos **1**, **9** y **10** se ensayaron contra las líneas celulares BC1, Lu1, Col2, KB, KB-V+, KB-V-, LNCaP, SW626, SKNSH, y M109 y se encontró que poseen actividad citotóxica (Ito, *et al.*, 2000) mientras que el compuesto **2** mostró actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (Rojas, *et al.*, 1992).

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *E. caribaeum*

ESTRUCTURA



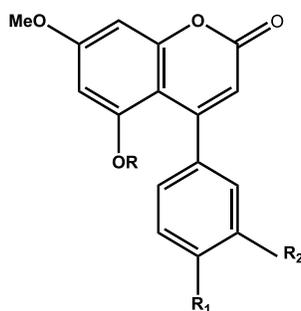
Exostemina (1)



2: R₁=H, R₂=H

3: R₁=CH₃, R₂=CH₃

4: R₁=CH₃, R₂=H



5: R=β-D-galactopiranosil, R₁=OH, R₂=OH

6: R=β-D-galactopiranosil, R₁=OCH₃, R₂=H

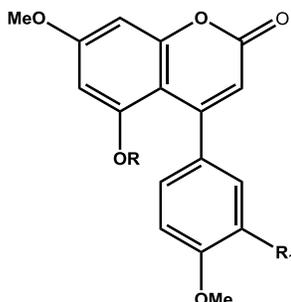
7: R=β-D-glucopiranosil, R₁=OH, R₂=OH

8: R=6''-acetyl-β-D-galactopiranosil, R₁=OH, R₂=OH

Referencias. Sánchez- Viesca, *et al.*, 1969 ; Mata, *et al.*, 1987;1988.

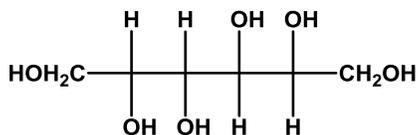
Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados de *E. caribaeum* (Cont.)

ESTRUCTURA



9: R= CH₃, R₁=H

10: R= H, R₁=OH



Manitol (**12**)

Referencias. Krebs, *et al.*, 1960; Mata, *et al.*, 1987; 1988.

1.4 Control de calidad de plantas medicinales

Se estima que un 85 % de la población mundial emplea plantas medicinales en el marco de los distintos sistemas de salud. En los países en vías de desarrollo, en especial en las poblaciones rurales, el uso de plantas medicinales sigue siendo la principal elección para procurar alivio a sus enfermedades. En consecuencia, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo existe un marcado interés para garantizar la calidad de las drogas crudas y preparados herbolarios derivados de los mismos. La calidad de las plantas medicinales es la base para garantizar su seguridad y eficacia (Cañigüeral *et al.*, 2005). De allí la importancia de establecer los criterios de calidad de las plantas medicinales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus resoluciones WHA31.33 (1978), WHA40.33 (1987) y WHA42.43 (1989) enfatizó la necesidad de asegurar la

calidad de las drogas crudas y/o preparados herbolarios. Es por esta razón que en el año de 1988 se publicó el documento “*Quality control methods for medicinal plant materials*” en el cual se establecen las recomendaciones y procedimientos para el aseguramiento de la calidad, en el 2011 se publicó la actualización del mismo. Posteriormente esta organización sanitaria generó otros documentos como “*Guidelines on good agricultural and collection practices for medicinal plants*”, “*Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*” así como cuatro volúmenes de una serie de monografías con los criterios de calidad de las plantas medicinales más utilizadas a nivel global. Todo este conjunto bibliográfico pretende proporcionar una orientación general para el establecimiento de los parámetros de calidad de las plantas más utilizadas en los estados miembros de la OMS (WHO, 1998; WHO, 2003; WHO, 2007).

La evaluación de la calidad engloba parámetros de identidad, pureza y composición de drogas crudas y/o preparados herbolarios.

1.4.1 Pruebas de identidad

Las pruebas de identidad de las drogas crudas permiten su identificación a través de una serie de pruebas botánicas, químicas y genéticas. Cuando estos parámetros se desconocen es necesario establecerlos para garantizar la eficacia y seguridad de las drogas evitando sustituciones o adulteraciones que afecten la salud de los consumidores.

Las pruebas de **identidad botánica** consisten en la identificación correcta de la droga cruda, mediante el uso de la definición botánica, su caracterización microscópica y macroscópica e incluso a través de la comparación con materiales de referencia. Estas pruebas son útiles para determinar que la planta es la especie requerida, así como asegurar que se utilice la droga cruda correcta (Bandaranayake, 2006).

Las pruebas de **identidad química** están enfocadas principalmente a la detección de compuestos marcadores y a la obtención de perfiles cromatográficos característicos aplicando métodos analíticos de vanguardia. Los compuestos marcadores se definen como constituyentes químicamente definidos, útiles para fines analíticos,

independientemente de que presenten actividad o no. Existen diferentes tipos de marcadores y los de mayor utilidad en las pruebas de identidad química son los denominados **marcadores analíticos**. Estos marcadores se utilizan cuando los principios activos no son conocidos, pero se conocen otros componentes del extracto. Sin embargo los principios activos pueden también fungir como marcadores (EMEA, 2006). En este último caso se designan como marcadores activos. Actualmente, los tipos de marcadores que pueden ser identificados en las drogas crudas o preparados herbolarios se especifican en las monografías y farmacopeas.

Los métodos más utilizados para la generación de los perfiles cromatográficos son la Cromatografía en Capa Delgada (CCD), la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) y la Cromatografía de Gases (CG) (Liang, *et al.*, 2004; Liang, *et al.*, 2009). Una técnica cromatográfica sencilla como la CCD puede proporcionar información de manera rápida y confiable sobre la presencia o ausencia de los metabolitos característicos de las drogas o sus productos de degradación presentes en los extractos preparados a partir de las drogas crudas o preparados herbolarios. La CCD, sin embargo, presenta algunas desventajas como su baja sensibilidad y resolución lo que impide la detección de compuestos presentes en trazas.

El uso de la CLAE se ha popularizado en los últimos años, debido a las características que ofrece, como la robustez, la facilidad para su operación, la selectividad y principalmente el acoplamiento de esta técnica, con diferentes detectores (UV/VIS, Índice de Refracción y EM) que dan información sobre la identidad de los componentes presentes en las mezclas complejas de los extractos y otros preparados, sin embargo su principal limitación ha sido la falta de una alta eficiencia especialmente en comparación con la Cromatografía de Gases (CG) ya que se ve comprometida por el tamaño de la partícula; el uso de partículas pequeñas ($< 5 \mu\text{m}$) está limitado por la presión. Se han propuesto diversas metodologías para evitar estas limitaciones, como la reciente introducción de la Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia (CLUE) que debido a su novedosa instrumentación soporta presiones más elevadas y columnas con un tamaño de partícula menor ($1.7 \mu\text{m}$). El uso de columnas empacadas con partículas de este

tamaño se traduce en un aumento de la resolución, la selectividad, la eficiencia y la velocidad de análisis reduciendo el consumo de disolvente y muestra (Villiers, *et al.*, 2006). Este tipo de cromatografía también emplea diferentes detectores (UV, TOF/EM, Q/TOF/EM) (Zheng, *et al.*, 2008; Kong, *et al.*, 2009). La CG también es ampliamente utilizada para generar perfiles de mezclas complejas de los componentes volátiles de las esencias con una alta sensibilidad.

En años recientes las pruebas de **identidad genética** han complementado las estrategias clásicas para la evaluación de la identidad de las drogas crudas. Estas pruebas consisten en el análisis de los marcadores moleculares, los cuales, son únicos, estables y específicos para cada especie, y no están influenciados por la edad, las condiciones fisiológicas y los factores ambientales. La elección del marcador depende de la naturaleza de la investigación y cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas (Kiran, *et al.*, 2010).

1.4.2 Pruebas de pureza

Las pruebas de pureza permiten garantizar que las drogas crudas estén libres de contaminantes como microorganismos, radioactividad, metales pesados, residuos de plaguicidas, insectos, piedras, arena y todo aquello que no pertenezca a la materia prima. Generalmente, estas pruebas son de carácter general, es decir se realizan de acuerdo a procedimientos bien establecidos en las farmacopeas y directrices de la OMS (WHO 2007). Las pruebas de pureza que se les practican de rutina a las drogas crudas son las siguientes:

- Determinación de materia extraña
- Determinación de cenizas totales
- Determinación de microorganismos y aflatoxinas
- Determinación de plaguicidas
- Determinación de radioactividad

1.4.3 Pruebas de composición

Las pruebas de composición consisten en la cuantificación de los principios activos, si estos son conocidos, o de los marcadores en las drogas crudas y/o preparados herbolarios con la finalidad de garantizar la obtención de extractos estandarizados y cuantificados. Los **principios activos** se definen como los compuestos responsables de las propiedades terapéuticas de las drogas. En las monografías se especifica su contenido. Una determinación cuantitativa de los principios activos durante los estudios de estabilidad de los productos herbolarios provee información necesaria para conocer las fechas de caducidad (Sahoo, *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Nuestro país se distingue por su larga tradición en el uso de plantas medicinales debido a que son parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. Cuenta con alrededor de 3 000 especies medicinales documentadas en diversas fuentes (Viesca-Treviño, 1987, 1993, 1999; Zolla y Medellín, 1993; Aguilar, 1994; Argueta, *et al*, 1994; Lozoya, 1998; Hersch, 1999). Muchas de estas plantas actualmente son objeto de un activo comercio a nivel nacional e inclusive internacional, constituyéndose así, en una opción muy importante para el tratamiento y prevención de enfermedades. Sin embargo, a pesar de su amplio uso, son pocas las plantas que han sido estudiadas para establecer los criterios que garanticen su calidad, pilar fundamental para garantizar la seguridad y eficacia de las mismas.

Dentro de las plantas más comercializadas en México se encuentra *Exostema caribaeum* la cual es ampliamente utilizada en las prácticas médicas populares de México como sustituto de la quina y de los otros copalchis. De allí la importancia de establecer no solo su eficacia y seguridad, sino también las pruebas de calidad.

En este contexto el presente trabajo tiene como objetivo general, establecer las pruebas de identidad química y composición de la droga cruda, con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para integrar las monografías tipo OMS y Farmacopéica de la droga cruda *E. caribaeum*. El establecimiento de estas pruebas en conjunto con las pruebas de eficacia y seguridad indudablemente garantizarán el uso racional de este importante recurso natural.

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

- Realizar el estudio químico del extracto acuoso aplicando las técnicas cromatográficas convencionales, con la finalidad de aislar los componentes característicos y/o marcadores de la especie. De manera adicional, se generarán los estándares apropiados para las pruebas de identidad y composición.

- Establecer los perfiles cromatográficos de la infusión de la planta mediante la aplicación de técnicas cromatográficas incluyendo la de capa delgada (CCD) y la de líquidos de ultra eficiencia (CLUE). El cumplimiento de este objetivo permitirá el desarrollo parcial de pruebas de identidad química.
- Desarrollar y validar de un método analítico por CLUE que permita la cuantificación de los principios activos de la corteza de *E. caribaeum*.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Material vegetal

Las dos muestras de corteza de *E. caribaeum* analizadas en este estudio se recolectaron en Temalac y Tuzantlan, municipio de Atenango del Río, Estado de Guerrero, en Enero de 2003 y Julio de 2010, respectivamente. Los ejemplares de referencia se depositaron en el herbario de la Facultad de Ciencias FCME, UNAM, México DF (131339 y 131340, respectivamente). La muestra de corteza de *Hintonia standleyana* se recolectó también en Temalac, Atenango del Río en Enero de 2003. En este caso la muestra de referencia (P. Hersch No 824) se encuentra depositada en el herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia (ASFM-INAH), Cuernavaca, Morelos. La muestra de corteza de *H. latiflora* se recolectó en Batopilas, Municipio de Batopilas, Chihuahua, en Junio de 2005. La muestra de referencia (Bye 33885) se encuentra depositada en el Herbario Nacional (MEXU), UNAM. Las muestras de “quina amarilla” se adquirieron en el Mercado de Sonora en Noviembre de 2012 en los puestos “El Niño de la Salud” y “La Señora Felix, la Tía”.

3.2 Procedimientos generales

3.2.1 Análisis cromatográficos

Para los análisis de cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice (0.25 mm; 60 F₂₅₄, Merck) y diversos sistemas de elución. La visualización de las placas se realizó, primero con luz UV (onda corta 254 nm; onda larga 365 nm) y, luego con un reactivo cromógeno [sulfato cérico amoniacal (12 g)-ácido sulfúrico (22.5 mL)] (Stahl, 1969); para el desarrollo del color fue necesario calentar a 110 °C durante un minuto.

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

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos Waters 996 (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, Massachusetts, EE. UU.), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA-2996). Se utilizó el “software” Empower versión 2.0 para el control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento de la información. Los análisis se realizaron en una columna Nucleosil C-18 de 4 mm de diámetro interno, 125 mm de longitud y 5 μm de tamaño de partícula (Phenomenex®).

Los análisis cuantitativos por Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia (CLUE) de los extractos acuosos de *E. caribaeum* se realizaron empleando un cromatógrafo Waters ACQUITY UPLC® clase H (Waters Chromatography Division), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA), una bomba cuaternaria, un inyector automático y la versión 3 del “software” Empower. En este caso se utilizó una columna BEH Shield RP18 (Waters Chromatography Division) de 2.1 de mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 1.7 μm de tamaño de partícula. Todas la muestras se filtraron a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.2 μm x 13 mm antes de ser inyectadas al cromatógrafo para su análisis.

3.2.2 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fischer-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en pastilla de KBr en un espectro Perkin Elmer 599. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN- ^1H) y de carbono-13 (RMN- ^{13}C) se registraron en los aparatos Varian Unity Inova (operado a una frecuencia de 400 MHz para RMN- ^1H y 100 para RMN- ^{13}C) y JEOL ECA-500 (operado a una frecuencia de 500 MHz para RMN- ^1H y 125 para RMN- ^{13}C), empleando $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ o $\text{DMSO}-d_6$ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales se utilizaron los programas MestreNova® versión 6 y Delta® versión 4.3.6. Los espectros de masas se registraron en los equipos JEOL SX 102 y LTQ Orbitrap XL system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) utilizando como método de ionización bombardeo de átomos acelerados (MS-FAB) en modo positivo,

con alcohol nitrobenílico (ANB) como matriz y ionización por electrospray (ESI) modo positivo respectivamente.

3.3 Obtención de estándares a partir del extracto acuoso obtenido de la corteza de *Exostema caribaeum* recolectada en Temalac

3.3.1 Preparación del extracto acuoso

La corteza se desecó a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días y posteriormente se fragmentó en un molino Willey Modelo 4 (Thomas Scientific Incorporation, Swedesboro, New Jersey, EE.UU.) con malla de 2 mm. Para obtener el extracto acuoso se empleó el método de infusión. La infusión se preparó a partir de 1.5 g de corteza molida utilizando 250 mL de agua a 93°C y se dejó reposando por 30 minutos. Posteriormente, se filtró utilizando papel filtro (Whatman no. 1) y se concentró a sequedad en un rotaevaporador Buchi® RII adaptado a una bomba de vacío V-710 (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) para generar 473.74 mg de extracto. El proceso se repitió 15 veces obteniéndose 7.1062 g de extracto seco acumulado.

El extracto acuoso seco total se reconstituyó con CH₃OH (30 mL), y tras un reposo de cinco minutos precipitaron 693.1 mg de manitol (**12**), con un punto de fusión de 166-168 °C. El material soluble en metanol (fracción metanólica) se concentró *in vacuo* (Figura 7).

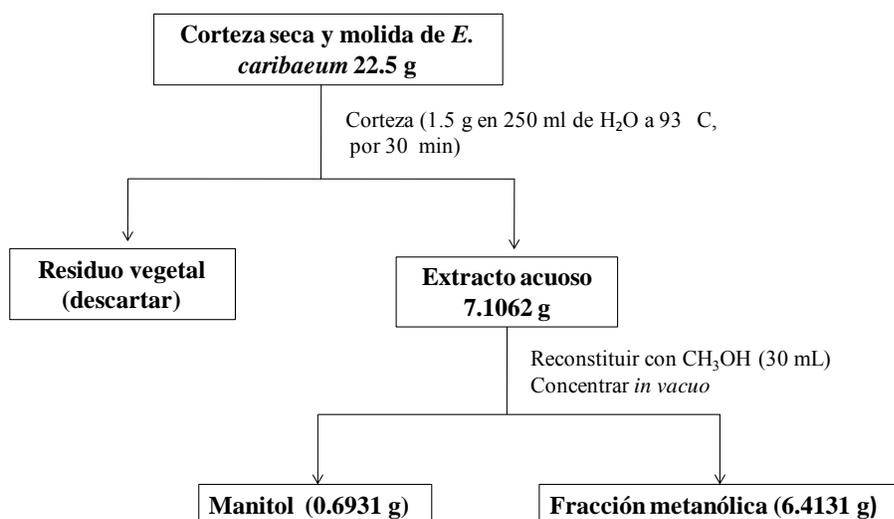


Figura 7. Obtención del extracto acuoso a partir de la corteza de *E. caribaeum*.

3.3.2 Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica del extracto acuoso

La fracción metanólica (6.4131 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta utilizando 332 g de gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexano–AcOEt (10:90→0:100) y AcOEt–CH₃OH (100:0→50:50) como eluyentes. Este procedimiento generó 17 fracciones (**F1-F17**, Tabla 2 y Figura 8).

Tabla 2. Fraccionamiento secundario de la fracción metanólica del extracto acuoso de *E. caribaeum*

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano-AcOEt	10:90	1-23	1-3	F1
AcOEt	100	24-72	4-23	F2
AcOEt–CH ₃ OH	98:2	73-79	24-45	F3
AcOEt – CH ₃ OH	95:5	98-182	46-57	F4
AcOEt – CH ₃ OH	94:6	183-215	58-72	F5
AcOEt – CH ₃ OH	93:7	216-236	73-79	F6
AcOEt – CH ₃ OH	92:8	237-257	80-86	F7
AcOEt – CH ₃ OH	90:10	258-276	87-97	F8
AcOEt – CH ₃ OH	88:12	277-291	98-106	F9
AcOEt – CH ₃ OH	85:15	292-305	107-120	F10
AcOEt – CH ₃ OH	80:20	306-307	121-130	F11
AcOEt – CH ₃ OH	50:50	308-314	131-165	F12
			166-190	F13
			191-219	F14
			220-250	F15
			251-295	F16
			296-314	F17

3.3.3 Obtención de 5-O-(6''-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**8**) y 5-O-(6''-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**14**) de la fracción F6

Tras la combinación de las fracciones cromatográficas que generaron **F6** (74 mg) precipitó un polvo amarillo que se purificó por lavados sucesivos con una mezcla de CHCl₃–CH₃OH (10:90). De este proceso se separaron 18 mg del compuesto **8**, con un punto de fusión de 232–234°C [reportado 215–220°C (Mata, *et al.*, 1988)]. El material soluble (**F6-M**, 56 mg) se purificó por cromatografía en columna con sephadex LH-20 utilizando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂–CH₃OH (5:95). Este proceso generó ocho fracciones (**F6-M-1** – **F6-M-8**, Tabla 3). De la fracción **F6-M-6** cristalizaron 9 mg del compuesto **14**, con un punto de fusión de 249–251°C [reportado 205–208°C (Mata, *et al.*, 1992)].

Tabla 3. Fraccionamiento cuaternario de la fracción **F6-M** de *E. caribaeum*

Eluyente	Proporción (%)	Fraciones	Clave
CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH	(5:95)	1-7	F6-M-1
		8-10	F6-M-2
		11-39	F6-M-3
		40-50	F6-M-4
		51-59	F6-M-5
		64-67	F6-M-6
		68-71	F6-M-7
		72-98	F6-M-8

5-O-(6''-Acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

(8). IR (KBr) ν_{\max} 3406, 3186, 2918, 1693, 1693, 1611, 1346, 1070 cm^{-1} ; RMN-¹H (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 6.85 (H-2' d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.84 (H-5' d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (H-6' dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.69 (H-6 d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.65 (H-8 d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.94 (H-3 s, 1H), 4.72(H-1'' d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.33 (H_α-6'' dd, *J* = 11.5, 8.5 Hz, 1H), 4.18 (H_β-6'' dd, *J* = 11.6, 3.7 Hz, 1H), 3.88 (MeO- s, 3H), 3.86 (H-5''), 3.79 (H-4'' da, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.44 (H-3'' dd, *J* = 9.6, 3.4 Hz, 1H), 3.14 (H-2'' dd, *J* = 9.5, 7.9 Hz, 1H), 2.05 (MeCOO- s, 3H); RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 171.1 (C=O), 163.4 (C-7), 161.5 (C-2), 156.1 (C-5), 156.5 (C-4), 155.6 (C-8a), 145.8 (C-4'), 144.0 (C-3'), 131.3 (C-1'), 119.3 (C-6'), 115.3 (C-2') 114.4 (C-5'), 112.0 (C-3), 103.9 (C-4a), 100.6 (C-1''), 99.2 (C-8), 94.5 (C-6), 73.1 (C-5''), 72.9 (C-3''), 70.5 (C-2''), 68.6 (C-4''), 63.4 (C-6''), 55.1 (C-MeO-), 19.2 (C-MeCOO); FAB *m/z* 505 [M+H]⁺, 301 [M+H-204]⁺.

5-O-(6''-Acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14). IR (KBr) ν_{\max} .3241, 2923, 1699, 1596, 1356, 1075 cm^{-1} ; RMN-¹H (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 6.85 (H-5' d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.83 (H-2' d, *J* = 2.12 Hz, 1H), 6.73 (H-6' dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.51 (H-8, H-6, 2H), 5.91 (H-3 s, 1H), 4.80 (H-1'' d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.35 (H_α-6'' dd, *J* = 11.8, 2.2 Hz, 1H), 4.25 (H_β-6'' dd, *J* = 11.8, 7.0 Hz, 1H), 3.56 (H-5''ddd, *J* = 9.4, 7.1, 2.3 Hz, 1H), 3.3(H-3''), 3.24 (H-4'' dd, *J* = 9.4, 9.1 Hz, 1H), 2.75 (H-2'' dd, *J* = 9.1, 7.7 Hz, 1H), 2.07 (CH₃COO- s, 3H); RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 171.3 (C=O), 161.9 (C-7), 161.8 (C-2), 156.9 (C-4), 156.6 (C-8a), 155.8 (C-5), 145.5 (C-4'), 144.1 (C-3'), 131.5 (C-1'), 119.2 (C-6'), 115.5 (C-2'), 114.2 (C-5''), 111.0 (C-3), 103.2 (C-4a), 99.7 (C-1''), 99.3

(C-8), 96.8 (C-6), 76.1 (C-3"), 74.1 (C-5"), 73.0 (C-2"), 69.9 (C-4"), 63.19 (C-6"), 19.24 (MeCOO⁻); FAB m/z 491 [M+H]⁺, 287 [M+H-204]⁺.

3.3.4 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F8: Obtención de 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7) y 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13)

La fracción secundaria **F8** (106 mg, Tabla 2) se reconstituyó en CH₃OH; inmediatamente precipitaron 65 mg de un sólido crema que se purificó tras sucesivos lavados con CH₃OH frío y se transformó en un sólido blanco (61 mg) con un punto de fusión de 269–270°C [reportado 237–238°C (Mata, *et al.*, 1988)] que se caracterizó como 5-O-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**).

La solución remanente tras la separación del producto **7** (**F8-M**, 40 mg) se analizó por CLAE en una columna analítica de Nucleosil C-18; como sistema de elución se empleó acetonitrilo-agua (20:80) con un flujo de 0.6 mL/min, la longitud de onda (λ) utilizada fue de 327 nm. El cromatograma presentó un compuesto mayoritario con un t_R de 4.58 min. Para el aislamiento de este compuesto se utilizó una columna semipreparativa Nucleosil C18 (5 μm 250 x 10 mm), el mismo sistema de elución y un flujo de 4 mL/min. La muestra **F8-M** se filtró a través de membranas de nylon (Acrodisc®) de 0.45 μm x 13 mm de diámetro y se inyectó un volumen final de 100 μL. Al cabo de la purificación se obtuvieron 16 mg del compuesto **13** con un punto de fusión de 260–263°C [reportado 250–252°C (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007)].

5-O-β-D-Glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7). IR (KBr) ν_{max} 3545, 3430, 3222, 2911, 1695, 1594, 1340, 1046. cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.73 (H-5' d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.72 (H-2' d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.70 (H-6 d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.65 (H-6' dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 6.62 (H-8 d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.83 (H-3 s, 1H), 4.82 (H-1''d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.83 (MeO- s, 3H), 3.64 (H-α-6" da, *J* = 11 Hz, 1H), 3.44–3.25 (H-5", H-β-6"), 3.13 (H-3"dd, *J* = 8.8, 8.8 Hz, 1H), 2.99 (H-4" dd, *J* = 9.2, 9.2 Hz, 1H), 2.51 (H-2" dd *J* = 8.8, 8.8 Hz 1H); RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.1 (C-7), 160 (C-2), 156.7 (C-5), 156.2 (C-8a), 155.9 (C-4), 146.1 (C-4'), 144.4 (C-3'), 130.6 (C-1'), 119.6

(C-6'), 116.0 (C-2'), 114.9 (C-5'), 112.5 (C-3), 103.8 (C-4a), 100.2 (C-1''), 98.60 (C-8), 95.61 (C-6), 77.50 (C-5''), 76.67 (C-3''), 73.31 (C-2''), 69.8(C-4''), 61.0 (C-6''), 56.30 (MeO-); FAB m/z 463 [M+H]⁺, 301 [M+H-162]⁺.

5-O-β-D-Glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13). IR (KBr) ν_{\max} 3252, 2908, 1679, 1595, 1355, 1068 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 6.82 (H-2' d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.81 (H-5' d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 6.72 (H-6' dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 6.55 (H-6, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.47 (H-8 d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.88 (H-3 s, 1H), 4.82 (H-1'' d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.86 (H_α-6'' dd, *J* = 12.0, 2.1 Hz, 1H), 3.70 (H_β-6'' dd, *J* = 11.9, 5.0 Hz, 1H), 3.38–3.34 (H-5'', ddd, *J* = 10.0, 5.2, 2.2 Hz, 1H), 3.38–3.30 (H-3''–H-4''), 2.74 (H-2'' dd, *J* = 9.1, 7.7 Hz, 1H); RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 162.1 (C-7), 161.8(C-2), 156.9 (C-4), 156.7 (C-8a), 155.9 (C-5), 145.7 (C-4'), 144.0 (C-3'), 131.4 (C-1') , 118.8 (C-6'), 115.1 (C-2'), 114.2 (C-5'), 110.8 (C-3), 102.9(C-4a), 99.8 (C-1''), 98.9 (C-6), 96.8 (C-8), 76.7(C-5''), 76.2 (C-3''), 73.1 (C-2''), 69.3 (C-4''), 60.8 (C-6''); FAB m/z 449 [M+H]⁺, 287 [M+H-162]⁺.

3.3.5 Obtención de 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5)

De la fracción secundaria **F10** (132 mg, Tabla 2) precipitó un polvo el que se purificó por recristalización de CH₃OH frío. De esta forma se obtuvieron 72 mg del compuesto **5** con un punto de fusión de 232–233°C [reportado 228–231°C (Mata, *et al.*, 1987)].

5-O-β-D-Galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5). IR (KBr) ν_{\max} 3355, 2890, 1698, 1615, 1354, 1064 cm⁻¹; RMN-¹H (400 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 6.86 (H-2' d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.84 (H-5' d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.73 (H-6' dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.74 (H-6 d, *J* = 2.2 Hz, 1H) 6.65 (H-8 d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.93 (H-3 s, 1H), 4.75 (H-1'' d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.88 (CH₃O- s, 1H), 3.80 (H-4'' da, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.75 (H_α-6'' dd, *J* = 11.5, 7.3 Hz, 1H), 3.69 (H_β-6'' dd, *J* = 11.5, 4.7 Hz, 1H), 3.63 (H-5'' ddd, *J* = 6.7, 5.1, 0.8 Hz, 1H), 3.43 (H-3'' dd, *J* = 9.7, 3.4 Hz, 1H), 3.14 (H-2'' dd, *J* = 9.6, 7.8 Hz, 1H); RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 163.5 (C-7), 161.5 (C-2), 156.6 (C-4), 156.5 (C-8a), 155.88 (C-5), 145.8 (C-4'), 143.9 (C-3'), 131.3 (C-1'), 119.3 (C-6'), 115.7 (C-2'), 114.4 (C-5'),

111.9 (C-3), 103.7 (C-4a), 100.9 (C-1''), 98.5 (C-6), 95.2 (C-8), 75.9 (C-5''), 73.2 (C-3''), 70.6 (C-2''), 68.6 (C-4''), 60.9 (C-6''), 55.0 (MeO-); FAB m/z 463 $[M+H]^+$, 301 $[M+H-162]^+$.

3.3.6 Aislamiento de 5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) y 5-O- $[\beta$ -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (16).

La fracción **F16** (63 mg, Tabla 2) se sometió a una separación mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) utilizando las condiciones descritas para la purificación de **13**. El cromatograma de la fracción presentó dos compuestos mayoritarios ($t_R=3.50$ min y 5.86 min). Al cabo de la separación de los componentes mayoritarios se obtuvieron 16 mg del compuesto **15** ($t_R=3.50$ min) y 15 mg de **16** ($t_R=5.86$ min) como sólidos vítreos.

5-O- $[\beta$ -D-Xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15). IR (KBr) ν_{max} 3278, 2906, 1684, 1598, 1357, 1037 cm^{-1} ; RMN- 1H (500 MHz, CH_3OH-d_4) δ 6.80 (H-5' d, $J = 8$ Hz, 1H), 6.80 (H-2' d, $J = 1.8$ Hz, 1H) 6.71 (H-6' dd, $J = 7.8, 2.2$ Hz, 1H), 6.64 (H-6 d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.47 (H-8 d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 5.86 (H-3 s, 1H), 4.73 (H-1'' d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.31 (H-1''' d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.05 (H- α -6'' da, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.82 (H- α -5''' dd, $J = 11.5, 5.3$ Hz, 1H), 3.73 (H- β -6'' dd, $J = 11.3, 6.5$ Hz, 1H), 3.5 (H-5'' m, 1H), 3.46 (H-4''' ddd, $J = 10.1, 9.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.26 (H-3''-H-3''', 2H), 3.21 (H-2''' m, 1H), 3.21 (H-4'' m, 1H) 3.08 (H- β -5''' dd, $J = 11.5, 10.3$ Hz, 1H), 2.71 (H-2'' dd, $J = 8.6, 7.4$ Hz, 1H); RMN- ^{13}C (125 MHz, CH_3OH-d_4) δ 162.2 (C-7), 161.9 (C-2), 157.0 (C-4), 156.8 (C-8a), 156.0 (C-5), 145.6 (C-4'), 144.2 (C-3'), 131.6 (C-1'), 119.7 (C-6'), 114.9 (C-2'), 114.3 (C-5'), 111.0 (C-3), 103.8 (C-1''), 103.1 (C-4a) 100.2 (C-1''), 99.4 (C-6), 97.3 (C-8), 76.4 (C-5''), 76.1 (C-3''), 76.2 (C-3'''), 73.7 (C-2'''), 73.3 (C-2''), 69.8 (C-4'''), 69.6 (C-4''), 68.2 (C-6''), 65.5 (C-5'''). ESI m/z 581 $[M+H]^+$, 449 $[M+H-132]^+$.

5-O- $[\beta$ -D-Xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16). IR (KBr) ν_{max} 3334, 2921, 1692, 1610, 1039 cm^{-1} ; RMN- 1H (500 MHz, CH_3OH-d_4) δ 6.80 (H-5' d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.80 (H-2' d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.72 (H-6

d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.71 (H-6' dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H), 6.67 (H-8 d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.92 (H-3 s, 1H), 4.80 (H-1" d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.25 (H-1''' d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.1 (H $_{\alpha}$ -6" da, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.89 (MeO- s, 3H), 3.81 (H $_{\alpha}$ -5''' dd, $J = 11.5, 5.2$ Hz, 1H), 3.75 (H $_{\beta}$ -6" dd, $J = 11.0, 6.6$ Hz, 1H), 3.58 (H-5" m, 1H), 3.46 (H-4''' ddd, $J = 10.1, 9.9, 5.4$ Hz, 1H), 3.26 (H-3", H-3'''), 3.19 (H-2"-H-4''' m, 2H), 3.07 (H $_{\beta}$ -5''' dd, $J = 11.5, 10.3$ Hz, 1H), 2.70 (H-2" dd, $J = 9.2, 7.5$ Hz, 1H); RMN-¹³C (125 MHz, CH₃OH-*d*₄) δ 163.6 (C-7), 161.7(C-2), 156.8 (C-4), 156.7 (C-8a), 155.7 (C-5), 145.7 (C-4'), 144.1 (C-3'), 131.5 (C-1'), 120.0 (C-6'), 114.9 (C-2'), 114.3 (C-5'), 111.8 (C-3), 104.2 (C-1'''), 104.2 (C-4a), 99.9 (C-1''), 99.2 (C-6), 94.9 (C-8), 76.4 (C-3'''), 76.2 (C-3''), 75.9 (C-5'''), 73.6 (C-2'''), 73.2 (C-2''), 69.8 (C-4'''), 69.7 (C-4''), 69.0 (C-6''), 65.5 (C-5'''), 55.2 (MeO-); ESI m/z 595 [M+H]⁺, 463 [M+H-132]⁺.

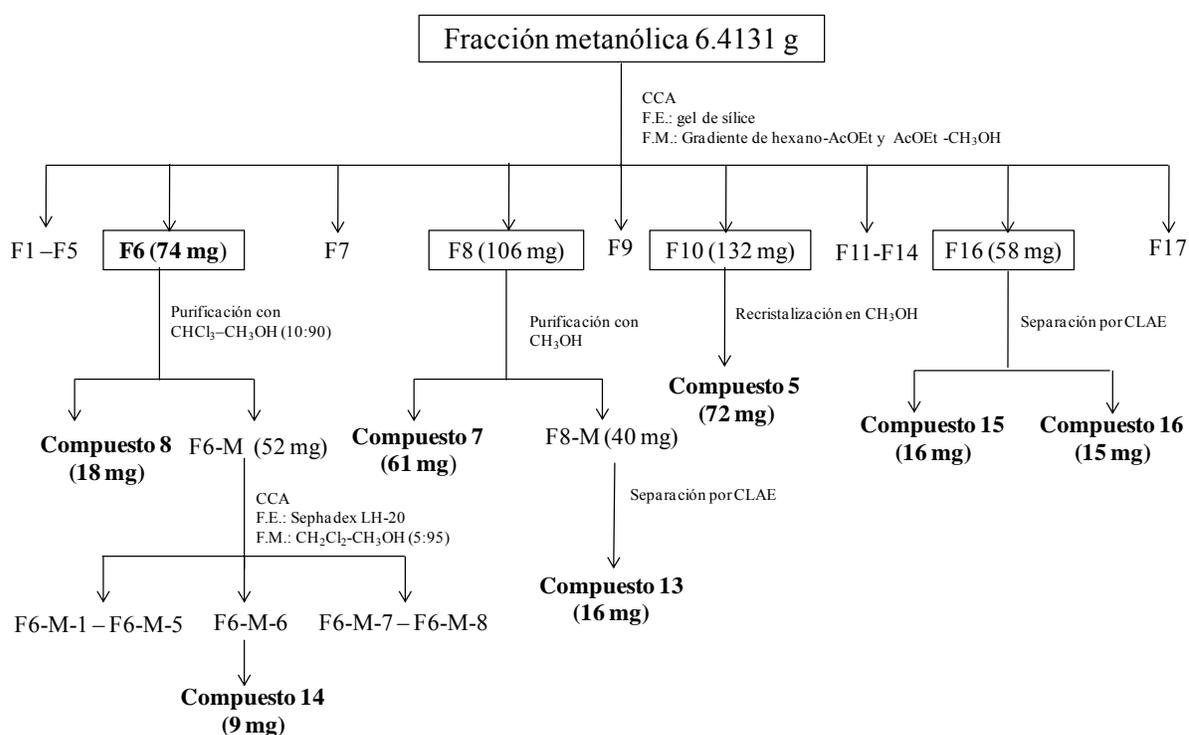


Figura 8. Obtención de estándares a partir de la corteza de *E. caribaeum*.

3.4 Establecimiento del perfil cromatográfico por CCD del extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

El extracto acuoso se analizó mediante una cromatografía en capa delgada utilizando como fase móvil una mezcla de CHCl_3 – CH_3OH (80:20) y 0.2 ml de HOAc. El cromatograma se comparó contra estándares conocidos de productos obtenidos durante el estudio químico (compuestos **5**, **7**, **8**, **13**, **14**, **15**, y **16**). Las muestras fueron disueltas en mezclas de CH_3OH – ACN .

3.5 Establecimiento del perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

El establecimiento del perfil cromatográfico y la identificación de los componentes mayoritarios presentes en el extracto acuoso de *E. caribaeum* se realizó por CLUE utilizando la columna BEH Shield RP18. Como sistema de elución se utilizó un gradiente de acetonitrilo-agua (Tabla 4). El flujo fue de 0.4 mL/min, y la temperatura de la columna de 35 °C. Los compuestos se detectaron a las longitudes de onda (λ) de 327 nm y 248 nm. Una vez filtradas las muestras (compuestos o extractos), se inyectaron 10 μL de la solución en todos los casos. La identificación de los compuestos en el cromatograma se llevó a cabo con base en el tiempo de retención y el enriquecimiento con cada uno de los compuestos aislados de *E. caribaeum* y una muestra auténtica de ácido clorogénico (**11**) (Sigma Aldrich, St. Louis Missouri, Missouri, EE.UU.). Para tal fin 1 mg de los compuestos **5**, **7** y **8** se disolvieron en 2 mL de ACN – H_2O (1:1); 1 mg de los compuestos **11**, **13**, **14**, **15**, y **16** se disolvieron en 2 mL de H_2O ; y se procesaron de la misma forma descrita en las líneas anteriores.

Tabla 4. Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE para el establecimiento del perfil cromatográfico de *E. caribaem*

Tiempo	% Acetonitrilo	% H_2O (0.1% Ac. fórmico)
0	16	84
5	16	84
7	30	70
10	30	70
10.5	16	84
12	16	84

3.6. Validación del método analítico para la cuantificación de los componentes del extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

La validación del método analítico desarrollado se realizó con bases en, los lineamientos establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos [ICH Q2 (R1), 2005] y por la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. (2002).

3.6.1 Preparación de la solución de referencia de los estándares

Cada uno de los estándares (5 mg) se disolvieron en 5 mL de H₂O (1 mg/mL). En el caso de **13** fue necesario someter la muestra a un proceso de sonicación durante 15 minutos. Todas las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon.

3.6.2 Preparación de la matriz de trabajo

El extracto acuoso se preparó bajo las condiciones descritas en el inciso **3.3.1**. Este extracto (6 mg) se disolvió en 5 mL de H₂O (1.2 mg/mL). La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon.

3.6.3 Selectividad

La evaluación de la selectividad del método se realizó mediante el registro de los espectros de UV de las muestras de cada uno de los estándares: compuestos **11**, **13**, **14** y **16**, la matriz de trabajo (extracto acuoso) y la matriz enriquecida con los estándares. Las muestras correspondientes a los estándares se analizaron a la concentración de 100 µg/mL; la de la matriz de trabajo a una concentración de 1.2 mg/mL; por último, para medir los espectros de la matriz de trabajo enriquecida con cada estándar, la muestra se preparó añadiendo a una solución de 600 µg/mL de la matriz 50 µg de cada estándar.

3.6.4 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada estándar con cinco niveles de concentración en el rango que se indica en la Tabla 5. Para la construcción de la curva de cada estándar se trabajó con una solución de referencia

Tabla 5. Rango de concentración para la determinación de la linealidad

Estándar	Rango de linealidad ($\mu\text{g/mL}$)
11	10-150
13	50-350
14	10-150
16	10-300

El área bajo la curva (ABC) correspondiente a cada uno de los picos de cada estándar se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $IC(\beta_1)$ no incluye el cero. Se analizaron seis réplicas por cada nivel de concentración.

3.6.5 Linealidad del método y exactitud

La linealidad y exactitud del método se determinaron mediante la adición de tres diferentes concentraciones de los estándares a la matriz de trabajo (Tabla 6). Se evaluaron seis réplicas por concentración.

Tabla 6. Rango de concentración para la evaluación de la linealidad y exactitud del método

Estándar	Rango de concentración ($\mu\text{g/mL}$)
11	10-150
13	50-350
14	10-150
16	10-300

Los valores de ABC resultantes se interpolaron en las curvas de calibración desarrolladas para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ($b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R \geq 0.99$, $R^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{Y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [$IC(\beta_1)$] del porcentaje de recobro.

3.6.6 Precisión

La repetitividad (repetibilidad) y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida (Tabla 7). El análisis se efectuó en tres días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

Tabla 7. Concentración de los estándares para la evaluación de la precisión

Estándar	Concentración (µg/mL)
11	60
13	150
14	50
16	100

3.6.7 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de curvas de calibración con una serie de disoluciones a partir de la solución de referencia. Las disoluciones empleadas contenían entre 1 y 5 µg/mL de los compuestos **11**, **14** y **16**, y entre 5 y 10 µg/mL del compuesto **13**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente a la referencia se graficó con respecto a la concentración en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

3.6.8 Estabilidad

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de cada uno de ellos en muestras preparadas a una concentración de 100 µg/mL sometidas a condiciones de refrigeración y ambientales e hidrólisis ácida. Las muestras se analizaron

por triplicado y las mediciones se obtuvieron a las 12 y 24 horas para el caso de las condiciones de temperatura.

3.6.9 Optimización del tiempo de extracción

La optimización del tiempo de extracción de los principios activos de la droga cruda de *E. caribaeum* se realizó, mediante la preparación de una serie de infusiones (1.5 g de planta en 250 mL de H₂O a 93 °C) variando el tiempo de extracción (*i.e.* 10, 20, 30 y 40 min). Posteriormente, las infusiones se concentraron a sequedad, y se inyectaron en el cromatógrafo (10 µL) a una concentración de 1.2 mg/mL; por cada tiempo de extracción se inyectaron seis réplicas; la reproducibilidad de los perfiles se evaluó con un CV ≤ 2%.

3.6.10 Cuantificación de los compuestos presentes en el extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

Seis miligramos de tres extractos preparados de manera independiente, de cada muestra de *E. caribaeum* (EC-1 y EC-2) se disolvieron en 5 mL de H₂O (1.2 mg/mL). Los compuestos presentes se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones indicadas en la Tabla 4. La concentración de los compuestos **11**, **13**, **14** y **16** se calculó por medio de la interpolación del área bajo la curva (ABC) en las ecuaciones de la recta, obtenidas a partir de las curvas de calibración diseñadas en la evaluación de la linealidad del sistema. La cuantificación del compuesto **15** se realizó con la ecuación obtenida de la curva diseñada para el compuesto **14**. Los compuestos **5** y **7** se cuantificaron por coelución, utilizando la ecuación de la recta diseñada para el compuesto **13** (Suárez, *et al.*, 2007). Por último, para la cuantificación del compuesto **8** se interpoló el área bajo la curva en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración diseñada para el compuesto **16**.

3.7 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de *Exostema caribaeum*, *Hintonia standleyana*, *H. latiflora* y dos muestras comerciales de quina amarilla

Los extractos se prepararon utilizando el procedimiento descrito en el inciso **3.3.1**, se prepararon tres extractos de manera independiente de cada muestra a analizar. Posteriormente, seis miligramos de cada extracto se disolvieron en 5 mL de H₂O (1.2

mg/mL), se filtraron y finalmente se inyectaron (10 μ L) en el cromatógrafo bajo las condiciones indicadas en la Tabla 4.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención y caracterización de marcadores activos a partir del extracto acuoso obtenido de la corteza de *Exostema caribaeum*

La aplicación de diversos procedimientos cromatográficos permitió el aislamiento de varios glicósidos de 4-fenilcumarinas a partir de la infusión de *E. caribaeum*. Este preparado se seleccionó para su análisis considerando que es el de mayor uso en las prácticas médicas populares de México. La aplicación conjunta de las cromatografías en columna abierta (gel de sílice y sephadex) y de alta resolución permitió el aislamiento de 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7), 5-*O*-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13), 5-*O*-(6"-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14), 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15) y 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16). Las estructuras y rendimientos de estos productos se indican en la Tabla 8. De los siete productos aislados, el 15 es un producto natural nuevo, en tanto que 13, 14 y 16 se describen por vez primera en *E. caribaeum*; previamente estos compuestos se habían aislado de las cortezas de *Exostema mexicanum*, *Hintonia latiflora* y *Coutarea hexandra* (Aquino, *et al.*, 1988; Mata, *et al.*, 1992; Guerrero-Analco, *et al.*, 2005; Froelich, *et al.*, 2006). En general todos los compuestos se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos, comparando la información obtenida en los diferentes espectros generados en el presente estudio (ANEXO 1) con las descritas previamente en la literatura.

Tabla 8. Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de la corteza de *E. caribaeum*

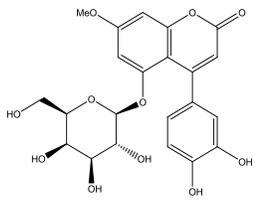
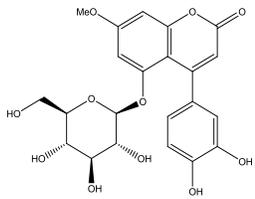
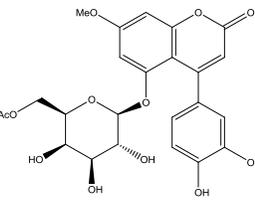
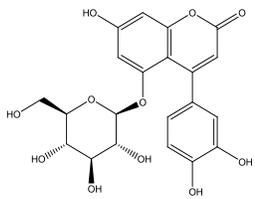
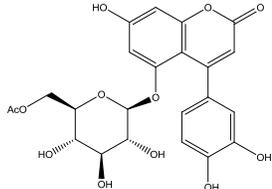
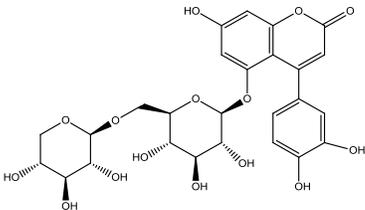
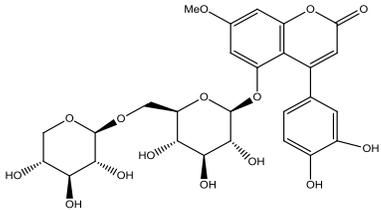
Compuesto aislado	Fracción y rendimiento	Fuente anterior y Referencia
 <p>5-<i>O</i>-β-D-Galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5)</p>	F10 (72 mg)	1. Corteza de <i>E. caribaeum</i> (Mata <i>et al.</i> , 1987). 2. Hojas de <i>Exostema mexicanum</i> (Froelich, <i>et al.</i> , 2006). 3. Corteza de <i>Hintonia latiflora</i> (Guerrero-Analco, <i>et al.</i> , 2007). 4. Hojas de <i>Hintonia latiflora</i> (Cristians, <i>et al.</i> , 2009).
 <p>5-<i>O</i>-β-D-Glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7)</p>	F8 (61 mg)	1. Corteza de <i>E. caribaeum</i> (Mata <i>et al.</i> , 1988) 2. Corteza de <i>E. mexicanum</i> (Mata, <i>et al.</i> , 1990). 2. <i>Coutarea hexandra</i> (Aquino <i>et al.</i> , 1988). 3. Corteza de <i>Hintonia latiflora</i> (Guerrero-Analco, <i>et al.</i> , 2005; Argotte-Ramos <i>et al.</i> , 2006). 4. Hojas de <i>Hintonia latiflora</i> (Cristians, <i>et al.</i> , 2009).
 <p>5-<i>O</i>-(6''-Acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8)</p>	F6 (18 mg)	1. Corteza de <i>E. caribaeum</i> (Mata, <i>et al.</i> , 1988).
 <p>5-<i>O</i>-β-D-Glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13)</p>	F8-M (16 mg)	1. <i>Coutarea hexandra</i> (Aquino, <i>et al.</i> , 1988). 2. Hojas de <i>Exostema mexicanum</i> (Froelich, <i>et al.</i> , 2006). 3. Corteza de <i>Hintonia latiflora</i> (Guerrero-Analco, <i>et al.</i> , 2007).

Tabla 8. Metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de la corteza de *E. caribaeum* (Cont.)

Compuesto aislado	Fracción y rendimiento	Referencia
 <p>5-<i>O</i>-(6''-Acetil-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14))</p>	F6-M-6 (9 mg)	1. Corteza de <i>Hintonia latiflora</i> (Mata <i>et al.</i> , 1992).
 <p>5-<i>O</i>-[β-D-Xilopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15)</p>	F16 (16 mg)	
 <p>5-<i>O</i>-[β-D-Xilopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (16)</p>	F16 (15 mg)	1. <i>Coutarea hexandra</i> (Aquino, <i>et al.</i> , 1988). 2. Corteza de <i>Hintonia latiflora</i> (Guerrero-Analco, <i>et al.</i> , 2005).

Los valores de las constantes espectroscópicas y espectrométricas utilizadas para la caracterización de **15** se resumen en el Tabla 9, su fórmula molecular se estableció por ESI modo positivo como $C_{26}H_{28}O_{15}$. Los fragmentos de masa principales se apreciaron en una relación de masa carga 581 $[M+H]^+$ y 449 $[M+H-132]^+$. El espectro en el IR fue muy similar al de los otros compuestos aislados, presentando bandas de absorción para grupos hidroxilo (3279 cm^{-1}), carbonilo de α -pirona (1685 cm^{-1}) y aromaticidad (~ 1600 y $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$). Los espectros de RMN fueron semejantes al del producto **16** (Figura 9), difiriendo

tan solo en la ausencia de las señales para el grupo metoxilo en la posición C-7. Así, el espectro de RMN-¹³C (Figura 10) presentó 26 señales de las cuales 11 corresponden a una unidad disacárida y 15 corresponden al núcleo de una 4-fenilcumarina tetra sustituida por grupos hidroxilos en las posiciones C-7, C-3' y C-4' y la unidad disacárida en C-5. Las asignaciones de los distintos carbonos se presentan en la Tabla 9. La presencia de la unidad disacárida en la posición C-5 se confirmó al analizar el espectro de RMN-¹H en el cual las señales de los hidrógenos anoméricos se observaron como dos dobletes diamagnéticamente desplazados en δ_H 4.73 [(d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'')] y δ_H 4.31 ((d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-1'''). Así mismo, los valores de las constantes de acoplamiento permitieron inferir las orientaciones axial de estos hidrógenos, por consiguiente las uniones glicosídicas se establecen a través de los hidroxilos β orientados. El espectro de RMN-¹H presenta también tres conjuntos de señales en la región aromática: la primera, correspondiente a dos hidrógenos *meta*-relacionados (sistema AB) asignables a H-6 [δ_H 6.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H)] y H-8 [δ_H 6.47 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H)] del anillo B de la 4-fenilcumarina; el segundo grupo corresponde a un sistema ABC atribuible a los hidrógenos del anillo C de la 4-fenilcumarina en δ_H 6.80 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-2'), δ_H 6.80 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H-5') y δ_H 6.71 (dd, $J = 7.8, 2.2$ Hz, 1H, H-6'); por último en δ_H 5.86 se observa el singulete diagnóstico de H-3.

Los cuadros de conectividad observados en los espectros de correlación homonuclear (COSY, Figura 11) y los desplazamiento químicos observados en el espectro de RMN-¹³C para el disacárido unido a C-5 permitieron identificar a la glucosa y xilosa como sus carbohidratos componentes (Guerrero-Analco, *et al.*, 2005; Cristians, *et al.*, 2009). Las señales de la glucosa se apreciaron en δ_H 4.73 (H-1'' d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.05 (H $_{\alpha}$ -6'' da, $J = 10.8$ Hz, 1H), 3.73 (H $_{\beta}$ -6'' dd, $J = 11.3, 6.5$ Hz, 1H), 3.5 (H-5'' m, 1H), 3.26 (H-3'', 1H), 3.21 (H-4'' m, 1H), 2.71 (H-2'' dd, $J = 8.6, 7.4$ Hz, 1H); estas señales correlacionan en el espectro HSQC con las presentes en δ_C 100.2 (C-1''), 76.4 (C-5''), 76.1 (C-3''), 73.3 (C-2''), 69.6 (C-4''), 68.2 (C6''), respectivamente. Las de la xilosa [δ_H 4.31 (H-1''' d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.82 (H $_{\alpha}$ -5''' dd, $J = 11.5, 5.3$ Hz, 1H), 3.46 (H-4''' ddd, $J = 10.1, 9.9, 5.3$ Hz, 1H), 3.26 (H-3''', 1H), 3.21 (H-2''' m, 1H), 3.08 (H $_{\beta}$ -5''' dd, $J =$

11.5, 10.3 Hz, 1H) correlacionaron en el espectro HSQC con las señales en δ_C 103.8 (C-1'''), 76.2 (C-3'''), 73.7 (C-2'''), 69.8 (C-4'''), 65.5 (C-5'''). La pérdida de 132 uma a partir del ion pseudomolecular permitió establecer que la xilosa es el azúcar externo. Las correlaciones observadas en el espectro HMBC indicaron que la glucosa se une directamente a C-5 a través de un enlace *O*- β -glicosídico [C-5 (δ_C 156.0) y H-1'' (δ_H 4.73) y la unión 1 \rightarrow 6 entre la xilosa y la glucosa de igual manera se estableció con base en las correlaciones observadas [C-6'' (δ_C 69.8) y H-1''' (δ_H 4.31)]. La naturaleza D de ambos azúcares se consideró con base en consideraciones de tipo biogénico.

Tabla 9. Datos de RMN- ^{13}C (100 MHz) y 1H (500 MHz) en CH_3OH-d_4 del compuesto **15**.

Posición	$\delta^{13}C$	δ^1H (J en Hz)
2	161.9	
3	111.0	5.86 (s)
4a	103.1	
4	157.0	
5	156.0	
6	99.4	6.64 (d, 1.8)
7	162.2	
8	97.3	6.47 (d, 1.8)
8a	156.8	
1'	131.6	
2'	114.9	6.80 (d, 1.8)
3'	144.2	
4'	145.6	
5'	114.3	6.80 (d, 8)
6'	119.7	6.71 (dd, 7.8, 2.2)
1''	100.2	4.73 (d, 7.5)
2''	73.3	2.71 (dd, 8.6, 7.4).
3''	76.1	3.26
4''	69.6	3.21 m
5''	76.4	3.5 m
6''	68.2	4.05 (da, 10.9) 3.73 (dd, 11.3, 6.5)
1'''	103.8	4.31 (d, 7.4)
2'''	73.7	3.21 m
3'''	76.2	3.26
4'''	69.8	3.46 (ddd, 10.1, 9.9, 5.3)
5'''	65.5	3.82 (dd, 11.5, 5.3) 3.08 (dd, 11.5, 10.3)

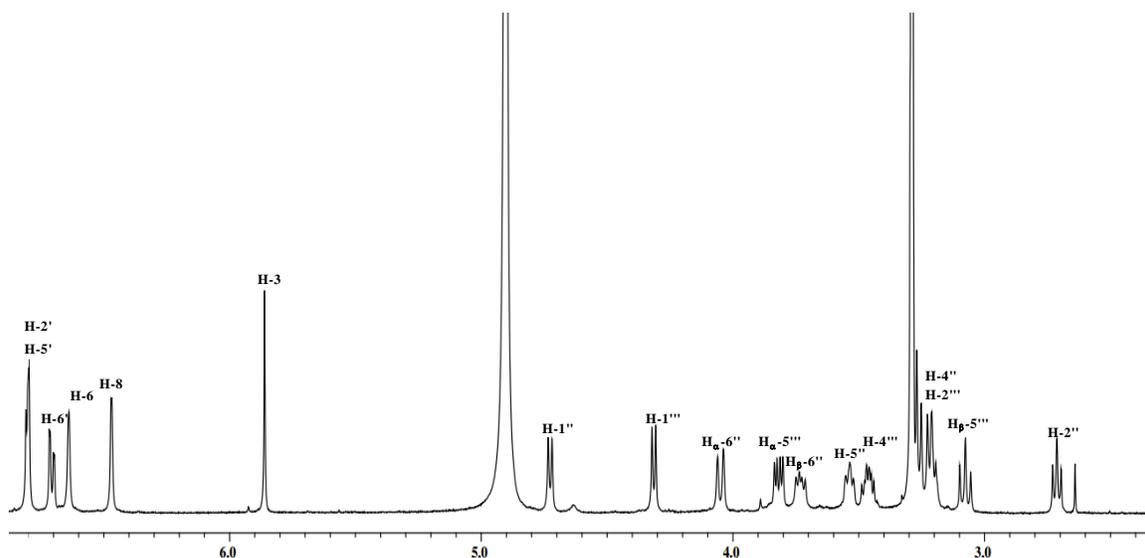


Figura 9. Espectro de RMN-¹H del compuesto **15** (CH₃OH-*d*₄, 500 MHz).

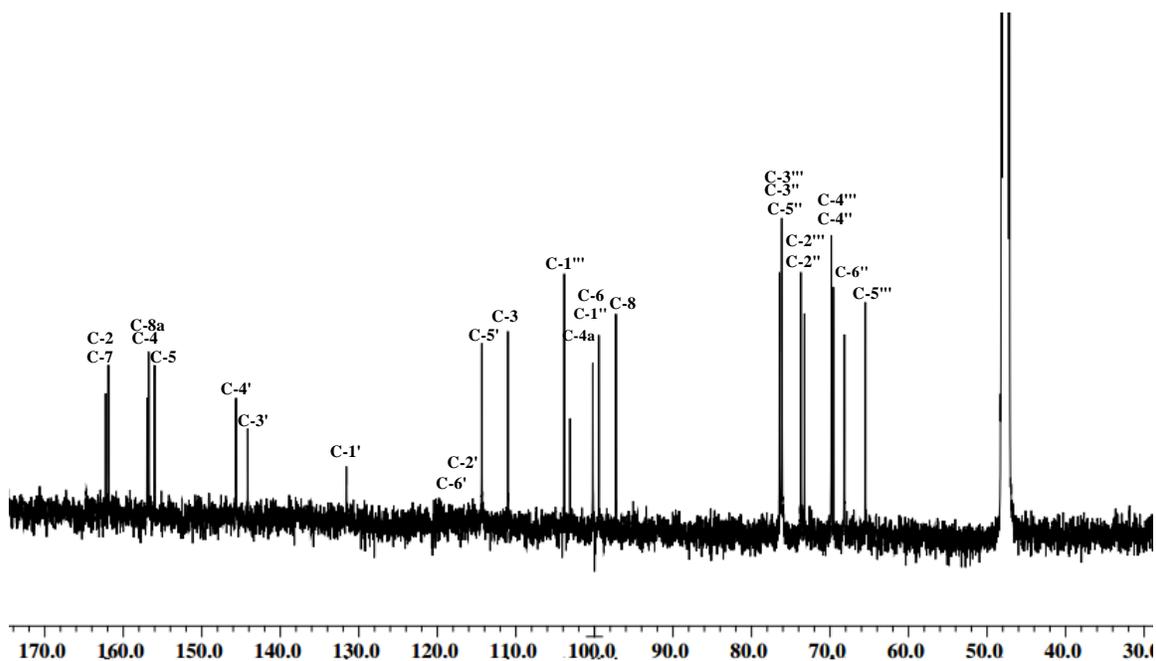


Figura 10. Espectro de RMN-¹³C del compuesto **15** (CH₃OH-*d*₄, 125 MHz).

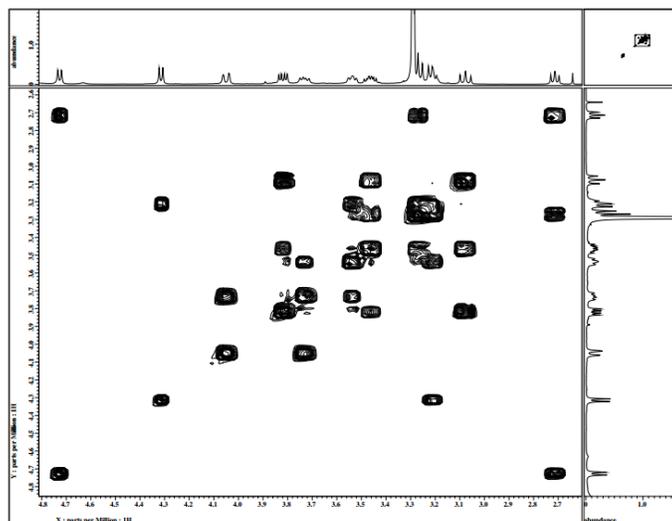


Figura 11. Vista parcial del espectro COSY del compuesto 15.

4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos

Una vez obtenidos los estándares se procedió al establecimiento de los perfiles cromatográficos de utilidad para los ensayos de identidad y composición de la droga cruda. Para el establecimiento de estos perfiles se pueden utilizar varias técnicas analíticas, tanto cromatográficas (CLAE, CCF, CG-MS) como espectroscópicas (RMN), siendo la Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia (CLUE) una de las más utilizadas debido a su sensibilidad, reproducibilidad y a la posibilidad de utilizar una gran variedad de soportes cromatográficos, mismos que permiten la resolución de mezclas muy complejas, de los extractos de las drogas crudas (Gong, *et al.*, 2003). La cromatografía en capa delgada es también utilizada para las pruebas de identidad debido a que es un procedimiento económico y fácil de implementar (Liang, *et al.*, 2004).

4.2.1 Perfil cromatográfico por CCD del extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

El extracto acuoso íntegro se analizó por CCD utilizando cromatofolios de aluminio cubiertos de gel de sílice. Para tal fin se ensayaron diferentes sistemas de elución y la mejor mezcla resultó ser CHCl_3 - CH_3OH (80:20) y 0.2 ml de HOAc. La placa se visualizó con una lámpara de UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y se reveló con una solución de

sulfato cérico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12. En la placa se puede observar que los productos mayoritarios corresponden a las 4-fenilcumarinas **5, 7, 8, 13-16**. Estos resultados se corroboraron al realizar las coeluciones de los compuestos con el extracto.

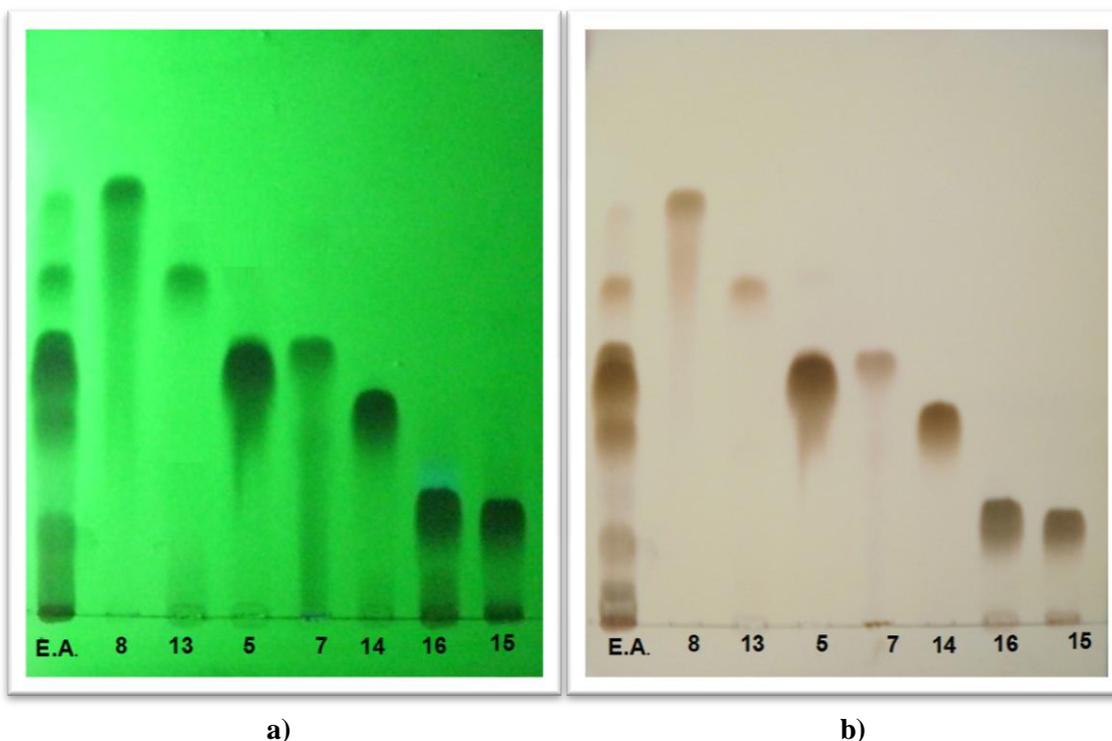


Figura 12. Perfil cromatográfico por CCD (gel de sílice) del extracto acuoso y compuestos aislados, utilizando $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (80:20) y 0.2 mL AcOH como fase móvil. **a)** Placa visualizada con una lámpara de UV $\lambda = 254$; **b)** Placa revelada con sulfato cérico.

4.2.2 Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de *Exostema caribaeum*

Para el desarrollo del perfil cromatográfico adecuado fue necesario establecer la fase estacionaria, temperatura de la columna, composición de la fase móvil, el gradiente de elución y la longitud de onda (λ) adecuadas, de tal forma que la separación cromatográfica resultante fuese de buena calidad.

Como fase estacionaria se seleccionó una columna de fase reversa considerando el hecho de que la mayoría de los reportes descritos para separación y purificación de 4-fenilcumarinas refieren el uso de este tipo de columnas (Mata, *et al.*, 2008). El modo de elución que mejor funcionó fue el de gradiente de tipo lineal; así se ensayaron diferentes mezclas de disolventes (CH₃OH–H₂O y ACN–H₂O) y gradientes de elución. La fase móvil compuesta por H₂O y ACN funcionó mejor ya que permitió una buena separación de los picos de interés. La adición de distintos ácidos orgánicos a la fase móvil mejoró la resolución así como la forma de los picos; se ensayaron distintas concentraciones de ácido fórmico (0.1-0.5%) y trifluoroacético (0.1-0.05%), mismas que se adicionaron al agua obteniéndose mejores resultados con ácido fórmico en una concentración de 0.1 %. De igual forma, la velocidad de flujo se estableció por ensayo y error, analizando los rangos entre 0.2 a 0.5 mL/min; la mejor velocidad fue la 0.4 mL/min.

El mejor gradiente de elución resultó ser el siguiente: ACN- H₂O [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)] que incluye el acondicionamiento de la columna. La temperatura de la columna se estableció a 35 °C porque de igual manera contribuyó al mejoramiento de la resolución y formas de los picos. Las longitudes de onda utilizadas fueron de 327 nm para 4-fenilcumarinas (Mata, *et al.*, 2008) y 248 para el ácido clorogénico (**11**).

Se identificaron en el perfil cromatográfico los componentes del extracto acuoso mediante la técnica de coelución con los compuestos aislados y caracterizados en este estudio (Tabla 8). Los resultados obtenidos permitieron identificar al compuesto 5-*O*-β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina (**5**) como mayoritario. De manera adicional se corroboró la presencia del ácido clorogénico (**11**) en la corteza. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 13.

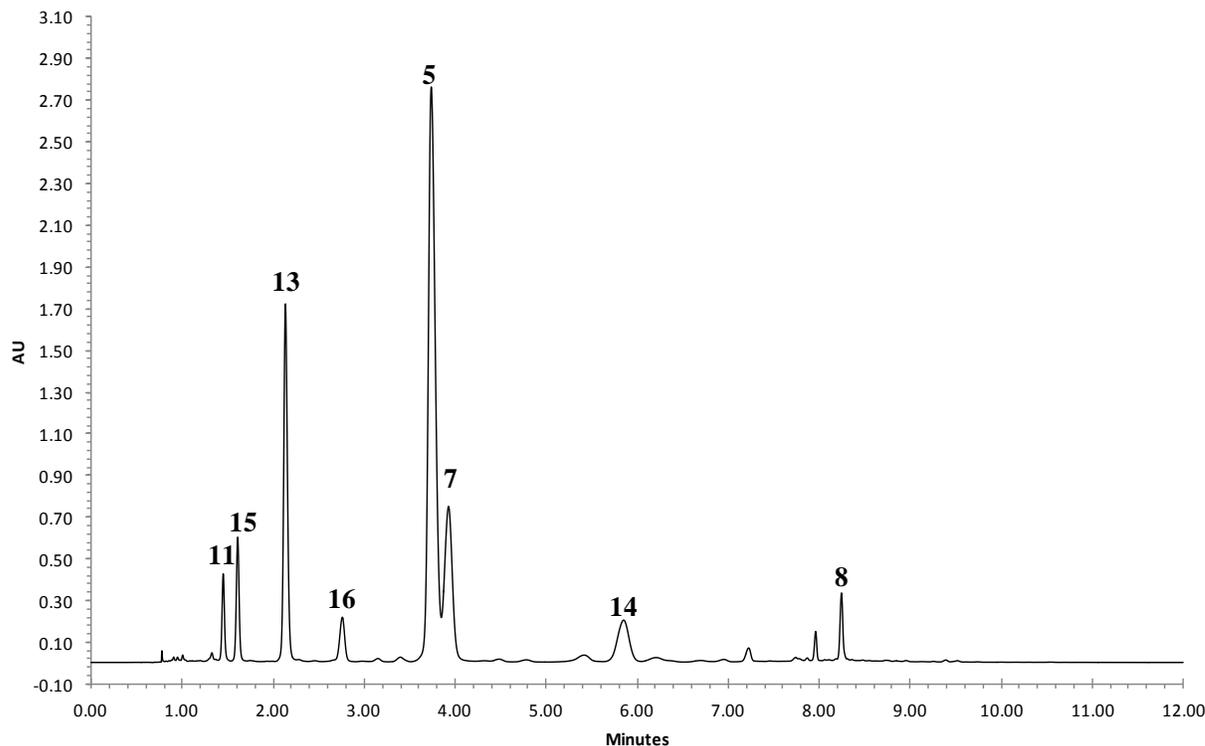


Figura 13. Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de *E. caribaeum*. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. $\lambda = 327 \text{ nm}$. Velocidad de flujo 0.4 mL/min. Tiempos de retención [**11** ($t_R = 1.45 \text{ min}$); **15** ($t_R = 1.61 \text{ min}$); **13** ($t_R = 2.12 \text{ min}$); **16** ($t_R = 2.76 \text{ min}$); **5** ($t_R = 3.74 \text{ min}$); **7** ($t_R = 3.80 \text{ min}$); **14** ($t_R = 5.85 \text{ min}$); **8** ($t_R = 8.25 \text{ min}$)].

4.3. Validación del método analítico

Una vez establecidos los perfiles cromatográficos se procedió a la validación de un método analítico para la cuantificación simultánea de 4-fenilcumarinas y de ácido clorogénico (**11**) presentes en dos muestras de *E. caribaeum* (EC-1 y EC-2). En el presente estudio, los parámetros de calidad fueron evaluados de acuerdo a las Guías de Validación publicadas por la FDA (ICH Q2 (R1), 2005) y por la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. (2002). La selección de estándares para la validación del método se realizó considerando la solubilidad de los compuestos y la resolución observada en el cromatograma. Se

realizaron pruebas de solubilidad en agua de todos los compuestos aislados, los compuestos **5**, **7** y **8** son insolubles o parcialmente solubles, mientras que **11**, **13**, **14**, **15** y **16** son totalmente solubles en agua. Con base en estas consideraciones y la pureza los compuestos **11**, **13**, **14** y **16** fueron seleccionados como estándares. Todos los análisis del ácido clorogénico (**11**) se realizaron a 248 nm (ANEXO 2) y los de las 4-fenilcurmarinas a 327 nm.

4.3.1 Selectividad

Un método es selectivo cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se relaciona únicamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en una muestra de análisis (Chow, *et al.*, 2004; ICH Q2(R1), 2005; WHO, 2007). La selectividad se evaluó mediante el registro de los espectros de UV de las muestras de cada uno de los estándares (compuestos **11**, **13**, **14** y **16**), la matriz de trabajo (extractos acuosos) y la matriz enriquecida con los estándares.

Los resultados obtenidos (Figuras 14-17) permiten establecer que los máximos de absorción de los espectros obtenidos al 50% y 100% de altura de cada pico son los mismos, garantizando la pureza del pico en todas las muestras; la adición del estándar a la matriz de trabajo, produjo un incremento en la respuesta analítica de igual manera sin modificar los máximos de absorción. Estos resultados nos indican que la respuesta analítica observada se debe únicamente a la presencia de 4-fenilcurmarinas y ácido clorogénico (**11**).

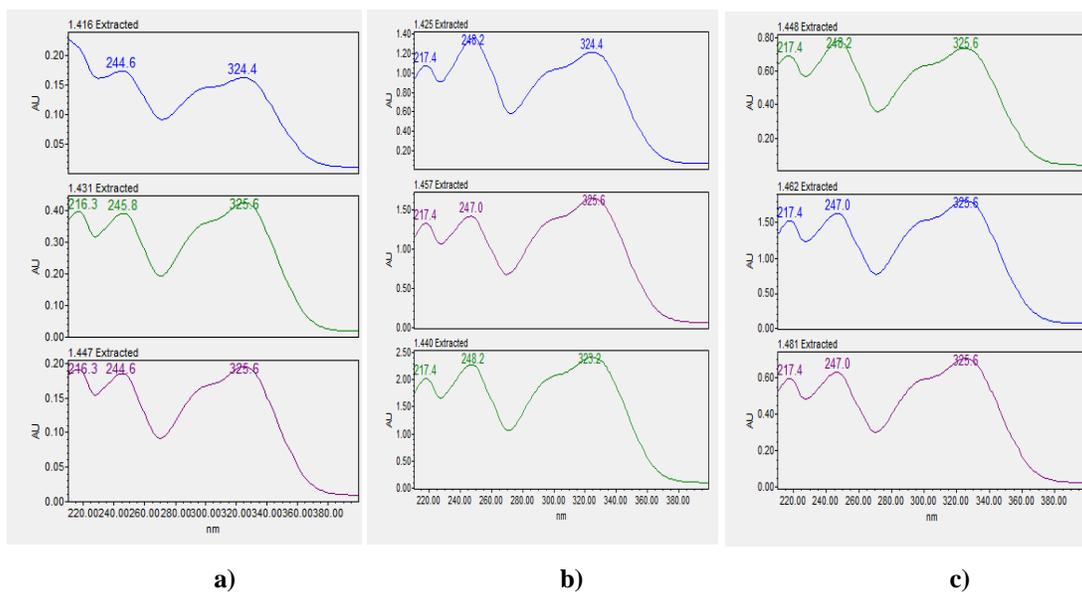


Figura 14. Espectros de UV del estándar **11** en tres diferentes muestras. **a)** Matriz (1.2 mg/mL); **b)** Estándar (100 $\mu\text{g/mL}$); **c)** Matriz (600 $\mu\text{g/mL}$) + Estándar (50 $\mu\text{g/mL}$).

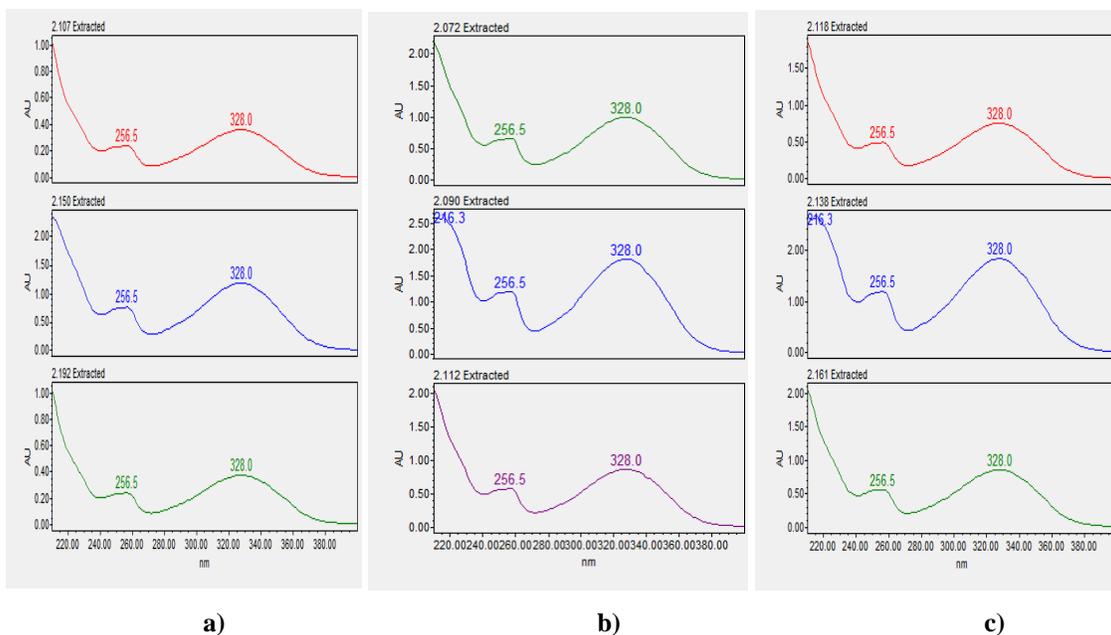


Figura 15. Espectros de UV del estándar **13** en tres diferentes muestras. **a)** Matriz (1.2 mg/mL); **b)** Estándar (100 $\mu\text{g/mL}$); **c)** Matriz (600 $\mu\text{g/mL}$) + Estándar (50 $\mu\text{g/mL}$).

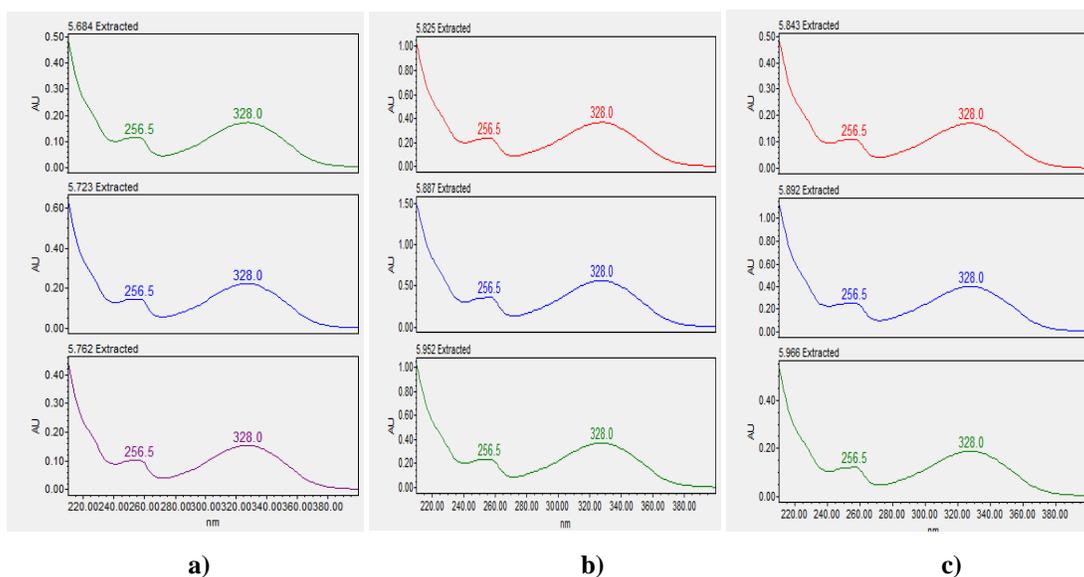


Figura 16. Espectros de UV del estándar **14** en tres diferentes muestras. **a)** Matriz (1.2 mg/mL); **b)** Estándar (100 $\mu\text{g/mL}$); **c)** Matriz (600 $\mu\text{g/mL}$) + Estándar (50 $\mu\text{g/mL}$).

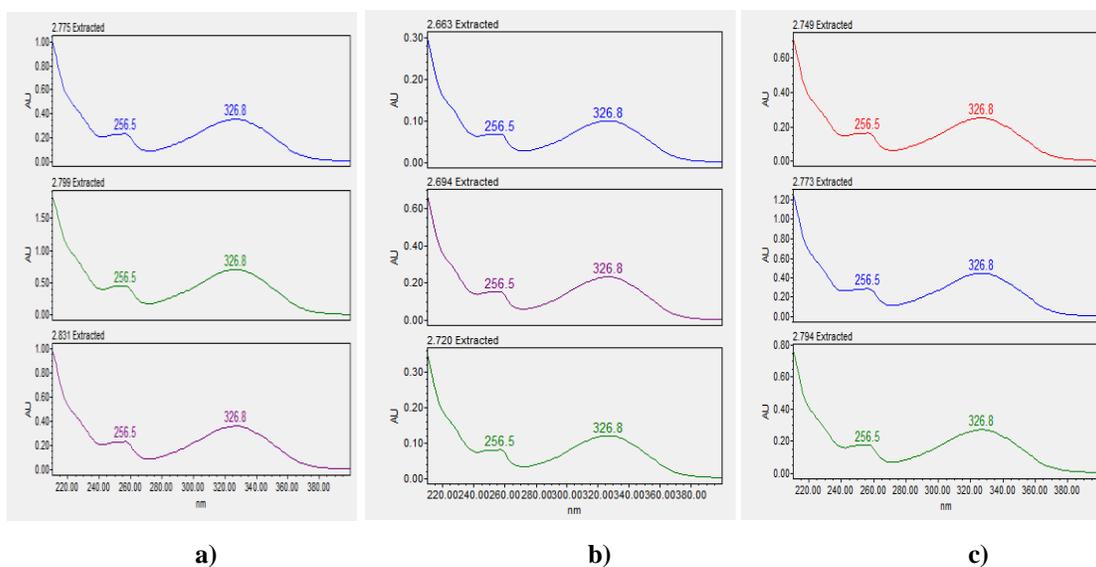


Figura 17. Espectros de UV del estándar **16** en tres diferentes muestras. **a)** Matriz (1.2 mg/mL); **b)** Estándar (100 $\mu\text{g/mL}$); **c)** Matriz (600 $\mu\text{g/mL}$) + Estándar (50 $\mu\text{g/mL}$).

4.3.2 Linealidad del sistema

Un sistema es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo, en un rango de concentraciones establecidas, son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (Chow, *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración para cada estándar con cinco niveles de concentración. Los compuestos utilizados como referencia durante el desarrollo del método analítico tienen una pureza mayor al 95 % de acuerdo con los análisis cromatográficos y espectroscópicos correspondientes. Los resultados de las curvas de calibración se resumen en la Tabla 10 y en las Figuras 18-21. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple, permitiendo establecer la linealidad del sistema cromatográfico en el intervalo de concentraciones analizadas. Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema se resumen en la Tabla 11.

Para evaluar si las ecuaciones de regresión obtenidas describen satisfactoriamente la relación entre la concentración y la respuesta analítica, se realizó un análisis de variancia de la regresión lineal. El resultado de tal análisis indicó que los estadísticos de Fisher (F) calculados [**11** (6185.27); **13** (4030.69); **14** (21867.71); **16** (153354.85)] son distintos del crítico [$F_{0.05(1, 28)} = 4.19$]. Entonces, la variación en la respuesta analítica se encuentra explicada por el modelo propuesto, que es lineal en el intervalo de concentraciones ensayadas.

Tabla 10. Resultados experimentales de las curvas de calibración de los compuestos **11**, **13**, **14** y **16**

Réplica	11		13		14		16	
	$\mu\text{g/mL}$	ABC	$\mu\text{g/mL}$	ABC	$\mu\text{g/mL}$	ABC	$\mu\text{g/mL}$	ABC
1	150	8737754	350	16042251	150	6113153	300	8338483
2	150	9113972	350	15928779	150	6079003	300	8300755
3	150	8654635	350	15067798	150	6073189	300	8292430
4	150	8774954	350	16656633	150	6091633	300	8195171
5	150	8800063	350	15466209	150	6129181	300	8172232
6	150	8755361	350	15293968	150	6147292	300	8165160
1	100	6245058	200	9973792	100	4043969	200	5544369
2	100	6528946	200	9956418	100	4047432	200	5552527
3	100	6185760	200	9821866	100	4044343	200	5529470
4	100	6010176	200	10036240	100	4029963	200	5469489
5	100	6281391	200	9915868	100	4010241	200	5467054
6	100	5863437	200	9917072	100	4015126	200	5476987
1	50	3397523	150	7277892	60	2674277	100	2805094
2	50	3469101	150	7289686	60	2664184	100	2776677
3	50	3289915	150	7439622	60	2653667	100	2794079
4	50	3306384	150	7429234	60	2406770	100	2803418
5	50	3346079	150	7369693	60	2405232	100	2765050
6	50	2912787	150	7362702	60	2403345	100	2751090
1	30	1987519	100	5117143	20	780369	50	1371834
2	30	2130647	100	5123180	20	779349	50	1376910
3	30	1955940	100	5170895	20	795204	50	1374611
4	30	1955687	100	5196437	20	810771	50	1353659
5	30	1948893	100	5188448	20	810536	50	1353659
6	30	1766522	100	5198187	20	813110	50	1360662
1	10	685657	50	2576857	10	447295	10	270949
2	10	689370	50	2578490	10	445970	10	282068
3	10	656484	50	2592446	10	444863	10	276925
4	10	668949	50	2616753	10	389274	10	275488
5	10	674161	50	2609384	10	389337	10	275129
6	10	572970	50	2607838	10	388365	10	282241

Tabla 11. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema de los compuestos **11**, **13**, **14** y **16**

Estadístico	11	13	14	16
(b_1)	58100.60546	43609.6335	40568.9075	27481.84732
(b_0)	228028.662	747088.3239	18862.3837	7413.72038
(R)	0.9977	0.9965	0.9993	0.9999
(R^2)	0.9955	0.9931	0.9987	0.9998
[$IC(\beta_1)$]	56587.6 – 59613.6	42202.9 – 45016.4	40007.1 – 41130.8	27338.1 – 27625.6
$t_{0.975,28}$	2.048	2.048	2.048	2.048

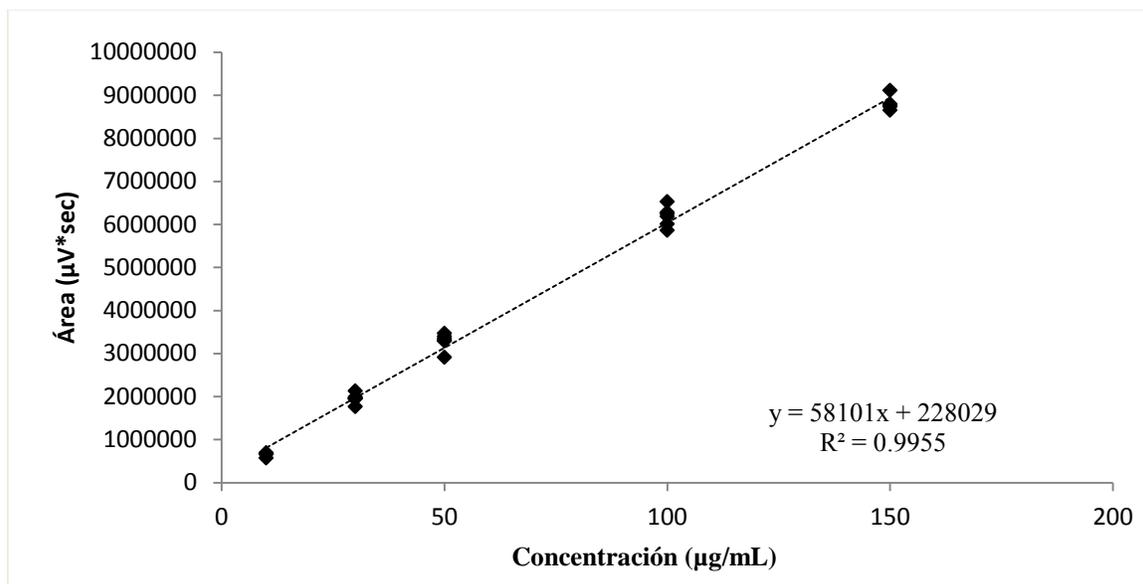


Figura 18. Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **11**.

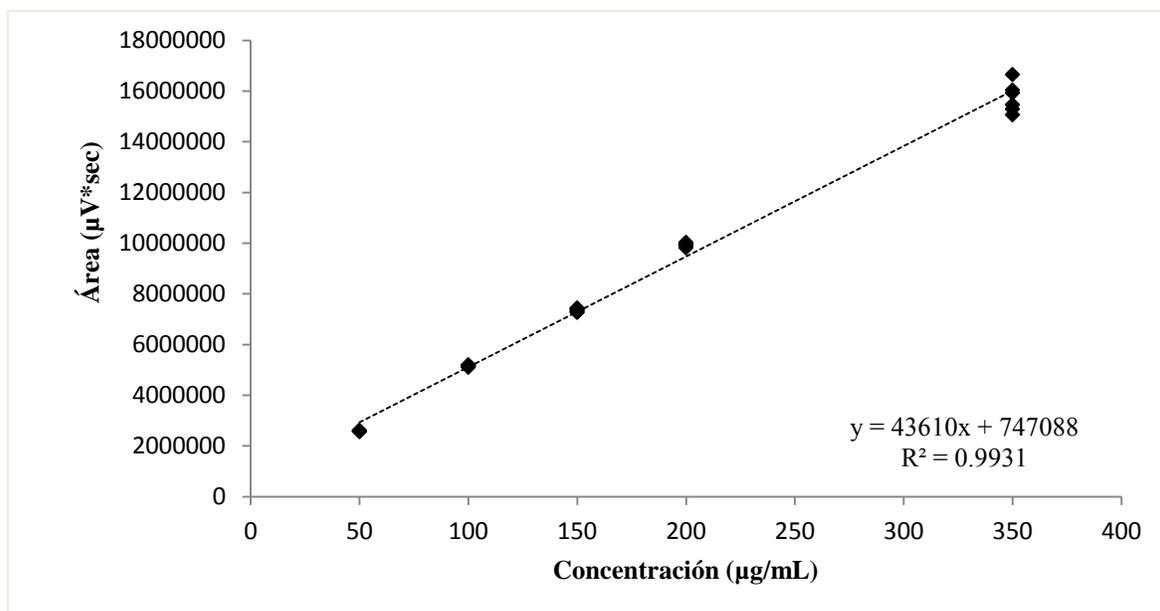


Figura 19. Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **13**.

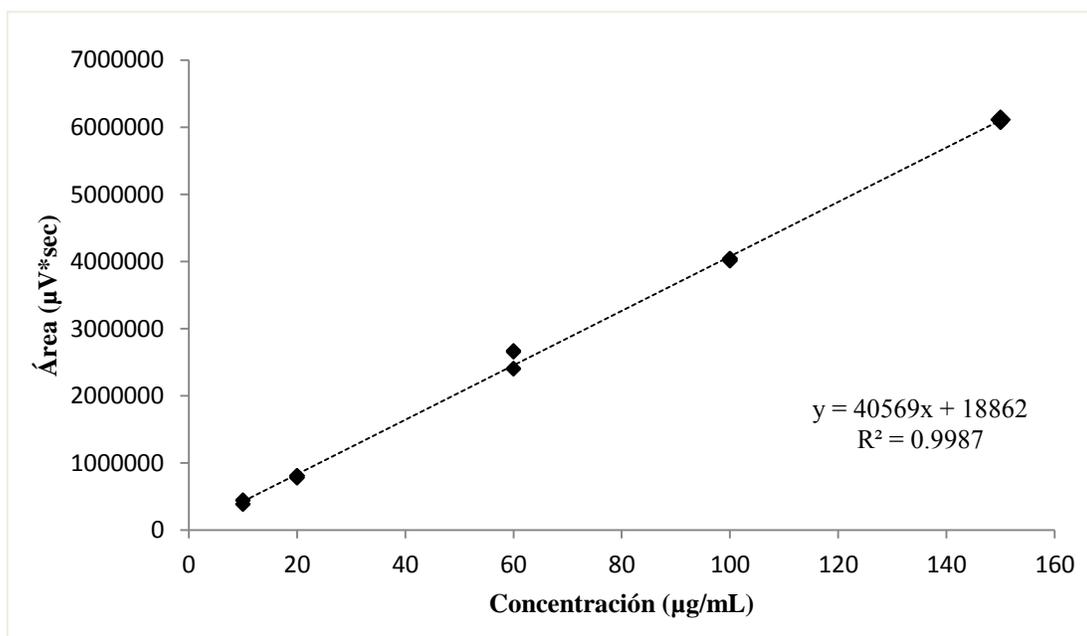


Figura 20. Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **14**.

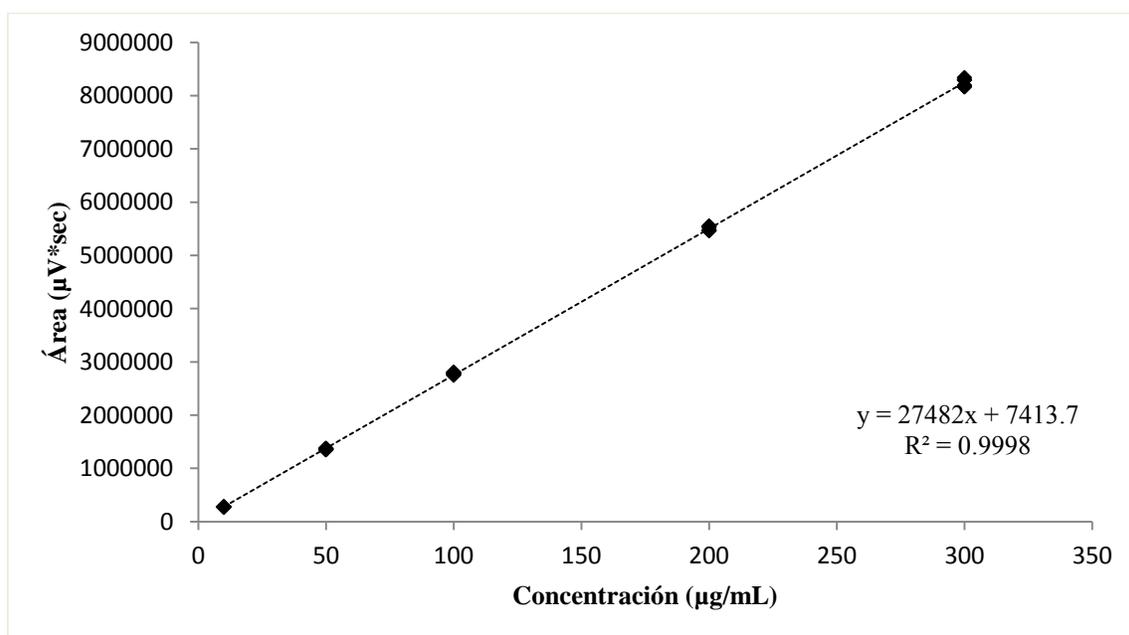


Figura 21. Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema del compuesto **16**.

4.3.3 Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método se evaluó con las curvas de calibración construidas a partir de diferentes concentraciones de los estándares que se adicionaron a la matriz de trabajo. En el caso de **11** y **14**, las concentraciones se encontraban en un intervalo entre 10 y 150 $\mu\text{g/mL}$; para **13** en un intervalo de 50 y 350 $\mu\text{g/mL}$ y finalmente para **16** en un intervalo de 10 y 300 $\mu\text{g/mL}$. En las Tablas 12-15 se muestran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método, el ajuste de datos se realizó mediante regresión lineal simple. Las Figuras 22-25 corresponden a las gráficas de linealidad del método y los parámetros estadísticos calculados se presentan en la Tabla 16.

Los resultados obtenidos permiten determinar que el método analítico es lineal, puesto que cumple con los criterios de aceptación establecidos en las guías normativas seleccionadas para este estudio (ICH Q2 (R1), 2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de la concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las Tablas 12-15. Los resultados obtenidos para todos los compuestos (**11**, **13**, **14** y **16**) se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%) por lo que el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayadas.

Tabla 12. Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto **11** para evaluar la linealidad y exactitud del método

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área µV*sec	Cantidad recuperada (µg/mL)	% Recobro
1	150	8963595	150.35	100.23
2	150	9060876	152.03	101.35
3	150	9029676	151.49	100.99
4	150	8987839	150.77	100.51
5	150	8887322	149.04	99.36
6	150	8905249	149.35	99.56
7	50	3130722	49.96	99.92
8	50	3098820	49.41	98.82
9	50	3106060	49.53	99.07
10	50	3162486	50.51	101.01
11	50	3183097	50.86	101.72
12	50	3134527	50.02	100.05
13	10	810357	10.02	100.23
14	10	800013	9.84	98.45
15	10	807798	9.98	99.79
16	10	802753	9.89	98.92
17	10	808991	10.00	100.00
18	10	806664	9.95	99.59

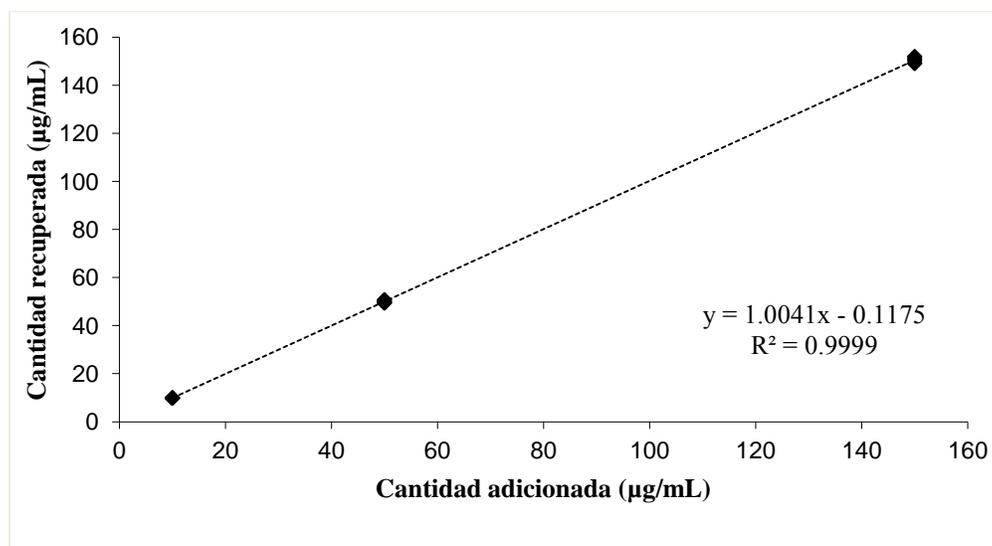


Figura 22. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **11**.

Tabla 13. Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto **13** para evaluar la linealidad y exactitud del método

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área µV*sec	Cantidad recuperada (µg/mL)	% Recobro
1	350	16211386	354.60	101.32
2	350	15897651	347.41	99.26
3	350	15794325	345.04	98.58
4	350	15819077	345.60	98.75
5	350	15807834	345.35	98.67
6	350	16005263	349.88	99.97
7	150	7308262	150.45	100.30
8	150	7185404	147.63	98.42
9	150	7359730	151.63	101.09
10	150	7317320	150.65	100.44
11	150	7285758	149.94	99.96
12	150	7250872	149.14	99.42
13	50	2967386	50.91	101.83
14	50	2945463	50.41	100.82
15	50	2936785	50.21	100.42
16	50	2932804	50.12	100.24
17	50	2916652	49.75	99.50
18	50	2925654	49.96	99.91

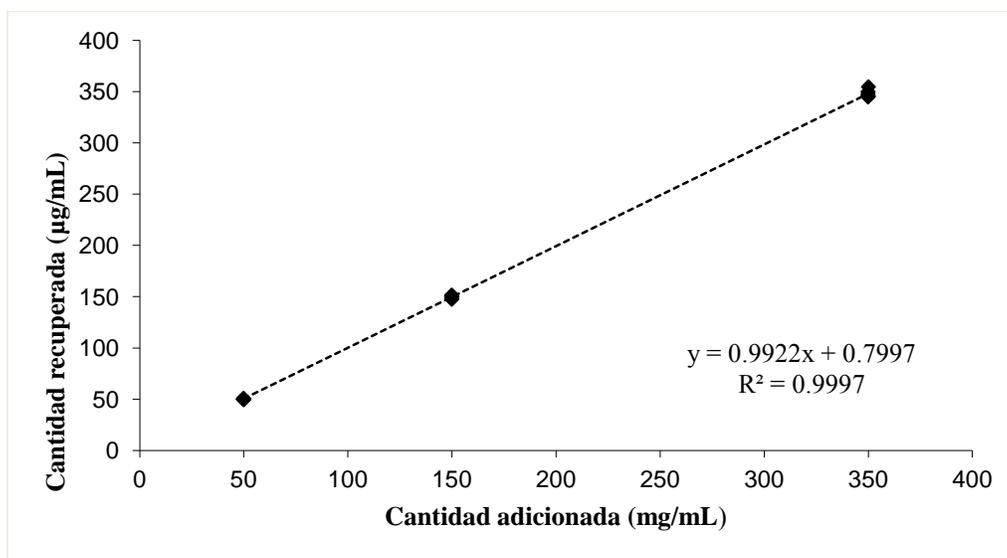


Figura 23. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **13**.

Tabla 14. Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto **14** para evaluar la linealidad y exactitud del método

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área µV*sec	Cantidad recuperada (µg/mL)	% Recuperado
1	150	5998176	147.39	98.26
2	150	6144097	150.98	100.66
3	150	6210286	152.61	101.74
4	150	6163385	151.46	100.97
5	150	6186258	152.02	101.35
6	150	6166872	151.54	101.03
7	60	2408773	58.91	98.18
8	60	2493893	61.01	101.68
9	60	2441436	59.71	99.52
10	60	2499687	61.15	101.92
11	60	2421762	59.23	98.72
12	60	2472858	60.49	100.82
13	10	419972	9.89	98.87
14	10	423704	9.98	99.79
15	10	431711	10.18	101.76
16	10	425485	10.02	100.23
17	10	432553	10.20	101.97
18	10	431136	10.16	101.62

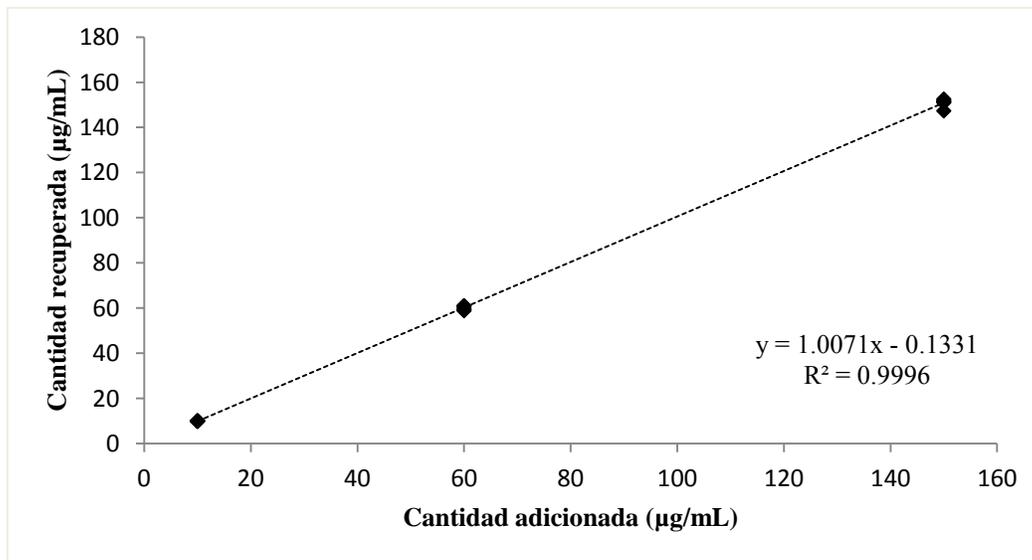


Figura 24. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **14**.

Tabla 15. Resultados experimentales de la curva de calibración del compuesto **16** para evaluar la linealidad y exactitud del método

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área µV*sec	Cantidad recuperada (µg/mL)	% Recobro
1	300	8255783	300.14	100.05
2	300	8133236	295.68	98.56
3	300	8376753	304.54	101.51
4	300	8152374	296.37	98.79
5	300	8328437	302.78	100.93
6	300	8408673	305.70	101.90
7	100	2784611	101.06	101.06
8	100	2718337	98.64	98.64
9	100	2754940	99.98	99.98
10	100	2744671	99.60	99.60
11	100	2768937	100.48	100.48
12	100	2773175	100.64	100.64
13	10	282733	10.02	100.18
14	10	287437	10.19	101.89
15	10	279405	9.90	98.97
16	10	279098	9.89	98.86
17	10	280703	9.94	99.44
18	10	281317	9.97	99.67

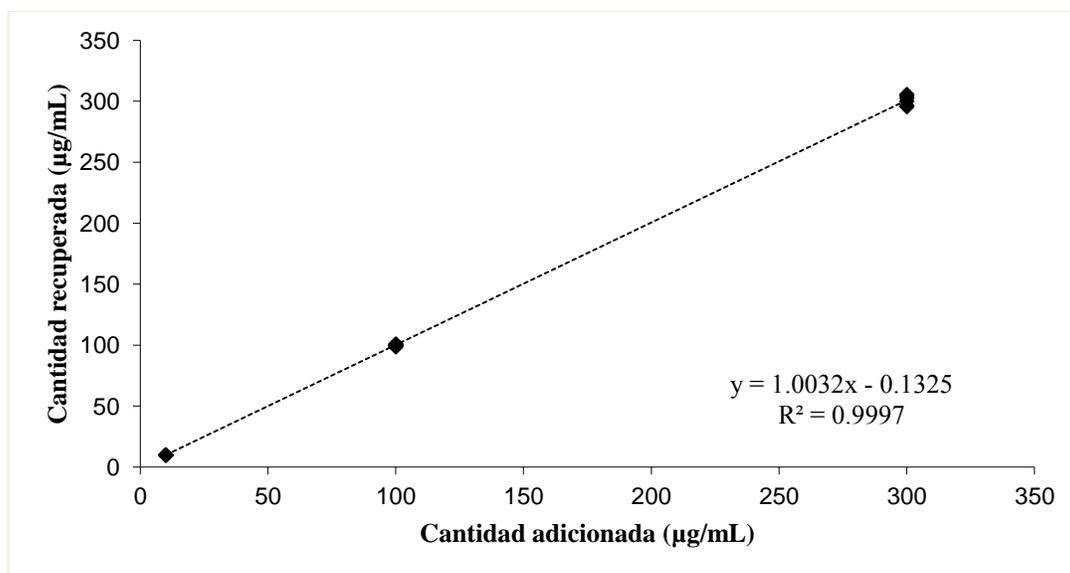


Figura 25. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método del compuesto **16**.

Tabla 16. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método

Estadístico	11	13	14	16
(b_1)	1.0041	0.9922	1.0071	1.0032
(b_0)	-0.1175	0.7997	-0.1331	-0.1325
(R)	0.9999	0.9998	0.9998	0.9998
(R^2)	0.9999	0.9997	0.9996	0.9997
$[IC(\beta_1)]$	0.9979 – 1.0102	0.9832 – 1.0012	0.9969 – 1.0172	0.9905 – 1.0159
$[IC(\beta_0)]$	-0.7400 – 0.5051	-1.4463 – 3.0456	-1.1843 – 0.9180	-2.6544 – 2.3893
$t_{0.975, 16}$	2.12	2.12	2.12	2.12
$CV_{y/x}$	0.9 %	1.06 %	1.4 %	1.6 %

4.3.4 Precisión

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

La precisión se determinó en términos de repetitividad y precisión intermedia. La repetitividad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (Chow, *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007).

La repetitividad (repetibilidad) y la precisión intermedia se establecieron mediante el análisis de seis réplicas a una concentración definida. El análisis se efectuó en tres días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos (Tabla 17) se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

Tabla 17. Evaluación de la precisión

Analito	Concentración (µg/mL)	Repetitividad (%CV)	Precisión intermedia (%CV)
11	50	0.63	1.20
13	150	0.36	0.62
14	60	0.63	1.46
16	100	1.86	1.91

El coeficiente de variación (CV) calculados para este análisis no exceden el 2% (criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$) con lo que se concluye que el método analítico es preciso.

4.3.5 Límite de Detección y Límite de Cuantificación

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (Chow, *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de curvas de calibración con tres niveles de concentraciones comprendidas entre un rango de 1 y 5 µg/mL de los compuestos **11**, **14** y **16**, y entre 5 y 10 µg/mL del compuesto **13**. Así, realizando el análisis estadístico de los datos y utilizando las expresiones matemáticas indicadas en el inciso **3.6.7** de la sección experimental, los valores de LD y LC calculados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Límites de Detección y Límites de Cuantificación de los estándares

Analito	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
11	0.125	0.380
13	0.335	1.015
14	0.076	0.231
16	0.029	0.089

4.3.6 Estabilidad

El objetivo de los estudios de estabilidad, es reportar como la concentración de una muestra varía con el tiempo, bajo influencia de la temperatura, de almacenaje y condiciones químicas. Esta concentración debe ser constante.

La estabilidad de los estándares se evaluó mediante el análisis del contenido de cada uno en las muestras preparadas a una concentración de 100 µg/mL, y sometidas a condiciones de refrigeración, temperatura ambiente e hidrólisis ácida. Las muestras se analizaron por triplicado y las mediciones se obtuvieron a las 12 y 24 horas para el caso de las condiciones de temperatura.

El resultado de la condición de refrigeración se expresa como la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial $|d_i|$. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Estabilidad de los estándares bajo condiciones de temperatura y almacenamiento

Temperatura	% $ d_i $ 11		% $ d_i $ 13		% $ d_i $ 14		% $ d_i $ 16	
	12 Hrs.	24 Hrs.						
Refrigeración	0.65	1.29	0.28	0.26	0.12	0.22	0.46	0.18
Ambiente	1.12	6.29	0.5	1.26	0.22	0.38	0.23	0.38

Los resultados obtenidos, así como, el análisis de los cromatogramas de cada una de las muestras analizadas indican que con excepción de la muestra del estándar **11** (almacenada a temperatura ambiente durante 24 horas), todas son estables al no presentar descomposición o degradación química del compuesto marcador debido a que los valores obtenidos no exceden el recomendado de $|d_i| \leq 2\%$. Todos estándares resultaron ser susceptibles a las condiciones ácidas, esto se comprobó al observar una deformación de los picos en los cromatogramas y la reducción de las áreas.

4.3.7 Optimización del tiempo de extracción

Con la finalidad de establecer el tiempo óptimo de extracción de los principios activos, se monitoreo la variación de su contenido en función del tiempo de extracción, aplicando el mismo método de infusión. Los tiempos ensayados fueron 10, 20, 30 y 40 minutos. Los resultados obtenidos permitieron concluir que el tiempo óptimo para la extracción de los principios activos es el de 30 minutos (Figura 26).

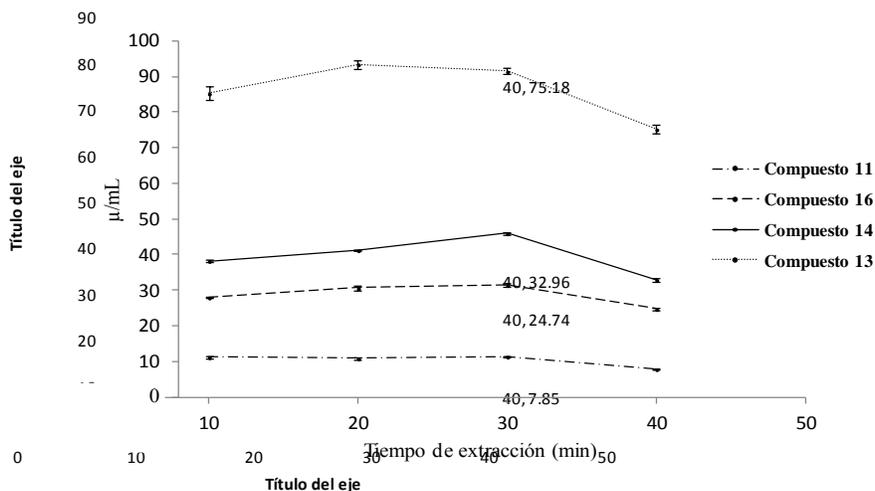


Figura 26. Variación del contenido de principios activos en función del tiempo de extracción.

En las prácticas médicas populares se recomienda extraer la corteza molida durante 30 minutos lo cual coincide con los resultados generados de manera formal en la presente investigación. Esta coincidencia corrobora una vez más que muchas de las prácticas populares se basan en observaciones cuidadosas; probablemente los usuarios monitorean la coloración del preparado en función del tiempo y así establecen cual es la preparación más eficaz. Esta especulación se basa en que fue la principal diferencia física observada en los preparados resultantes de la extracción a diferentes tiempos.

4.3.8 Cuantificación simultánea de metabolitos presentes en los extractos acuosos de *Exostema caribaeum*

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar el contenido de ácido clorgénico (**11**) y de 4-fenilcumarinas en tres extractos preparados de manera

independiente y bajo las mismas condiciones, de dos muestras de *E. caribaeum* (EC-1 y EC-2), el CV de cada pico fue $\leq 2\%$. Para la cuantificación se emplearon las ecuaciones de las rectas descritas para la linealidad del sistema, [$y = 58101x + 228029$ (**11**); $y = 43610x + 747088$ (**13**); $y = 40569x + 18862$ (**14**); $y = 27482x + 7413.7$ (**16**)]. La cuantificación del compuesto **15** se realizó con la ecuación obtenida de la curva diseñada para el compuesto **14**. Los compuestos **5** y **7** se cuantificaron por coelución, utilizando la ecuación de la recta diseñada para el compuesto **13** (Suárez, *et al.*, 2007). Por último, para la cuantificación del compuesto **8** se interpoló el área bajo la curva en la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración diseñada para el compuesto **16**. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 20.

Tabla 20. Cuantificación de los metabolitos presentes en dos muestras de *E. caribaeum* (EC-1 y EC-2)

Compuesto	mg/g	
	EC-1	EC-2
5+7	359.41 \pm 5.58	350.64 \pm 5.33
8	27.70 \pm 0.59	25.67 \pm 0.47
11	11.46 \pm 0.29	8.82 \pm 0.07
13	100.24 \pm 1.63	83.88 \pm 1.39
14	43.37 \pm 1.12	35.75 \pm 0.73
15	16.62 \pm 0.35	27.5 \pm 0.78
16	21.09 \pm 0.17	28.25 \pm 0.27

Las diferencias en el contenido de ácido clorogénico (**11**) y 4-fenilcumarinas en las dos muestras (EC-1 y EC-2) puede deberse a variaciones ontogénicas, estacionales y de origen geográfico, ya que las muestras fueron recolectadas en diferentes épocas del año y en diferentes zonas.

4.4 Análisis comparativo de los perfiles cromatográficos de *E. caribaeum*, *Hintonia standleyana*, *H. latiflora* y dos muestras comerciales de quina amarilla

Como se mencionó previamente *Exostema caribaeum* junto con *Hintonia latiflora*, y *Hintonia standleyana* son las especies del “complejo copalchi” que más se comercializan en México de manera indistinta al igual que muchas especies medicinales de otros complejos de plantas. Además, como muchas otras especies medicinales en nuestro país estas plantas son sujeto de adulteraciones y/o sustituciones. De allí la

importancia del establecimiento de los perfiles cromatográficos para la identificación de cada una de las especies. Por esta razón se comparó el perfil de *E. caribaeum* con los generados para muestras auténticas de *Hintonia standleyana*, *H. latiflora* y para dos muestras comerciales de una corteza llamada quina amarilla.

Para el establecimiento de los perfiles cromatográficos 6 mg de cada extracto se disolvieron en 5 mL de H₂O (1.2 mg/mL) y se analizaron bajo las condiciones indicadas en la Tabla 4. La reproducibilidad de los extractos se evaluó con el CV del ABC del pico **16**, en tres extractos preparados de manera independiente para cada muestra [*Hintonia standleyana* (%CV=1.76); *Hintonia latiflora* (%CV=1.21); quina amarilla 1 (%CV=1.54); quina amarilla 1 (%CV=1.83)]. Los resultados obtenidos (Figuras 27-31) permiten apreciar que existen diferencias y similitudes químicas entre estas especies. Así por ejemplo, los compuestos **13** y **16** están presentes en todas las muestras analizadas, aunque en diferentes proporciones. En cambio los compuestos **8**, **11**, **14** y **15** solo están presentes en *E. caribaeum*.

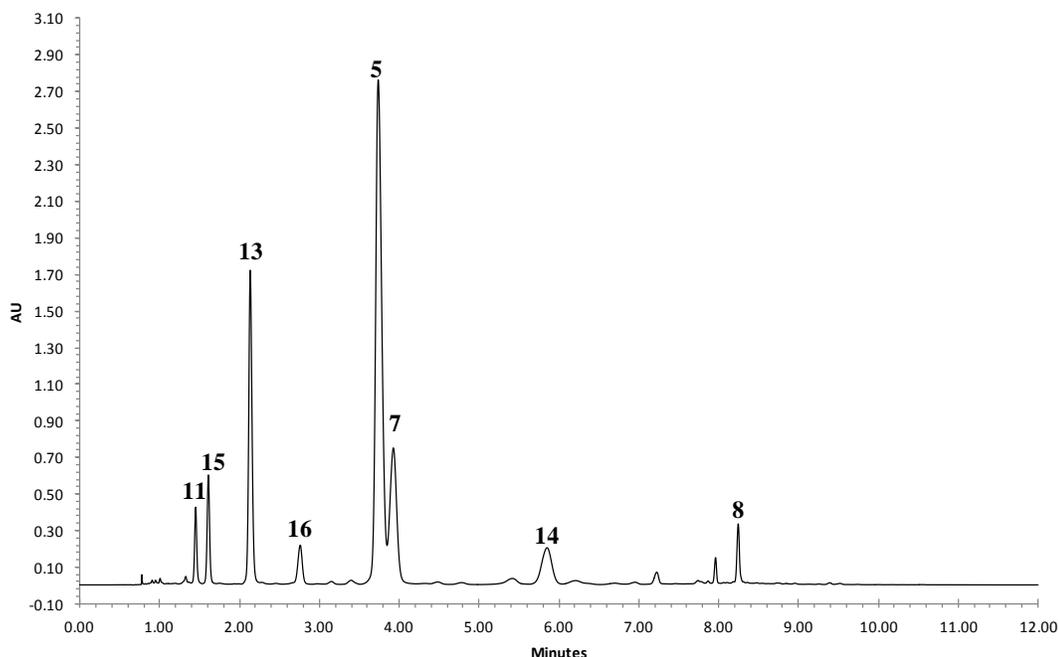


Figura 27. Cromatograma del extracto acuoso de la corteza *Exostema caribaeum*. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, CH₃CN-H₂O (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. λ = 327 nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min.

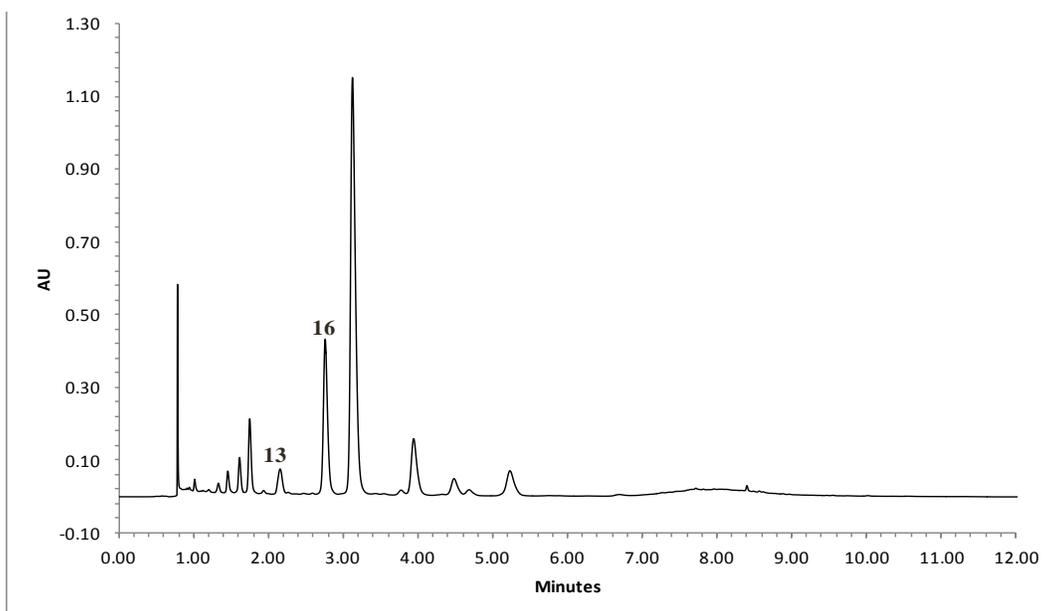


Figura 28. Cromatograma del extracto acuoso de la corteza *Hintonia standleyana*. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. $\lambda = 327$ nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min.

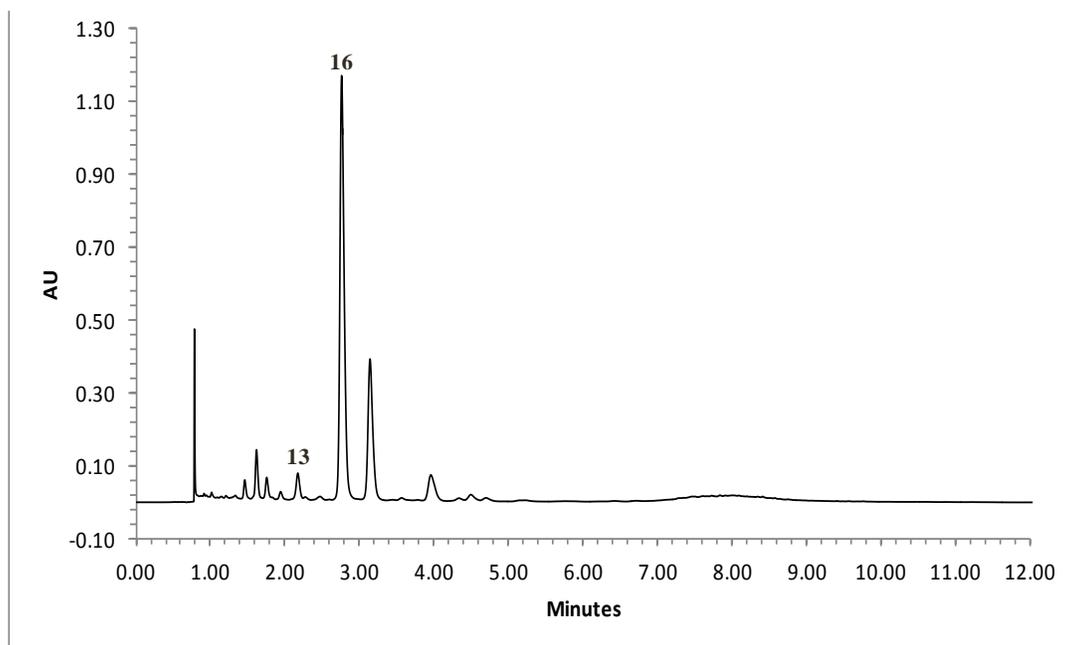


Figura 29. Cromatograma del extracto acuoso de la corteza *Hintonia latiflora*. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. $\lambda = 327$ nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min.

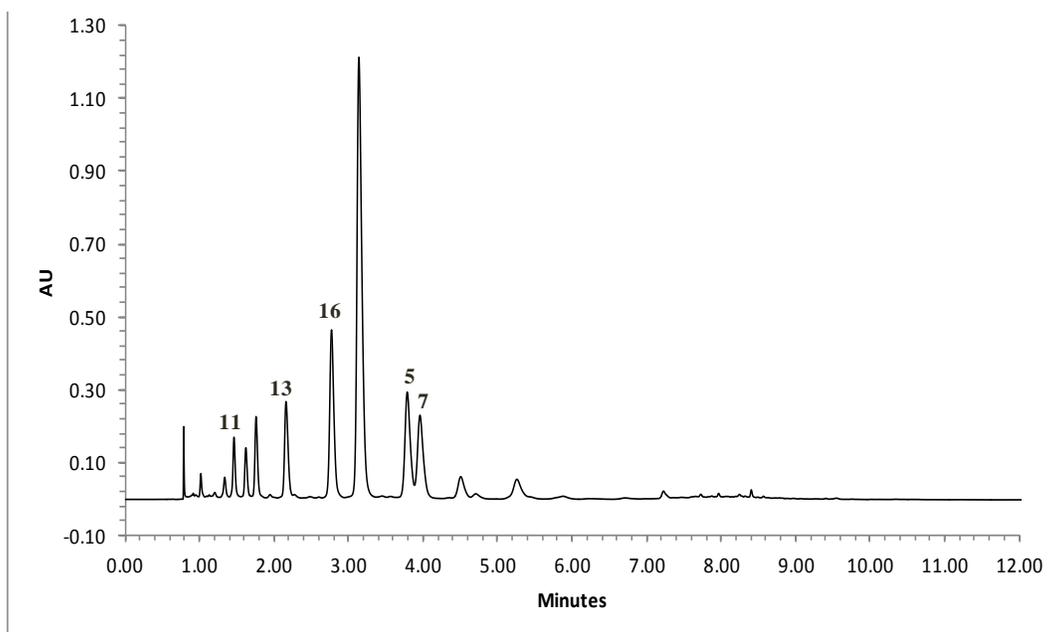


Figura 30. Cromatograma del extracto acuoso de la corteza quina amarilla 1. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. $\lambda = 327$ nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min.

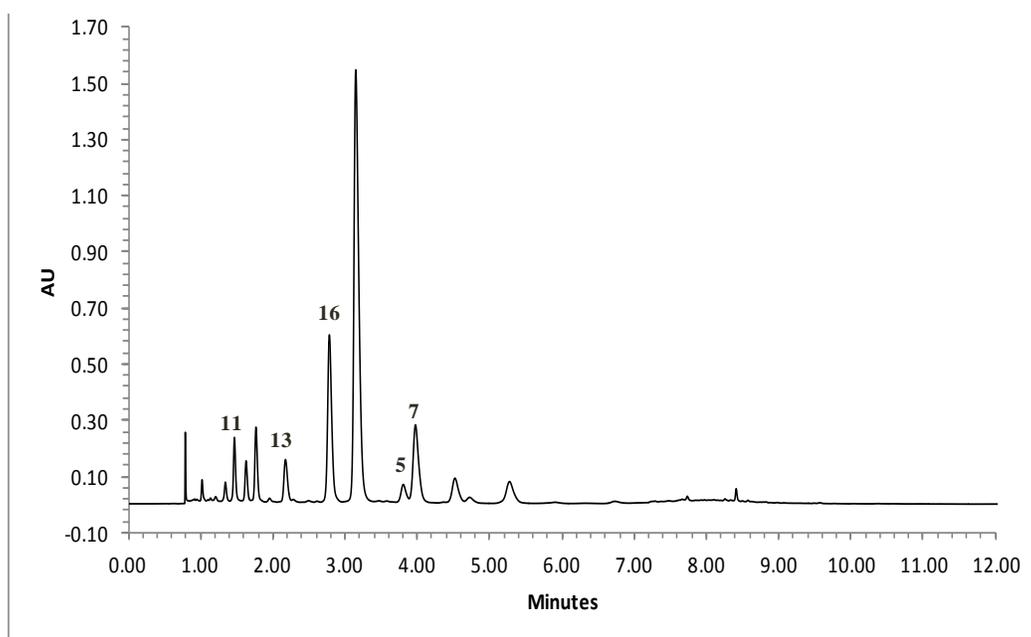


Figura 31. Cromatograma del extracto acuoso de la corteza quina amarilla 2. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. $\lambda = 327$ nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min.

5. CONCLUSIONES

- ❖ El estudio químico realizado sobre la infusión de la corteza de *E. caribaeum* permitió la caracterización de siete 4-fenilcumarinas: 5-*O*- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**5**), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**7**), 5-*O*-(6''-acetil- β -D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**8**), 5-*O*- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**), 5-*O*-(6''-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**16**), 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**15**) y 5-*O*-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**16**). Los productos **13**, **14** y **16** son nuevos en la planta y **15** es un nuevo producto natural. Estos compuestos de tipo 4-fenilcumarina y el ácido clorogénico (**11**) son algunos de principios responsables de la actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica de los copalchis, por lo tanto se seleccionaron como marcadores activos.
- ❖ Se obtuvieron los perfiles cromatográficos del extracto acuoso de *E. caribaeum* por CCD y CLUE en los cuales se identificó la presencia de las siete 4-fenilcumarinas aisladas (**5,7, 8, 13, 14, 15** y **16**) y del ácido clorogénico (**11**). Estos perfiles constituyen una prueba de identidad para la droga cruda de *E. caribaeum*, y una herramienta fundamental su control de calidad.
- ❖ Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar el contenido de 4-fenilcumarinas y ácido clorogénico en el extracto acuoso de *E. caribaeum*, este método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas.
- ❖ Se compararon los perfiles cromatográficos de las tres especies dominantes del “complejo copalchi” taxonomicamente relacionadas, encontrándose diferencias relevantes entre *E. caribaeum* y las dos especies de *Hintonia*. Estos resultados permitirán evidenciar la sustitución o adulteración de las especies de copalchis por otras. Incluso, estos perfiles permitirán detectar si las dos especies de *Hintonia*, muy parecidas entre sí y hoy día muy escasas, se sustituyen por *E. caribaeum*, o se

combinan con esta. Evidentemente la mezcla de cortezas puede afectar la eficacia de las plantas y aunque en muchos casos es deseado, Guerrero Analco y colaboradores en el 2007 demostraron que la eficacia hipoglucemiante de una mezcla de cortezas de *Hintonia* y *Exostema* o la de un extracto de *E. caribaeum* es menor que la de cualquiera de las dos especies de *Hintonia*.

- ❖ Los resultados generados sobre la identidad y la composición de la droga cruda de *E. caribaeum* aportan información científica para el aseguramiento de la calidad, útil en la generación de su monografía tipo OMS y Farmacopéica para su inclusión en la tercera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, E. (1994). Plantas Medicinales del Herbario, Instituto Mexicano del Seguro Social. México, D. F.
- Anderson, E. N., Canul, C. J., Dzib, A., Guido, S. F. (2005). Las Plantas de los Mayas: Etnobotánica en Quintana Roo, México. ECOSUR, CONABIO. México.
- Aquino, R., D'Agostino M., De Simone F., Cosimo P. (1988). Plant metabolites. Part 10. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*. **27**: 1827–30.
- Arévalo, R. (1897). Estudio sobre la corteza de Copalchi. Nueva Recopilación de Monografías Mexicanas y Tesis Inaugurales de Materia Médica. Folletín del tomo II de los Anales del Instituto Médico Nacional. Oficina Topográfica de la Secretaría de Fomento.
- Argotte-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M. C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M. H., González-Cortazar, M., Alvarez, L. (2006). Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products*. **69**(10): 1442–1444.
- Argueta, V.A., Cano, L., Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas Medicinales Tradicionales Mexicanas. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F.
- Bandaranayake, W. M. (2006). Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. En: Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants Into Drugs. Ahmad, I. Aqil, F., Owais, M., (Editores). Wiley-VCH. Weinheim.
- Borhidi A. (2006). Rubiáceas de México. Primera edición. Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Calera, M. R., Mata, R., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen, B. (1995). 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin, an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*. **45**: 105–110.
- Calera, M. R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, A. L. (1996). Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**(10): 2966–2969.
- Cañigual, S., Vila, R. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. **6**: 43–51.
- Chow, C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X. (2004). Analytical method validation and instrument performance verification. Ed. Wiley Interscience. United States of America.
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J. A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R. (2009). Hypoglycemic activity of extracts and

- compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products*. **72**(3): 408–413.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G. E., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **110**(2): 334–342.
- Díaz, J. L. (1976). Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C. IMEPLAM. México, D.F.
- Discover Life. <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Exostema+caribaeum> (acceso en Marzo 2013).
- Durjardin, Beamet, Egasse, E. (1889). Les Plantes médicinales indigènes et exotiques, leurs usages thérapeutiques, pharmaceutiques et industriel. Doin. Paris.
- European Medicines Agency. (2006). Committee for Medicinal Products for Human Use. Committee For Medicinal Products For Veterinary Use. *Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products I/ Traditional Herbal Medicinal Products*.
- Froelich, S., Siems, K., Hernandez, M. A., Ibarra, R. A., Berendsohn, W. G., Jenett-Siems, K. (2006). Phenolic glycosides from *Exostema mexicanum* leaves. *Pharmazie*. **61**(7): 641–644.
- García M. A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. L., Alcántara A. (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C.
- Gong, F., Liang, Y. Z., Xie, P. S., Chau, F. T. (2003). Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *Journal of Chromatography A*. **1002**(1-2): 25–40.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martinez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata R. (2005). Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica* **71**(12): 1099–1105.
- Guerrero-Analco, J. A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. **68**(15): 2087–2095.
- Herbario Nacional Mexu, <http://www.ibiologia.unam.mx/mexu/> (acceso en Marzo de 2013).

- Hernández, F. (1615). Historia de las plantas de la Nueva España. Tomo II, Libros 3 y 4. Instituto de Biología, UNAM. Imprenta Universitaria México. México.
- Hersch, P. (1999). De hierbas y herbolarios en el México actual. *Arqueología Mexicana VII*. Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Step 4 version.
- Ito, A., Chai, H. B., Shin, Y. G., García, R., Mejía, M., Gao, Q., Fairchild, C. R., Lane, K. E., Menendez, A. T., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (2000). Cytotoxic Constituents of the Roots of *Exostema acuminatu*. *Tetrahedron*. **56**(35): 6401–6405.
- Kiran, U., Khan, S., Mirza, K. J., Ram, M., Abdin, M. Z. (2010). SCAR markers: a potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*. **81**(8): 969–976.
- Kong, W. J., Zhao, Y. L., Xiao, X. H., Jin, C., Li, Z. L. (2009). Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality control of *Rhizoma coptidis chinensis* based on UPLC-PAD combined with chemometrics methods. *Phytomedicine*. **16**(10): 950–959.
- Krebs, K. G., Griesinger, E. (1960). Ingredients of the bark of *Exostemma caribaeum*. *Arzneimittel-Forschung*. **10**, 32–3.
- Lanessan, J. M. (1886). Les plantes utiles des colonies françaises. Imprimerie nationale Paris. Francia.
- Liang, Y. Z., Xie, P., Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*. **812**(1-2): 53–70.
- Liang, X. M., Jin, Y., Wang, Y. P., Jin, G. W., Fu, Q., Xiao, Y. S. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. **1216**(11): 2033–2044.
- Little, L. E., Wadsworth, H. F., Marrero, J. (2001). Árboles Comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Segunda edición. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico.
- Loeza, A., (1894). Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo I. Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
- Loeza, A., (1904). Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo IV. Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
- López, L. A., Sánchez de Lorenzo, C. J. M. (2001). Árboles en España: Manual de Identificación. Segunda edición. Mundi Prensa Libros. España.

- Lozoya, X. (1984). Plantas y luces en México: la Real Expedición Científica a Nueva España. Ediciones del Serbal. España.
- Lozoya, X. (1998). La Herbolaria en México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. Colección Tercer Milenio. México.
- Manzanilla N., Linda R. COBA, Quintana Roo. (1987). Análisis de dos unidades habitacionales mayas del Horizonte Clásico. UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas. México.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. Sexta edición. Ediciones Botas. México, D.F.
- Mata, R., Calzada, F., García, R. M., Reguero, M. T. (1987). Chemical studies on plants used in traditional medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **55**(5): 866–871.
- Mata, R., Calzada, F., García, R. M. (1988). Chemical studies on plants used in traditional medicine, VI: additional new 4-phenylcoumarins from *Exostema Caribaeum*. *Journal of Natural Products*. **51**(5): 851–856.
- Mata, R., Albor, C., Pereda-Miranda, R., McLaughlin, J. L. (1990). Cytotoxic constituents of *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*. **56**(2): 241.
- Mata, R., DelRayo-Camacho, M., Mendoza, S., Cruz, M. C. (1992). A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **31**(9): 3199–3201.
- Mata, R., Acevedo, L., Méndez-Bautista, D. I., Guerrero-Analco, J. A., Rivero, B. E., Rodríguez, J. M. (2008). Development and validation of liquid chromatography method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. *Pharmaceutical Biology*. **46**(1-2): 105–110.
- Mociño, J. M., Sessé M. (2010). La Real Expedición Botánica a Nueva España. Volumen X. Siglo XXI Editores, UNAM. México, D. F.
- Monroy, O. C., Castillo, E. P. (2007). Las Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos. Segunda Edición. Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). México.
- Nassar-Carballo, M., Saenz-Renaud, J. A., Galvez-Hidalgo, N. (1980). Phytochemical screening of Costa Rican plants: alkaloid analysis. V. *Revista de Biología Tropical*. **28**: 1–11.
- Noster, S. (1992). Untersuchung del Copalchi-Rinden unter besonderer Berücksichtigung von *Coutarea hexandra* (Jacq.) Schum., *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roem & Schult., *Exostema mexicanum* Gray and *Hintonia latiflora* (Sessé & Mociño ex DC.) Bullock

- Doktorgrades Dissertation, Universitat Hamburg Alemania.
- Noster, S., Kraus, L. (1990). In vitro antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica*. **56**(1): 63–5.
- Pinto, A., Capasso, A., Sorrentino, L. (1997). Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Arzneimittelforschung*. **47**(7): 829–833.
- Ramírez, L. R., (2012). Alimentación Del Venado Cola Blanca: Biología y Ecología Nutricional. Palibrio. México.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., y Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**(3): 275–28.
- Sahagún, B. (1988). Historia general de las cosas de la Nueva España: primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino. Libro XI. Alianza Editorial. España.
- Sahoo, N., Manchikantia, P., Dey, S. (2010). Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*. **81**(6): 462–471.
- Sánchez-Viesca, F. (1969). Structure of exostemin, a new 4-phenylcoumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry*. **8**(9): 1821–3.
- Stahl, E. (1969). Thin layer Chromatography. Segunda edición. Academic Press Inc. New York.
- Suárez, B., Palacios, F. N., Rodríguez, R. (2005). Liquid chromatographic method for quantifying polyphenols in ciders by direct injection. *Journal of Chromatography A*. **1066**(1-2): 105–110.
- Viesca-Treviño, C. (1987). Las plantas medicinales americanas y la medicina hipocrática. En: memorias del impacto del encuentro de dos mundos. México.
- Viesca-Treviño, C. (1993). La herbolaria medicinal en el México prehispánico. En: la investigación científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud. México.
- Viesca-Treviño, C. (1999). Usos de las plantas medicinales mexicanas. *Arqueología Mexicana VII*.
- Villiers, A., Lestremau, F., Szucs, R., Gélébart, S., David, F., Sandra, P. (2006). Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. *Journal of Chromatography A*. **1127**(1-2): 60–69.
- WHA31.33. (1978). Medicinal plants.

WHA40.33. (1987). Traditional medicine.

WHA42.43. (1989). Traditional medicine and modern health care.

WHO (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneve.

WHO (2003). Guidelines on good agricultural and collection practices for medicinal plants. Geneve.

WHO (2007). Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Geneve.

Zheng, X., Shi, P., Cheng, Y., Qu, H. (2008). Rapid analysis of a Chinese herbal rescription by liquid chromatography–time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1206**(2): 140–146.

Zolla, C., Medellín, E. C. (1993). Las Organizaciones de Médicos Indígenas Tradicionales y las Plantas Medicinales en la Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaria de Salud. México D.F.

7. ANEXOS

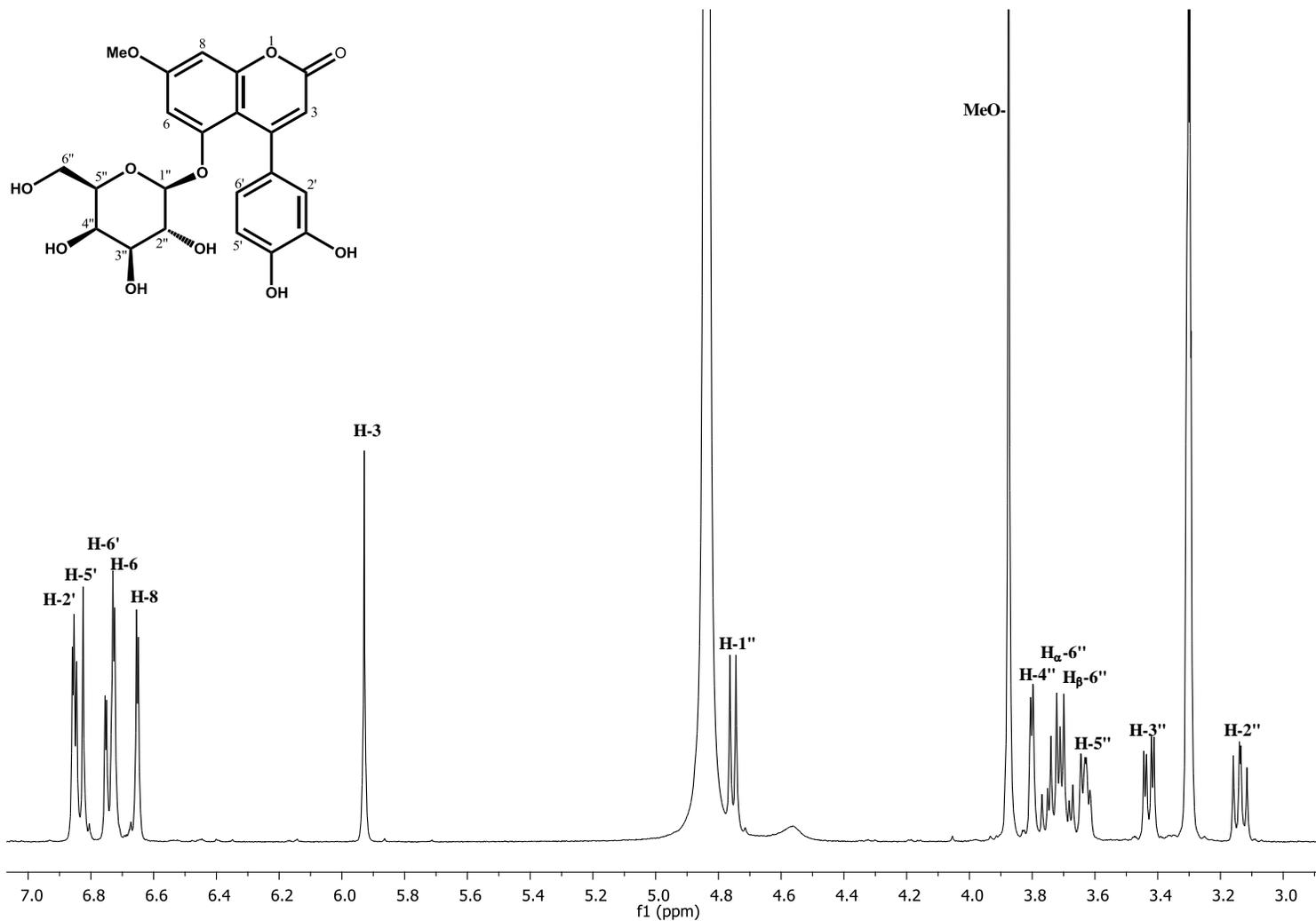


Figura 32 Espectro de RMN¹H (400 MHz, CD₃OH) de 15-*O*-β-D-galactopiranosil-7-*O*-etil-2',4'-dihidroxi-4-fenil (5).

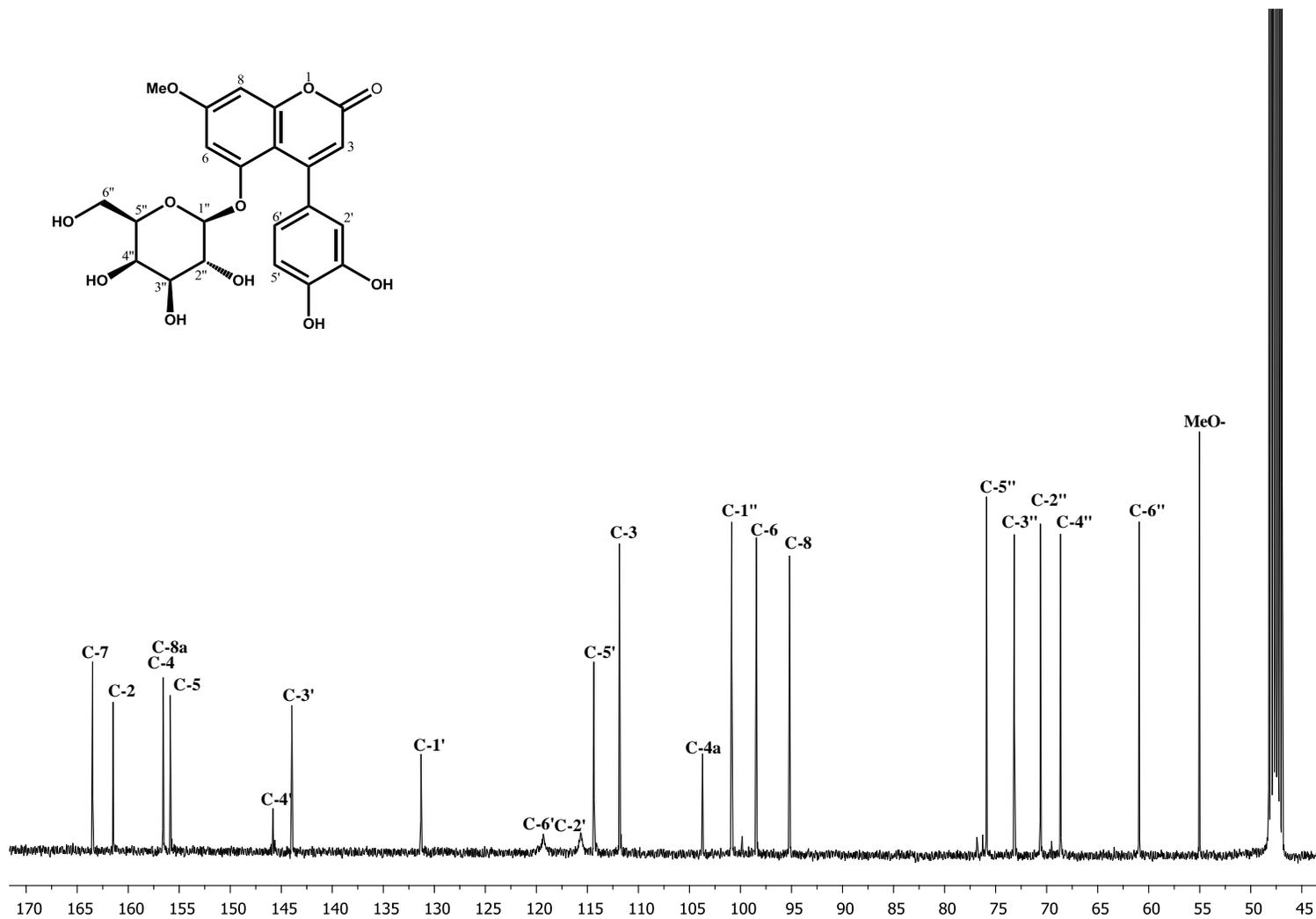
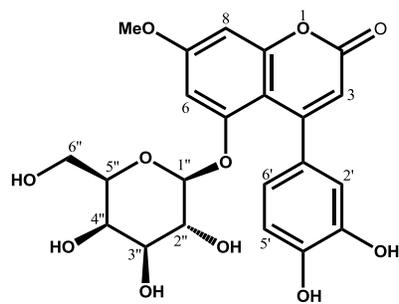


Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-ferulcumarina (5).
Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) de la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-ferulcumarina (5).

OT4665_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 3.4
 T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

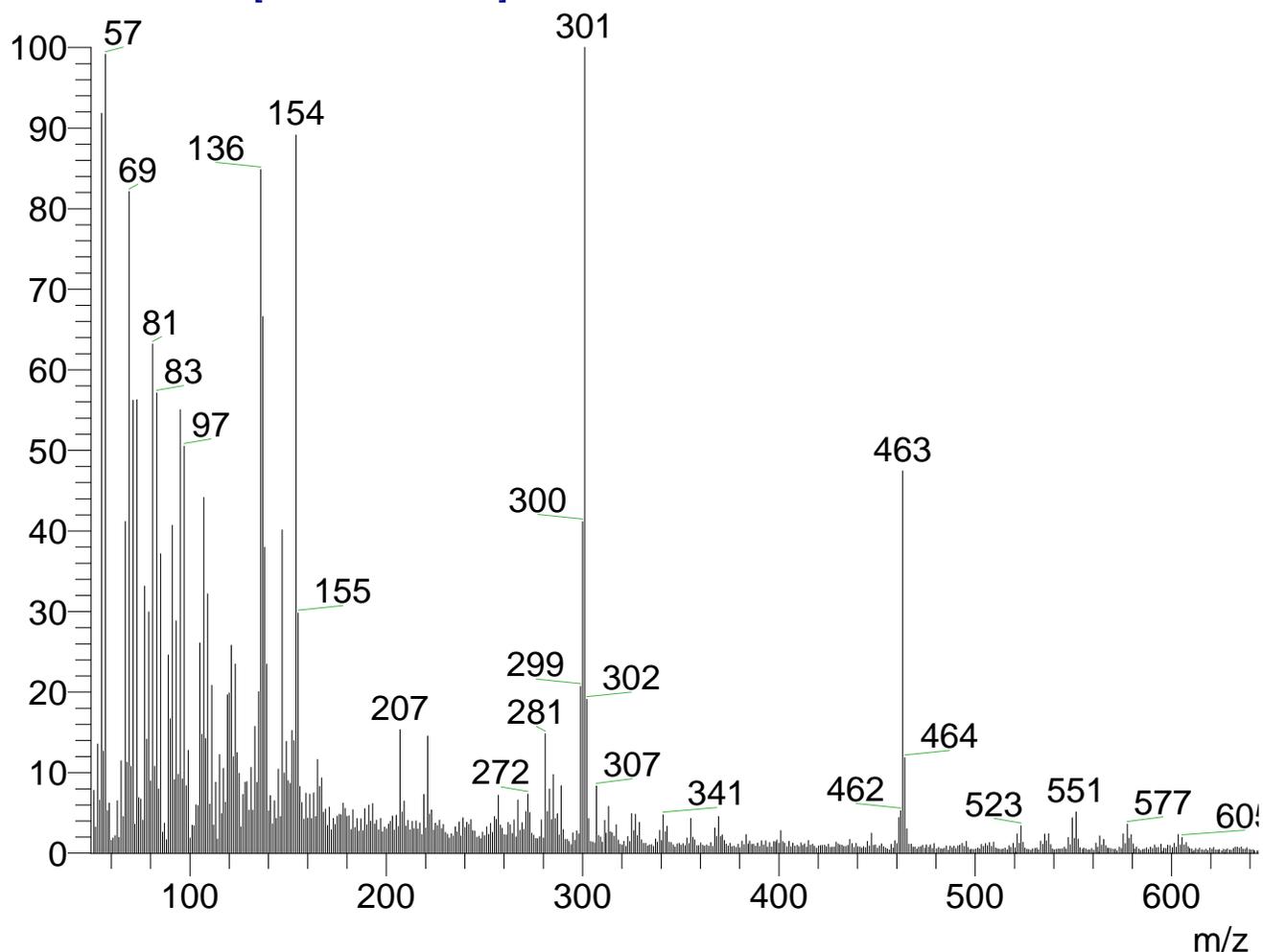


Figura 34. Espectro de masas (FAB positivo) de la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (5).
 OT4665_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 3.48E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



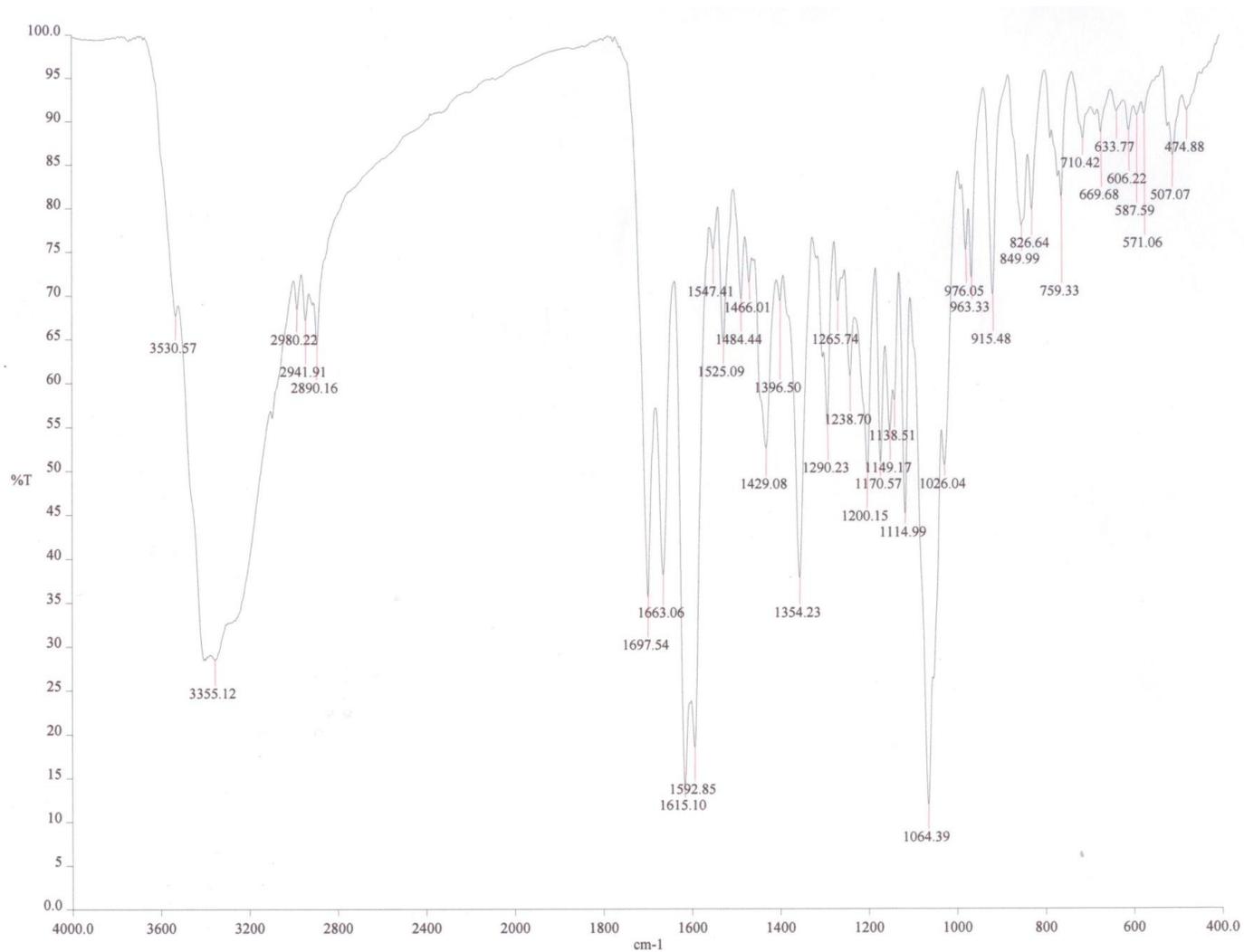


Figura 35. Espectro IR de 5-O-(1->6)-galactopiranosil-3,4-dihidroxi-2H-piridin-2-one (5).

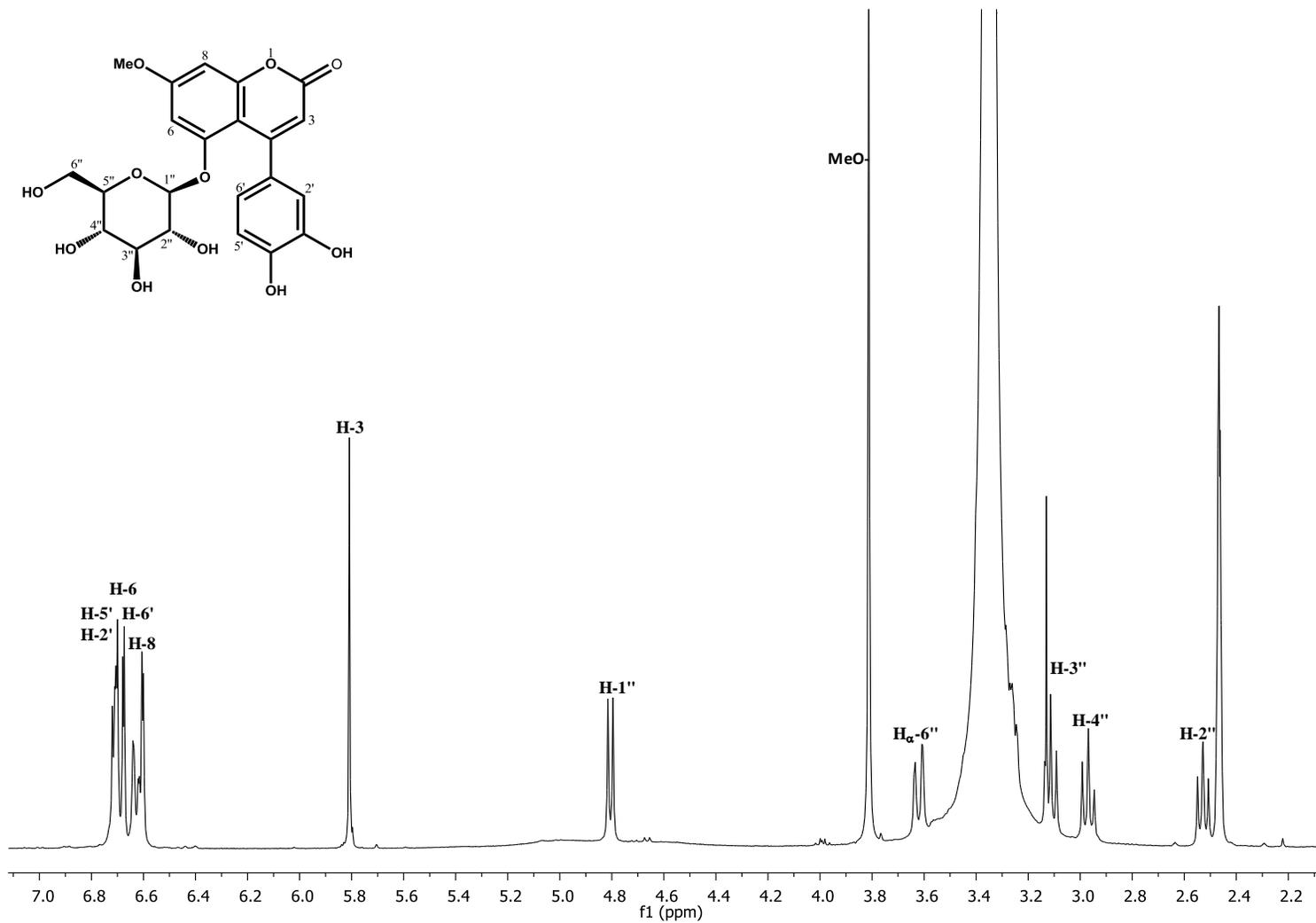


Figura 36. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) 5-*O*-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7).
Figura 36. Espectro de RMN-¹³C (400 MHz, DMSO-*d*₆) 5-*O*-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7).

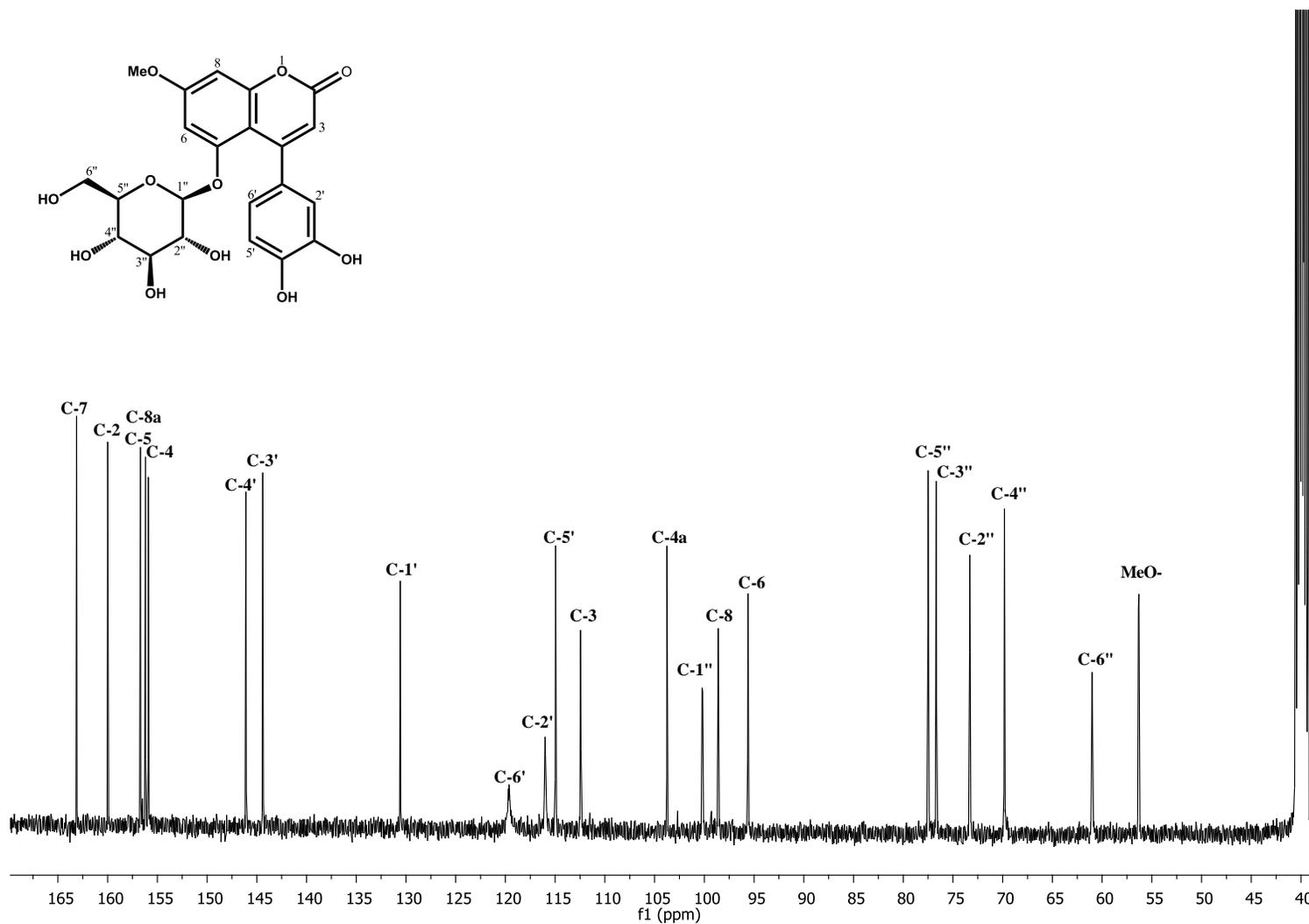


Figura 37. Espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (7).

Figura 38. Espectro de masas (FAB positivo) de la 0560-β-peptidasa de *Silene spaldingii* (7).

OT4664_2_#1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 4.67E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



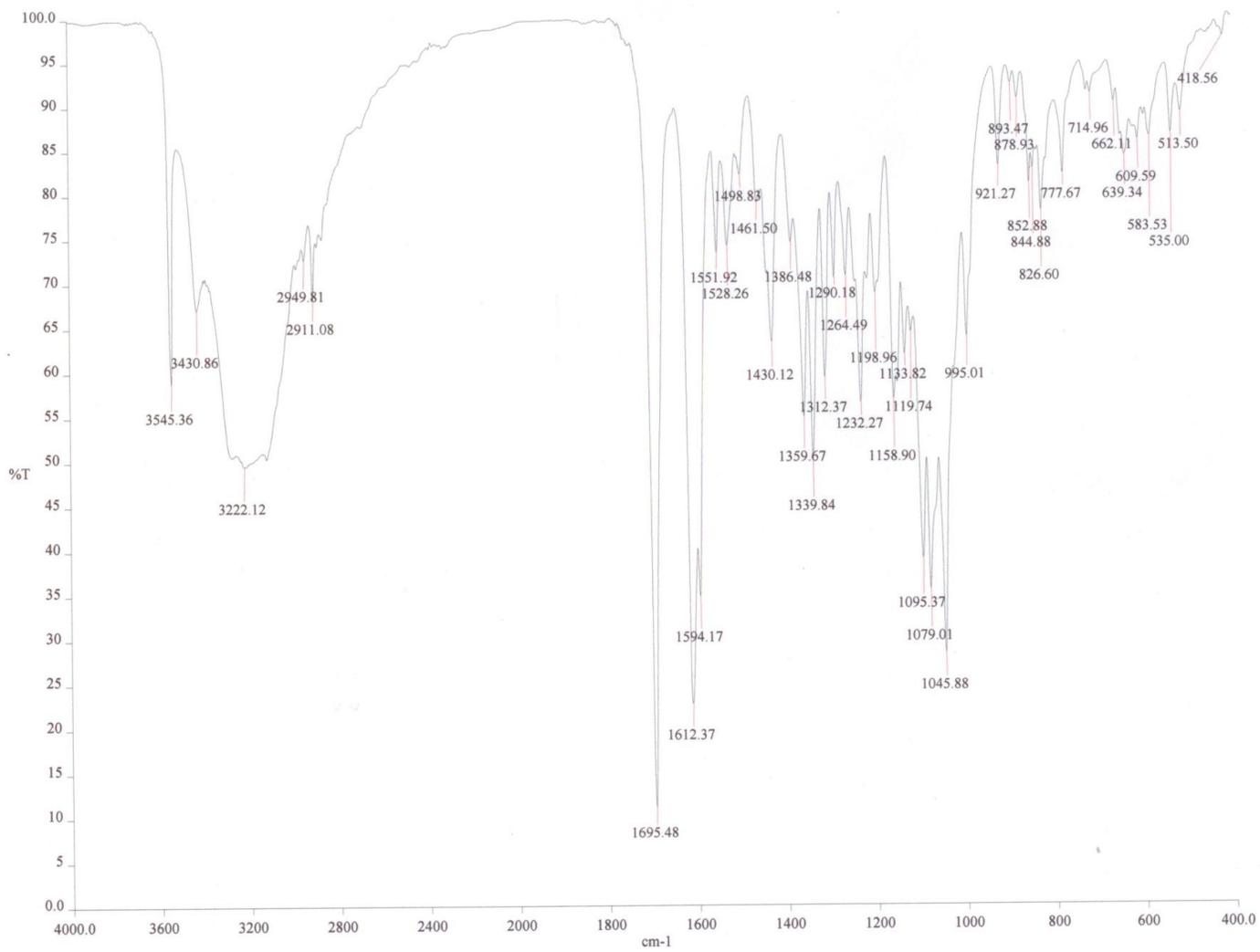


Figura 39. Espectro de IR de la 5-O-(β-D-glucopiranosil-3,4-dihidroxi-7-metoxi-4-β-fenilmenaxina (7).

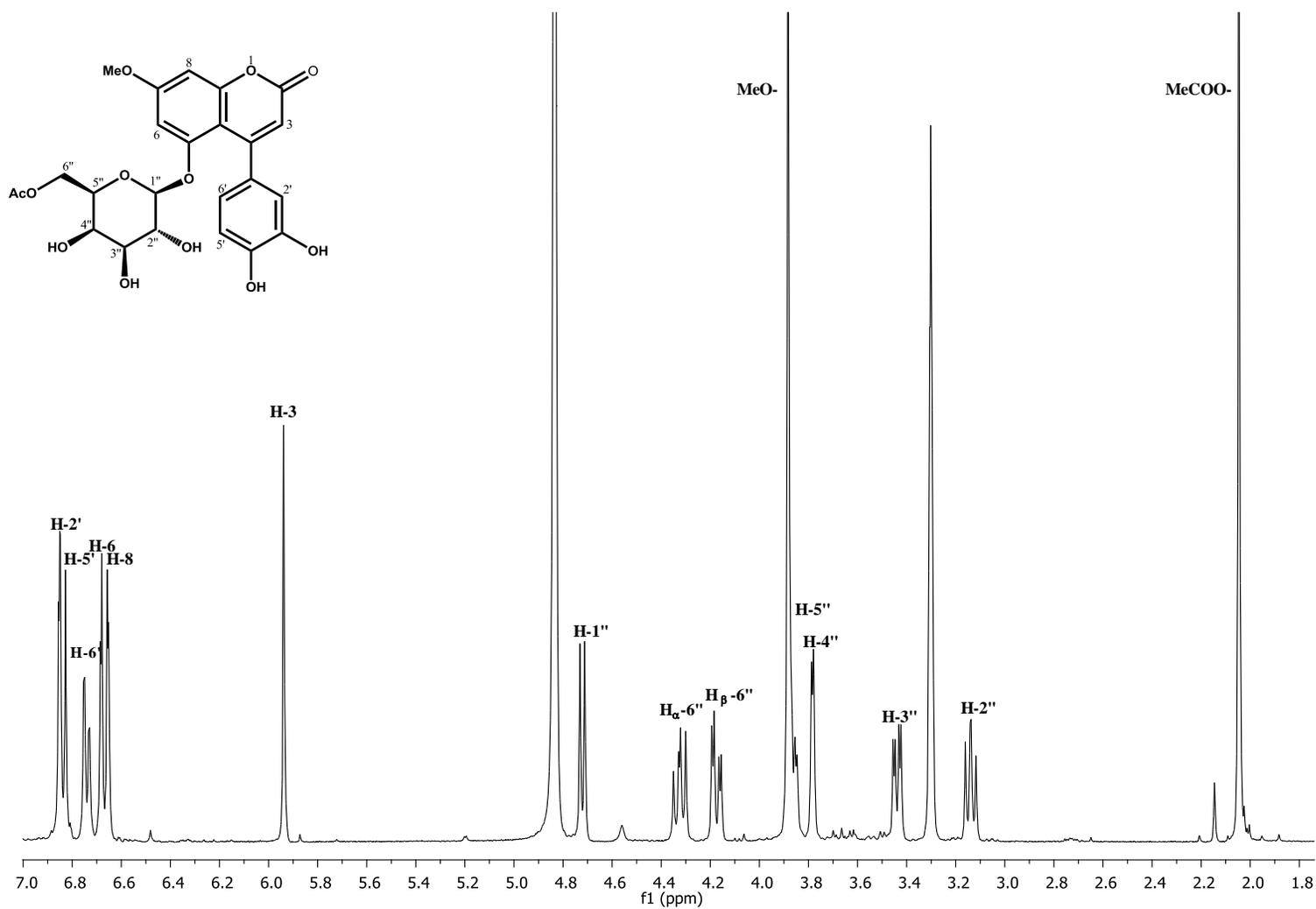


Figura 40. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) de la 5-O-(6-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidro-2H-fenacina (8).

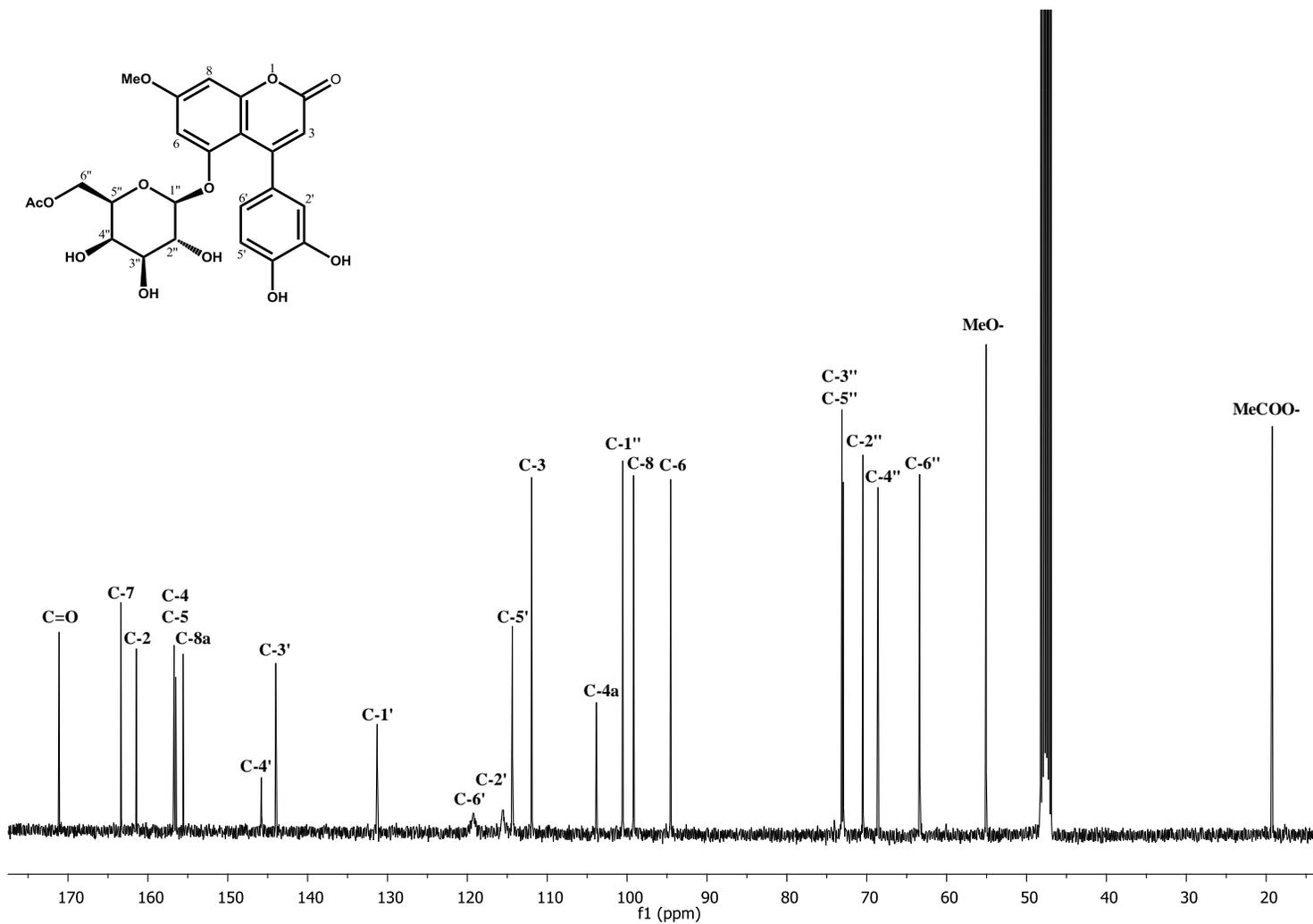


Figura 41. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH/*d*₄) de la 5-O-(6''-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).

OT4666_2 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 6.4
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

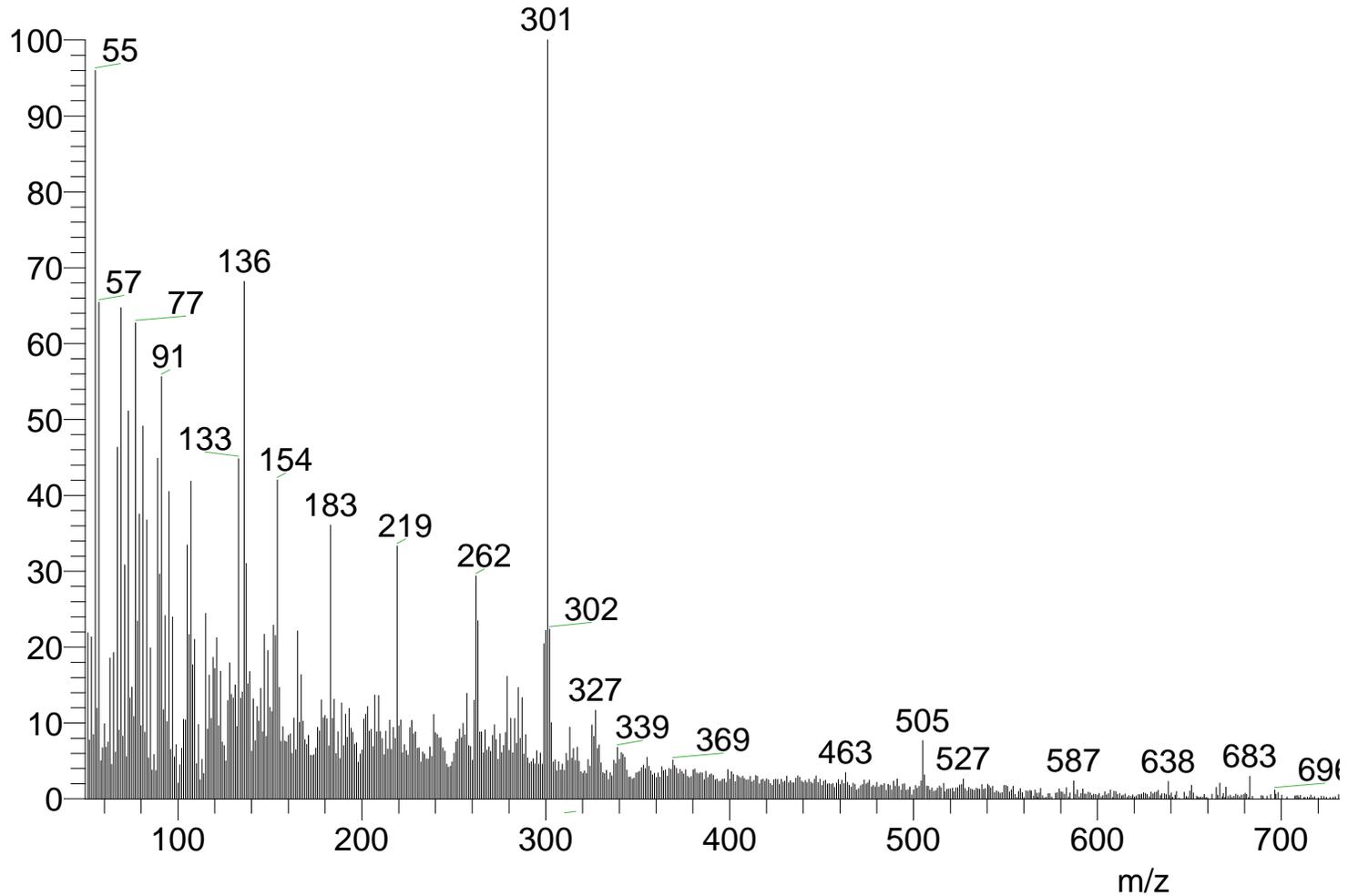
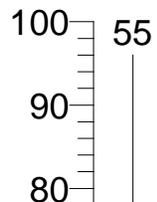


Figura 42. Espectro de masas (FAB positivo) de la 5-O-(6''-acetil-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).
OT4666_2 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 6.4
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



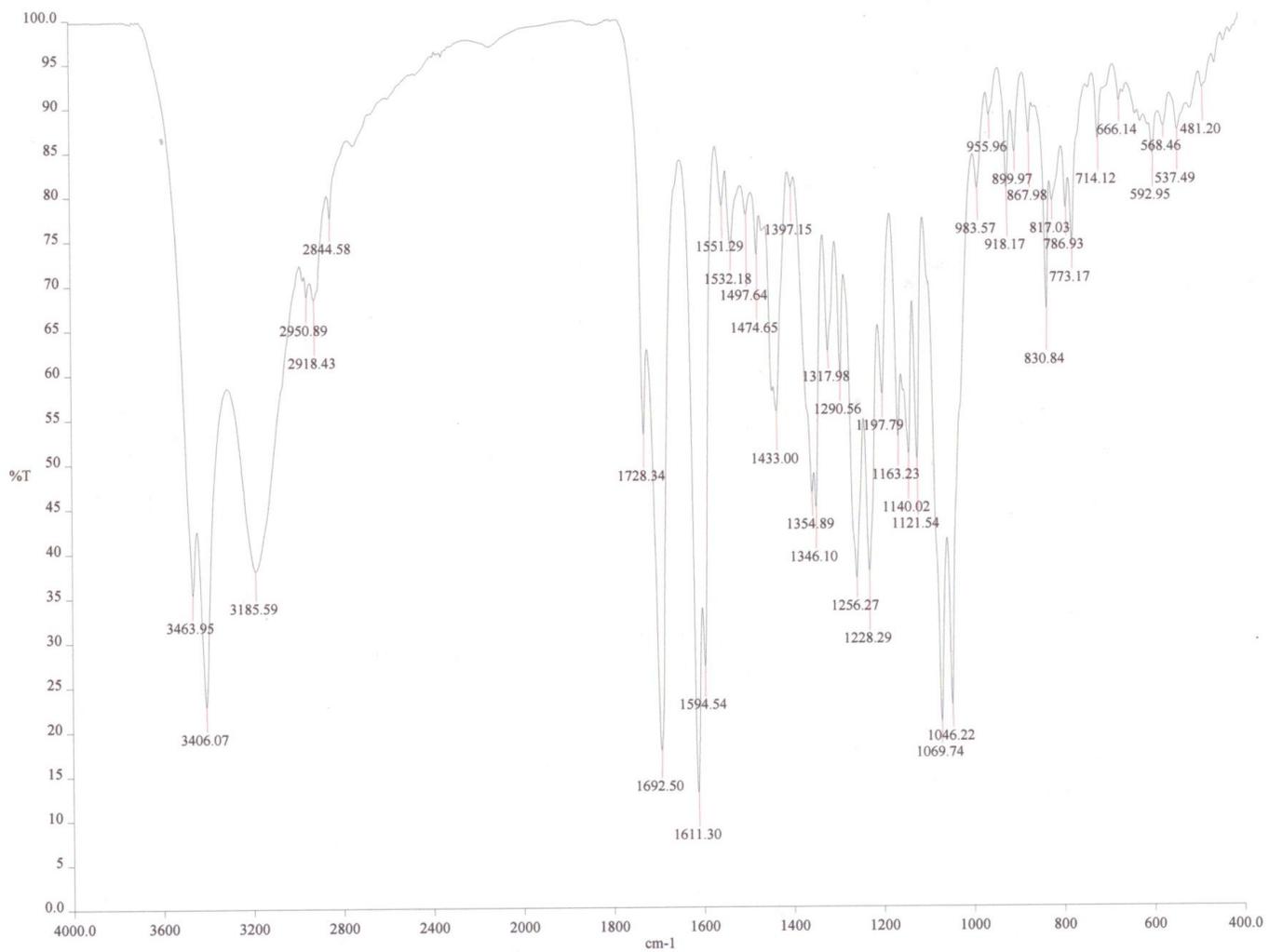


Figura 43. Espectro de IR de la 5-O-(6''-acetyl-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).
Figura 43. Espectro de IR de la 5-O-(6''-acetyl-β-D-galactopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (8).

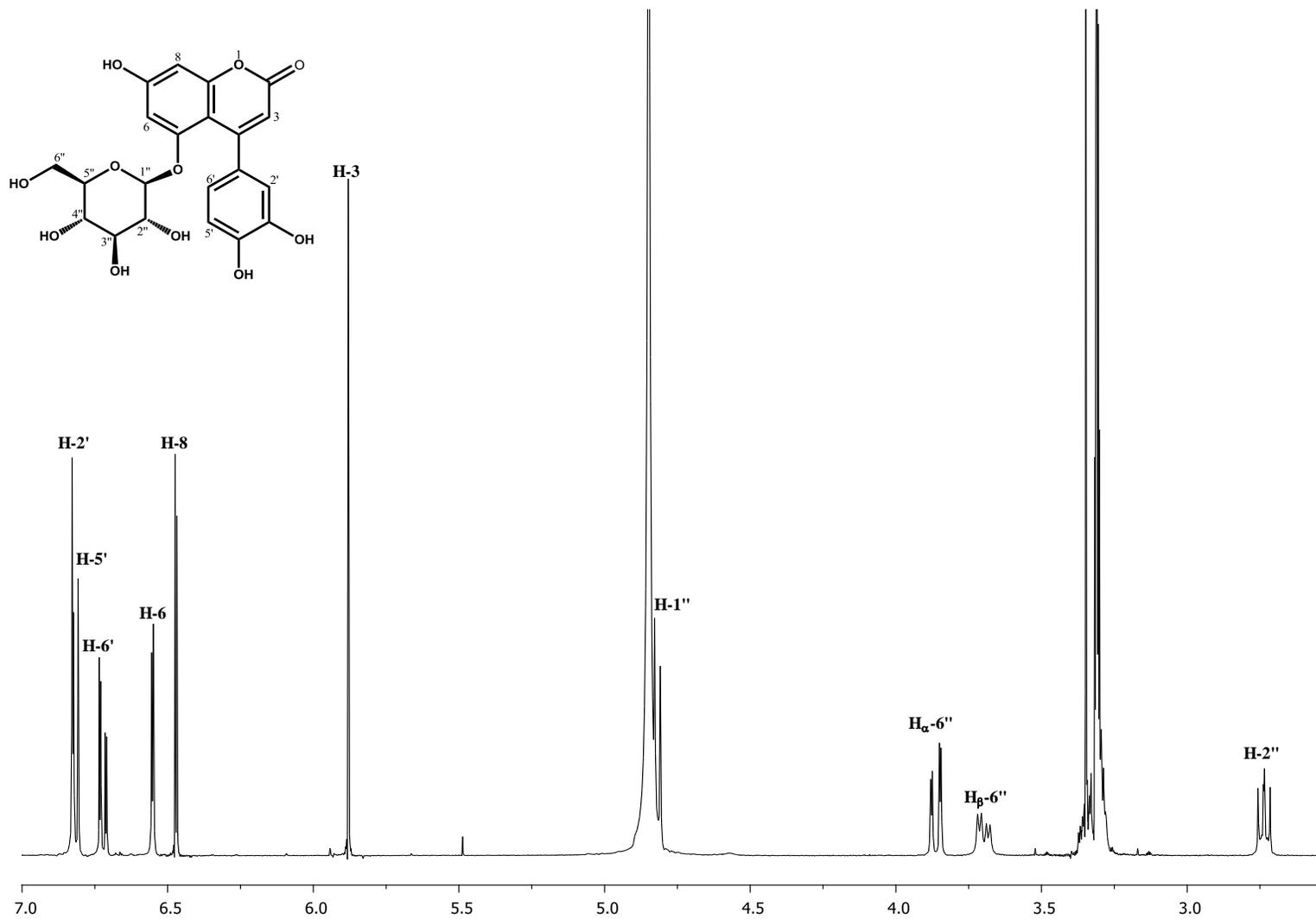


Figura 4.44. Espectro de RMN (^1H , 400 MHz, CDCl_3) de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3'-4'-Fenilidamirina-4-(12)-lucumarina (13).

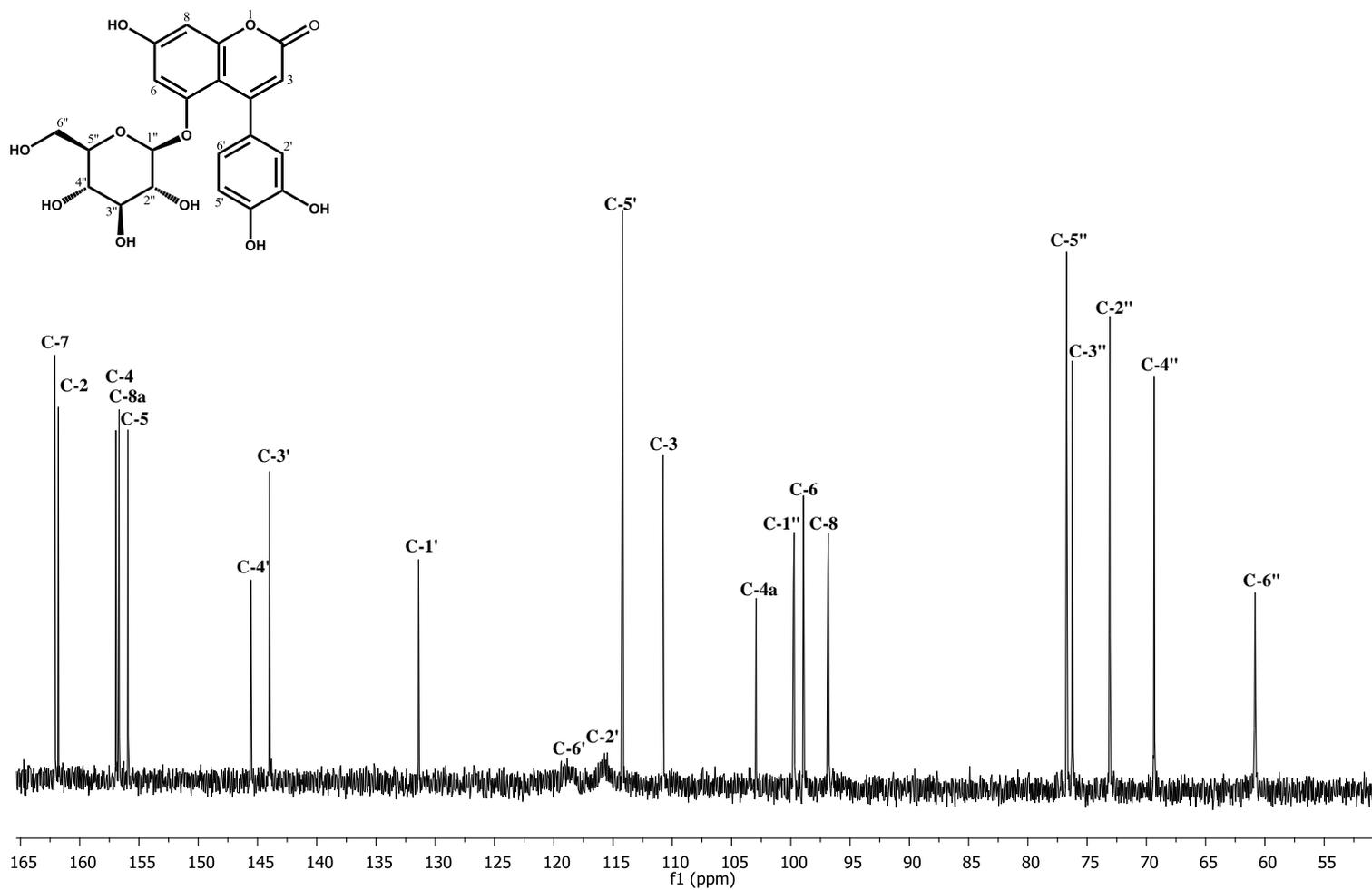


Figura 45. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CD₃OD) de la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3,4-trihidroxi-1-flavona (12) y la cumarina (13).

Figura 46. Espectro de masas (FAB positivo) de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).
Figura 47. Espectro de masas (FAB positivo) de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (12).
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



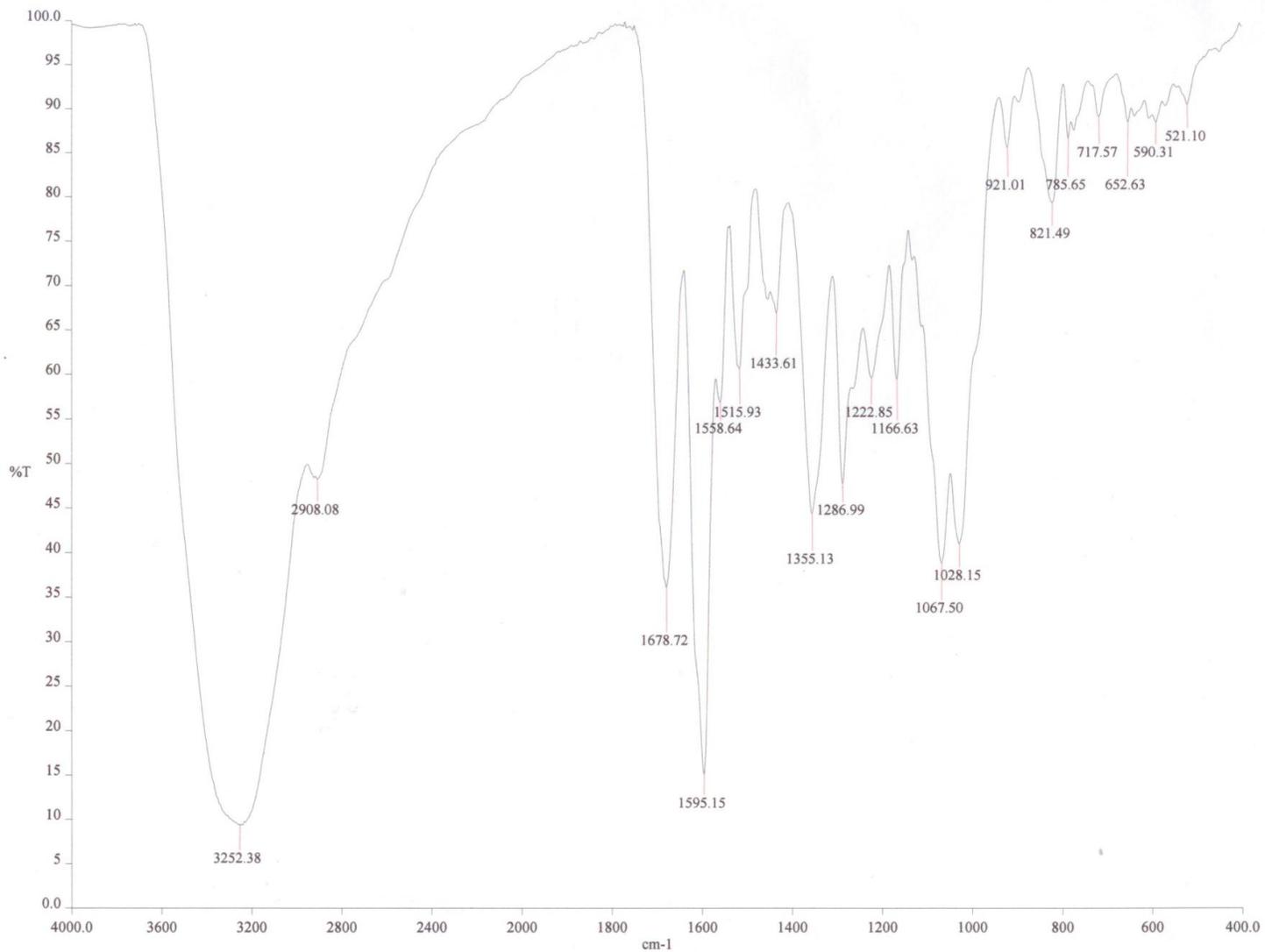


Figura 47. Espectro de IR de la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4'-fenilcumarina (13).

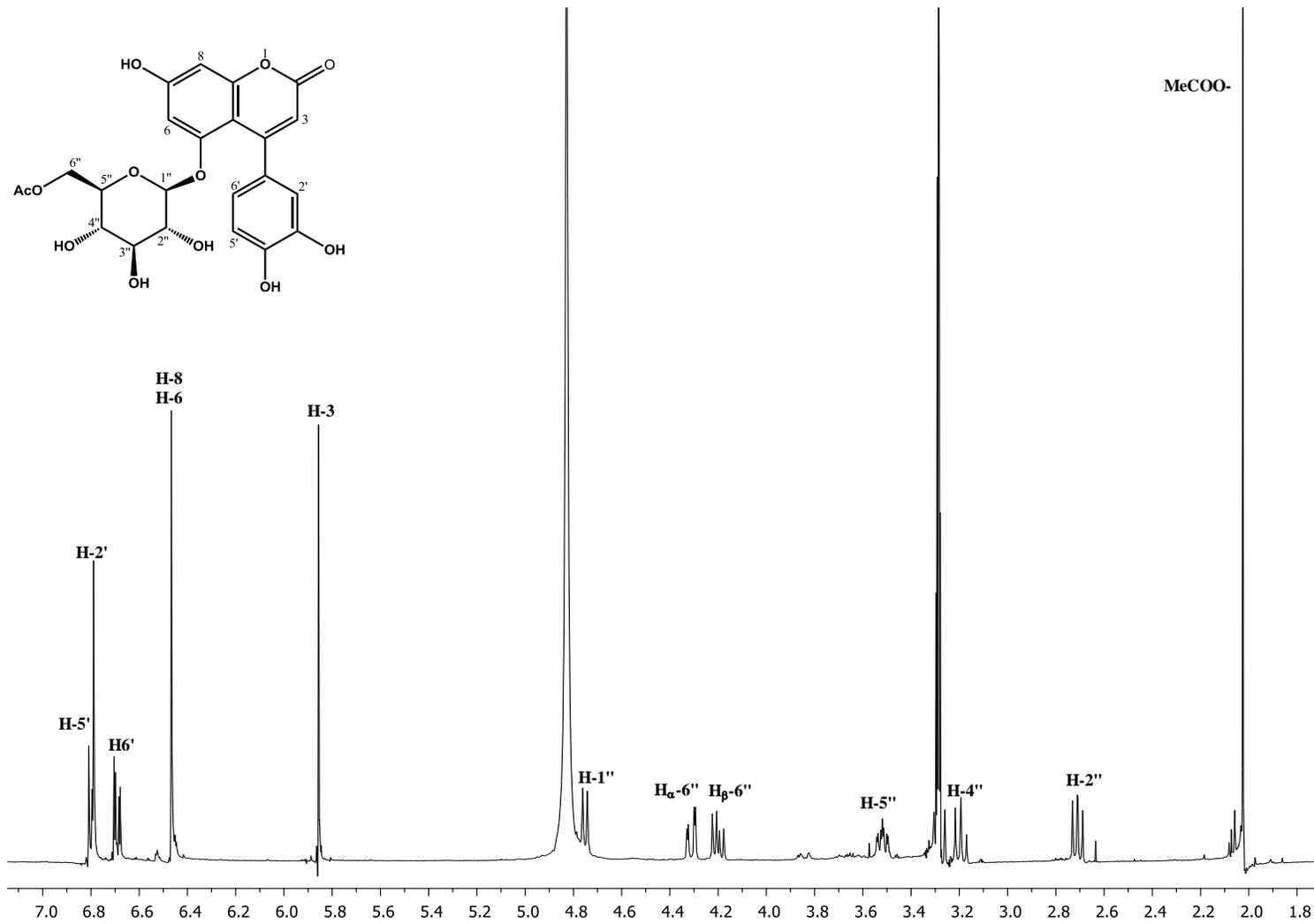


Figura 48. Espectro de RMN-¹H (100 MHz, CH₂Cl₂) de la 5-O-(6'-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).
 Figura 48. Espectro de RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) de la 5-O-(6'-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).

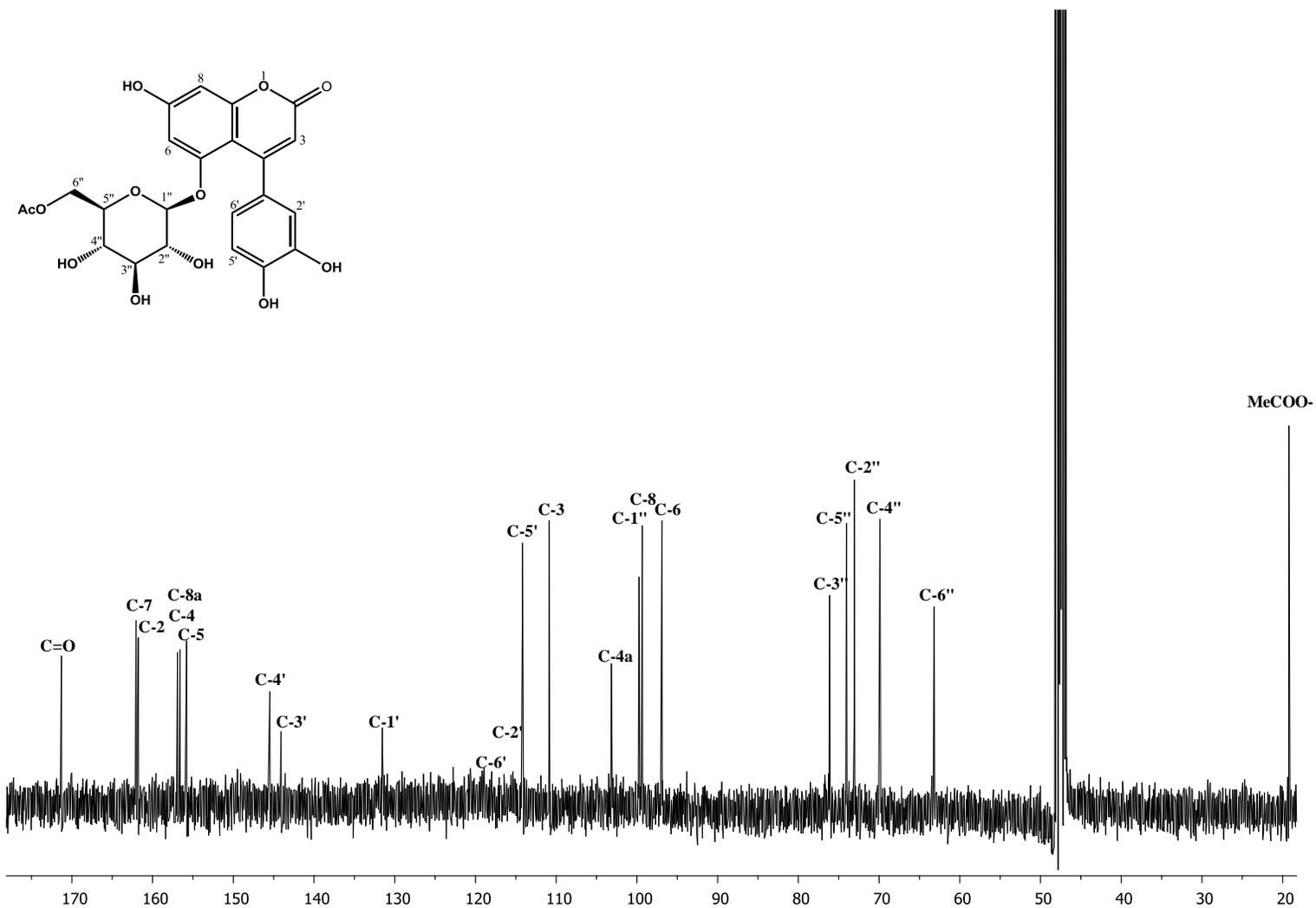
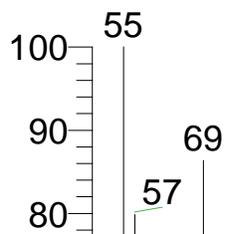


Figura 49. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) de la 5-*O*-(6'' acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).

Figura 49. Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, CH₃OH-*d*₄) de la 5-*O*-(6'' acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13).

Figura 50. Espectro de masas (FAB positivo) de la 6'-acetil-5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**).
 Figura 50. Espectro de masas (FAB positivo) de la 5-O-(6'-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**14**).
 T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



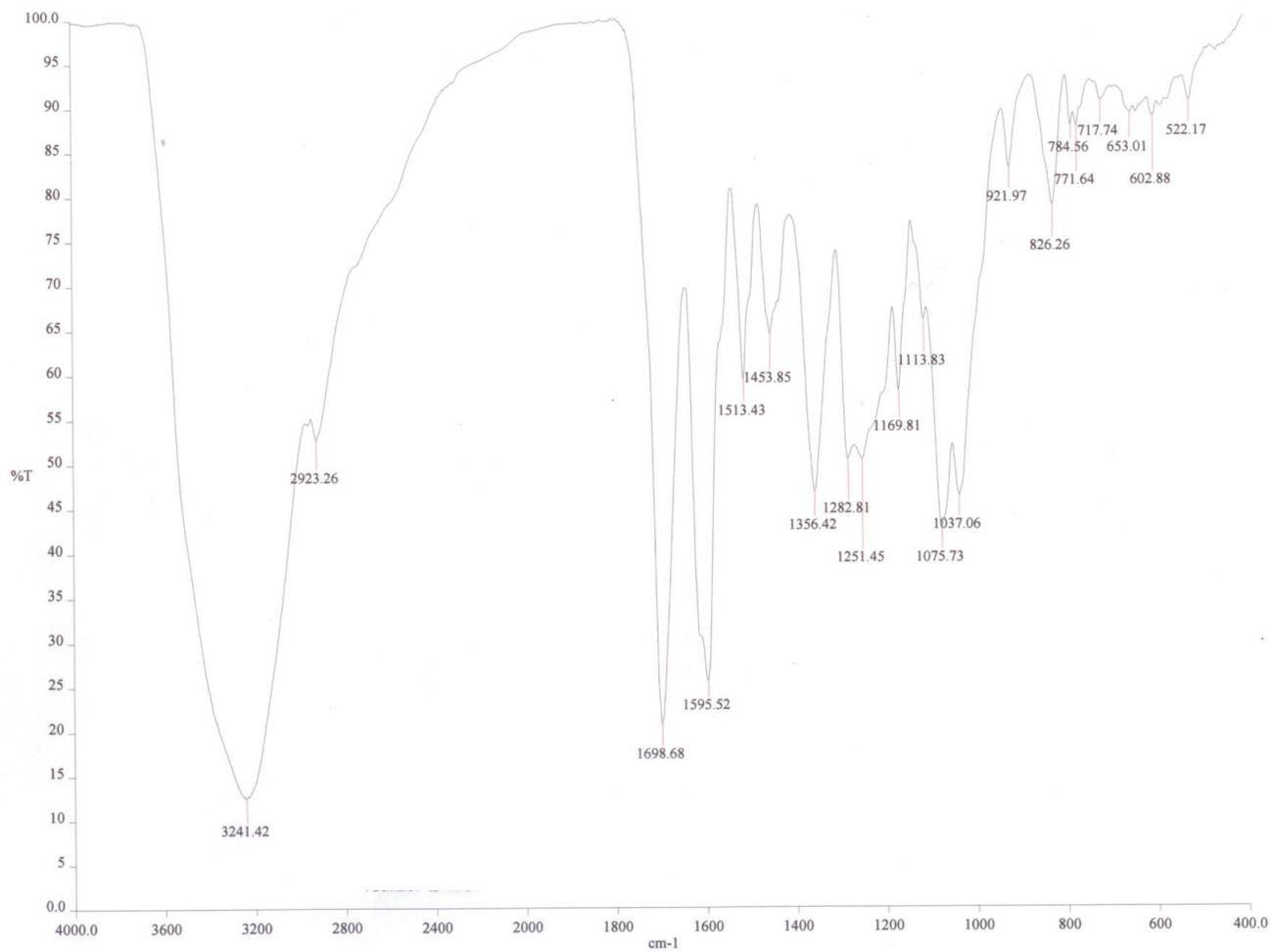


Figura 51. Espectro de IR de la 6''acetil-5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**).

Figura 51. Espectro de IR de la 5-O-(6''acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**14**).

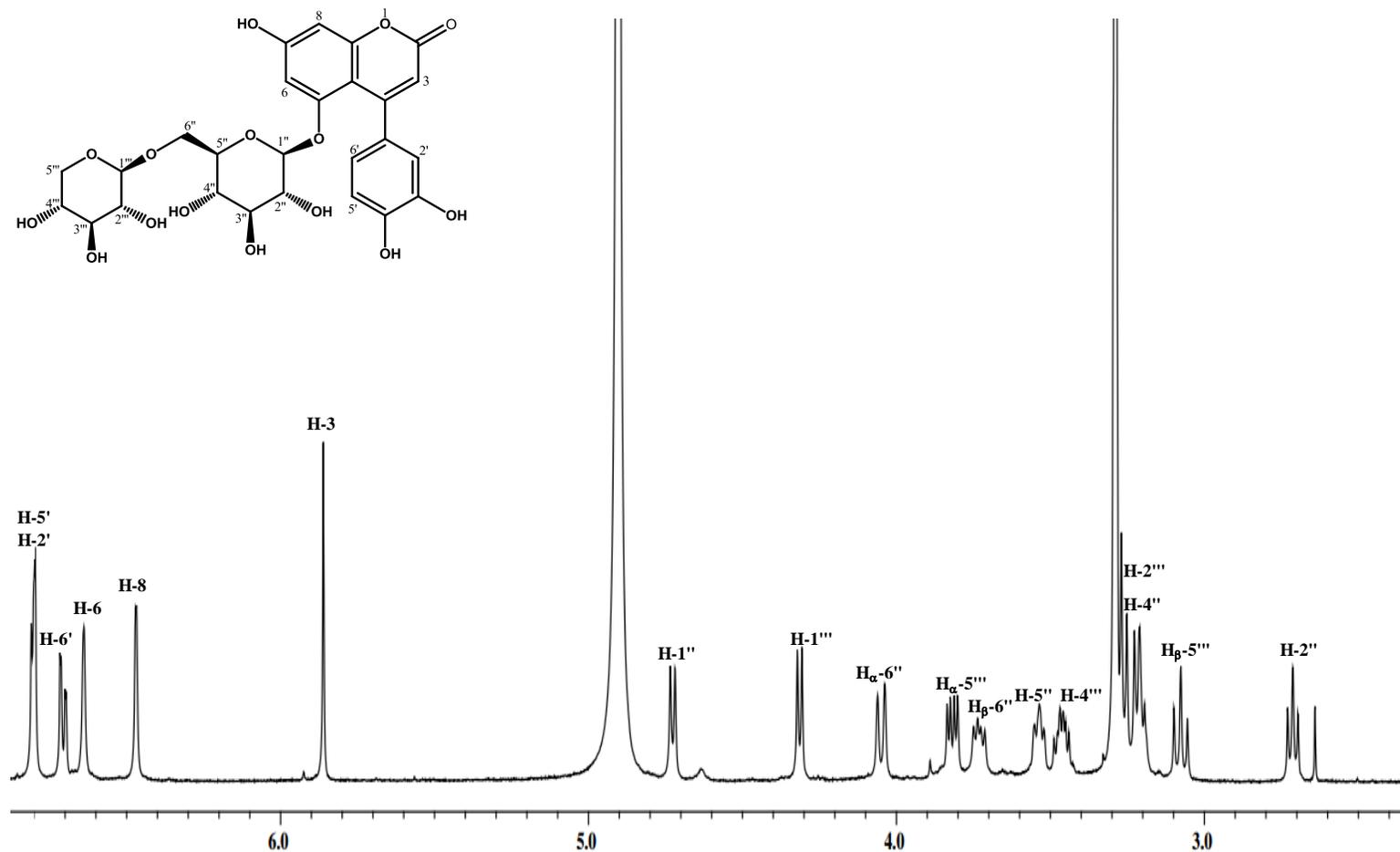


Figura 52. Espectro de RMN-¹H (500 MHz, CH₃OH-*d*₄) de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).
Figura 52. Espectro de RMN-¹H (500 MHz, CH₃OH-*d*₄) de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).

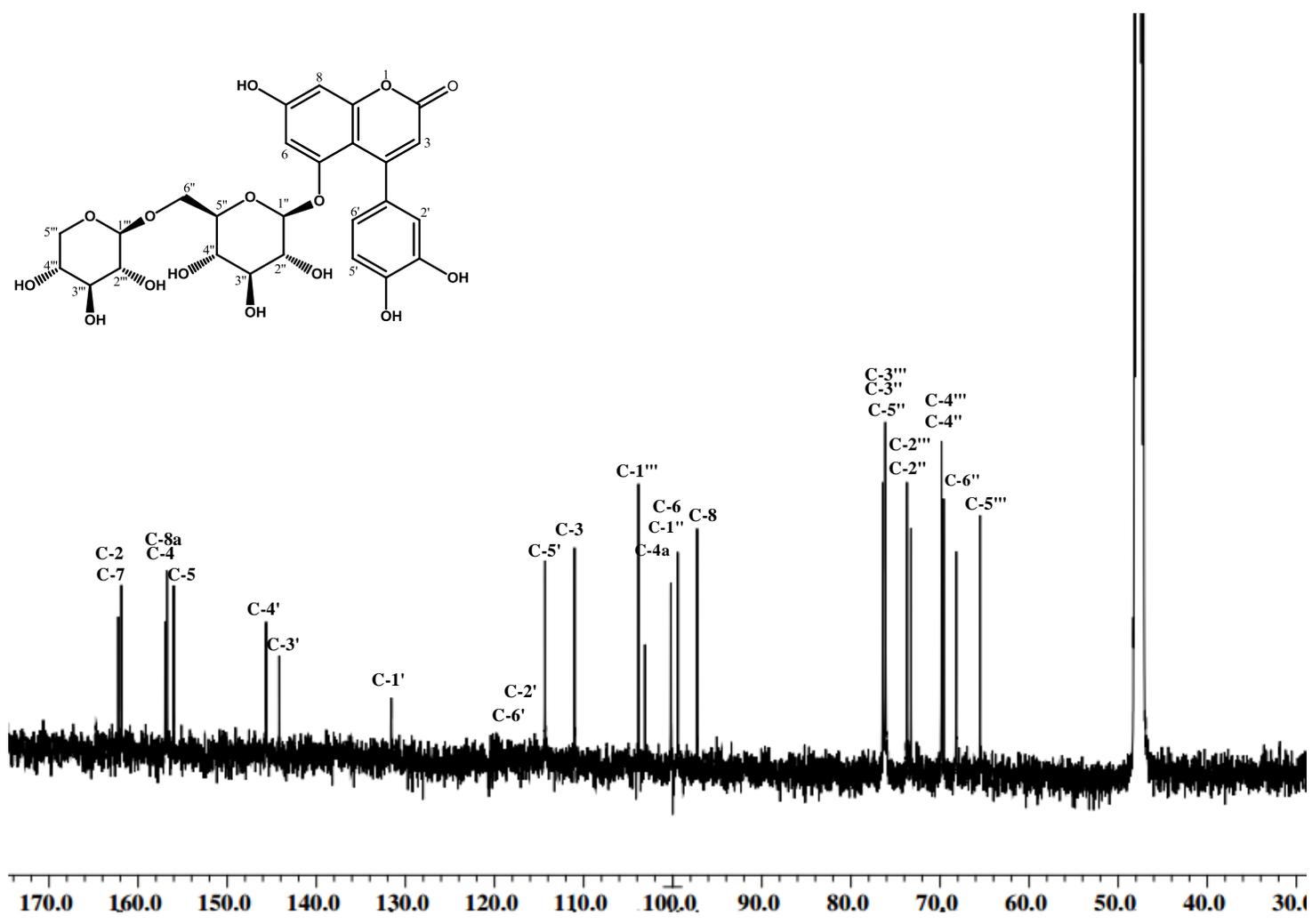


Figura 53. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃, OH) de (1→6)-β-D-galactopiranosil-(1→3)-D-glucopiranosil-7,3,4-trioxi-1,4-fenilumarina (15).

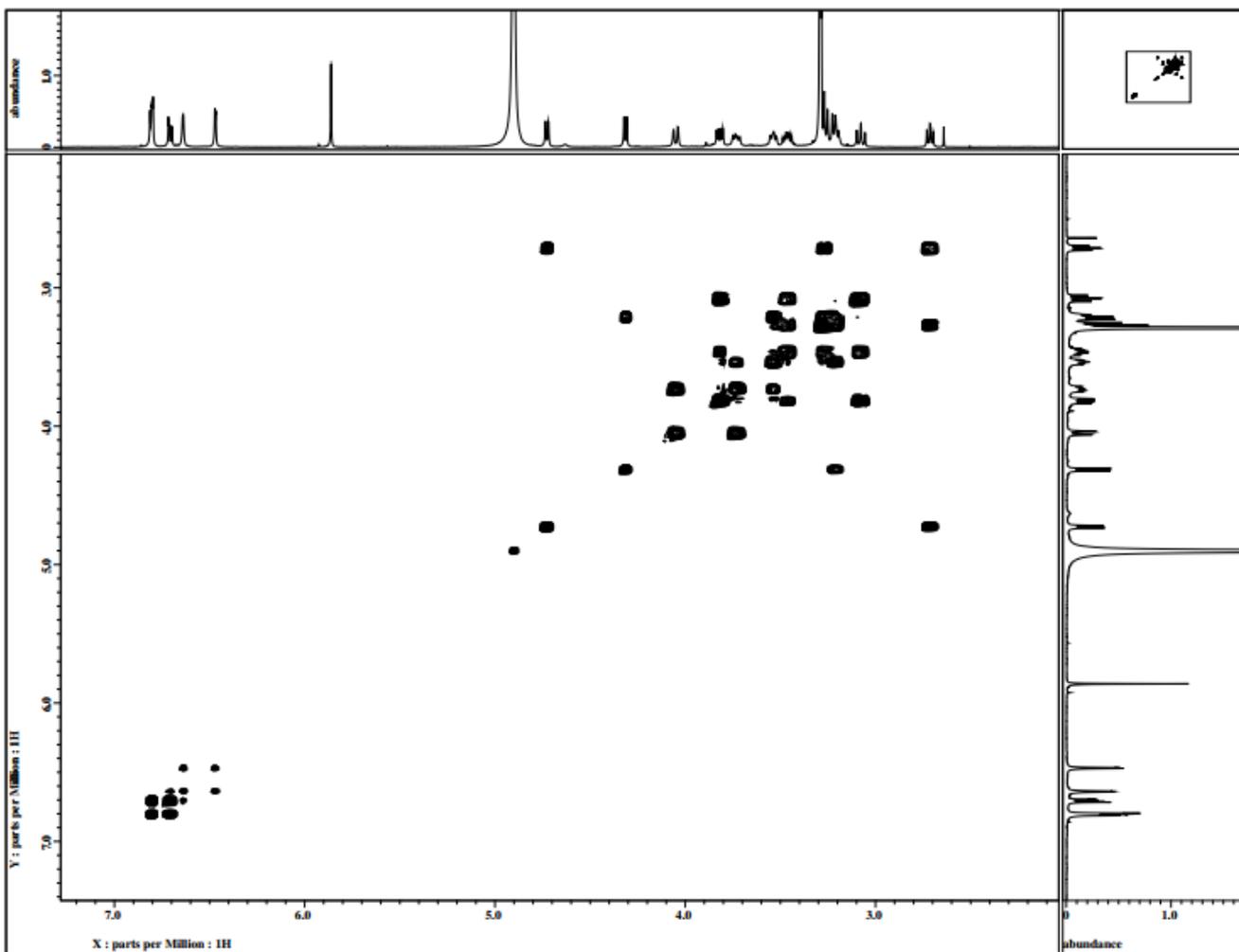


Figura 54. Espectro COSY de la 5-O-(β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilumarina (15).

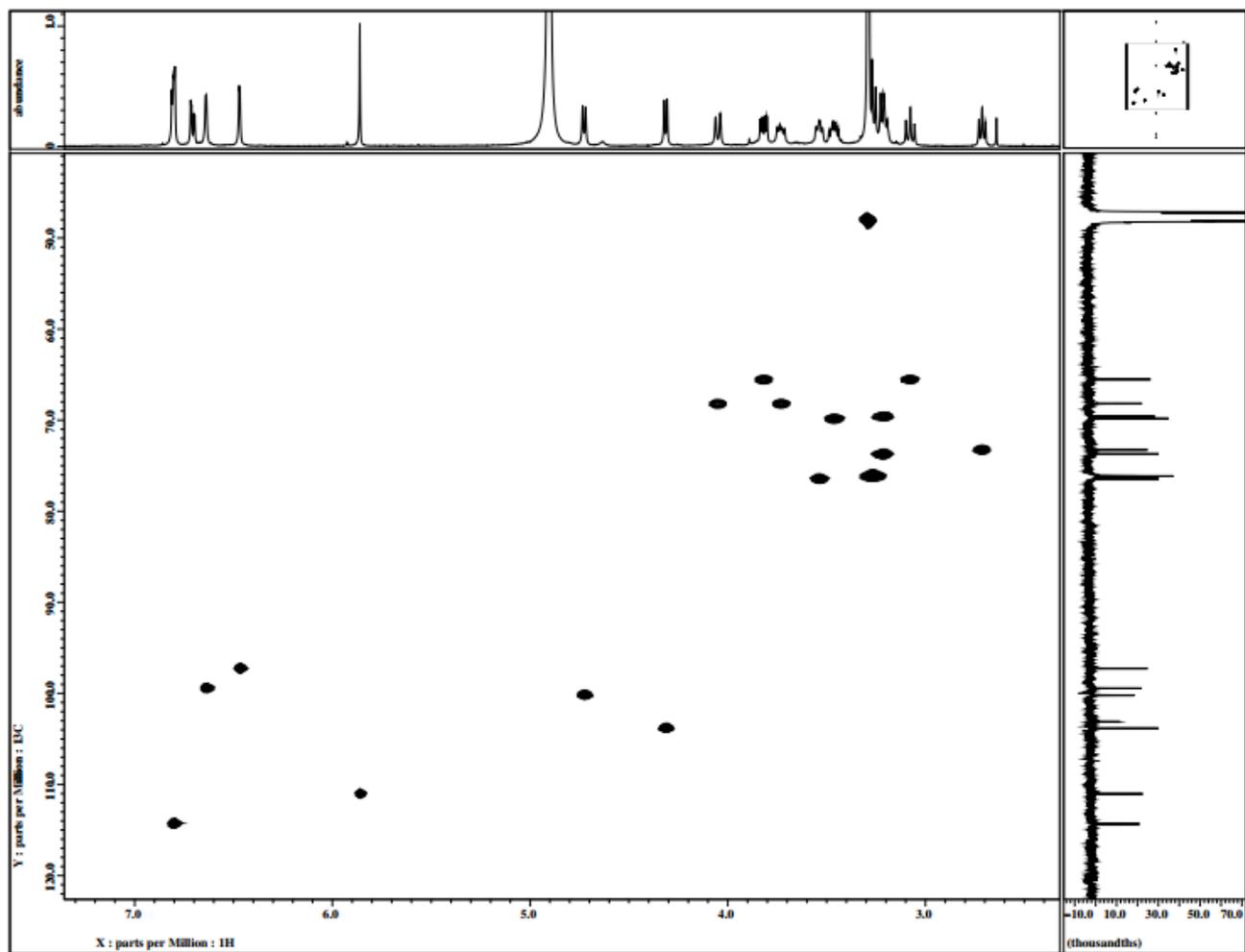


Figura 55. Espectro HSQC de la 5-O-[(β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).

Figura 55. Espectro HSQC de la 5-O-[(β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).

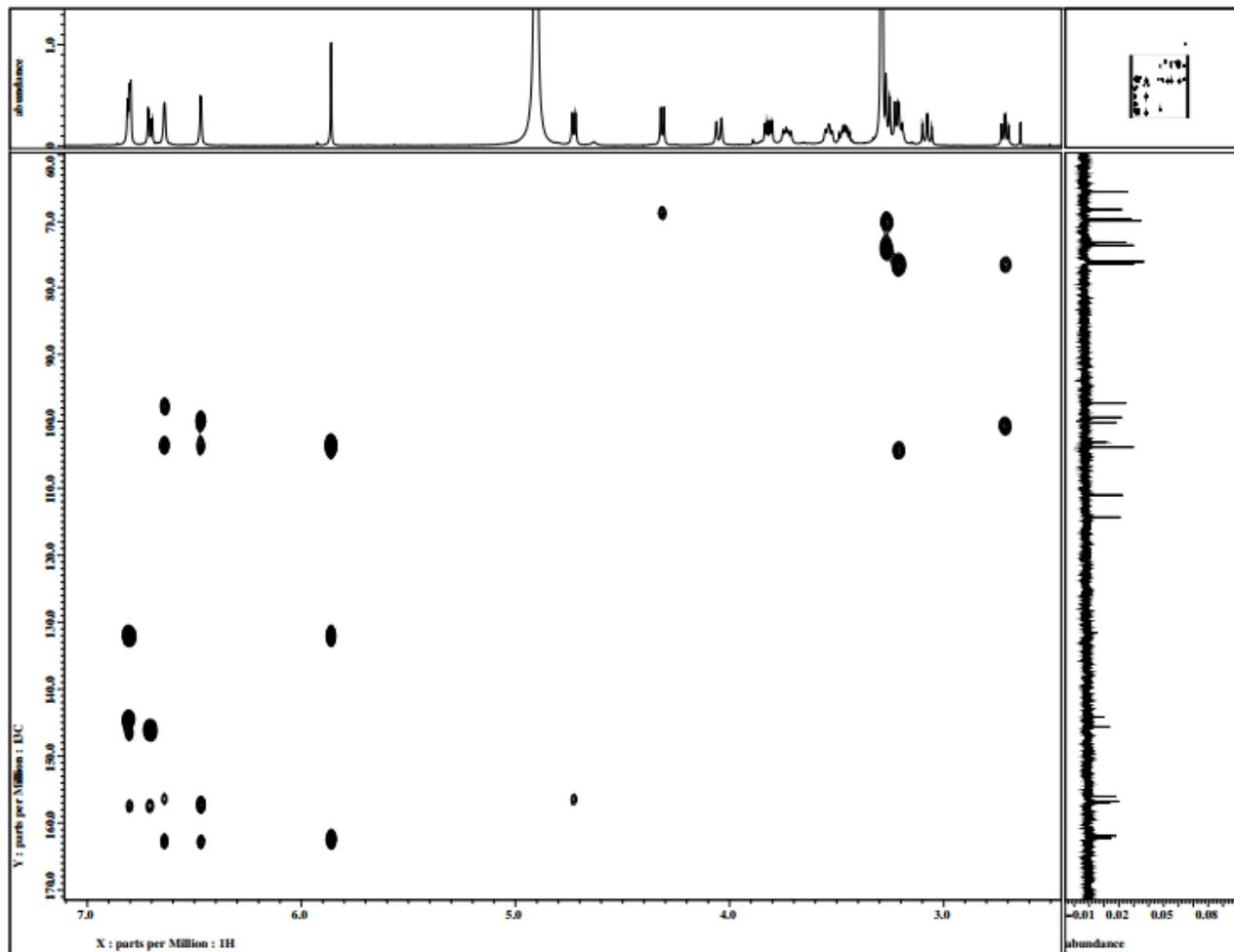


Figura 56. Espectro HMBC de la 5-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).

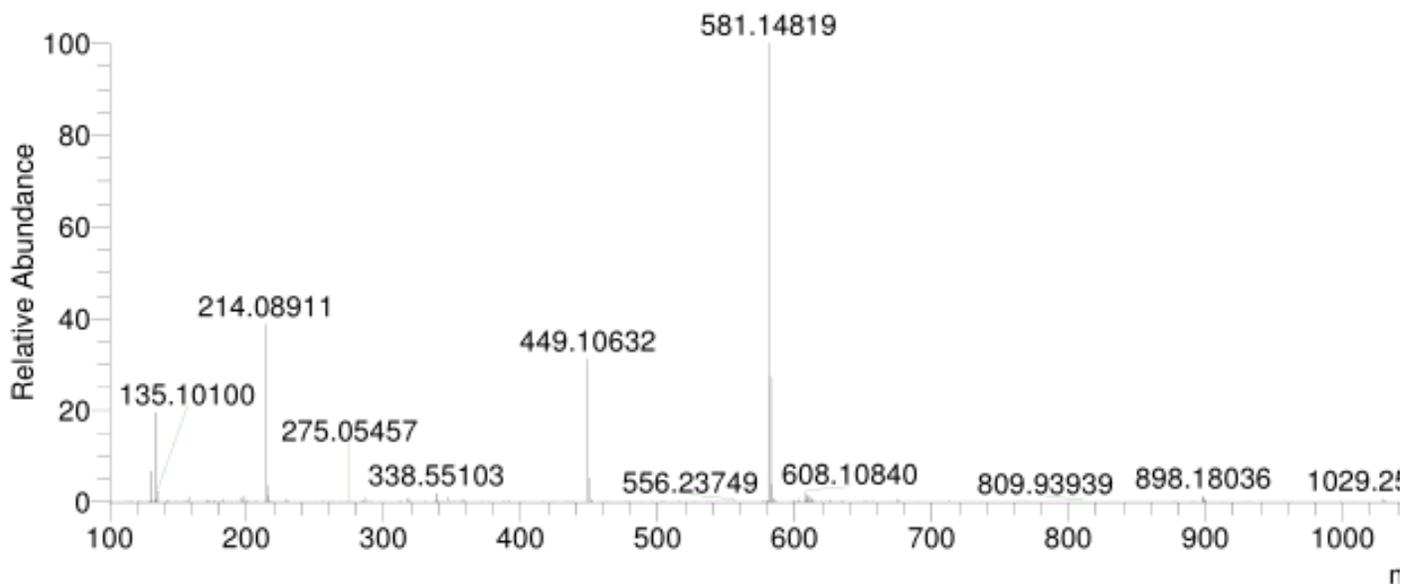


Figura 57 Espectro de massas (ESI) de la *C-D* diopiridinil (11-*b*) / *E* ligand piridinil (5,13',7,3',4) dihidro-*b*-ferrocenar (14). (15).

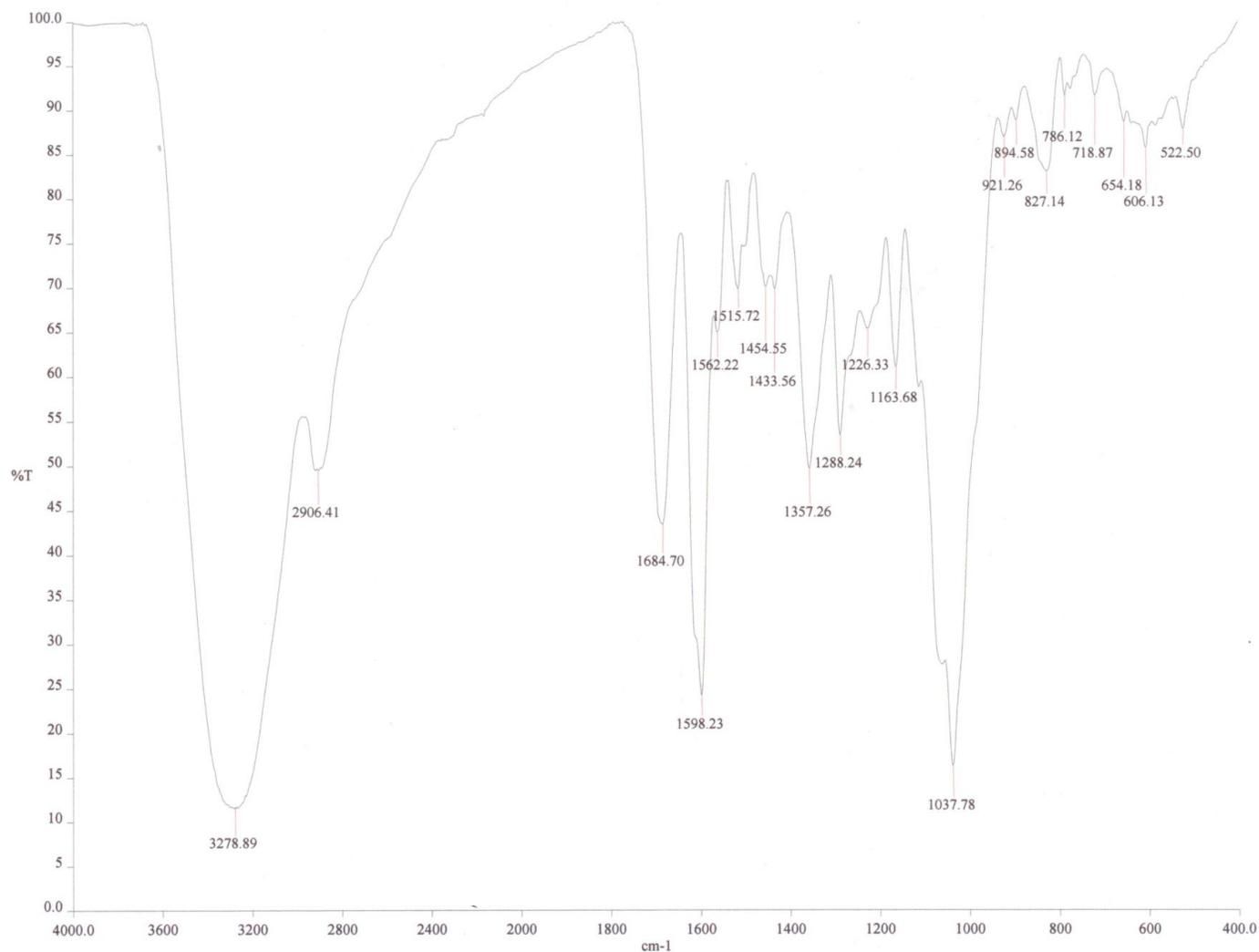


Figura 58. Espectro de IR de la 5-*O* [β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (14).
Figura 58. Espectro de IR de la 5-*O* [β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (15).

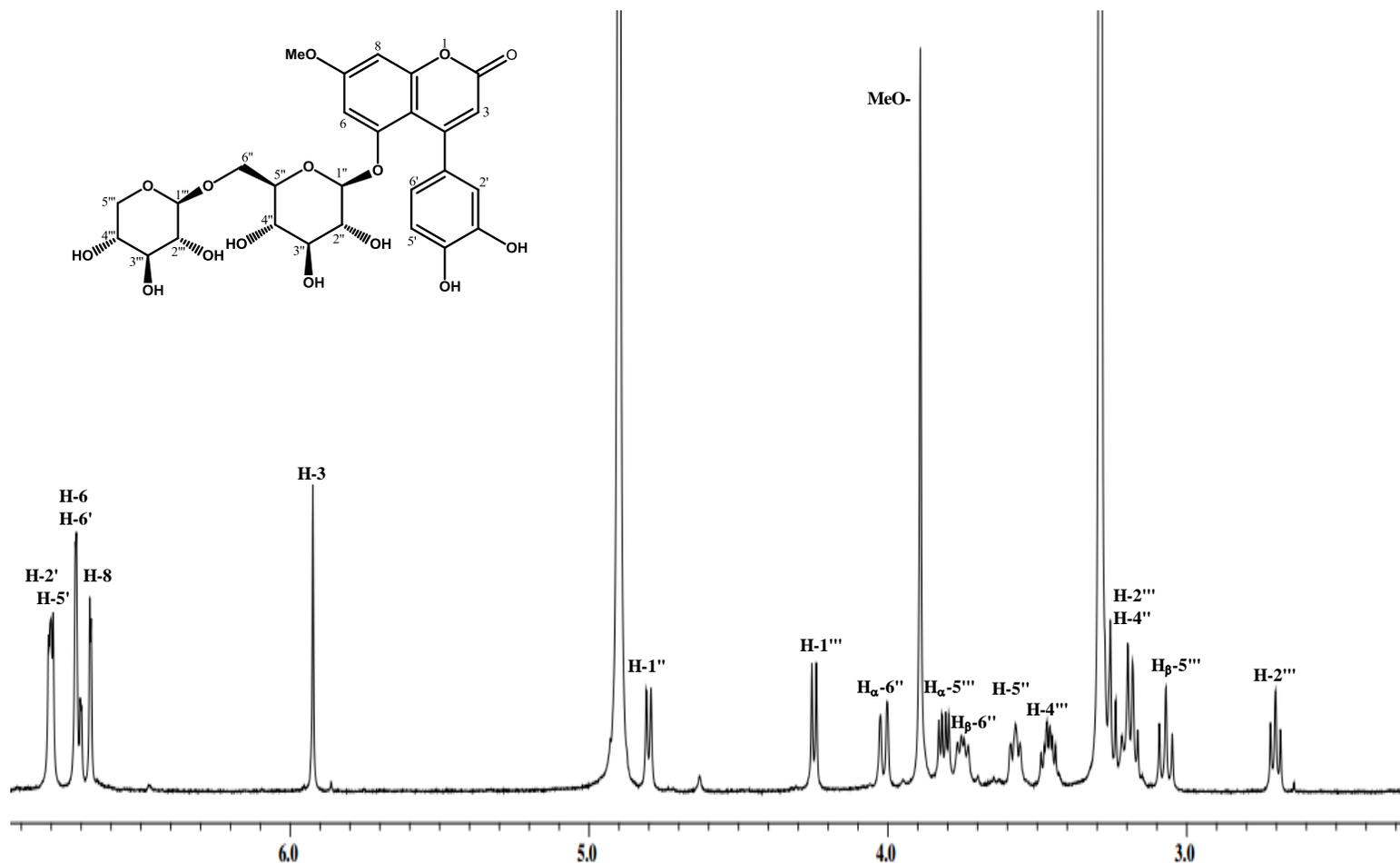


Figura 159 – Espectro de RMNRM (500 MHz, CDCl_3) da 5-O-(β -D-xilopiranosil-(1->6))- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-4',4'-dihidroxi-4-fenilcarica (15).

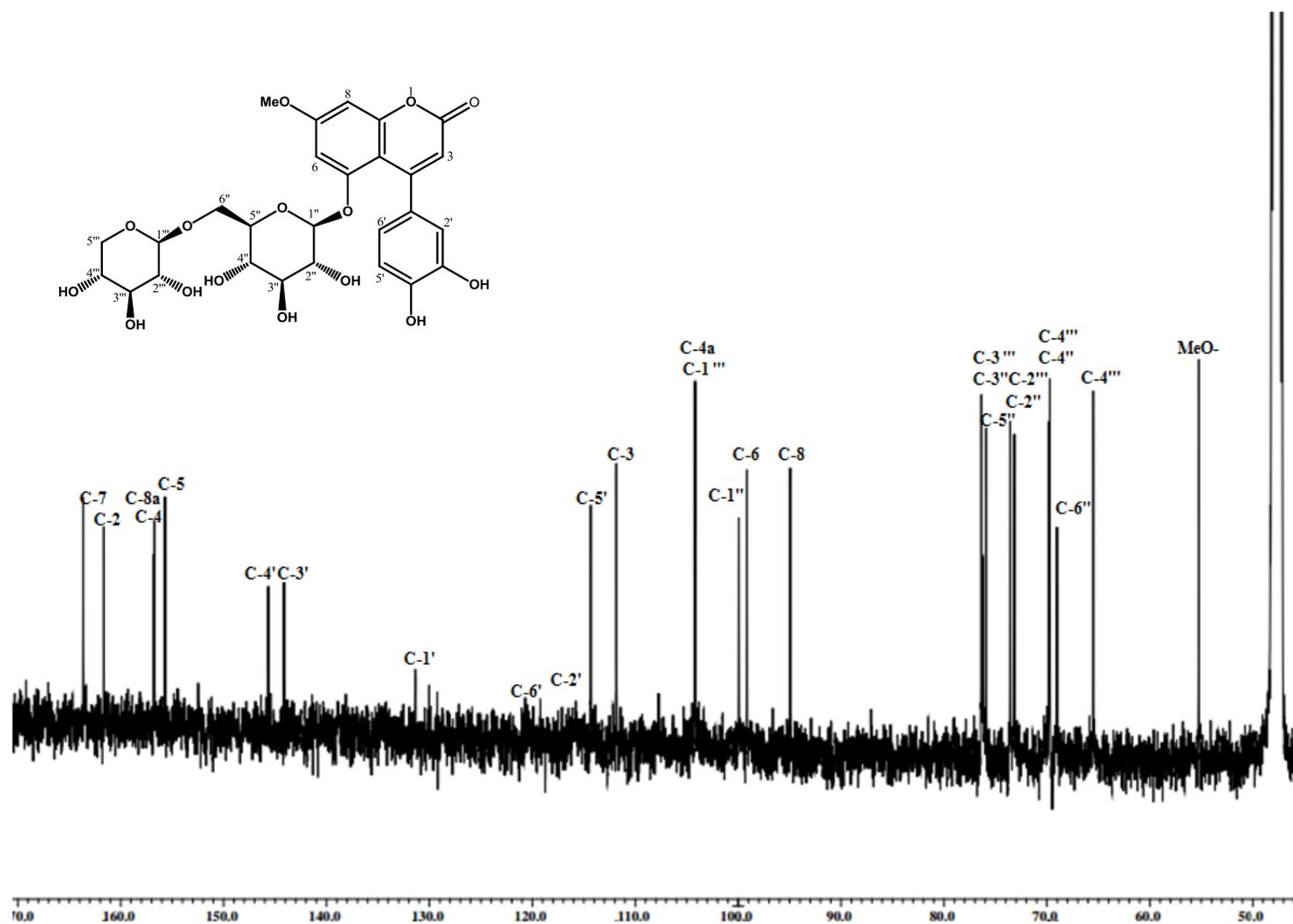


Figura 60. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CD₃OH, δ) de 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)]-β-D-glucopiranosil-7-metoxi-2',4'-dihidroxi-4'-β-D-cumarina (16).

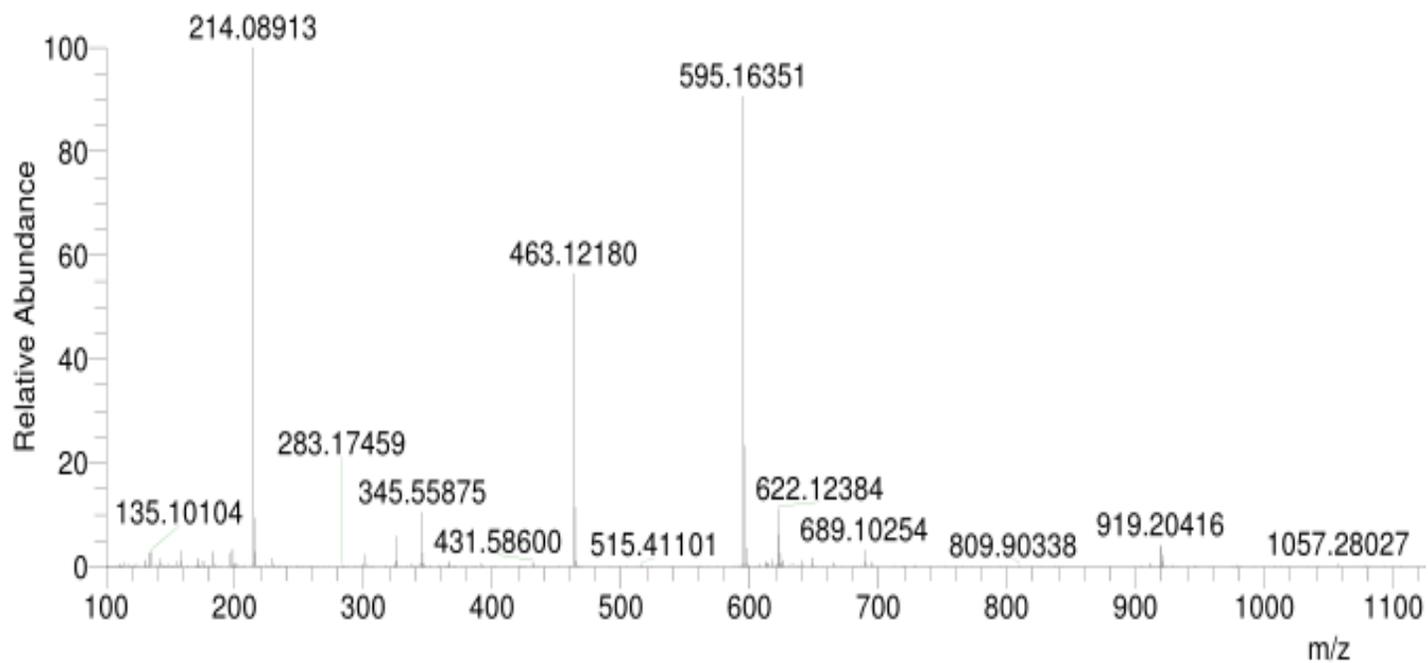


Figura 6.16. Espectro de masas (ESI-MS) de la 5-(1,2-dihidro-3,4-dihidroquinolin-6-yl)-1,2,4-triazol-3-ilidina (15).

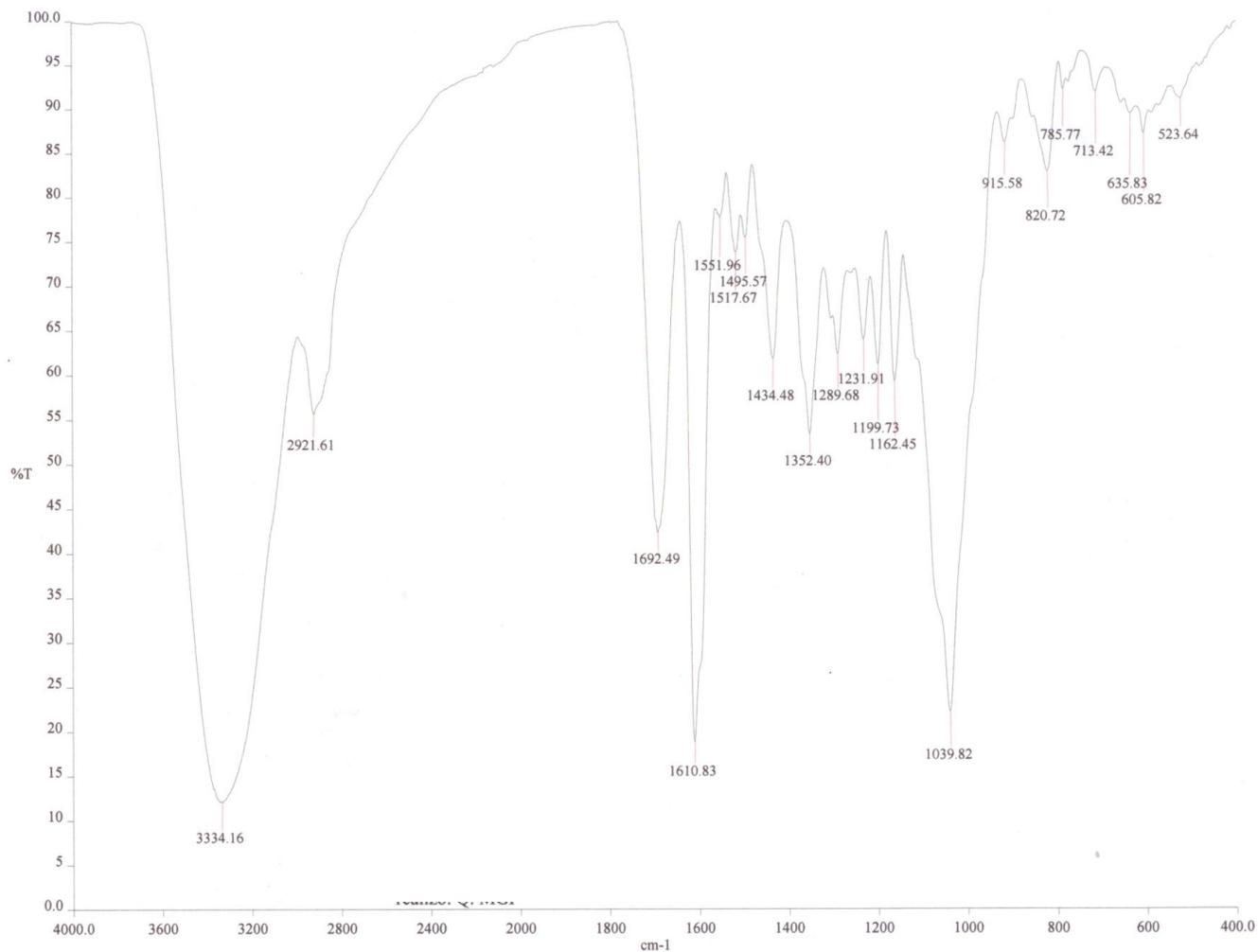


Figura 62. Espectro de IR de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**16**).

Figura 62. Espectro de IR de la 5-O-[β-D-xilopiranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**15**).

ANEXO 2

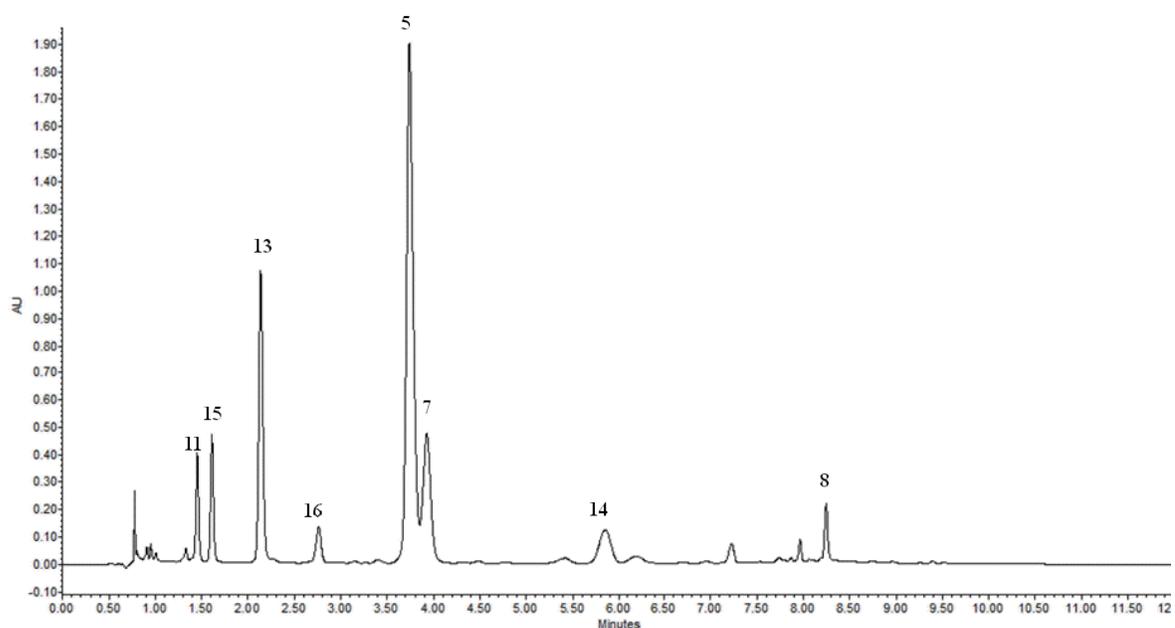


Figura 63. Perfil cromatográfico por CLUE del extracto acuoso de *E. caribaeum*. Columna BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm). Fase móvil, CH₃CN-H₂O (0.1% Ac. Fórmico) [0-5 min, (16:84–16:84); 5-7 min, (16:84–30:70); 7-10 min, (30:70–30:70); 10-10.5 min, (30:70–16:84); 10.5-12 min, (16:84–16:84)]. λ = 248 nm. Velocidad de flujo 0.4 mL/min. Tiempos de retención [**11** (t_R = 1.45 min); **15** (t_R = 1.61 min); **13** (t_R = 2.12 min); **16** (t_R = 2.76 min); **5** (t_R = 3.74 min); **7** (t_R = 3.80 min); **14** (t_R = 5.85 min); **8** (t_R = 8.25 min)].

ANEXO 3

Parámetros cromatográficos de los compuestos **11**, **13**, **14** y **16**.

Parámetro	Compuesto			
	11	13	14	16
Factor de capacidad (K')	0.86	1.72	2.53	6.47
Factor de coileo (T)	1.04	1.10	0.90	1.10
Número de platos teóricos (N)	4245.7	5139.5	11240.8	5057.6