



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas para cuantificar a los principios activos de la droga cruda de *Acourtia thurberi*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ROSA JENIFER MUÑOZ GÓMEZ



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2016



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

1er. Suplente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

2do. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sustentante:

Rosa Jenifer Muñoz Gómez

Índice

<i>Lista de Tablas</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Cuadros</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Gráficas</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>v</i>
1. Introducción	1
2. Antecedentes	12
2.1 Antecedentes del género <i>Acourtia</i> (Asteraceae).....	12
2.2 Antecedentes botánicos de <i>Acourtia thurberi</i> (Asteraceae).....	14
2.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) una herramienta para el análisis y estandarización de drogas crudas.....	16
2.3.1 Cromatografía de líquidos.....	16
2.3.2 Espectrometría de masas (EM).....	18
2.3.2.1 Interfases.....	19
2.4 Importancia del control de calidad en las plantas medicinales.....	22
3. Objetivos	24
4. Parte experimental	25
4.1 Material vegetal.....	25
4.2 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento preliminar.....	25
4.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar a la perezona (1) y al 8- β -D- glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4).....	26
4.3.1 Preparación de las soluciones de referencia	26
4.3.2 Evaluación de los parámetros de calidad.....	27
4.3.2.1 Linealidad del sistema.....	27
4.3.2.2 Límite de cuantificación (LC).....	28
4.3.2.3 Exactitud, precisión y recobro	28
5. Resultados y discusión	30

Índice -continuación-

5.1 Desarrollo del método analítico por UPLC-ESI/EM.....	30
5.2 Validación del método.....	32
5.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño.....	33
5.2.1.1 Linealidad del sistema.....	33
5.2.1.2 Linealidad del método y exactitud.....	38
5.2.1.3 Precisión.....	43
5.2.1.4 Limite de cuantificación (LC).....	45
6. Conclusiones.....	46
7. Referencias bibliográficas.....	47

Lista de Tablas

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes	4
Tabla 2. Plantas medicinales de reconocido uso medicinal tradicional de nuestro país como antidiabéticas	9
Tabla 3. Resultados experimentales de las curvas de calibración de la perezona (1) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) para evaluar la linealidad del sistema	35
Tabla 4. Datos obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método, para cuantificar a la perezona (1) en la decocción de <i>A. thurberi</i>	41
Tabla 5. Datos obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método, para cuantificar al 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) en la decocción de <i>A. thurberi</i>	42
Tabla 6. Resultados experimentales para evaluar la precisión del sistema	43
Tabla 7. Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto de <i>A. thurberi</i>	44

Lista de Figuras

Figura 1. Principales metabolitos secundarios aislados del género <i>Acourtia</i>	13
Figura 2. <i>Acourtia thurberi</i> (Gray) Reveal y King (Asteraceae)	14
Figura 3. Cromatograma del extracto acuoso de <i>Acourtia thurberi</i> . Picos identificados: perezona (1), α-pipitzol (2), β-pipitzol (3) y 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)	31
Figura 4. Cromatograma TIC generado por la técnica de electrospray (ESI) en la modalidad positiva de la decocción de <i>A. thurberi</i> , indicando los iones moleculares [M+H] ⁺ de a) la perezona (1) y b) el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)	32

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas del método analítico por UPLC-ESI/EM	27
Cuadro 2. Gradiente de elución utilizado en el método analítico	27
Cuadro 3. Modelos matemáticos de la linealidad del sistema para la perezona (1) y el 8- β -D-glucopiranosido de la 4-metoxi-5-metilcumarina (4)	34
Cuadro 4. Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema de los compuestos 1 y 4	37
Cuadro 5. Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del método de los compuestos 1 y 4	40

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar a la perezona (1)	36
Gráfica 2. Linealidad del sistema para cuantificar al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)	37
Gráfica 3. Linealidad del método para cuantificar a la perezona (1)	38
Gráfica 4. Linealidad del método para cuantificar al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)	39

Lista de Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
APIs	Interfases a presión atmosférica
CH₃CN	Acetonitrilo
CCA	Cromatografía en columna abierta
CL	Cromatografía de líquidos
CG	Cromatografía de gases
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EM	Espectrometría de masas
ESI	Técnica de ionización por electrospray
FA	Ácido fórmico
g	Gramo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
kg	Kilogramo
L	Litro
λ	Longitud de onda
MeOH	Metanol
μg	Microgramo
mg	Miligramo
μL	Microlitro
mL	Mililitro
min	Minuto
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
Q	Cuadrupolo
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
t_R	Tiempo de retención
UPLC-MS	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas

1. Introducción

La diabetes mellitus es definida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-015-SSA2-2010) como “una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por presentar un estado de hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas”. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se diagnostica a una persona como paciente diabético cuando tiene valores de glucosa sanguínea igual o mayores a 126 mg/dL en ayuno (WHO, 2010), a nivel mundial, se han reportado más 387 millones de pacientes que padecen esta enfermedad (IDF, 2014).

Se reconocen dos tipos principales de diabetes: la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) también conocida como diabetes juvenil o diabetes insulino dependiente, que es una enfermedad autoinmune y metabólica caracterizada por una destrucción selectiva de las células beta del páncreas causando una deficiencia absoluta en la producción de insulina; y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), también denominada no insulino dependiente, la cual se caracteriza por presentar una resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en la producción de la misma (WHO, 2010; NOM 015, 2010), este es un padecimiento con un grado de mortalidad y morbilidad significativo debido a sus complicaciones como son: las enfermedades microvasculares (retinopatías, neuropatías y nefropatías) y macrovasculares (ataques al corazón y problemas vasculares periféricos) (WHO, 2010; Patel *et al.*, 2012; Surendra *et al.*, 2014).

La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial es de aproximadamente un 6% y se pronostica un crecimiento exponencial en pocos años. El tratamiento farmacológico para la diabetes incluye en la mayoría de los casos diagnosticados clínicamente, el uso de agentes hipoglucemiantes orales y/o insulina. Sin embargo, durante muchos años la población de los países en vías de desarrollo ha optado por tratamientos médicos alternativos, que incluyen el uso de plantas medicinales, que han representado durante décadas el principal recurso para la atención primaria de la salud alrededor del mundo. Esta

circunstancia obedece a muchos factores entre los que destacan los de tipo socioeconómico y cultural (WHO, 1999). Así mismo, la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos ha promovido la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas (Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012).

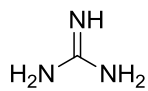
Es importante destacar que en la mayoría de los casos el conocimiento científico disponible sobre los vegetales que curan, se limita al inventario de los mismos y los aspectos botánicos, químicos, toxicológicos y farmacológicos se desconocen; además de que, no están sujetos a un riguroso control de calidad o estandarización que permita garantizar su seguridad y eficacia. A nivel mundial, se conocen alrededor de 800 especies utilizadas para el control de la diabetes, sin embargo, solo un número limitado de las mismas ha sido estudiado desde el punto de vista químico y farmacológico. De allí la necesidad de valorar estos recursos con el propósito de garantizar su uso racional.

De manera adicional, las plantas medicinales representan un punto de partida de importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Un ejemplo, lo representa el hipoglucemiente oral metformina que pertenece a la categoría de las biguanidas. La historia de este fármaco se puede iniciar a partir del empleo de la planta *Galega officinalis* popularmente denominada “ruda cabruna” o “lila francesa”, para el tratamiento de la diabetes en Europa desde la época medieval (Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012).

Diversos estudios farmacológicos realizados utilizando clorhidrato de guanidina administrado vía oral a animales ocasionaba convulsiones que eran consecuencia de cuadros hipoglucémicos que no se corregían por la administración de glucosa intravenosa. Estos resultados, sentaron las bases para evaluar a otros derivados de guanidina como la galengina (3-metil-3-butenil-guanidina) un producto natural aislado a partir de las semillas de *G. officinalis* y la agmatina (γ -aminobutilguanidina) aislada a partir del esperma del arenque, pero debido a su escasa actividad farmacológica no fueron utilizados como medicamentos.

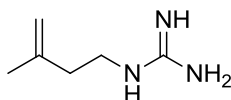
Posteriormente, a partir de estos productos naturales se realizó el diseño de otras biguanidas sintéticas: la metformina (dimetilbiguanida), la fenformina (feniletilbiguanida) y la butformina (*n*-butil-guanidina), que no se comportan como hipoglucemiantes estrictos, sino como agentes antihiperoglucemiantes, debido a que estos productos no ocasionan un cuadro de hipoglucemia, sino que reducen la hiperoglucemia basal y/o posprandial en el paciente diabético. De estos derivados sintéticos, la fenformina fue retirada a finales de la década de 1970, debido a la asociación con varios cuadros de acidosis láctica, siendo la metformina el único representante de este grupo de hipoglucemiantes orales, que sigue en uso debido a su eficacia, y que actualmente es el segundo antidiabético oral más prescrito después de la glibenclamida.

Algunos ejemplos selectos de plantas medicinales cuyo uso medicinal para el tratamiento de la diabetes ha sido validado desde el punto de vista químico y/o farmacológico se resumen en la **Tabla 1**.

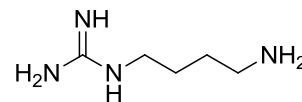


HCl

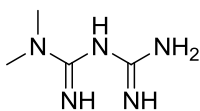
clorhidrato de guanidina



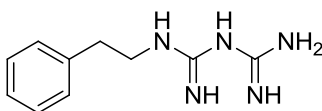
galengina



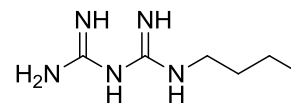
agmatina



metformina



fenformina



butformina

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes.

Especie	Familia	Nombre común	Parte utilizada	Compuestos Aislados	Estudios de Mecanismo de Acción
<i>Abies pindrow</i>	Pinaceae	Morinda	Planta entera		Secretagogo de insulina
<i>Allium cepa</i>	Amaryllidaceae	Cebolla	Bulbo	Sulfóxido de S-metil cisteína	Antidiabética
<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Ajo	Bulbo	Alicina, alil disulfuro de propilo, S-alil-cisteína, S-alil-mercaptocisteína	Estudios <i>in vivo</i> actividad antidiabética
<i>Aloe barbadensis</i>	Alliaceae	Gheequar	Hojas		Estimulación en la síntesis y liberación de la insulina
<i>Aloe vera</i>	Alliaceae	Sábila	Planta entera	Pseudoprototinosaponina AIII y prototinosaponina AIII	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	Acajú	Planta entera		Hipoglucemiante y antiinflamatorio
<i>Annona squamosa</i>	Annonaceae	Sharifa	Hojas		Incrementa los niveles de insulina
<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae	Annotta	Partes aéreas		Incrementa los niveles de insulina en plasma y favorece la unión al receptor de insulina
<i>Boerhaavia diffusa</i>	Nyctaginaceae	Punamava	Hojas		Incrementa los niveles de insulina en plasma

Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012 y referencias ahí citadas.

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes. –*continuación*–

Especie	Familia	Nombre común	Parte utilizada	Compuestos Aislados	Estudios de Mecanismo de acción
<i>Brassica juncea</i>	Cruciferae	Mostaza oriental	Semillas		Hipoglucemiante
<i>Bursera simaruba</i>	Burseraceae	Jiote	Corteza		Antidiabética
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Té verde	Hojas	Galato de <i>epi</i> -galocatequina	Incrementa la secreción de insulina
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanacea	Mirch	Frutos		Incrementa la secreción de insulina
<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	Papaya	Raíces		Hipoglucemiante e hipolipemiante
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Periwinkle	Hojas		Hipoglucemiante
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Lauraceae	Dalchini	Corteza		Incrementa los niveles de insulina en plasma
<i>Coccinia indica</i>	Cucurbitaceae	Pepino cimarrón	Frutos	Lupeol	Incrementa la síntesis del glucógeno
<i>Ephedra distachya</i>	Ephedraceae	Belcho	Partes aéreas	<i>L</i> -efedrina	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Eriobotrya japonica</i>	Rosaceae	Níspero japonés	Hojas	Cinchonaina	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Eucalyptus globulus</i>	Myrtaceae	Eucalipto	Hojas		Estimula la secreción de insulina en las células beta pancreáticas

Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012 y referencias ahí citadas.

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes. –*continuación*–

Especie	Familia	Nombre común	Parte utilizada	Compuestos Aislados	Estudios de Mecanismo de acción
<i>Ficus religiosa</i>	Moraceae	Peepal	Planta entera		Favorece la unión de la insulina con su receptor
<i>Gymnema sylvestre</i>	Asclepidaceae	Gurma	Hojas		Antidiabética
<i>Hamelia patens</i>	Rubiaceae	Chacloco	Hojas		Hipoglucemiante
<i>Helicteres isora</i>	Sterculiaceae	Tornillo de indio	Frutos		Disminuye los niveles de triglicéridos y es un sensibilizador de la insulina
<i>Hibiscus rosa</i>	Malvaceae	Gudhal	Flores	Quercetina	Estimula la secreción de insulina en las células beta pancreáticas
<i>Ipomoea batata</i>	Convolvulaceae	Shakarkand	Tallos		Reduce la resistencia a la insulina y los niveles de glucosa en sangre
<i>Juniperus communis</i>	Pinaceae	Hauber	Frutos		Incrementa el transporte de glucosa en la sangre e induce la secreción de insulina
<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	Melón amargo	Hojas	3 β ,7 β ,25-dihidroxi-5,23-cucurbita(<i>E</i>)dien-19-al, momordicina, charantina	Hipoglucemiante
<i>Neurolaena lobata</i>	Asteraceae	Mano de tigre	Hojas		Hipoglucemiante

Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012 y referencias ahí citadas.

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes. –*continuación*–

Especie	Familia	Nombre común	Parte utilizada	Compuestos Aislados	Estudios de Mecanismo de acción
<i>Olea europia</i>	Oleacea	Olivo	Hojas		Incrementa la liberación de insulina y transporte periférico de la glucosa
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Ginseng	Hojas	Polipéptidos (polipéptido pancreático (PP) - péptido bioactivo)	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Granada	Frutos	Peltatósido, hiperósido, isoquercitrina, guaijaverina, <i>epi</i> -catequina	Antihiperglucemiante mediante la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV, enzima clave en la homeostasis de la glucosa
<i>Pterocarpus marsupium</i>	Fabaceae	Quino de Malabar	Corteza		Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Quassia amara</i>	Simaroubaceae	Madera de Quassia	Planta entera	Quercetina, catequina	Hipoglucemiante
<i>Scoparia dulcis</i>	Serophulariaceae	Mithi patti	Planta entera	Ameli-6-metoxi-benzolinona	Secretagogo de insulina
<i>Solanum torvum</i>	Solanacea	Berenjena silvestre	Frutos		Antihiperglucemiante

Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012 y referencias ahí citadas.

Tabla 1. Plantas medicinales selectas utilizadas en el tratamiento de la diabetes. –*continuación*–

Espece	Familia	Nombre común	Parte utilizada	Compuestos Aislados	Estudios de Mecanismo de acción
<i>Stevia rebaudiana</i>	Asteraceae	Planta de los diabéticos	Hojas	Esteviósido, esteviol	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Swertia chirayita</i>	Gentianaceae	Chirayata	Hojas	Swerchiring	Estimula la secreción de insulina en las células beta del páncreas
<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae	Vainillo	Hojas	Tecomina y tecostanina	Hipoglucemiante reduce los niveles de triglicéridos y colesterol en pruebas <i>in vivo</i>
<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae	Zamarilla	Partes aéreas	Apigenina	Insulinomimético y/o secretagogo de insulina
<i>Theobroma cacao</i>	Sterculiaceae	Cacao	Frutos	Polifenoles, quercetina, catequina, <i>epi</i> -catequina, procianidina	Antidiabéticas
<i>Tinospora crispa</i>	Menispermaceae	Giloe	Tallos		Antihiperoglucemiante y estimula la liberación de insulina en las células beta pancreáticas
<i>Urtifca dioica</i>	Urticaceae	Bichhu booti	Hojas		Estimula la secreción de insulina
<i>Vinca rosea</i>	Apocyaceae	Sadabahar	Planta entera		Rejuvenece, regenera y estimula a las células beta del páncreas
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Adrak	Rizoma		Incrementa los niveles de insulina e hipoglucemiante

Alarcón *et al.*, 1998; Arumugam *et al.*, 2013; El-Abhar *et al.*, 2014; Mukesh *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012 y referencias ahí citadas.

De las especies enlistadas en la **Tabla 1** todas son utilizadas en la prevención o control de la diabetes en países como América Latina, China e India, entre otros, y su uso involucra el tratamiento con una sola especie o la combinación de dos o más especies así como diferentes preparaciones.

Por muchos años la población mexicana, ha utilizado a las plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de este padecimiento, y se cuenta con registros de alrededor de 150 especies medicinales localizadas en nuestro país para este fin. Sin embargo, pocas especies han sido evaluadas desde el punto de vista químico para desarrollar los procedimientos de control de calidad que permitan establecer la valoración de los marcadores y la identidad de cada especie, así como la caracterización farmacológica preclínica conducente a determinar la eficacia e inocuidad de las mismas (Alarcón *et al.*, 1998, Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En la **Tabla 2**, se enlistan algunas plantas medicinales utilizadas en México para control y/o tratamiento de la diabetes.

Tabla 2. Plantas medicinales de reconocido uso en la medicina tradicional de nuestro país como antidiabéticas.

Especie	Familia	Nombre popular	Parte utilizada
<i>Artemisia mexicana</i>	Leguminosae	Estafiate	Planta entera
<i>Astianthus viminalis</i>	Bignoniaceae	Azuchil	Hojas
<i>Bidens pilosa</i>	Compositae	Aceitilla	Planta entera
<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Naranja agria	Fruto
<i>Cnidocolus multilobus</i>	Euphorbiaceae	Chaya	Hojas
<i>Euphorbia preslii</i>	Euphorbiaceae	Golondrina	Planta entera
<i>Euphorbia prostrata</i>	Euphorbiaceae	Golondrina	Planta entera
<i>Exostema caribaeum</i>	Rubiaceae	Quina	Corteza
<i>Eysenhardtia polystachia</i>	Leguminosae	Palo dulce	Tallos
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Sterculiaceae	Guacima	Hojas
<i>Jatropha dioica</i>	Euphorbiaceae	Sangre grado	Raíces

Alarcón *et al.*, 1998, Andrade-Cetto y Heinrich, 2005 y referencia ahí citadas.

Tabla 2. Plantas medicinales de reconocido uso en la medicina tradicional de nuestro país como antidiabéticas. – *continuación* -

Especie	Familia	Nombre popular	Parte utilizada
<i>Lepechinia caulescens</i>	Labiatae	Salvia	Flores
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiceae	Mango	Hojas
<i>Mentha piperita</i>	Labiatae	Hierbabuena	Planta entera
<i>Musa sapientum</i>	Musaceae	Plátano	Flores
<i>Olea europea</i>	Oleaceae	Olivo	Hojas
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Cactaceae	Nopal	Tallos
<i>Parmentiera edulis</i>	Bignoniaceae	Chote	Fruto
<i>Persea americana</i>	Lauraceae	Aguacate	Semillas
<i>Randia echinocarpa</i>	Rubiaceae	Grangel	Fruto
<i>Ravolfia tetraphylla</i>	Apocynaceae	Paulillo	Hojas
<i>Rhizophora mangle</i>	Rizophoraceae	Mangle rojo	Tallos
<i>Salpianthus macrodonthus</i>	Nyctaginaceae	Apatzicua	Raices
<i>Sena skinneri</i>	Leguminosae	Paracata	Hojas
<i>Serjania triquetra</i>	Sapindaceae	Palo	Tallos
<i>Trigonella foenum graceum</i>	Leguminosae	Fenogreco	Semillas
<i>Tournefortia hirsutissima</i>	Boraginaceae	Lágrimas de San Pedro	Tallos
<i>Turnera diffusa</i>	Turneraceae	Damiana	Hojas

Alarcón *et al.*, 1998, Andrade-Cetto y Heinrich, 2005 y referencia ahí citadas.

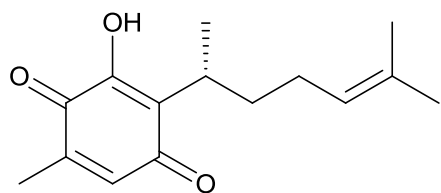
Algunas de estas plantas son consideradas excelentes candidatos para futuros estudios de eficacia como agentes antidiabéticos y para el aislamiento e identificación de los principios bioactivos responsables de la actividad farmacológica. En este contexto, *Acourtia thurberi* (Gray) Reveal y King (Asteraceae) es una planta mexicana ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes (Linares *et al.*, 1986). Desde el punto de vista farmacológico, la decocción de *A. thurberi* ha sido objeto de un estudio farmacológico conducente a establecer su efecto hipoglucemiante en conejos, y los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Desde el punto de vista químico, *A. thurberi* no ha sido objeto de estudio alguno (Alarcón *et al.*, 1997).

2. Antecedentes

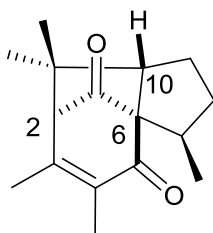
2.1 Antecedentes del género *Acourtia* (Asteraceae).

Las especies del género *Acourtia* presentan hojas verde oscuro en forma ovadas u oblongas y florecen en los meses de febrero y marzo. Sus flores pueden ser rosas o blancas y forman racimos terminales ligeramente ramificados. El género comprende alrededor de 86 especies distribuidas desde el suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Honduras (Gómez *et al.*, 2012). Estas plantas son silvestres y gozan de reputación folklórica por sus propiedades medicinales desde tiempos ancestrales. Muchas de éstas especies se conocen popularmente con el nombre náhuatl de "pipitzahuac". La infusión obtenida a partir de las raíces de algunas especies del género (*A. microcephala*, *A. wrightii* y *A. thurberi*) se utiliza en la medicina tradicional por sus propiedades laxantes, diuréticas y analgésicas (Martínez, 1989; Escobedo *et al.*, 2015), recientemente se documentó el uso de la decocción de *A. thurberi* para el tratamiento de la diabetes (Alarcón *et al.*, 1997, Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

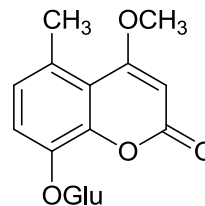
Algunas especies del género acumulan en sus raíces un sólido cristalino amarillo-naranja aislado y caracterizado como la perezona, una benzoquinona sesquiterpénica, el producto se reportó por primera vez en el año de 1852 por el Dr. Leopoldo Rio de la Loza con el nombre de ácido pipitzaico (Gómez *et al.*, 2012). Otros estudios químicos realizados con algunas especies del género han permitido el aislamiento y la caracterización de metabolitos secundarios pertenecientes a las categorías de los isocedranos, benzoquinonas y compuestos aromáticos simples (Zdero *et al.*, 1991; Escobedo *et al.*, 2015; **Figura 1**).



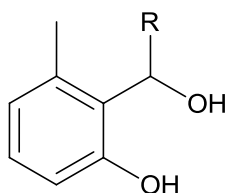
perezona (1)



α -pipitzol (2)
 β -pipitzol (3)

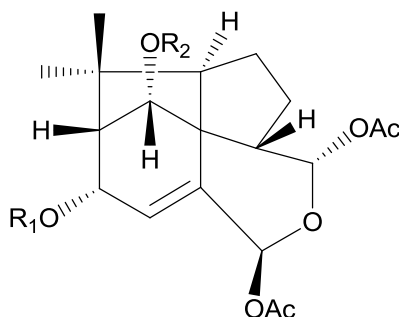


8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)



R= H; 2-(hidroximetil)-3-metilfenol 5

R= OH; 2-hidroxi-6-metil-[1,2-dihidroxietyl] benceno 6



R₁= epoxiangeloiloxi; R₂= H ; 1- α -hidroxi-3 α -epoxiangeloiloxi-14 α ,15 β -diacetoxi-14 β ,15 α -epoxi- α -isocedrano 7

R₁= angeloiloxi; R₂= H; 1- α -hidroxi-3 α -angeloiloxi-14 α ,15 β - diacetoxi-14 β ,15 α -epoxi- α -isocedrano 8

R₁= epoxiangeloiloxi; R₂ = propioniloxi; 1- α -propioniloxi-3 α -epoxiangeloiloxi-14 α ,15 β -diacetoxi-14 β ,15 α -epoxi- α -isocedrano 9

R₁= epoxiangeloiloxi; R₂= 2-metilbutiriloxi; 1- α -[2-metilbutiriloxi]-3 α -epoxiangeloiloxi-14 α ,15 β -diacetoxi-14 β ,15 α -epoxi- α -isocedrano 10

R₁= epoxiangeloiloxi; R₂= isovaleriloxi; 1- α -isovaleriloxi-3 α -epoxiangeloiloxi-14 α ,15 β -diacetoxi-14 β ,15 α -epoxi- α -isocedrano 11

Figura 1. Principales metabolitos secundarios aislados del género *Acourtia*.

2.2 Antecedentes botánicos de *Acourtia thurberi* (Asteraceae).

Acourtia thurberi (Gray) Reveal y King (Asteraceae) (**Figura 2**), conocida popularmente como “yerba de la tarántula”, “mata gusano”, “pipichawi” y “matarique” (Linares *et al.*, 1987), es una especie que se localiza en el continente americano desde el norte de la Sierra Madre Occidental hasta las montañas del sur de Arizona y Nuevo México. *A. thurberi* es una planta herbácea y vivaz, con un rizoma revestido de vello café o amarillo y tallos estriados y rojizos en las extremidades. Sus hojas son de forma ovada u oblonga, almenado dentadas. Las flores en forma de capítulos dispuestos en corimbos son rosadas o púrpuras (Martínez, 1969; **Figura 2**).



Figura 2. *Acourtia thurberi* (Gray) Reveal y King (Asteraceae).

A. thurberi, es una planta que se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar la diabetes, problemas del tracto urinario, la disfunción eréctil y como agente emenagogo (Raymond, 2001). Desde el punto de vista farmacológico, la especie ha sido objeto de un estudio realizado por Alarcón y colaboradores, en el que se determinó que la decocción de las raíces de la especie disminuye el estado de hiperglucemia en conejos y que esta actividad farmacológica se lleva a cabo solamente en presencia de insulina (Alarcón *et al.*, 1997). En este contexto, nuestro grupo de trabajo, se inició una investigación conducente a

establecer la inocuidad y eficacia preclínica como agente antidiabético de la planta, encontrándose que los diferentes preparados de la planta, así como los compuestos mayoritarios aislados, administrados por vial oral en ratones normales e hiperglucémicos, presentan un efecto hipoglucemiante y antihiperglucemiante importante (Martínez *et al.*, 2016).

Por otra parte, los estudios químicos realizados a la fecha han permitido el aislamiento y la caracterización de la perezona (**1**) y compuestos de tipo isocedrano siendo los mayoritarios el α -pipitzol (**2**) y el β -pipitzol (**3**). Otros productos aislados y caracterizados son de tipo cumarina como el 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**). Es importante destacar, que la presencia de éste metabolito en *A. thurberi* se reporta por primera vez.

2.3 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) una herramienta para el análisis y estandarización de drogas crudas.

La calidad farmacéutica de las drogas crudas y sus preparados se puede garantizar mediante el uso de métodos analíticos apropiados que permitan establecer la identidad química y valoración. Aunque desde principios de 1970 las técnicas de análisis que involucran diferentes tipos de acoplamientos (CL-UV, CL-EM, CL-RMN, etc.) ya eran visualizadas entre los diferentes grupos de investigación, no fue hasta la siguiente década cuando los primeros instrumentos de cromatografía gases y/o de líquidos acoplados a la espectrometría de masas (CG-EM y/o CL-EM) se empezaron a comercializar (Liang *et al.*, 2004). En particular, el acoplamiento de la CL con la EM, reúne en una sola técnica instrumental; propiedades analíticas de utilidad en la identificación de diferentes metabolitos presentes en matrices de naturaleza compleja, éstas incluyen la excelente separación que proporciona la CL, junto con la versatilidad, sensibilidad y selectividad que aporta el uso de la EM como técnica de detección. Cabe destacar que, la implementación de esta técnica analítica acoplada ha tenido que solventar algunos problemas como son: la introducción de flujos elevados de la fase móvil en un sistema de detección que requiere alto vacío. Además de la falta de afinidad entre los detectores de EM con las fases móviles no volátiles frecuentemente empleadas en la CL, que dificultan en la mayoría de los casos la ionización de los analitos. No fue sino hasta principios de los años 90 que se pudieron subsanar estas incompatibilidades. En principio se utilizaron dos interfases a presión atmosférica (APIs), los modo de ionización por electrospray (ESI) y química (APCI) se aplicaron con las mejores ventajas sobre las demás, siendo de las más utilizadas actualmente (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

2.3.1 Cromatografía de líquidos (CL).

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una inmóvil (fase estacionaria) y una móvil (fase móvil) siendo esta última la que percola a través de la primera (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006). El proceso cromatográfico se da como resultado de

repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes presentes en una mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase móvil y la fase estacionaria. Prácticamente no existen restricciones sobre la naturaleza de las fases a utilizar, siempre que la fase estacionaria sea sólida o líquida y la fase móvil líquida o gaseosa, por lo que es posible realizar por medio de estas técnicas la separación de los componentes de cualquier mezcla.

La cromatografía líquida (CL), es una técnica de separación caracterizada por una fase móvil líquida constituida por una mezcla de disolventes de distinta fuerza eluotrópica que eluye a través de una columna que contiene una fase estacionaria generalmente sólida. El proceso cromatográfico consiste en una repetición de etapas que tiene lugar durante el movimiento de los analitos presentes a través de la fase estacionaria en función de sus afinidades con la fase móvil. Con el objetivo de incrementar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de partícula de la fase estacionaria se ha ido disminuyendo, lo que ha obligado a utilizar sistemas capaces de soportar altas presiones para lograr la elución de la fase móvil a través de la fase estacionaria. De esta manera, dependiendo del tamaño de partícula de la fase estacionaria, se pueden considerar dos tipos de cromatografía líquida, la de alta resolución (HPLC), con un tamaño de partícula en un rango entre 3.5–7.0 μm , y la de ultra presión (UPLC), con un tamaño de partícula menor a 2 μm . Cabe destacar que dependiendo de la fase estacionaria utilizada existen también diferentes tipos de separación, uno de los cuales involucra a la cromatografía en fase reversa, que se fundamenta en que la fase móvil presenta una mayor polaridad (agua, metanol, acetonitrilo) respecto a la de la fase estacionaria, formada generalmente por largas cadenas de hidrocarburos que contienen entre 8 y 18 átomos de carbono (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

2.3.2 Espectrometría de masas (EM).

La característica distintiva entre los diversos espectrómetros de masas se encuentra en el tipo de analizador utilizado. El analizador es la parte del instrumento que permite separar, a muy bajas presiones, los iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización, en función de su relación masa/carga (m/z). Los analizadores de mayor relevancia que se pueden encontrar actualmente son: el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones (IT, LIT), sector magnético y, resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICRMS). De estos analizadores, el más versátil es el cuadrupolo que consiste en cuatro barras o polos de sección cilíndrica o hiperbólica, alineadas paralelamente entre sí, equidistantes a un eje central imaginario situado sobre el eje z , el cual funciona mediante la aplicación de voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) a cada pareja de barras opuestas. Esto permite que los iones de una relación m/z determinada pasen por el túnel formado por las cuatro barras siguiendo trayectorias oscilantes estables que conducen al detector, mientras que el resto de los iones se desvía. Entonces, variando rápidamente el voltaje aplicado, se pueden seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. De este modo, el cuadrupolo actúa como un filtro de iones, discriminándolos en función de su relación m/z . Los cuadrupolos, junto a las trampas de iones, son los analizadores más usados para estudios cuantitativos de compuestos “target” (diana), es decir, de compuestos previamente seleccionados, que son los que se quiere determinar (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

Uno de los parámetros instrumentales de mayor relevancia de los analizadores de EM es su resolución ($m/\Delta m$), es decir, su capacidad de separar iones de masas adyacentes. La resolución está íntimamente ligada a la sensibilidad, de manera que cuando se trabaja con mucha resolución la sensibilidad que se obtiene suele ser deficiente, y viceversa. Esto se debe a que tanto la resolución como la sensibilidad dependen del número de iones que atraviesa el cuadrupolo y llega al detector, es decir, del número de trayectorias estabilizadas al aplicar voltajes variables de DC y RF. Con este tipo de analizadores, pese a poder alcanzar resoluciones de 0.1 Da, se suele trabajar a una resolución de la unidad (se consigue discernir entre iones cuyas relaciones m/z difieren entre sí de 1 Da), facilitando la obtención

de una buena sensibilidad para la determinación de analitos a niveles de concentración muy bajos en un rango de masas de hasta 4000 m/z . Una de las principales limitaciones del cuadrupolo, pese a la rápida velocidad de barrido (~ 4000 umas/s) y alta transmisión de iones, es su baja sensibilidad en la modalidad de trabajo “full-scan” o barrido completo de iones, ya que no todos los iones generados en la interfase de una misma m/z alcanzarán el detector. Debido a ello y a las mediciones de masa nominal, como consecuencia de su baja resolución, este analizador no se suele utilizar en la búsqueda de compuestos desconocidos o como una técnica de elucidación estructural. Los modos de trabajo típicos cuando se dispone de un analizador cuadrupolo son: “full-scan” o barrido total, en el que se registra un espectro de masas continuo en un rango definido, cuya aplicación suele tener finalidades cualitativas y “SIM” (selected ion monitoring). En la técnica SIM se selecciona uno o más iones específicos y sólo se determinan estos con fines cuantitativos (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

2.3.2.1 Interfases.

Los primeros esfuerzos reseñables con objeto de conseguir acoplar CL a detectores EM se remontan a finales de 1960 cuando el científico ruso Tal'roze y sus colaboradores desarrollaron una interfase inspirada en la ya utilizada de CG-EM, dotadas de ionización electrónica (EI). Esta interfase se basa en la introducción directa del líquido proveniente de CL a flujos muy bajos de alrededor de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Unos años después, McLafferty propuso lo que actualmente se considera como punto de partida de las actuales APIs: la posibilidad de hacer uso de los disolventes orgánicos con la finalidad de facilitar la reacción química de ionización. Paralelamente a estas aportaciones, se desarrollaron dos interfases, la “moving wire” y “moving belt”, cuyo funcionamiento consiste en la eliminación del disolvente previo a la ionización de los analitos, sin embargo pese a la popularidad inicial, estas interfases fueron descartadas debido a su complejidad y a las limitaciones relacionadas con el uso de los disolventes adecuados. Una de las interfases que alcanzó mayor fama durante la década de los 80 fue el “thermospray”, desarrollado por ML. Vestal, ya que permitía trabajar con mayores flujos cromatográficos, además, de que facilitaba la determinación de

compuestos termolábiles. No obstante, tanto su efectividad como la selección de las condiciones óptimas de rendimiento dependían excesivamente del tipo de muestra a analizar, por lo que la aplicación de esta interfase quedó limitada. Finalmente, otra interfase con muy buena aceptación dentro del grupo de las basadas en la eliminación del disolvente, previa a la llegada de las moléculas de analito a la fuente de ionización, fue la “particle beam”, cuya aplicación se asocia generalmente al uso de fuentes de tipo IE o de ionización química (CI). Así, no fue hasta el año de 1980 cuando las APIs empezaron a destacar sobre las demás interfases debido a su capacidad de determinar compuestos de elevado peso molecular y a su robustez al permitir ionizar una amplia gama de analitos en matrices de diversa naturaleza y su implementación fue generalizada en el año de 1990. Estas interfases se caracterizan por la formación de los iones a presión atmosférica fuera de la zona de alto vacío, evitando los problemas técnicos relacionados con la incompatibilidad líquido/alto vacío. Actualmente, las interfases de ionización por electro spray (ESI) y por ionización química (APCI) son las más utilizadas en los instrumentos CL-EM, habiendo contribuido al progreso tecnológico de la espectrometría de masas con el consecuente aumento de sus aplicaciones. En el año 2002, el científico norteamericano John B. Fenn fue galardonado con el premio Nobel de Química por su contribución al desarrollo de la interfase ESI para su aplicación en métodos de identificación y de análisis estructural de macromoléculas biológicas.

Cuando el acoplamiento CL-EM se lleva a cabo mediante una interfase ESI, los analitos disueltos en la fase móvil pasan al detector EM a través de un capilar de acero inoxidable a presión atmosférica sometido a un alto voltaje (del orden de 3-5 kV). La corriente de líquido, al fluir a través del capilar, se dispersa y las moléculas de los analitos y del disolvente forman un spray de pequeñas gotas cargadas en un proceso de nebulización. La mayor parte de las moléculas de disolvente se evaporan (desolvatación) al atravesar la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas (T 120°C). Dicha desolvatación es asistida además por una corriente de nitrógeno (T 350°C). A medida que se evapora el disolvente, las gotas se hacen cada vez más pequeñas hasta que las fuerzas repulsivas entre cargas en la superficie son capaces de superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial y se produce la ruptura final de la gota originando iones en fase gaseosa (explosión de Coulomb). Finalmente, dichos iones se transfieren a través de lentes

focalizadoras al espectrómetro de masas. Entre las moléculas del analito y las de la fase móvil tienen lugar reacciones de transferencia protónica en fase vapor y como resultado, se pueden obtener moléculas de analito protonadas, desprotonadas y también aductos con moléculas de disolvente de la propia fase móvil o con los modificadores adicionados, siendo muy comunes los aductos de sodio, potasio o amonio. Los aductos formados con moléculas de disolvente (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+) se suelen convertir en $[\text{M}+\text{H}]^+$ cuando aumenta el voltaje de cono, ya que la primera fragmentación que sufren (fragmentación de cono) es la pérdida de la molécula de disolvente.

Una de las principales características de esta interfase es el abanico de posibilidades que abarca para su detección desde sustancias de bajos hasta altos pesos moleculares y termolábiles, además de que suele ser la más apropiada para el análisis de compuestos muy polares o incluso iónicos, y la incorporación de la corriente de nitrógeno a alta temperatura, permite trabajar con flujos del orden de $1 \mu\text{L}/\text{min}$, existiendo de manera puntual alguna aplicación actual capaz de llegar a $1 \text{ mL}/\text{min}$, convirtiéndose con ello en la técnica de ionización de referencia más utilizada en los laboratorios, sobretodo aquellos relacionados con la industria farmacéutica y proteómica, por mencionar algunos (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

Cabe destacar, que para alcanzar las condiciones más adecuadas en cada análisis por CL-EM, se deben considerar una serie de parámetros generales relacionados con la selección de la fase móvil, la columna o el flujo de trabajo. Así, las soluciones amortiguadoras de pH y aditivos empleados deben ser volátiles (acetato de amonio, formiato de amonio, trietilamina, ácido acético, ácido fórmico) e introducidos a concentraciones relativamente bajas. Los disolventes orgánicos utilizados deben ser polares, tales como el acetonitrilo y el metanol, favoreciendo así la ionización de los analitos en la interfase.

2.4 Importancia del control de calidad en las plantas medicinales.

Los medicamentos obtenidos de plantas medicinales han sido ampliamente utilizados durante las últimas décadas en diversas partes del mundo. Por este motivo, es necesario asistir a las autoridades sanitarias a nivel mundial con información actualizada y autorizada para la formulación de criterios básicos para la evaluación del control de calidad, la seguridad y la eficacia de los productos herbolarios y, en consecuencia, ayudar a la integración de monografías farmacopéicas y/o tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) de las especies. Esto con la finalidad de regular y homogenizar a nivel mundial los criterios de evaluación para el control de calidad, la seguridad y la eficacia de las drogas crudas y sus derivados (Liang *et al.*, 2004; WHO, 1999).

En México, a pesar de la gran tradición en el uso de plantas medicinales existe una carencia notable de estándares para realizar el control de calidad de los recursos naturales y sus preparados. De tal manera que, la importancia del control de calidad y de la estandarización de los productos botánicos es la principal preocupación para la aceptación global de éstos en cualquier sistema moderno de la medicina.

Para asegurar la identidad, la pureza y la composición de los insumos de origen vegetal que se utilizan para la fabricación de medicamentos, es necesaria la realización de metodologías específicas, con el fin de establecer la identidad botánica y química de la planta. Estos ensayos, se realizan a través de una comparación con las características de materiales de referencia autenticados (ARM) o bien estándares de referencia. Durante el análisis de las materias primas, los ARM, también se someten a las mismas pruebas de diagnóstico botánico y químico que procedan (WHO, 1999).

La identificación botánica de una especie medicinal, requiere de personal capacitado (botánico). Este proceso debe realizarse en el hábitat natural o bien en el campo de cultivo. Alternativamente, una muestra representativa de la colecta se debe identificar por comparación con una muestra botánica de referencia que se encuentre almacenado en un herbario. Una vez realizada la identificación botánica se lleva a cabo la identificación química para confirmar la autenticidad del insumo herbolario. En la identificación química

se emplean procedimientos espectroscópicos o cromatográficos para detectar la presencia de compuestos activos o marcadores específicos de la especie, empleándose métodos espectroscópicos (UV, IR) o cromatográficos (CG, CL, HPLC, UPLC) que permiten realizar la identificación química mediante la comparación de las huellas dactilares o de propiedades físicas y químicas con un estándar de referencia. Los métodos analíticos seleccionados para detectar huellas digitales deben ser capaces de detectar el mayor número de componentes posibles. En ocasiones, resulta favorable el empleo de una combinación de métodos analíticos con diferentes principios de separación y condiciones de análisis. Una vez establecida la autenticidad botánica y química del material vegetal, el insumo herbolario, puede emplearse para elaborar preparaciones botánicas (Liang *et al.*, 2004, WHO, 1999).

3.- Objetivos

El objetivo primordial del presente trabajo de investigación es establecer los criterios de calidad de la droga cruda *A. thurberi* para seleccionar a los marcadores químicos de la planta, mediante el uso de métodos analíticos apropiados que involucran diferentes tipos de acoplamiento, en particular, a la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (CL-EM). Todo ello, con la finalidad de generar la monografía farmacopéica y/o tipo OMS de la especie.

Para el cumplimiento del objetivo principal, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- a) Determinar a los marcadores analíticos y perfiles cromatográficos de los preparados de *A. thurberi*.

- b) Desarrollar y validar un método analítico apropiado para cuantificar al menos a dos de los marcadores analíticos presentes en el extracto acuoso aplicando la técnica de UPLC-ESI/EM.

4.- Parte experimental

4.1 Material vegetal.

Las raíces de la especie medicinal *Acourtia thurberi* (Gray) Reveal y King (Asteraceae) se recolectaron en la Sierra Tarahumara, Chihuahua, México en abril de 2015. Una muestra de referencia se encuentra depositada en el Herbario Nacional MEXU (Bye 37299). La identidad y la clasificación botánica de la especie fue establecida por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). El material vegetal se fragmentó (2 mm) en un molino de cuchillas Thomas Wiley Model 4 (Thomas Scientific, EE.UU.).

4.2 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento preliminar.

La preparación del extracto acuoso de la especie objeto de estudio se realizó a partir de 10 g de las raíces secas y molidas de la planta, mediante la técnica de decocción, utilizando 1 L de agua hirviendo. El extracto acuoso resultante se filtró y se evaporó a sequedad a presión reducida. En un estudio químico previo se realizó el aislamiento y la caracterización de cuatro metabolitos secundarios: la perezona (**1**), el α -pipitzol (**2**), el β -pipitzol (**3**) y el 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**). Todos los productos aislados fueron aislados empleando procesos de reparto y cromatográficos, y fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales (Martínez *et al.*, 2016).

4.3 Desarrollo del método analítico para cuantificar a la perezona (1) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4).

El desarrollo del método de análisis se realizó en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia UPLC clase H marca Waters (Milford, MA, EE.UU.) equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un horno para columna y un detector UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) acoplado a un detector de masas SQD2 simple cuadrupolo con una fuente de ionización por electrospray (ESI/EM). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynk| version 4.1. Todos los análisis se llevaron (**Cuadro 1**) a cabo en una columna BEH C-18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) (Waters, Milford, MA, USA). La fase móvil empleada consistió en una mezcla binaria compuesta por CH₃CN-H₂O (0.1% Ácido fórmico) utilizando el gradiente descrito en el **Cuadro 2**. La longitud de onda empleada para la detección fue de 270 nm, con un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 3 μL.

Empleando el sistema de detección acoplado (CL-EM) descrito se identificaron a la perezona (1) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) en la decocción de *A. thurberi* mediante el análisis comparativo de sus tiempos de retención y la co-elución de ambos estándares con el preparado bajo análisis. Para ello, las soluciones de la decocción y los estándares se prepararon a una concentración de 1 mg/mL utilizando como disolventes H₂O-MeOH (1:1) en el caso de la decocción y metanol para los estándares.

4.3.1 Preparación de las soluciones de los estándares.

Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de las soluciones de referencia de la perezona (1) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) en MeOH a una concentración de 1000 μg/mL. A partir de estas soluciones de referencia se prepararon

las curvas de calibración con cinco niveles de concentración: 10, 50, 75, 150 y 250 µg/mL para 1 y 1, 5, 10, 50 y 100 µg/mL para 4.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas del método analítico por UPLC-ESI/EM.

Fase móvil	Solución A CH ₃ CN Solución B Agua acidificada (0.1% Ácido fórmico)
Temperatura	40 °C
Flujo	0.3 mL/min
Volumen de inyección	3 L
Longitud de onda de detección	270 nm
Voltaje del cono	4 kV (1) / 3 kV (4)
Voltaje del capilar	35 V (1) / 40 V (4)
Temperatura de desolvatación	350 °C (1) / 400 °C (4)
Flujo de nitrógeno	450 L/hr (1) / 465 L/hr (4)

Cuadro 2. Gradiente de elución utilizado en el método analítico.

Tiempo (minutos)	Solución A (%)	Solución B (%)	Elución
0–2.4	15	85	gradiente
2.4–10	20	80	gradiente
10–10.4	100	0	gradiente
10.4–12	15	85	isocrático

4.3.2 Evaluación de los parámetros de calidad.

4.3.2.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se evaluó mediante la preparación de cinco curvas de calibración, con cinco niveles de concentración, preparadas por pesadas independientes y en el rango de concentraciones indicado en el inciso 4.3.1 de esta sección experimental. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables

concentración (x) y área bajo la curva (y). Los parámetros estadísticos calculados fueron: la ordenada al origen (β_0), la pendiente de la recta (β_1), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r). Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza para la pendiente IC (β_1) no debe incluir al cero mientras que, el de la ordenada al origen IC (β_0) debe incluir al cero (USP 37).

4.3.2.2 Límite de cuantificación (LC).

La estimación del límite de cuantificación (LC) se realizó mediante diluciones seriales de cada compuesto hasta encontrar la concentración mínima que presentara una respuesta identificable de por lo menos cinco veces la señal de ruido (comparada con el blanco), con un coeficiente de variación menor al 20% y una exactitud en la concentración recuperada del $\pm 20\%$. Para ello, las muestras se prepararon por quintuplicado y se analizaron en el sistema cromatográfico.

4.3.2.3 Exactitud, precisión y recobro.

Para evaluar estos parámetros de desempeño se preparó, por quintuplicado, una curva con tres niveles de concentración que contenía ambos estándares a las concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$ para **1** y de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 150 $\mu\text{g/mL}$ para **4**. A cada nivel de concentración se adicionó un volumen constante 0.5 mL de la decocción de *A. thurberi* (matriz de trabajo) a una concentración de 1 mg/mL. Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) y se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: β_0 , β_1 , r y r^2 . Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.999$; el intervalo de confianza para la

pendiente IC (β_1) no debe incluir al cero mientras que, el de la ordenada al origen IC (β_0) debe incluir al cero (USP 37).

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

$$Exactitud = \frac{\text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100$$

Finalmente, se calculó para cada nivel el promedio aritmético y el coeficiente de variación. El método analítico es exacto si los porcentajes de recobro se encuentran en un rango entre el 98–102% y el coeficiente de variación no es mayor del 2.0% (USP 37).

Finalmente, la precisión se estimó a través de la repetibilidad y la precisión del sistema. La primera, se evaluó mediante la preparación, por sextuplicado, de una muestra de la matriz de trabajo (500 $\mu\text{g/mL}$) adicionada con un solo nivel de concentración 50 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ para **1** y **4**, respectivamente. La respuesta analítica obtenida permitió calcular la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación para esta característica de calidad establece que el coeficiente de variación (CV) no debe ser mayor al 2.0% (USP 37).

El segundo parámetro de desempeño se determinó mediante el análisis, por triplicado, de una solución de 75 $\mu\text{g/mL}$ de la perezona (**1**) y de 100 $\mu\text{g/mL}$ del 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) preparadas de forma independiente en dos días y por dos analistas diferentes. Con el área bajo la curva, obtenida como respuesta analítica, se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). Para cumplir con este parámetro se requiere que el CV sea menor al 2.0% (USP 37).

5.- Resultados y discusión

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de éste trabajo consistió en el establecimiento de perfiles cromatográficos para la identificación de los marcadores; un procedimiento útil para establecer las pruebas de identidad química de la droga cruda derivada de *Acourtia thurberi* planta comercializada en México para tratar la diabetes. Enseguida, se desarrolló y se validó un método analítico por UPLC–ESI/EM para evaluar el contenido de los marcadores en la decocción derivada de la especie. Toda la metodología analítica desarrollada en la presente disertación indudablemente será de gran valor para el control de calidad de ésta especie sea cual fuere su utilidad comercial.

La técnica de UPLC–ESI/EM fue seleccionada debido a su gran selectividad permitiendo realizar una “doble separación”, la primera que se produce en el sistema cromatográfico y la segunda realizada por el detector de masas, también se seleccionó debido a que la muestra a analizar representa una matriz multi-componenete de naturaleza compleja. Cabe destacar que a pesar de la gran selectividad de la técnica, es importante considerar el tipo de interfase utilizada, la matriz objeto de análisis, así como, las características fisicoquímicas del analito (Crockford *et al.*, 2008; Engström *et al.*, 2015; Nordström *et al.*, 2006).

5.1 Desarrollo del método analítico por UPLC–ESI/EM.

Para el desarrollo del método analítico, en primer lugar, se establecieron las condiciones cromatográficas para la separación de los componentes mayoritarios presentes en la decocción de *A. thurberi*, estas condiciones incluyeron una columna C18 (Fase reversa), un sistema binario de disolventes (agua acidificada y acetonitrilo) y los detectores de UV (PDA) y EM (SQD2). Con base en estas consideraciones se ensayaron varias columnas C18 utilizando diferentes longitudes de onda, para la detección de los analitos de interés, así como diversos sistemas de elución y flujos, hasta encontrar las mejores

condiciones de separación de los compuestos perezona (**1**) y 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) presentes en el extracto acuoso. Así, la identificación de los marcadores analíticos en el extracto acuoso se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención, las absorbancias y los espectros de masas, que presentaron cada uno de los estándares con las señales presentes en el cromatograma obtenido con la decocción. De manera adicional, se realizó la co-elución de los estándares con la matriz de trabajo utilizada para validar el método. Los tiempos de retención (t_R) obtenidos para cada compuesto, bajo las condiciones de análisis empleadas, fueron los siguientes: perezona (**1**) (t_R 9.22) y 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) (t_R 3.94). En la **Figura 3** se ilustra el perfil cromatográfico del extracto acuoso utilizado como matriz de trabajo. Como se observa en dicha **Figura 3** el compuesto **4** es el que presenta la señal de mayor intensidad en una relación (1.2:1) con respecto al compuesto **1**. En la **Figura 4** se ilustran los espectros de masas de los estándares de interés.

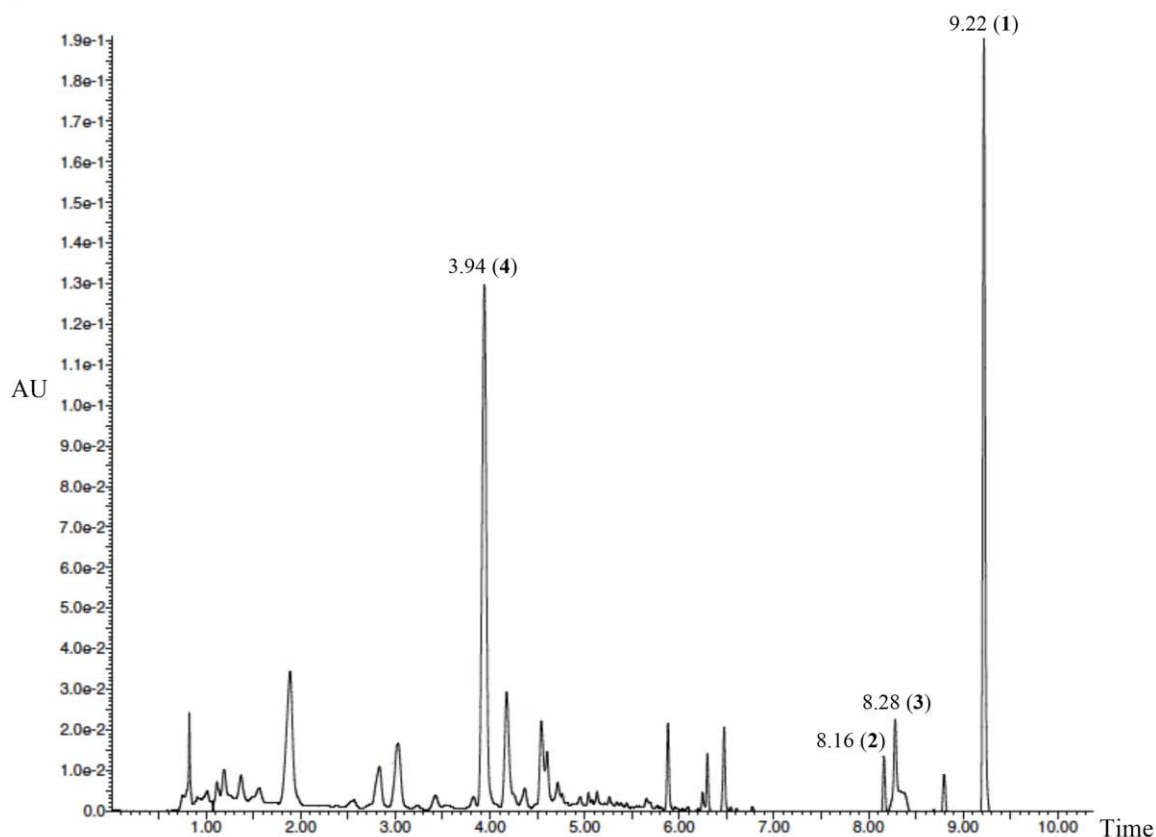


Figura 3. Cromatograma del extracto acuoso de *Acourtia thurberi*. Picos identificados: perezona (**1**), α -pipitzol (**2**), β -pipitzol (**3**), y 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**).

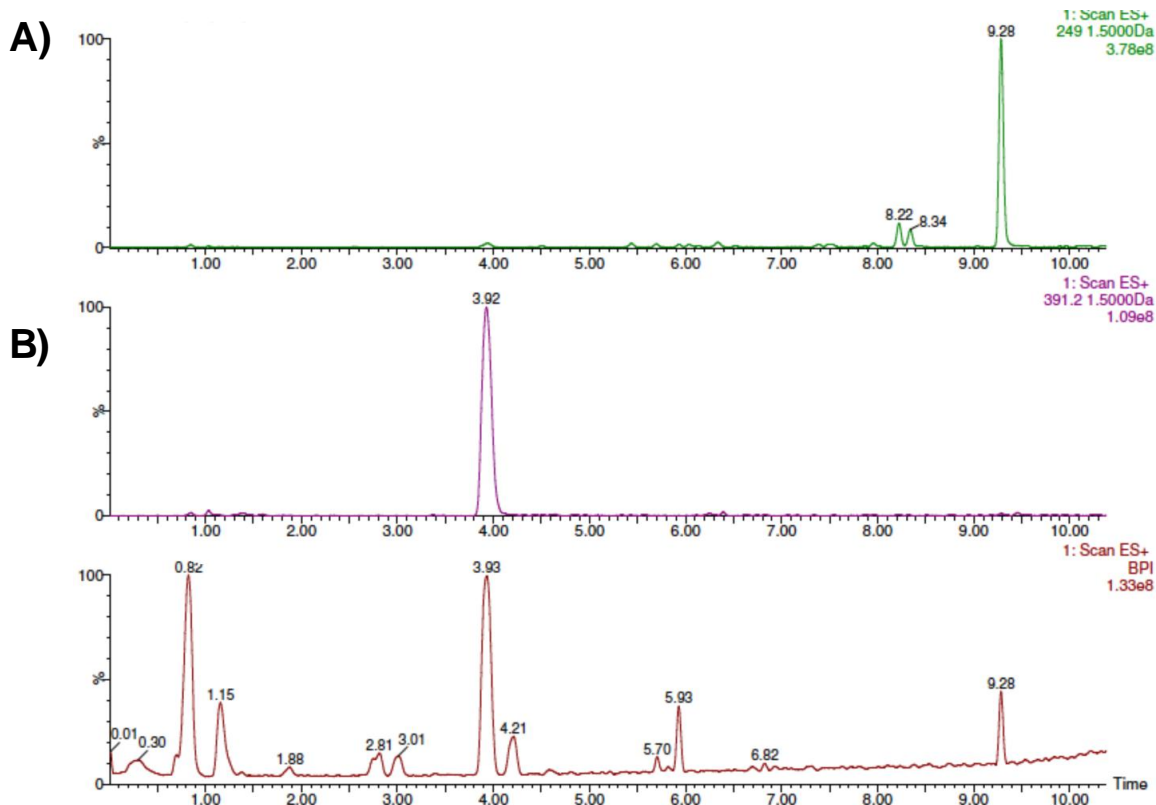


Figura 4. TIC generado por la técnica de electrospray (ESI) en la modalidad positiva de la decocción de *A. thurberi*, indicando los iones moleculares $[M+H]^+$ de **a)** la perezona (**1**) y **b)** el 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**).

5.2 Validación del método analítico.

Los métodos analíticos utilizados para evaluar la calidad de los productos farmacéuticos están sujetos a varios requisitos de acuerdo con la normatividad vigente, y con otros documentos normativos nacionales e internacionales. La Secretaría de Salud, a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) establece que los métodos analíticos que no estén publicados en la FEUM deben ser validados. De acuerdo con este documento los métodos analíticos para fines de validación se clasifican en cuatro categorías ya que requieren diferentes esquemas de estudio:

CATEGORÍA I. Método analítico para cuantificar un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos.

CATEGORÍA II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límite. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.

CATEGORÍA III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico, y

CATEGORÍA IV. Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés (FEUM, 2014).

Los parámetros de desempeño recomendados para la validación de métodos pertenecientes a la categoría I son la precisión y la linealidad del sistema; la especificidad/selectividad; la exactitud y la linealidad y la precisión del método (ICHQ2B R1, 2005; USP 37).

5.2.1 Evaluación de los parámetros de desempeño.

5.2.1.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema es la capacidad de un método analítico, para verificar que las respuestas analíticas obtenidas se ajustan a un modelo matemático en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica (FEUM, 2014).

El rango de concentraciones tanto para la perezona (1) como para el 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) se estableció mediante el cálculo aproximado de la concentración de cada marcador en la matriz de trabajo. Este parámetro de desempeño se evaluó mediante el análisis, de cinco curvas de calibración con cinco

niveles de concentración de los compuestos **1** y **4** de manera independiente. Los resultados obtenidos para estos experimentos, permitieron la estimación de los modelos lineales ajustados indicados en el **Cuadro 3**. El análisis estadístico de los datos permite establecer que el modelo estimado cumple con los criterios de aceptación: $r^2 > 0.98$; $r \geq 0.99$; IC (β_I) = [381.1 – 428.9 (**4**); 1115.9 – 1223.4 (**1**)] no incluye al cero.

Cuadro 3. Modelos matemáticos de la linealidad del sistema para la perezona (**1**) y el 8- β -D-glucopiranosido de la 4-metoxi-5-metilcumarina (**4**).

Compuesto	Modelo lineal
perezona (1)	$y = 404.96$ (concentración) + 3898.6
8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)	$y = 1169.7$ (concentración) – 94.812

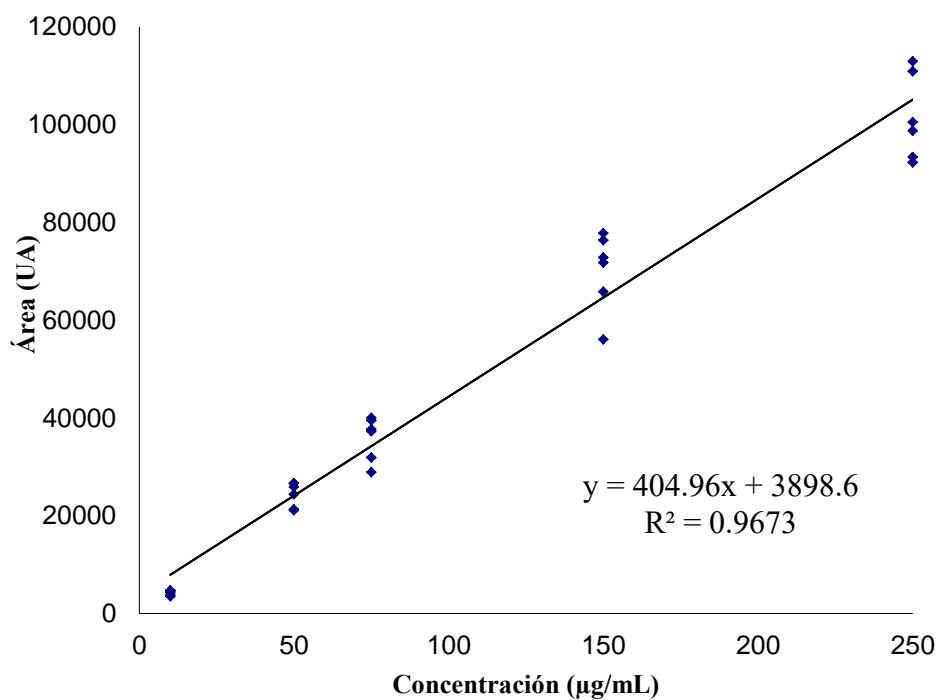
Los resultados obtenidos para las respuestas analíticas de ambos marcadores se resumen en la **Tabla 3**. Como se deduce del análisis estadístico el valor del coeficiente de correlación (r) para **1** y **4** nos indica una relación lineal entre la respuesta y la concentración (**Gráficas 1 y 2**).

Por otro lado, el coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 96.73% y el 98.74% de la variabilidad en la respuesta para la perezona (**1**) como para el 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**), respectivamente se encuentra explicada por ambos modelos (**Gráficas 1 y 2**).

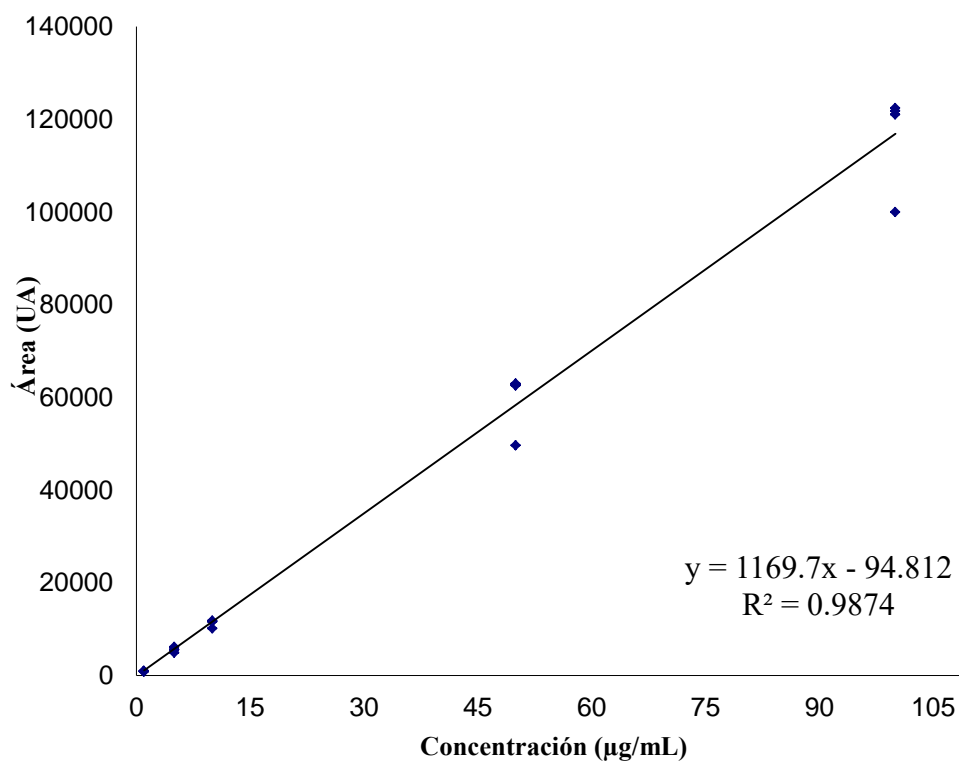
Tabla 3. Resultados experimentales de las curvas de calibración de la perezona (1) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4) para evaluar la linealidad del sistema.

perezona (1)			8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)		
Réplica	μg mL ⁻¹	Área (UA)	réplica	μg mL ⁻¹	Área (UA)
1	10	4664	1	1	840
2	50	24434	2	5	4921
3	75	37292	3	10	10179
4	150	71798	4	50	49668
5	250	98757	5	100	100010
1	10	4759	1	1	997
2	50	26725	2	5	5554
3	75	37665	3	10	11828
4	150	72826	4	50	63011
5	250	100533	5	100	121862
1	10	3548	1	1	890
2	50	21336	2	5	6187
3	75	31960	3	10	11630
4	150	65821	4	50	62780
5	250	93360	5	100	121067
1	10	3836	1	1	990
2	50	21145	2	5	5629
3	75	28928	3	10	11674
4	150	56067	4	50	62595
5	250	92254	5	100	122449
1	10	4349	1	1	518
2	50	26626	2	5	2922
3	75	40032	3	10	5861
4	150	76377	4	50	32781
5	250	112956	5	100	67934

Finalmente, en el **Cuadro 4** se resumen los parámetros estadísticos de la regresión lineal del sistema para cada compuesto, en donde se observa que con un nivel de confianza del 95%, que el intervalo de confianza para la pendiente no incluye el cero. Con base en lo antes expuesto se deduce que los modelos estimados describen adecuadamente la relación lineal entre las variables y pueden emplearse convenientemente con fines de estimación y predicción de la perezona (**1**) y el 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**), en los intervalos de trabajo de 10–250 µg/mL y 1–100 µg/mL, respectivamente.



Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar a la perezona (**1**).



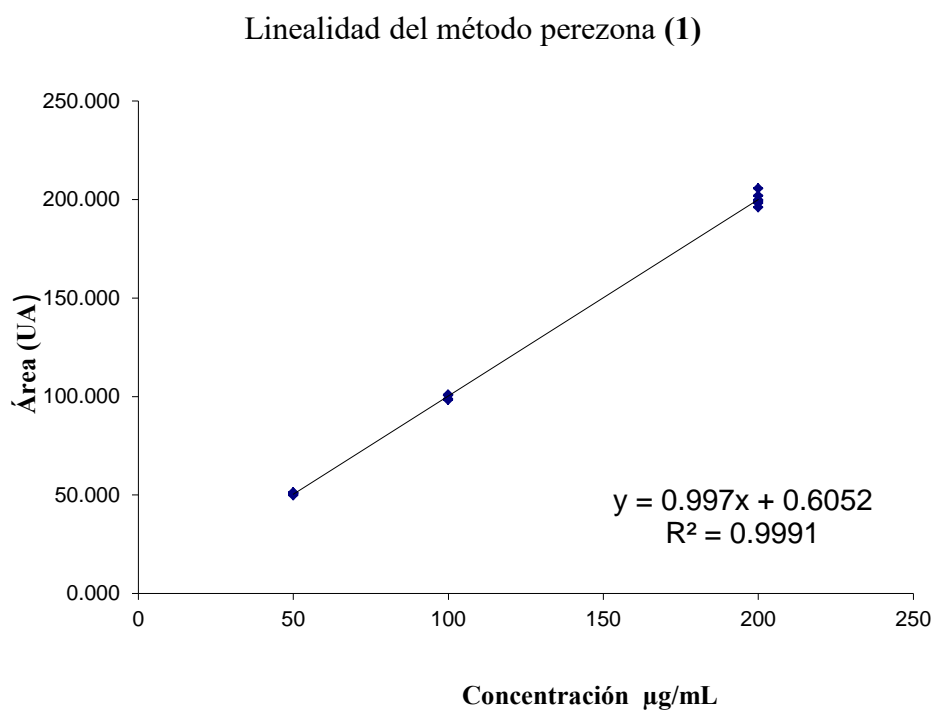
Gráfica 2. Linealidad del sistema para cuantificar al 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4).

Cuadro 4. Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema de los compuestos 1 y 4.

Estadístico	perezona (1)	8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)
pendiente (b_1)	404.9608857	1169.66453
ordenada al origen (b_0)	3898.585233	-94.81240513
coeficiente de correlación (r)	0.9867	0.9998
coeficiente de determinación (r^2)	0.9673	0.9874
IC (β_1)	381.1- 428.9	1115.9-1223.4

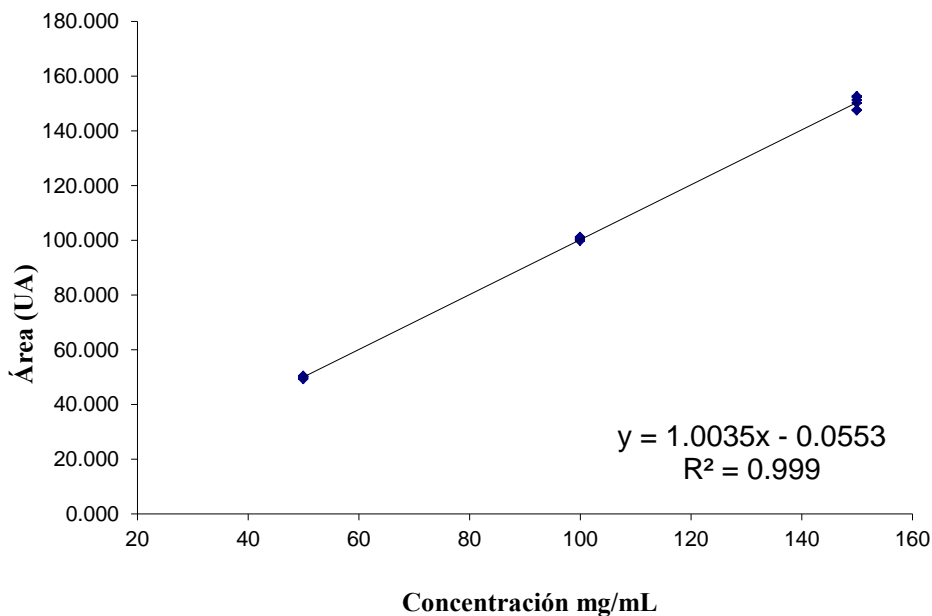
5.2.1.2 Linealidad del método y exactitud.

Para evaluar éste parámetro de desempeño se construyó una curva con la concentración adicionada y la concentración recuperada en las matrices herbolarias seleccionadas (**Gráficas 3 y 4**). Los datos empleados para éste propósito, obtenidos para el extracto acuoso se resumen en las **Tablas 4 y 5**. Como se observa en las **Gráficas 3 y 4** los resultados muestran una tendencia lineal



Gráfica 3. Linealidad del método para cuantificar a la perezona (1).

Linealidad del método 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)



Gráfica 4. Linealidad del método para cuantificar al 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4).

Los parámetros de las curvas de calibración obtenidas, obedecen a los siguientes modelos matemáticos, para el compuesto 1: 0.997 (concentración) + 0.6052 y para el compuesto 4: 1.0035 (concentración) - 0.0553 . Estos resultados señalan que el método es lineal, cumple con los criterios de aceptación estadísticos: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$ establecidos en la norma internacional (ICH2B, 2005).

En el **Cuadro 5** se describen los parámetros estadísticos calculados para los modelos de los dos estándares cuantificados. En ambos casos, los coeficientes de correlación son mayores a 0.999 mientras que, los coeficientes de determinación superan el valor de 0.98. Por otra parte, los intervalos de confianza (**Cuadro 5**) para la pendiente incluye la unidad en los dos modelos estimados. Con base en estos hallazgos se concluye

que el método cumple con los criterios de linealidad establecidos para validar, este parámetro de desempeño.

Cuadro 5. Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del método de los compuestos **1** y **4**.

Estadístico	perezona (1)	8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)
pendiente (b_1)	0.997	1.0035
ordenada al origen (b_0)	0.6052	-0.0553
coeficiente de correlación (r)	0.99954	0.99949
coeficiente de determinación (r^2)	0.9991	0.999
IC (β_1)	0.9807–1.0132	0.9869–1.0201

La exactitud del método analítico se define como la concordancia absoluta entre un valor obtenido empleando un método determinado y un valor de referencia. En las **Tablas 4** y **5** se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la exactitud del método para cuantificar a la perezona (**1**) y al 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) en la decocción de *A. thurberi*. Los porcentajes de recobro obtenidos para ambos compuestos evaluados se encuentran dentro del intervalo establecido para métodos cromatográficos (98-102%), así mismo en ambos casos, la desviación estándar relativa (CV) calculada para cada nivel es menor al 2.0%. Por lo tanto, el método analítico diseñado para cuantificar a **1** y **4** es exacto.

Tabla 4. Datos obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método, para cuantificar a la perezona (1) en la decocción de *A. thurberi*.

Replica	Nivel	Concentración adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (UA)	Concentración recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Porcentaje de recobro (%)
1	150	200	79402	205.701	102.8
2	150	200	77888	201.962	100.9
3	150	200	76328	198.110	99.0
4	150	200	75463	195.974	97.9
5	150	200	76984	199.730	99.8
6	150	200	76764	199.187	99.5
Promedio (% recobro) 100.0 y CV 1.6%					
1	100	100	36842	100.604	100.6
2	100	100	36895	100.735	100.7
3	100	100	35913	98.310	98.3
4	100	100	36067	98.690	98.6
5	100	100	36867	100.666	100.6
6	100	100	36947	100.863	100.8
Promedio (% recobro) 99.9 y CV 1.5%					
1	50	50	16468	50.293	100.5
2	50	50	16251	49.757	99.5
3	50	50	16682	50.821	101.6
4	50	50	16722	50.920	101.8
5	50	50	16726	50.930	101.8
6	50	50	16879	51.308	102.6
Promedio (% recobro) 101.3 y CV 1.0%					

Tabla 5. Datos obtenidos para evaluar la linealidad y exactitud del método, para cuantificar al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) en la decocción de *A. thurberi*.

Replica	Nivel	Concentración adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (UA)	Concentración recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Porcentaje de recobro (%)
1	150	150	175668	150.268	100.1
2	150	150	172468	147.532	98.3
3	150	150	176941	151.357	100.9
4	150	150	178195	152.429	101.6
5	150	150	172666	147.702	98.4
6	150	150	178535	152.719	101.8
Promedio (% recobro) 100.2 y CV 1.51%					
1	100	100	118335	101.251	101.2
2	100	100	118269	101.195	101.1
3	100	100	117078	100.194	100.1
4	100	100	117767	100.766	100.7
5	100	100	117193	100.275	100.2
6	100	100	116658	99.818	99.8
Promedio (% recobro) 100.5 y CV 0.57%					
1	50	50	58754	50.313	100.6
2	50	50	58707	50.273	100.5
3	50	50	58093	49.748	99.4
4	50	50	57604	49.330	98.6
5	50	50	58071	49.729	99.4
6	50	50	58960	50.489	100.9
Promedio (% recobro) 99.9 y CV 0.89%					

5.2.1.3 Precisión.

La precisión de un método analítico expresa la concordancia entre una serie de mediciones independientes. La precisión puede ser evaluada a través de la precisión del sistema, precisión del método y precisión intermedia. La precisión del sistema se evaluó preparando, por dilución, seis soluciones independientes a una concentración de 75 µg/mL y 100 µg/mL para **1** y **4** en MeOH, respectivamente. En la **Tabla 6** se resume la respuesta analítica obtenida para ambos marcadores. En ambos los casos, el coeficiente de variación fue menor al 2.0% y por lo tanto, cumple con el criterio correspondiente a la categoría I del método, y se deduce que el sistema es preciso.

Tabla 6. Resultados experimentales para evaluar la precisión del sistema.

Réplica	perezona (1)	8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)
1	26912	89631
2	28004	89182
3	27572	89722
4	28282	89605
5	27552	88659
6	28021	89296
Promedio	27723.83333	89349.1667
DE	487.8534274	397.740326
CV	1.8 %	0.4 %

La repetibilidad es una medida de la variabilidad que se presenta entre los resultados generados del análisis de muestras durante una corrida analítica (FEUM, 2014). En la **Tabla 7** se resumen las respuestas medidas para cada uno de los marcadores estudiados. Como se deduce de los datos presentados, el método es preciso para cuantificar a la perezona (**1**) y al 8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) en la decocción de *A. thurberi*.

Tabla 7. Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método empleando el extracto acuoso de *A. thurberi*.

perezona (1)				8-β-D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (4)			
Muestra	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	Muestra	Área	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)
1	16468	50	50.293	1	118335	100	101.251
2	16251	50	49.757	2	118269	100	101.195
3	16682	50	50.821	3	117078	100	100.194
4	16722	50	50.920	4	117767	100	100.766
5	16726	50	50.930	5	117193	100	100.275
6	16879	50	51.308	6	116658	100	99.818
Promedio			50.671	Promedio			100.583
DE			0.554175	DE			0.580881
CV			1.1%	CV			0.6%

5.2.1.4 Límite de cuantificación.

La concentración mínima a la cual fue posible cuantificar a la perezona (**1**) y al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) de manera reproducible y exacta fue de 10 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ para **1** y **4**, respectivamente. El límite de cuantificación (LC) es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables.

Una vez validado el método analítico, se analizaron las concentraciones de perezona (**1**) y la 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**), presentes en las decocciones preparadas a partir del material vegetal, y las cantidades de los marcadores cuantificadas en ambas muestras fueron de 20.3 ± 0.21 mg/g de **1** y 27.0 ± 0.24 mg/g de **4**.

De tal manera, que con el presente trabajo, se establecieron las pruebas de identidad y de composición de la decocción preparada a partir de las raíces de *A. thurberi*, y en conjunto esta información servirá para la elaboración de la monografía tipo farmacopéica que garantice el uso racional de la especie. Por otra parte, los derivados de tipo benzoquinona, isocedrano y cumarina aislados de la especie fueron caracterizados como los principios activos y responsables de las propiedades antidiabéticas demostradas previamente para este preparado, en nuestro grupo de trabajo.

6.- Conclusiones

- a) Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplado a espectrometría de masas (UPLC-ESI/MS) para cuantificar a la perezona (**1**) y al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) en la decocción de la especie *Acourtia thurberi*. Éste método fue validado de acuerdo con los estándares que establecen las guías nacionales e internacionales asegurando que es adecuado para los fines que se pretenden.
- b) Se cuantificó a la perezona (**1**) y al 8- β -D-glucopiranosido de la 5-metil-4-metoxi-cumarina (**4**) en el extracto acuoso de la planta encontrándose que por cada gramo de droga cruda la cantidad de **1** y **4** presente es de 20.3 ± 0.21 y 27.0 ± 0.24 mg, respectivamente.
- c) Finalmente, el presente trabajo constituye una aportación original para el control de calidad de la planta mediante el desarrollo de las pruebas de identidad y valoración de la droga cruda, y la información generada servirá para la elaboración de su monografía tipo farmacopéica.

7.- Referencia bibliográficas

- Alarcón A., Román R., Jiménez E., Reyes Ch., González P., Flores S. (1997). Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, **55**(3): 171-177.
- Alarcón A., Román R., Pérez G., Aguilar C., Contreras W., Flores S. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, **61**(2): 101-110.
- Andrade C., Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**(3): 325-348.
- Arumugam G., Manjula P., Paari N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease*, **2**(3): 196-200.
- Crockford D., Maher A., Ahmadi K., Barrett A., Plumb R., Wilson I., Nicholson J. (2008). ¹H NMR and UPLC-MS statistical heterospectroscopy: Characterization of drug metabolites (xenometabolome) in epidemiological studies. *Analytical Chemistry*, **80** (18): 6835.
- El-Abhar H., Schaalán M. (2014). Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World Journal of Diabetes*, **5**(2): 176-197.
- Engström M., P lij rvi M., Salminen J. (2015). Rapid fingerprint analysis of plant extracts for ellagitannins, gallic acid, and quinic acid derivatives and quercetin, kaempferol and myricetin-based flavonol glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(16): 4068-4079.
- Escobedo G., Bahena L., Arias T., Hinojosa T., Ruvalcaba M., Aceves H. (2015). Characterization and comparison of perezone with some analogues. Experimental and theoretical study. *Journal of Molecular Structure*, **1097**, 98-105.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América (2014). Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. USP 37 – NF, 1140-1447.

- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014). Comisión Permanente de la Farmacopea. Tomo II. 11^a Edición. Secretaria de Salud. México, 2427-2435.
- Gómez S., Cristiani U., Villegas G. (2012). Time-dependent perezone production in different culture systems of *Acourtia cordata* Central. *European Journal of Biology*, 7(3): 507-518.
- International Conference on Harmonisation (ICH Harmonised Tripartite Guideline) (2005). Validation of analytical procedures: Text and Methodology. Q2A y Q2B, Q2 (R1).
- International Diabetes Federation (2014). Diabetes Atlas, Sexta edición.
- Liang Y., Xie P., Chan K. (2004). Quality control of herbal medicines. *Journal of chromatography B*, 812(1): 53-70.
- Linares E., Bye R. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, 19(2): 153-183.
- Martínez A., Madariaga A., Rivero I., Bye R., Mata R. (2016). Antidiabetic and anti-hyperalgesic effects of a decoction and compounds from *Acourtia thurberi*. *Journal of Ethnopharmacology*, en revision.
- Martínez M. (1989). Las plantas medicinales de México, Sexta edición. Editorial Botas, México, D.F.
- Mukesh R., Namita P. (2010). Medicinal plants with antidiabetic potential - A Review. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13(1): 81-94.
- Norma Oficial Mexicana (2010). NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
- Nördstrom A., O'Maille G., Qin C., Siuzdak G. (2006). Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Analytical Chemistry*, 78(10): 3289-3295.
- Patel D., Prasad S., Kumar R., Hemalatha S. (2012). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(4): 320-330.

- Raymond T. (2001). Bioassay – guided isolation of potential antineoplastic natural products from southwestern plants. Tesis de Doctorado, Universidad de Arizona. 117-119.
- Surendran S., Abdul D., Vallikattukuzhiyil D., Betty C., Ravindrakurup A., Sunil C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(5): 337-347.
- World Health Organization. (1999) Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications.
- World Health Organization. (2010) Global report on diabetes.
- Zdero C., Bohlmann F., Sánchez H., Dominguez X. (1991). Isocedrene derivatives and other constituents from *Acourtia nana*. *Phytochemistry*, 30(8): 2695-2697.