



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRUEBAS DE COMPOSICIÓN E IDENTIDAD PARA EL CONTROL DE CALIDAD  
DE LA DROGA CRUDA DE *Simira mexicana* (Bullock) Steyerm. (RUBIACEAE)**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. CITLALY VALLADARES LÓPEZ**

**DRA. RACHEL MATA ESSAYAG**

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO DE 2017



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 está 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. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dra. Martha Patricia García Camacho
Vocal:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Vocal:	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
Secretario:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

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

Parte de los resultados obtenidos a partir de este proyecto se presentaron en la 13ª Reunión internacional de investigación en productos naturales “Dr. Juan Diego Hernández” (México, Mayo de 2017)

---

Q.F.B. Citlaly Valladares López

---

Dra. Rachel Mata Essayag

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que mediante el Programa de Maestría en Ciencias químicas, me permitió continuar y ampliar mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que gracias a su apoyo fue posible la realización de mis estudios de maestría, mediante el número de beca 583660.

Al CONAyT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (219765) y DGAPA-UNAM (217516).

A los miembros del jurado asignado, por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones.

A la Dra. Isabel Rivero Cruz, por la asesoría e invaluable apoyo. Le agradezco su tiempo y enseñanzas sin las cuales no hubiera sido posible el desarrollo de este proyecto.

Agradezco especialmente a mi tutora, la Dra. Rachel Mata Essayag, por permitirme ser parte de su equipo de investigación. Por brindarme su tiempo, apoyo y por compartirme un poco de sus conocimientos y experiencia profesional.

# INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
1.1 Generalidades de la familia Rubiaceae .....	4
1.2 Características fitoquímicas del género <i>Simira</i> .....	6
1.3 Generalidades de <i>Simira mexicana</i> (Bullock) Steyerem. ....	18
1.4 Aspectos etnobotánicos.....	19
1.5 Generalidades sobre las monografías de plantas medicinales de la OMS .....	20
1.6 Control de calidad de plantas medicinales .....	23
1.6.1 Pruebas de identidad.....	23
1.6.2 Pruebas de pureza.....	26
1.6.3 Pruebas de composición.....	26
<b>2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 Justificación .....	27
2.2 Objetivo general.....	27
2.3 Objetivos particulares .....	28
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>29</b>
3.1 Material vegetal .....	29
3.2 Procedimientos generales.....	29
3.2.1 Análisis cromatográficos.....	29
3.3 Caracterización de los productos naturales.....	30
3.4 Preparación de los extractos orgánico y acuoso .....	31
3.5 Obtención de los analitos a partir del extracto orgánico de la corteza de <i>S. mexicana</i> .....	32
3.5.1 Fraccionamiento preliminar .....	32
3.5.2 Fraccionamiento secundario de fraccion F <sub>9</sub> del extracto orgánico.....	32

3.5.3 Fraccionamiento terciario de F <sub>1</sub> derivada del extracto orgánico .....	34
3.6 Ensayos de composición .....	35
3.6.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos.....	35
3.7 Validación del método analítico para cuantificar al palicósido (1) .....	35
3.7.1 Linealidad del sistema.....	35
3.7.2 Linealidad del método y exactitud .....	36
3.7.3 Precisión del sistema .....	36
3.7.4 Límite de cuantificación y límite de detección .....	37
3.7.5 Cuantificación del compuesto 1 presente en el extracto acuoso de <i>S. mexicana</i> .	37
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
4.1 Obtención y caracterización de los compuestos marcadores a partir del extracto orgánico obtenido de la corteza de <i>S. mexicana</i> .....	39
4.1.1 Obtención y elucidación estructural del palicósido (1).....	41
4.1.2 Aislamiento y elucidación estructural de la ofiorina B (4) .....	44
4.1.3 Obtención y elucidación estructural de la ofiorina A (3).....	49
4.1.4 Aislamiento y elucidación estructural del harmano (2) .....	54
4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos .....	55
4.2.1 Perfil cromatográfico por CLUE-ESI/EM de la droga cruda de <i>S. mexicana</i> ....	56
4.3 Validación del método analítico .....	56
4.3.1 Linealidad del sistema.....	58
4.3.2 Linealidad y exactitud del método .....	60
4.3.3 Precisión .....	63
4.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación .....	66
4.3.1 Cuantificación del palicósido (1) en diferentes extractos de <i>S. mexicana</i> .....	68
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>71</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Algunos géneros que pertenecen a la familia Rubiaceae	5
2	Corteza de <i>S. mexicana</i> (fotografía tomada de la colección etnobotánica, Jardín Botánico, UNAM).	18
3	Fraccionamiento, separación y purificación de los principales componentes del extracto orgánico de <i>S. mexicana</i> .	34
4	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>1</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz).	43
5	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>1</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 100 MHz).	43
6	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>4</b> (Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 400 MHz).	46
7	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>4</b> (Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 100 MHz).	46
8	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>4</b> (D <sub>2</sub> O, 100 MHz).	48
9	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>4</b> (D <sub>2</sub> O, 400 MHz).	48
10	Efecto $\gamma$ -gauche observado en la ofiorina A ( <b>3</b> ).	49
11	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>3</b> (Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 100 MHz).	50
12	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>3</b> (Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> , 400 MHz).	50
13	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>3</b> (D <sub>2</sub> O, 100 MHz).	53
14	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>3</b> (D <sub>2</sub> O, 400 MHz).	53
15	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto <b>2</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 100 MHz).	54
16	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto <b>2</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz).	55
17	Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda = 270$ nm) correspondiente del extracto acuoso de <i>S. mexicana</i> . Tiempos de retención [palicósido ( <b>1</b> ) ( $t_R = 6.28$ min); harmano ( <b>2</b> ) ( $t_R = 3.78$ min); ofiorina A ( <b>3</b> ) ( $t_R = 1.69$ min); ofiorina B ( <b>4</b> ) ( $t_R = 2.24$ min)].	57

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
18	Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda = 270$ nm) correspondiente del extracto metanólico de <i>S. mexicana</i> . Tiempos de retención [palicósido (1) ( $t_R = 6.02$ min); harmano (2) ( $t_R = 3.65$ min); ofiorina A (3) ( $t_R = 1.63$ min); ofiorina B (4) ( $t_R = 2.16$ )].	57
19	Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico.	60
20	Linealidad del método para la cuantificación del palicósido (1) en el extracto acuoso de <i>S. mexicana</i> .	62
21	Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y detección del palicósido (1), en el extracto acuoso.	66
22	Espectro COSY del compuesto 1.	79
23	Espectro HMBC del compuesto 1.	80
24	Espectro COSY del compuesto 4.	81
25	Espectro HMBC del compuesto 4.	82
26	Espectro HMBC del compuesto 3.	83
27	Espectro COSY del compuesto 3.	84
28	Espectro COSY del compuesto 2.	85
29	Espectro HMBC del compuesto 2.	86

## LISTA DE CUADROS

Figura		Página
1	Perfil fitoquímico del género <i>Simira</i> .	7



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE-ESI/EM para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de <i>S. mexicana</i> .	30
2	Fraccionamiento preliminar del extracto de <i>S. mexicana</i> .	33
3	Fraccionamiento secundario de F <sub>9</sub> del extracto orgánico de <i>S. mexicana</i> .	33
4	Metabolitos secundarios aislados del extracto orgánico de la corteza de <i>S. mexicana</i> .	40
5	Datos espectroscópicos de RMN para el alcaloide palicósido ( <b>1</b> ) en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . ( <sup>1</sup> H a 400 MHz; <sup>13</sup> C a 100 MHz).	42
6	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz) y RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) en Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> del compuesto <b>4</b> .	45
7	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz) y RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) en D <sub>2</sub> O del compuesto <b>4</b> .	47
8	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz) y RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) en Metanol- <i>d</i> <sub>4</sub> del compuesto <b>3</b> .	51
9	Datos de RMN- <sup>13</sup> C (100 MHz) y RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz) en D <sub>2</sub> O del compuesto <b>3</b> .	52
10	Resultados experimentales de la curva de calibración del palicósido ( <b>1</b> ) para establecer la linealidad del sistema.	59
11	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema del compuesto <b>1</b> .	59
12	Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.	61
13	Parámetros estadísticos del modelo lineal del método empleado para la cuantificación del palicósido ( <b>1</b> ) en el extracto acuoso de <i>S. mexicana</i> .	61
14	Resultados obtenidos de la exactitud del método en el extracto acuoso de <i>S. mexicana</i> .	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>15</b>	Datos obtenidos para evaluar la repetibilidad del método.	64
<b>16</b>	Resultados de la precisión de intermedia.	65
<b>17</b>	Resultados para establecer los límites de detección y cuantificación del compuesto <b>(1)</b> .	67
<b>18</b>	Resumen de la regresión lineal simple de la curva para establecer el LD y LC del palicosido <b>(1)</b>	68
<b>19</b>	Límites de detección y límites de cuantificación del compuesto <b>1</b> .	68
<b>20</b>	Cuantificación de palicosido <b>(1)</b> por CLUE-ESI/EM en los extractos orgánicos (lote 1 y 2) y acuoso de <i>S. mexicana</i> .	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ANADEVVA</b>	Análisis de varianza
<b>b<sub>0</sub></b>	Ordenada al origen
<b>b<sub>1</sub></b>	Pendiente de la recta
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>	Metanol
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble de dobles
<b>ddd</b>	Doble de dobles de dobles
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>ESCOF</b>	European scientific cooperative on phytotherapy
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
<b>FHEUM</b>	Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
<b>g</b>	Gramo
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>CLAE</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>Hz</b>	Hertz
<b>ICH</b>	International Conference on Harmonisation
<b>IR</b>	Infrarrojo

<b>KBr</b>	Bromuro de potasio
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litros
$\lambda$	Longitud de onda
<b>Metanol-<i>d</i><sub>4</sub></b>	Metanol deuterado
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b>Mg</b>	Miligramos
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Min</b>	Minutos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
<b>S<sub>b</sub></b>	Varianza de la pendiente
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>CLUE-MS</b>	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>WHA</b>	World Health Assembly
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo establecer las pruebas de identidad y composición de la droga cruda (corteza) de *Simira mexicana* (Bullock) Steyerem. (Rubiaceae) con la finalidad de establecer algunos parámetros de calidad de utilidad para la integración de sus monografías científicas bajo los lineamientos recomendados por la Organización Mundial de la Salud. La corteza de esta planta se utiliza en México como sustituto de la quina y para el tratamiento de anemia, problemas de hígado y caída de cabello.

Para el desarrollo de esta investigación fue necesario el aislamiento de los metabolitos mayoritarios presentes en la infusión y extracto orgánico de la droga cruda. Posteriormente, se establecieron los perfiles cromatográficos de los extractos, y finalmente se validó un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) para la cuantificación de al menos un compuesto marcador.

El estudio químico del extracto acuoso preparado a partir de la corteza seca de *S. mexicana* permitió el aislamiento y la caracterización de cuatro alcaloides: palicósido (**1**), harmano (**2**), y las ofiorinas A y B (**3** y **4**). Los metabolitos **1**, **3** y **4** se reportan por primera vez en la especie, en tanto que **2** ya se encuentra reportado previamente en esta planta. La caracterización de estos alcaloides se realizó mediante técnicas espectrométricas (ESI/EM) y espectroscópicas (IR y RMN).

Para el desarrollo de los perfiles cromatográficos por CLUE-ESI/EM se ensayaron varias condiciones y las mejores fueron las siguientes: como fase estacionaria se empleó una columna BEH C-18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) (Waters). La fase móvil consistió en una mezcla binaria compuesta por CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (0.1% ácido fórmico), con un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 3 μL.

El método desarrollado se validó, de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la International Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005), con el propósito de cuantificar al palicósido (**1**), alcaloide seleccionado como compuesto marcador debido a su estabilidad y disponibilidad. Los parámetros de desempeño que se evaluaron fueron los siguientes: linealidad del sistema y del método, exactitud, precisión, y los límites de detección y cuantificación [LD (0.12 μg/mL) y LC (0.37 μg/mL)]. El método es lineal ( $r^2$  igual a 0.9998), preciso (CV menor al 2%) y exacto en el intervalo de concentraciones eva-

luado (5-100  $\mu\text{g/mL}$ ) y constituye una prueba de composición para la droga cruda de *S. mexicana*.

La información científica generada durante la presente investigación permitirá, en conjunto con otros estudios, garantizar la calidad y contribuir al uso racional de *S. mexicana* al evitar posibles adulteraciones o sustituciones. De igual manera, la información obtenida en esta investigación será de utilidad para la integración de su monografía tipo OMS y Farmacopéica.

## ABSTRACT

The present work aims to establish some of the quality control methods of the crude drug (stem-bark) of *Simira Mexicana* (Bullock) Steyerf. (Rubiaceae), according to the guidelines recommended by the World Health Organization. *Simira mexicana* is a medicinal species used in Mexico as a quinine substitute for treating anemia, liver problems and hair loss.

The first step in this work was the isolation of the major metabolites in the infusion and organic extract prepared from the crude drug. Afterwards, the chromatographic profiles of the aqueous and organic extracts were established; the resulting Ultra High Efficiency Liquid chromatographic (UPLC) method was then validated in order to quantify the marker compound.

Phytochemical analysis of the aqueous extract allowed the isolation and characterization of four alkaloids, namely palicoside (**1**), harmano (**2**), and ophiorines A and B (**3** and **4**). Metabolites **1**, **3** and **4** are reported for the first time in the species, while **2** was previously reported in the plant. The characterization of these alkaloids was performed by spectrometric (ESI/EM) and spectroscopic techniques (IR and RMN). Subsequently, an analytical method by UPLC-ESI / EM for quantification of compound **1** was developed and validated according to the International Conference on Harmonization Validation Guide for Analytical Methods (ICH; Q2 (R1) 2005). The chromatographic conditions were: A BEH C-18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) (Waters) was used as the stationary phase. The mobile phase consisted of a binary mixture composed of CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid), with a flow rate of 0.3 mL/min and an injection volume of 3 μL. The performance parameters evaluated were linearity of the system and method, accuracy, precision and the limits of detection and quantification [LD (0.12 μg/mL) and LC (0.37 μg/mL)]. The method is linear (0.9998), precise (CV less than 2%) and accurate in the range of concentrations evaluated (5-100 μg/mL) and constitutes a compositional test for the crude drug of *S. mexicana*. The compound **1** was selected as the marker due to its stability and availability.

The method was successfully applied to quantify the amount of **1** in the infusion of the crude drug and will be useful for the integration of its WHO and pharmacopeic monographs. These will be important for supporting the rational use of this medicinal Mexican plant.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Generalidades de la familia Rubiaceae.

Las rubiáceas constituyen la cuarta familia de plantas vasculares más grande del planeta; incluye 620 géneros y 13,000 especies (Bremer y Eriksson, 2009). La mayoría de las especies se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales de nuestro país. Desde el punto de vista biológico y morfológico, las rubiáceas presentan diferentes tipos de forma de vida, de tal manera que algunas son hierbas, otras epífitas o lianas, y la mayoría son arbustos y árboles (León y Williams, 2011).

En el aspecto taxonómico, esta familia ha sido sujeta a varias clasificaciones. Inicialmente Schumann (1891) la dividió en dos subfamilias: Cinchonoideae y Rubioideae; posteriormente, Bremekamp (1966) reconoció ocho subfamilias de las cuales sólo tres (Cinchonoideae, Rubioideae y Guettardeae) fueron aceptadas por Verdcourt (1958). En 1988, Robbrecht presentó una nueva clasificación ya que dividió la familia en cuatro subfamilias: Cinchonoideae, Rubioideae, Ixoroideae y Antirheoideae. Posteriormente, estudios basados en el análisis de diferentes regiones del ADN permitieron a Bremer y colaboradores (1995) integrar las especies en tres subfamilias: Cinchonoideae, Rubioideae e Ixoroideae (Bremer et al. 1995). Recientemente, las reconstrucciones filogenéticas basadas análisis moleculares llevaron a Robbrecht & Manen (2006) a considerar solo dos subfamilias: Cinchonoideae y Rubioideae. Finalmente, Bremer & Eriksson (2009) llegaron a la conclusión de mantener también la subfamilia Ixoroideae. Las subfamilias Cinchonoideae e Ixoroideae incluyen principalmente especies arbóreas y arbustos, mientras que la subfamilia Rubioideae contiene esencialmente hierbas y arbustos (Martínez-Cabrera *et al.*, 2015).

En México, la familia se encuentra entre las cinco más importantes y está representada por 85 géneros y alrededor de 500 especies. De acuerdo a Borhidi y Diego-Pérez (2002) no se cuenta con un inventario detallado sobre el potencial económico de esta familia.

A nivel global muchas especies de la familia tienen gran valor económico destacándose entre ellas *Coffea arabica* y *C. robusta*, principales especies productoras de café; las especies de *Cinchona* spp fuentes de quinina y quinidina; *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson tiene diversos usos terapéuticos como antidiarreico, antipirético, emético y



expectorante, y es una fuente importante de emetina (Soares, *et al.*, 2012); los géneros *Morinda* y *Rubia*, útiles para la producción de tintes; especies de *Antocephalus*, *Burchelia*, *Hymenodictyum* y *Mitragyna* son utilizadas con fines maderables (León y Williams. 2011; Delprete, 2004), *Morinda citrifolia* (el noni) por sus propiedades antioxidantes, hipotensoras y anticancerígenas, y *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Schult.) DC (uña de gato), se considera una panacea por sus múltiples beneficios medicinales (Delprete, 2004); por mencionar las más populares.



**Figura 1.** Algunos géneros que pertenecen a la familia Rubiaceae

Desde el punto de vista químico esta familia vegetal presenta una gran variedad de metabolitos secundarios con efectos farmacológicos significativos; entre los principales grupos de compuestos destacan los iridoideos, antraquinonas, terpenoides (triterpenos y diterpenos), flavonoides y alcaloides de tipo indol-monoterpenoides y quinolínicos. Los alcaloides se consideran como marcadores quimiotaxonómicos de esta familia y se acumulan en la corteza, raíces, hojas, flores, frutas y semillas (Moreira *et al.*, 2014). La amplia gama de metabolitos biosintetizados por las Rubiaceae demuestra el potencial de la familia como fuente de nuevas moléculas activas o prototipos de fármacos. Actualmente, muchas de estas plantas tienen uso en la medicina tradicional mostrando efectos de tipo antiinflamatorio, analgésico, antibacteriano, mutagénico, antiviral, antioxidante, sobre las enfermedades vasculares, así como actividad sobre el sistema nervioso central (Martins y Nuñez, 2015).

## 1.2 Características fitoquímicas del género *Simira*.

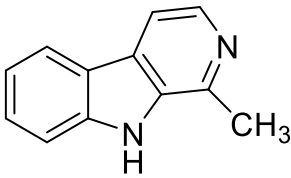
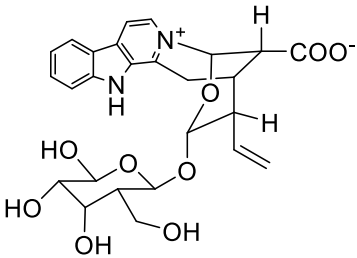
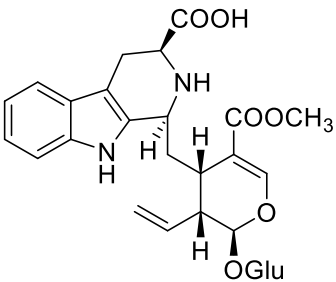
El género *Simira* pertenece a la subfamilia Ixoroideae, tribu Condamineae (Moreira *et al.*, 2014); incluye 45 especies, distribuidas principalmente en la región Neotropical de México a Bolivia, Paraguay y Brasil, con especies reportadas en Colombia, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Belice, Ecuador, Perú, Guyana y Argentina (Moreira *et al.*, 2014). Las especies de *Simira* pueden ser arbustos o árboles inermes terrestres (Lorence y Taylor, 2012). En México se hallan las siguientes especies: *S. lancifolia* (Lundell) E. Martinez & Borhidi; *S. mexicana* (Bullock) Steyerem.; *S. multiflora* (Lundell) E. Martinez & Borhidi; *S. rhodoclada* (Standl.) Steyerem.; *S. salvadorensis* (Standl.) Steyerem.; y *S. vestita* (Lundell) E. Martinez & Borhidi (Borhidi, 2012).

Muchas de las especies son de interés económico por su uso como tintes, maderable y hasta como ornamento. El duramen de la madera de sus árboles es marrón o grisáceo, en tanto que la albura es amarillenta o grisácea cuando está recién cortada, y va enrojeciendo cuando se expone al aire (Moreira *et al.*, 2014).

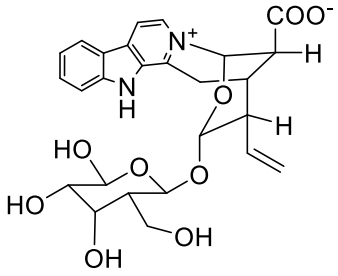
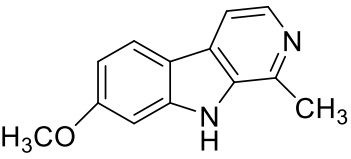
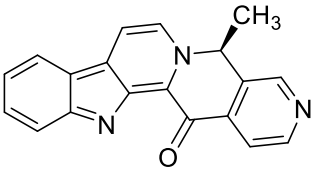
Las especies de *Simira* producen metabolitos secundarios farmacológicamente activos, incluyendo alcaloides  $\beta$ -carbolínicos como la *N*-acetilserotonina, la estrictosamida, el áci-

do liolicosídico, la 5-alfa-carboxiestrictosidina, la sickingina, el harmano, siendo este último considerado como el marcador quimiotaxonómico del género, entre otros (Alves *et al.*, 2001). Los metabolitos aislados a la fecha y sus propiedades conocidas se resumen en el **Cuadro 1** (Moreira *et al.*, 2014).

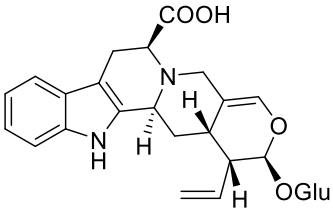
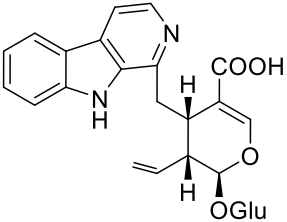
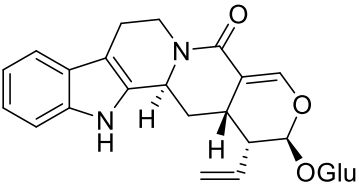
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014).

		Compuesto	Especie	Efectos principales
<b>ALCALOIDES</b>		 <p><b>Harmano</b></p>	<i>S. mexicana</i> <i>S. glaziovii</i> <i>S. salvadorensis</i> <i>S. grazielae</i>	-Interactúa con el ADN por intercalación (Sharma, 2012).  -Inhibe la MAO (Rommelspacher <i>et al.</i> , 1994).
		 <p><b>Ofiorina B</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Espasmolítico (Aquino <i>et al.</i> , 1996).  -Atenúa los efectos de morfina <i>in vitro</i> (Capasso <i>et al.</i> , 1997).
		 <p><b>5α- Carboxiestrictosidina</b></p>	<i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Hipoglucemiante (Liu <i>et al.</i> , 2016).  -Espasmolítica (Aquino <i>et al.</i> , 1996).  -Atenúa los efectos de morfina <i>in vitro</i> (Capasso <i>et al.</i> , 1997).

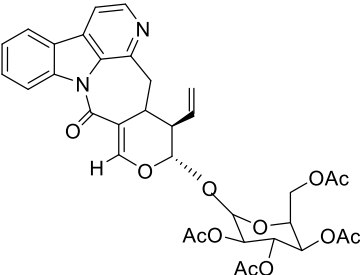
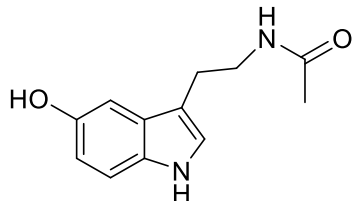
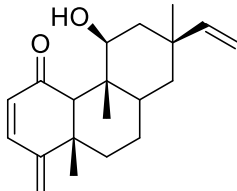
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>ALCALOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Ofiorina A</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i> <i>S. grazielae</i>	-Atenúa los efectos de morfina <i>in vitro</i> (Capasso <i>et al.</i> , 1997).
		<i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Antiviral que interfiere con las vías NF-κB y MAPK celulares inducidas por el estrés oxidativo (Chen <i>et al.</i> , 2015).  -Antimicrobiano, anti-Plasmodium (Patel <i>et al.</i> , 2012).  -Antifúngico, antioxidante, antitumoral, antimutagénico, citotóxico y alucinógeno (Patel <i>et al.</i> , 2012).
	 <p style="text-align: center;"><b>Maxonina</b></p>	<i>S. maxonii</i>	Actividad no reportada

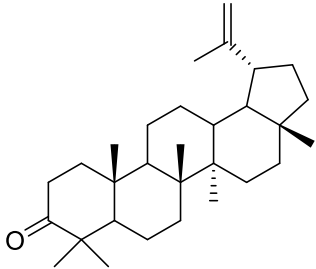
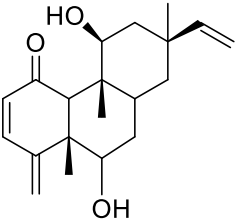
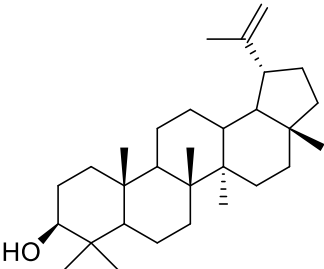
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>ALCALOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Sickingina</b></p>	<p><i>S. tinctoria</i></p> <p><i>S. williamsii</i></p>	-Espasmolítico (Aquino <i>et al.</i> , 1996).
	 <p style="text-align: center;"><b>Ácido liolicosídico</b></p>	<p><i>S. tinctoria</i></p> <p><i>S. williamsii</i></p>	<p>-Espasmolítico (Aquino <i>et al.</i>, 1996).</p> <p>-Atenúa los efecto de morfina <i>in vivo</i> (Capasso <i>et al.</i>, 1997).</p>
	 <p style="text-align: center;"><b>Estrictosamida</b></p>	<i>S. mexicana</i>	<p>-Antiinflamatorio (Zhu <i>et al.</i>, 2016a).</p> <p>-Antiviral y antiproliferativo (Zan <i>et al.</i>, 2015).</p> <p>-Analgésico (Li <i>et al.</i>, 2012).</p>

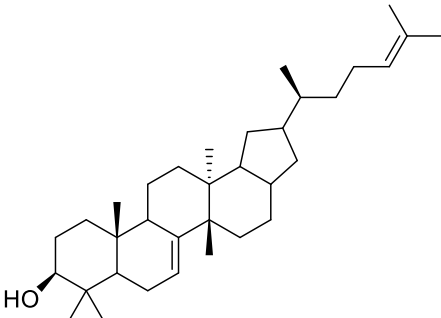
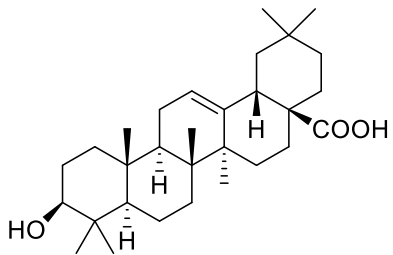
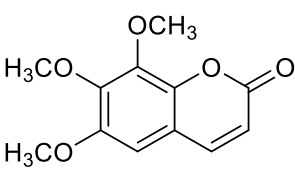
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>ALCALOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>1,22- Lactamialósido</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	Actividad no reportada
	 <p style="text-align: center;"><b>N-acetil serotonina</b></p>	<i>S. grazielae</i>	-Antioxidante (Siu <i>et al.</i> , 2001). -Neuroprotector (Jae-Myung <i>et al.</i> , 2017).
<b>TERPENOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Simirano B</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. eliezeriana</i>	Actividad no reportada

**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

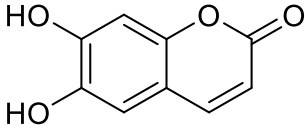
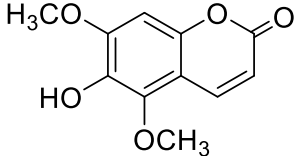
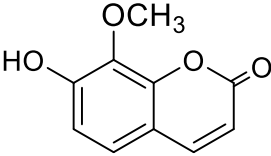
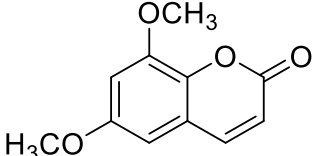
	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>TERPENOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Lupenona</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Prevención y tratamiento de la demencia senil (Xiao <i>et al.</i>, 2016a).</li> <li>-Anticancerígeno (Suwito <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Antioxidante (Çulhaoğlu <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Inhibidor de la acetilcolinesterasa (Çulhaoğlu <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Inhibe el desarrollo de <i>Leptospira</i> (Chander <i>et al.</i>, 2015).</li> </ul>
	 <p style="text-align: center;"><b>Simirano A</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. eliezeriana</i>	Actividad no reportada
	 <p style="text-align: center;"><b>Lupeol</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Anticancerígeno (Suwito <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Antiviral y antimicrobiano (Xiao <i>et al.</i>, 2017).</li> <li>-Antitumoral (Bhattacharyya <i>et al.</i>, 2017).</li> </ul>

**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

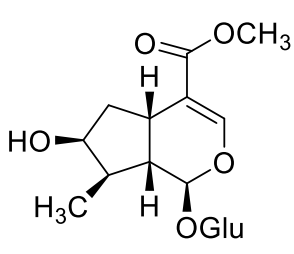
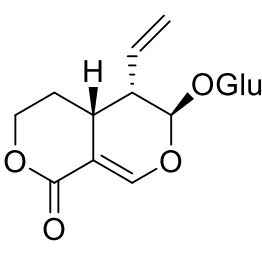
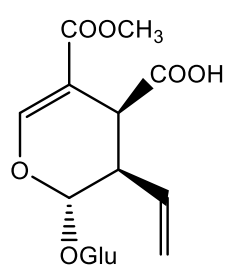
	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>TERPENOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Butirospermol</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	Actividad no reportada
	 <p style="text-align: center;"><b>Ácido oleanólico</b></p>	<i>S. tinctoria</i> S. <i>williamsii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Antioxidante (Çulhaoğlu <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Inhibidor de la acetilcolinesterasa (Çulhaoğlu <i>et al.</i>, 2015).</li> <li>-Antimicrobacteriano (Nguyen <i>et al.</i>, 2016).</li> </ul>
<b>CUMARINAS</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Escopoletina</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. graziwlae</i> <i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Antiinflamatorio (Grover y Jachak, 2015).</li> <li>-Antitumoral (Bai <i>et al.</i>, 2016).</li> <li>-Colerético (Nieschulz y Schmersahl, 1968).</li> </ul>



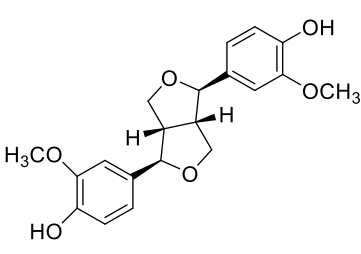
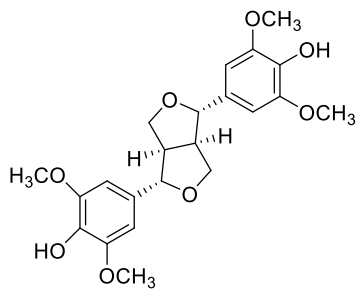
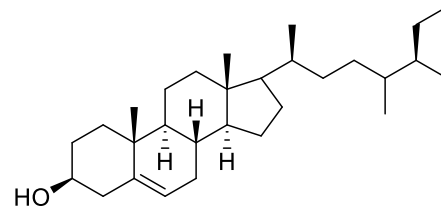
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>CUMARINAS</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Isofraxidina</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. grazielae</i>	-Colerético (Nieschulz y Schmersahl, 1968). -Antiinflamatorio (Witai-cenis <i>et al.</i> , 2014).
	 <p style="text-align: center;"><b>Dimetilfratexina</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. grazielae</i>	Actividad no reportada
	 <p style="text-align: center;"><b>7-Hidroxi-8-metoxicumarina</b></p>	<i>S. grazielae</i>	-Antiviral (virus de la hepatitis C) (Wei <i>et al.</i> , 2013). -Antiinflamatorio, analgésico y antiviral (Li <i>et al.</i> , 2012).
	 <p style="text-align: center;"><b>5,7-Dimetoxicumarina</b></p>	<i>S. grazielae</i>	-Antidepresivo (Yang y Wang, 2016). -Antiproliferativo contra la línea celular de melanoma humano (Wolny <i>et al.</i> , 2014).

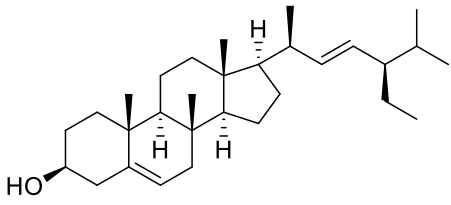
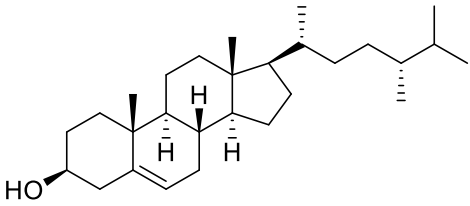
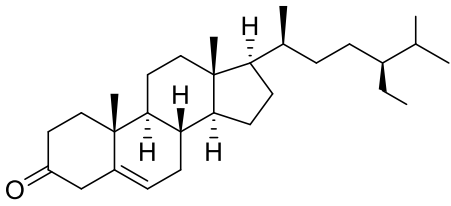
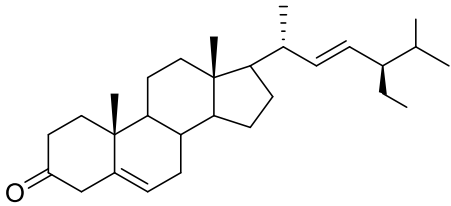
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>IRIDOIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Loganina</b></p>	<i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Antiinflamatorio, antitumoral y previene la osteoporosis (Hwang <i>et al.</i> , 2017). -Inhibe la proliferación de células humanas de melanoma maligno (Dang <i>et al.</i> , 2016).
	 <p style="text-align: center;"><b>Swerósido</b></p>	<i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Anticancerígeno y antiosteopórotico (Wang <i>et al.</i> , 2015b).
	 <p style="text-align: center;"><b>Secoxiloganina</b></p>	<i>S. tinctoria</i> <i>S. williamsii</i>	-Antiparasitario (Zebiri <i>et al.</i> , 2016). -Antiasmático (Xiao <i>et al.</i> , 2016b).

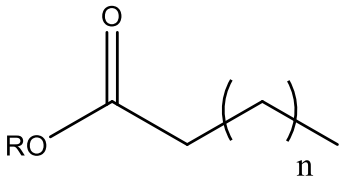
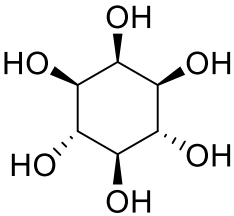
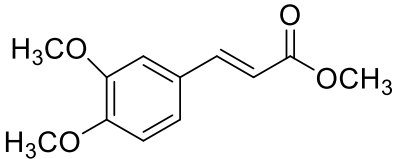
**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>LIGNANOS</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Pinoresinol</b></p>	<i>S. grazielae</i> <i>S. eliezeriana</i>	-Analgésico y anestésico local (Okuyama <i>et al.</i> , 1995).
	 <p style="text-align: center;"><b>Pinocebrina</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	Actividad no reportada
<b>ESTEROIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Sitosterol</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. grazielae</i> <i>S. eliezeriana</i>	-Antiviral (virus de la influenza A) (Yang <i>et al.</i> , 2016). -Antidiabético (Kushwaha <i>et al.</i> , 2015). -Antibacteriano (Chen <i>et al.</i> , 2015). -Antiinflamatorio (Wang <i>et al.</i> , 2015a).

**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>ESTEROIDES</b>	 <p style="text-align: center;"><b>Estigmasterol</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. grazielae</i> <i>S. eliezeriana</i>	-Antiinflamatorio (Wang <i>et al.</i> , 2015a). -Antitumoral (Lim <i>et al.</i> 2016). -Hipocolesterolemiante (Steenber, 2009).
	 <p style="text-align: center;"><b>Campesterol</b></p>	<i>S. glaziovii</i> <i>S. grazielae</i>	-Antitumoral (Cilla <i>et al.</i> , 2015). -Hipocolesterolemiante (Steenber, 2009).
	 <p style="text-align: center;"><b><math>\beta</math>-Sitostenona</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	-Inhibe la melanogénesis (Chu <i>et al.</i> , 2015).
	 <p style="text-align: center;"><b>Estigmastenona</b></p>	<i>S. glaziovii</i>	-Insecticida (Gonzales <i>et al.</i> , 2015).

**Cuadro 1.** Perfil fitoquímico del género *Simira* (Moreira *et al.*, 2014) (continuación).

	<b>Compuesto</b>	<b>Especie</b>	<b>Efectos principales</b>
<b>OTROS COMPUESTOS</b>	 <p>a) R=CH<sub>3</sub>; n=13 Hexadecanoato de metilo            b) R=H; n=13 Ácido hexadecanoico            c) R=H; n=15 Ácido octadecanoico            d) R=H; n=17 Ácido eicosanoico</p>	<i>S. glaziovii</i>	a) Actividad no reportada. b) Derivados demuestran potentes efectos analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos (Saqib <i>et al.</i> , 2012). c) Actividad no reportada. d) Actividad no reportada.
	 <p style="text-align: center;"><b>Inositol</b></p>		-Anticancerígeno (Dinicola <i>et al.</i> , 2016).
	 <p style="text-align: center;"><b>Metil <i>trans</i>-4-hidroxi-3-metoxicinamato</b></p>		Actividad no reportada

### 1.3 Generalidades de *Simira mexicana* (Bullock) Steyerm.

*Simira mexicana* [*Sickingia mexicana* (Bullock)] es un árbol que mide de 2 a 6 m y tiene la particularidad de presentar una densa pubescencia en ramas y hojas. Este hecho la distingue de la especie relacionada *S. rhodoclada* (Standley) Steyerm. Sus flores son rosadas y la corteza es café en su parte externa y rojiza en su parte interna, donde se observan también manchas alargadas de color claro. Externamente presenta lenticelas, es delgada y con un sabor ligeramente amargo. Cuando el árbol se descortezado su madera se oxida con facilidad y adquiere tono rojizo (Lorence, 1999) (**Figura 2**).



*Simira* sp

**Figura 2.** Corteza de *S. mexicana* (fotografía tomada de la colección etnobotánica, Jardín Botánico. UNAM)

## 1.4 Aspectos etnobotánicos.

En México, el nombre popular de “quina roja” se emplea para designar a una serie de especies de diferentes familias de plantas (Rubiaceae y Betulaceae) cuyas cortezas son aparentemente similares a las de *Cinchona* spp, y que erróneamente se usan para tratar el paludismo. Con el propósito de justificar esta sustitución de una planta por otra, Anaya (1991) agrupó a todas estas especies en un complejo de plantas medicinales que denominó “Complejo Quina”; este complejo incluye también a las llamadas quininas amarillas que pertenecen al género *Hintonia* y *Exostema*. Además, se emplean como purgantes, eupépticas, diuréticas, antipiréticas y para evitar la caída de cabello. Esta situación genera controversia respecto a la calidad y seguridad en el consumo de estas plantas medicinales. Son dos las especies de *Simira* que se emplean como sustitutos de la quina: *Simira mexicana* y *S. rhodoclada*. El modo de uso, preparación y dosificación es variable ya que depende principalmente de la información proporcionada por los vendedores. Sin embargo, las formas de preparación son similares a las establecidas para la quina verdadera (*Chinchona* spp), es decir infusiones, macerados y cocimientos cuando se utilizan como febrífugo y antipalúdico (Anaya, 1991).

Las cortezas de *S. mexicana* y *S. rhodoclada* son muy parecidas físicamente, y para distinguirlas se requiere de la pericia de un botánico. Este hecho conlleva a la posibilidad de que las cortezas se vendan indistintamente. Castillo y Monroy (2007) reportan que la especie que se vende en diferentes mercados del Estado de Morelos (Cuautla, Cuernavaca, Axochiapan, Jojutla y Puente de Ixtla) es *S. rhodoclada*, bajo los nombres populares de “cascara sagrada roja” o “quina roja”. Los vendedores en esos mercados recomiendan *S. rhodoclada* contra la bilis y para el hígado; su modo de preparación consiste en hervir una cantidad regular en un litro de agua y se bebe como agua de tiempo. En caso de usarse para anemia, enfermedades de hígado, cólicos y vómito, se hierve un puño de la planta en un litro de agua y se bebe como agua de uso. Ahora bien, si se padece de diabetes, se requiere hervir dos “cascaritas” en un litro de agua y se bebe una taza en ayunas. Cuando se trata de problemas en la sangre, se remojan dos o tres “cascaritas” en un cuarto de litro de agua, la cual se bebe como agua de tiempo. Finalmente, para el tratamiento de enfermedades del cabello se emplea cascara sagrada roja, y se hierven dos “cascaritas” en dos litros de agua y se realizan enjuagues. Específicamente si se desea evitar la caída

de cabello y acabar con la orzuela, el modo de preparación consiste en hervir cantidades regulares en dos litros de agua y se aplica como enjuague del baño (Castillo y Monroy, 2007).

Por otro lado, en un estudio realizado en dos centros regionales de acopio de plantas medicinales (Axochiapan, Morelos y Jolalpan, Puebla) se detectó la presencia de *S. mexicana* como una de las especies silvestre más comercializadas en el centro del país para el tratamiento de “problemas de la sangre” (Hersch, 1997).

En este contexto, se vuelve necesario caracterizar y describir las especies medicinales que en México son comercializadas bajo el nombre común de quina roja y así conocer los alcances y limitaciones del consumo de estas especies.

## **1.5 Generalidades sobre las monografías de plantas medicinales de la OMS.**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), se define como medicina tradicional al conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

A través del tiempo la medicina tradicional ha adquirido mayor relevancia ya que desempeña un papel importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo. Aproximadamente el 80 % de la población en estos países recurre a este tipo de medicina para satisfacer sus necesidades primarias de salud, mientras que en países desarrollados la gente utiliza este tipo de medicina pues la considera natural y por lo tanto, erróneamente inocua (Prieto-González *et al.*, 2004).

Ante esta situación, el interés por regular el uso de las plantas medicinales y los productos herbolarios ha ido en aumento, puesto que la mayoría de estos productos son de venta libre y por lo tanto fomenta la automedicación, además de que su preparación, en muchos casos, solo se basa en el conocimiento empírico de la sociedad. Estas circunstancias aunadas con la falta de un seguimiento médico generan dudas acerca de la seguridad, efi-



ca y calidad de los productos herbolarios utilizados y, por lo tanto, sobre su idoneidad terapéutica. Otro obstáculo que impide el uso racional de la medicina herbolaria es la ausencia de proveedores calificados y autorizados, situación que provoca incertidumbre sobre la identidad del producto adquirido (OMS, 2000; 2004). En conjunto con este hecho se encuentra la problemática derivada entre los países al tener diferentes conceptos acerca de lo que son las plantas medicinales y sus derivados, lo que genera que la autorización y comercialización de estos productos no sea de forma homogénea al igual que las especificaciones sobre calidad, inocuidad y eficacia (OMS, 1998a).

Como respuesta a esta demanda, la OMS a través de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) emitió una serie de resoluciones (WHA31.33, 1978; WHA40.33, 1987 y WHA42.43, 1989) en las cuales convocaba a los países miembros y asociados que desarrollaran estrategias para asegurar la seguridad, eficacia y calidad de los productos medicinales a base de plantas (OMS, 1998b).

En este contexto, y como resultado de las recomendaciones de la Conferencia Internacional de Autoridades Regulatoras de Drogas (ICDRA), la OMS también se planteó la necesidad de revisar y analizar diversas farmacopeas (India, Británica, China, Europea, entre otras), con el objetivo de elaborar una lista de las plantas medicinales más utilizadas y las especificaciones que sus preparados debían de cumplir a fin de establecer los parámetros de calidad, inocuidad y eficacia. Posteriormente, la OMS publicó varias guías y cinco volúmenes de monografías de plantas medicinales ampliamente utilizadas a nivel global [World Health Organization (WHO, 1999, 2002, 2007a, 2009)], con el propósito de fomentar la regulación de plantas de uso global y de crear modelos para que los países miembros elaboraran sus propias monografías. Las monografías tipo OMS están conformadas por dos partes: en la primera se hace un resumen farmacopeico cuyo objetivo es el aseguramiento de la calidad, la cual incluye pruebas de identidad botánica (descripción macroscópica y microscópica de la droga vegetal), y química (reacciones frente a reactivos característicos y perfiles cromatográficos); ensayos de pureza (presencia de otros vegetales, metales pesados, pesticidas, humedad y microorganismos, así como determinación de cenizas), y pruebas de composición (cantidad de principios activos y/o marcadores); la segunda parte está integrada por una revisión integral de la literatura científica, incluyendo los principales constituyentes químicos de las plantas; estudios farmacológicos, toxicológicos y clínicos, así como información detallada sobre advertencias de uso, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas y dosificación. De manera adicional, se inclu-

yen índices acumulativos de todas las monografías publicadas con los nombres científicos y comunes.

Como respuesta a las iniciativas de la OMS, algunos países decidieron elaborar sus propias monografías y/o documentos oficiales a fin de recopilar la mayor información acerca de la seguridad, eficacia, inocuidad y composición química de las plantas medicinales más utilizadas por sus respectivas poblaciones y así mantener un control de calidad en la producción, comercialización y prescripción de los productos fitoterapéuticos y drogas crudas. Un ejemplo a destacar lo constituye la Comunidad Europea, que en 1989 fundó la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP) con la finalidad de establecer las bases y criterios para la evaluación de productos herbolarios y así contribuir a la aceptación y consumo seguro de éstos. Las monografías publicadas por la ESCOP contienen la siguiente información: componentes principales, aspectos terapéuticos (usos), efectos secundarios y contraindicaciones. A finales de los 90's, se publicaron 60 monografías ESCOP y posteriormente todas fueron actualizadas y ampliadas para el primer volumen de la segunda edición publicada en 2003, además de que se incluyeron 20 monografías más (ESCOP, 2017).

En México, las autoridades de salud han hecho poco para garantizar el uso racional de las más de 3,000 especies con atributos medicinales. No fue sino hasta años recientes, y quizás como una respuesta a las demandas de la OMS, que la Secretaría de Salud publicó en 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), documento que contiene 41 monografías de plantas y 23 monografías de aceites esenciales de mayor consumo, y que abarca aspectos de seguridad, preparación y almacenamiento de las plantas. De igual forma contiene procedimientos generales de análisis, con el fin de establecer las especificaciones que deben cumplir las plantas y sus derivados fitoterapéuticos, y los métodos validados para llevar a cabo el análisis del material vegetal. Posteriormente, en 2013, se publicó una segunda edición que contiene un mayor número de especies autóctonas, sin embargo, el trabajo es aún insuficiente si se considera el número de especies utilizadas.

Es así como las monografías tipo OMS constituyen una importante herramienta para el sector salud, pues además de regular el uso terapéutico de las plantas, también proporcionan elementos para garantizar su calidad, ya que los productos herbolarios que se comercializan pueden ser sustituidos y/o adulterados con otras plantas de morfología o nombre popular similar. En este contexto, la OMS continúa desarrollando estrategias, do-

cumentos y métodos que permitan la regulación del uso de la medicina tradicional, teniendo como ejemplo la estrategia sobre medicina tradicional 2014-2023, que tiene como objetivos aprovechar la contribución de la medicina tradicional a la salud y promover la utilización segura y eficaz de la misma a través de la reglamentación y la investigación, así como mediante la incorporación de productos, profesionales y prácticas en los sistemas de salud (OMS, 2013).

## **1.6 Control de calidad de plantas medicinales**

Debido al incremento en el uso de plantas medicinales como principal elección para procurar el alivio de diversas enfermedades, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo existe un marcado interés por 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 (Cañigual *et al.*, 2005). De allí la importancia de establecer los criterios de calidad de las mismas. Dentro de las primeras soluciones propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para asegurar la calidad de las drogas crudas y preparados herbolarios, fue la publicación en 1988 del documento “*Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*” en el cual se establecen las recomendaciones y procedimientos para el aseguramiento de la calidad, cabe mencionar que este documento fue actualizado en 2011(OMS, 2017b).

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

### **1.6.1 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.

- **Pruebas de identidad botánica**

Este tipo de pruebas 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. Las pruebas de identidad son útiles para determinar que la planta es la especie requerida, así como asegurar que se utilice la droga cruda correcta (Bandaranayake, 2006).

- **Pruebas de identidad química**

La evaluación de la identidad química está enfocada 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 (componentes terapéuticos, activos, sinérgicos, mayoritarios, tóxicos, entre otros) 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 y se denominan 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 (Li, *et al.*, 2008).

Por otro lado, para la generación de los perfiles cromatográficos, la investigación se ha apoyado de diversas técnicas cromatográficas, incluyendo la cromatografía en capa delgada (CCD), la Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) y la cromatografía de gases (CG) (Liang, *et al.*, 2009).

Considerada como una técnica cromatográfica sencilla, la CCD puede proporcionar información de manera rápida y confiable sobre la presencia o ausencia de los metabolitos característicos de las drogas crudas o bien de sus productos de degradación presentes en los extractos preparados a partir de las mismas. Sin embargo, esta técnica presenta algunas desventajas como su baja sensibilidad y resolución lo que impide la detección de compuestos presentes en trazas.

Otra de las técnicas es la CLAE, la cual 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 diversos detectores (UV/VIS, Índice de refracción y espectrometría de masas) que dan información sobre la identidad de los componentes presentes en las mezclas complejas de los extractos y otros preparados.

Actualmente se han desarrollado otras metodologías, dentro de las cuales, se encuentra la Cromatografía de Líquidos de ultra eficiencia (CLUE), una nueva categoría que aprovecha los principios establecidos de la CLAE usando columnas con partículas de tamaño inferior a los 2  $\mu\text{m}$ , debido a su novedosa instrumentación, la CLUE soporta presiones más elevadas para producir separaciones rápidas con sensibilidad y resolución mayores. La CLUE permite también reducir notablemente los tiempos de análisis y en consecuencia el consumo de disolvente y muestra, además de que, esta técnica también puede acoplarse con diferentes detectores. Cabe mencionar que los métodos de acoplamiento combinan las capacidades de separación de la cromatografía con las de detección cuantitativa y cualitativa de los métodos espectrales tales como infrarrojo, resonancia magnética nuclear y masas, entre otros. Así, el acoplamiento de cromatografía líquida-espectroscopia de masas, es una herramienta poderosa para el análisis de muestras complejas. Estos acoplamientos permiten reunir las ventajas de una técnica de separación con una herramienta de identificación. De esta forma, pueden registrarse espectros de masas a lo largo de toda la separación cromatográfica y registrarse inequívocamente los picos y comprobar incluso su pureza, es decir si la separación ha sido completa o se ha producido en algún momento la co-elución de dos compuestos (Quintela *et al.*, 2005).

- **Pruebas de identidad genética**

Recientemente este tipo de pruebas ha complementado las estrategias clásicas para la evaluación de la identidad de las drogas crudas. Las pruebas de identidad genética 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 (Kirana, *et al.*, 2010).

### **1.6.2 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 2007b). Las pruebas de pureza que se determinan con mayor frecuencia son: materia extraña, cenizas totales, microorganismos, aflatoxinas, plaguicidas y radioactividad.

### **1.6.3 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. Se definen como principios activos a 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 sus fechas de caducidad (Sahoo, *et al.*, 2010).

## 2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

### 2.1 Justificación

Debido al incremento en el interés de la población por el uso de plantas medicinales, diversas organizaciones nacionales e internacionales han impulsado el desarrollo de metodologías y técnicas analíticas que permitan determinar la identidad, pureza y calidad de las mismas. Algunas de estas metodologías consisten en la descripción botánica de las plantas o partes de ella, los análisis micro y macroscópicos, así como los métodos de análisis para establecer los compuestos activos y/o marcadores en los diferentes preparados y drogas crudas. Indudablemente, la aplicación de estas tecnologías permitirá garantizar la calidad de estos productos y evitar posibles adulteraciones y/o sustituciones.

Tomando en consideración la propuesta realizada por la OMS, en 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos y, posteriormente, en 2013 la segunda edición. Sin embargo, la gran riqueza herbolaria de nuestro país, el amplio uso y el comercio de las plantas medicinales con fines curativos, las monografías de especies autóctonas de amplio uso médico tradicional resultan aún muy limitadas ya que no se dispone de la información científica necesaria para integrarlas adecuadamente (FHEUM, 2013). Es así que en México aún persiste una carencia notable de estándares para el control de calidad de las plantas y sus preparados. De igual manera, la información acerca de la eficacia, inocuidad, desarrollo sustentable, composición química y otros aspectos farmacéuticos de las mismas es limitada y en ocasiones nula.

Dentro de las plantas más comercializadas en México se encuentran algunas pertenecientes al género *Simira*, incluyendo *S. mexicana*. Estas especies son ampliamente utilizadas en nuestro país como sustituto de la quina para el tratamiento de malaria y fiebre. De allí la importancia de establecer no solo su eficacia y seguridad, sino las pruebas de calidad.

### 2.2 Objetivo general

- Establecer las pruebas de identidad química y composición de la droga cruda de *S. mexicana*, con la finalidad de generar parte de la información científica necesaria para integrar su monografía Farmacopéica y tipo OMS. El establecimiento de estas prue-

bas, en conjunto con las pruebas de eficacia y seguridad garantizarán el uso racional de este importante recurso natural.

### 2.3 Objetivos particulares

Para el cumplimiento del objetivo principal, se establecieron los siguientes objetivos particulares.

- Identificar los constituyentes mayoritarios de la infusión mediante un estudio fitoquímico convencional.
- Obtener 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).
- Desarrollar y validar un método analítico por CLUE-ESI/MS que permita la cuantificación de los productos mayoritarios del extracto acuoso de la corteza de *S. mexicana*. Los parámetros de desempeño del método a evaluar son: precisión y linealidad del sistema, exactitud, recobro, límites de cuantificación y detección.



## 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.1 Material vegetal.

La corteza de la especie medicinal *Simira mexicana* (Bullock) Steyerm. (Rubiaceae), fue recolectada en el estado de Guerrero, México, en Octubre de 2015. La corteza seca se almaceno en condiciones de oscuridad, en un lugar seco, cerrado y a temperatura ambiente. La identidad y la clasificación de la especie fueron establecidas por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares (Instituto de Biología, UNAM). La muestra de herbario (No. voucher: Bye y Linares 2811) fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

### 3.2 Procedimientos generales.

#### 3.2.1 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (CCD) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla de 3.5–7.0 mm ASTM), de diferentes dimensiones y empleando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon una solución de sulfato de cérico amoniacal (Sigma Aldrich) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J.T. Baker) y el reactivo de Dragendorff (Maldoni, 1991). Por otra parte, se efectuó una cromatografía tipo flash en un cromatógrafo CombiFlash® Rf System (Teledyne Isco, Inc; NE, EE.UU.), equipado con un detector UV/Visible de arreglo de fotodiodos (PDA) y otro evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y una bomba binaria. Los análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) a nivel analítico y/o preparativo, se realizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con detectores PDA y ELSD; éste último se utilizó bajo las siguientes condiciones: ganancia 100; presión de gas 40 psi; nebulizador en modo de calentamiento; temperatura del tubo 50°C ± 25°C y una columna XBridge Shield

RP18. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 3 (Waters).

Finalmente, el desarrollo de las pruebas de composición de la droga cruda se efectuó en un cromatógrafo de líquidos de ultra eficiencia (CLUE) clase H marca Waters (Milford, MA, EE.UU.), equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático, un horno para columna y un detector PDA acoplado a un detector de masas SQD2 (cuadrupolo simple) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa MassLynx® versión 4.1 (Waters). Todos los análisis en el CLUE se llevaron a cabo en una columna BEH C-18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) (Waters). La **Tabla 1** muestra el gradiente de la fase móvil empleada, la cual consistió en una mezcla binaria compuesta por CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O ácida (0.1% ácido fórmico). 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. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC). Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 40°C.

**Tabla 1.** Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLUE-ESI/EM para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de *S. mexicana*.

Tiempo (min)	Ácido fórmico acuoso (0.1%)	CH <sub>3</sub> CN (%)
0	88	12
8	78	22
10.5	60	40
12	0	100

### 3.3 Caracterización de los productos naturales.

La determinación de la estructura molecular de los productos naturales aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos (IR y RMN) y espectrométricos.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns (Thermo Scientific, P12144Q) y se reportan sin corregir. Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en

un espectrofotómetro modelo Bruker Tensor 27, utilizando las técnicas de pastilla de KBr y película.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) se registraron en los equipos Varian VNMRS y Bruker Avance III-400. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno y  $\text{D}_2\text{O}$ , metanol- $d_4$  y  $\text{DMSO}-d_6$  como disolventes. El registro de los espectros de RMN se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, y en el Instituto de Química, UNAM.

Los análisis por espectrometría de masas se realizaron por la técnica de electrospray (ESI) en el modo positivo (ESI+) y negativo (ESI-) en un espectrómetro de masas SQD2 (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Las condiciones del equipo en el modo de ionización positivo fueron las siguientes: temperatura del capilar,  $150^\circ\text{C}$ ; voltaje de la fuente, 4.5 kV; y 3.0 kV para el voltaje del capilar. Para el modo de ionización negativo las condiciones utilizadas fueron: temperatura del capilar:  $150^\circ\text{C}$  y 4.5 kV para la fuente voltaje del y 2.5 V para el voltaje del capilar. Fue utilizado como gas acarreador el nitrógeno (450 L/hr). El control del instrumento y el análisis de datos se realizaron utilizando el programa MassLynx® version 4.1 (Waters).

### 3.4 Preparación de los extractos orgánico y acuoso.

La preparación del extracto orgánico en mediana escala de la especie objeto de este estudio se realizó a partir de 500 g de material vegetal seco y molido, mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente, utilizando como disolvente de extracción metanol (2 L). Este proceso se repitió tres veces, posteriormente se filtró y concentró a sequedad para reunir 105.3 g de extracto vegetal bajo la forma de un residuo naranja oscuro. Por otra parte, el extracto acuoso se preparó mediante la técnica de infusión a partir de 50 g de corteza molida y 1 L de agua destilada hirviendo; el extracto resultante se dejó reposar durante 20 minutos. Al finalizar el tiempo de extracción, el infuso se filtró y concentró a sequedad en un rotaevaporador Buchi® RII adaptado a una bomba de vacío V-710 (BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza), obteniéndose 11.4 g de extracto como un residuo rojo oscuro.

### 3.5 Obtención de los analitos a partir del extracto orgánico de la corteza de *S. mexicana*.

#### 3.5.1 Fraccionamiento preliminar

El extracto orgánico seco obtenido en el inciso anterior se sometió a un fraccionamiento preliminar empleando cromatografía tipo flash, utilizando 4 g de muestra y 40 g de gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) como fase estacionaria. Como fase móvil se empleó un gradiente de hexano,  $\text{CHCl}_3$  y MeOH, en orden creciente de polaridad, con un flujo de 40 mL/min y un tiempo de corrida de 63.6 min. Las fracciones obtenidas se reunieron con base en la similitud cromatográfica observada en los perfiles en el UV y ELSD. Este proceso generó un conjunto de diez fracciones primarias ( $F_1$ – $F_{10}$ ) compuestas cada una de diferente número de subfracciones de 25mL. La **Tabla 2** y la **Figura 3** resumen el proceso cromatográfico correspondiente al fraccionamiento preliminar del extracto de *S. mexicana*.

#### 3.5.2 Fraccionamiento secundario de $F_9$ del extracto orgánico.

Una vez que se reunieron las fracciones obtenidas del proceso anterior, la  $F_9$  (1.72 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna tipo flash, utilizando 60 g de gel de sílice como fase estacionaria (RediSep Rf Gold Si-gel), y un gradiente entre  $\text{CHCl}_3$  y MeOH como fase móvil en orden creciente de polaridad, con un flujo de 50 mL/min y un tiempo de corrida de 65 min. Este proceso condujo a la obtención de un conjunto de diez fracciones secundarias ( $F_A$  –  $F_J$ ) reunidas con base en la similitud cromatográfica observada con los detectores en el UV y ELSD (**Tabla 3**) (**Figura 3**).

**Tabla 2.** Fraccionamiento preliminar del extracto de *S. mexicana*.

Fase Móvil	Volumen total	Clave fracción primaria (subfracciones reunidas)
Hex 100% ↓	565.5 mL	F1 (1-8)
CHCl <sub>3</sub> 100%		F2 (9-22)
CHCl <sub>3</sub> 100% ↓	436 mL	F3 (23-32)
CHCl <sub>3</sub> 100%		F4 (33-68)
CHCl <sub>3</sub> 100% ↓	1, 590 mL	F5 (69-74)
MeOH 100%		F6 (75-86)
MeOH 100%		F7 (87-89)
MeOH 100% ↓	577.2 mL	F8 (90-96)
MeOH 100%		F9 (97-100)
MeOH 100%		F10 (101-110)

Flujo: 40 mL

**Tabla 3.** Fraccionamiento secundario de F<sub>9</sub> del extracto orgánico de *S. mexicana*.

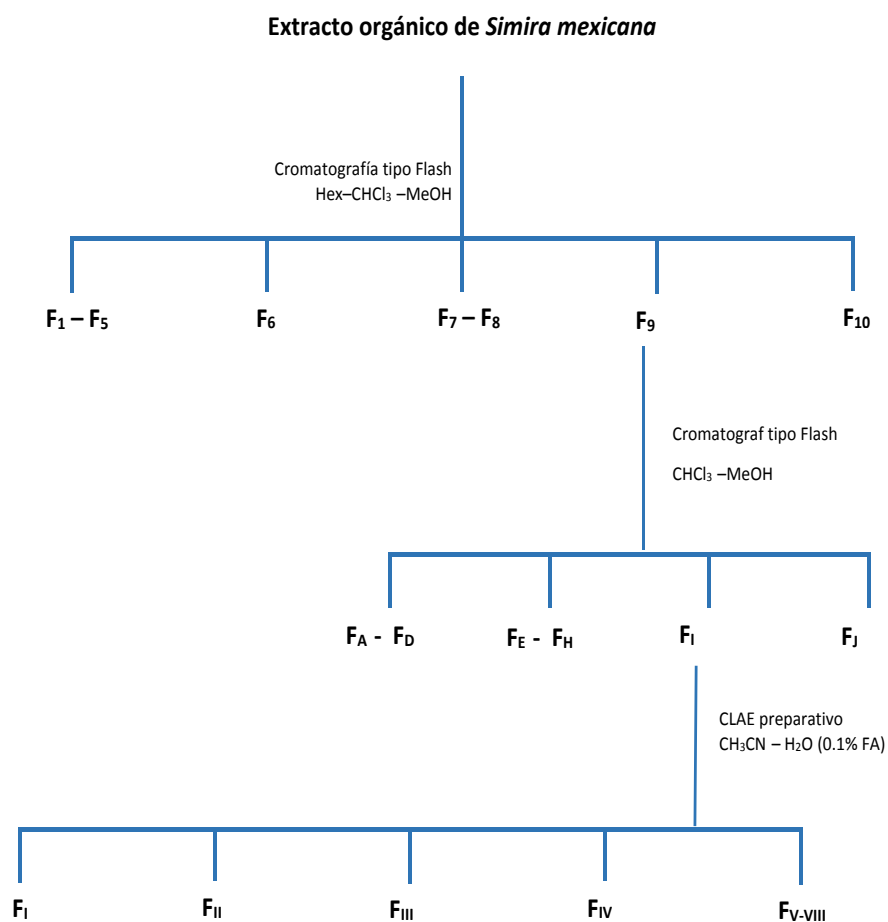
Fase Móvil	Volumen total	Clave fracción secundaria (subfracciones reunidas)
CHCl <sub>3</sub> 100% ↓	92 mL	F1 (1-17)
CHCl <sub>3</sub> 100%		F6 (57-66)
CHCl <sub>3</sub> 100% ↓	2, 300 mL	F2 (18-23)
CHCl <sub>3</sub> 100%		F7 (87-89)
CHCl <sub>3</sub> 100%		F3 (24-31)
CHCl <sub>3</sub> 100% ↓	2, 300 mL	F4 (43-50)
MeOH 100%		F8 (67-76)
MeOH 100%		F9 (77-98)
MeOH 100%		F5 (51-56)
MeOH 100%		F10 (99-106)

Flujo: 50 mL

### 3.5.3 Fraccionamiento terciario de F<sub>I</sub> derivada del extracto orgánico.

El análisis cromatográfico por CLAE de la fracción secundaria F<sub>I</sub> (303.6 mg) se llevó a cabo utilizando una columna XBridge Prep Shield RP18 (5 μm, 19 × 250 mm) y como fase móvil una mezcla binaria de agua ácida (A, 0.1% ácido fórmico) y CH<sub>3</sub>CN (B), con el siguiente gradiente de elución: 0 min: 95% A; 15 min: 75% A; 25 min: 75% A; 30 min: 100% B. El volumen de inyección fue de 250 μL con un flujo de 17.1 mL/min, y una longitud de onda de detección de 270 nm. Este proceso permitió el aislamiento y la purificación de los cuatro compuestos de interés (**Figura 3**)

**Figura 3.** Fraccionamiento, separación y purificación de los principales componentes del extracto orgánico de *S. mexicana*.



### **3.6 Ensayos de composición.**

#### **3.6.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos.**

El análisis cromatográfico cualitativo por CLUE-ESI/EM de los extractos acuoso y orgánico de *S. mexicana*, utilizando las condiciones de análisis indicadas en el inciso **3.2.1** de esta sección experimental, permitió identificar cuatro metabolitos como los principales componentes presentes en los extractos analizados. La identificación se realizó mediante el análisis comparativo de sus tiempos de retención, espectros de masas y la co-elución con los productos puros caracterizados en el presente estudio. Las disoluciones de los extractos acuoso, orgánico y los estándares se prepararon a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizando  $\text{H}_2\text{O}$  como disolvente.

### **3.7 Validación del método analítico para cuantificar al palicósido (1).**

Las condiciones del método analítico por CLUE-ESI/MS para cuantificar al compuesto **1**, producto mayoritario presente en los extractos analizados de *S. mexicana*, se describió en el párrafo anterior. La validación del método analítico se realizó de acuerdo a los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos de la International Conference on Harmonisation (ICH; Q2 (R1) 2005). Los parámetros de calidad evaluados se describen a continuación:

#### **3.7.1 Linealidad del sistema.**

La linealidad del sistema se evaluó preparando cuatro curvas de calibración del palicósido (**1**) a las concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cada curva se preparó mediante diluciones independientes a partir de una solución stock (1  $\text{mg}/\text{mL}$ ). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables concen-

tración ( $x$ ) y área bajo la curva ( $y$ ). Los parámetros estadísticos calculados fueron: ordenada al origen ( $b_0$ ), pendiente de la recta ( $b_1$ ), coeficiente de determinación ( $r$ ) y coeficiente de correlación ( $r^2$ ). Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.999$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

### 3.7.2 Linealidad del método y exactitud.

La linealidad del método se determinó mediante la preparación, por sextuplicado, de una curva de calibración del palicósido (**1**) a las concentraciones de 20, 40 y 80  $\mu\text{g/mL}$ . A cada concentración se adicionó un volumen constante (0.5 mL) de la infusión de *S. mexicana* (matriz de trabajo) a una concentración de 250  $\mu\text{g/mL}$ . Con los datos obtenidos se determinó la linealidad 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:  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $r$  y  $r^2$ . Los criterios de aceptación establecidos para esta característica de calidad son:  $r^2 > 0.98$ ;  $r \geq 0.999$  (ICH; Q2 (R1) 2005).

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

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad adicionada}} \times 100$$

Finalmente, se calculó para cada nivel el promedio aritmético y el coeficiente de variación (CV). 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% (ICH; Q2 (R1) 2005).

### 3.7.3 Precisión del sistema.

La precisión del sistema se estimó a través del cálculo de los parámetros de la repetibilidad y la reproducibilidad (precisión intermedia del sistema). La primera, se evaluó mediante la preparación, por sextuplicado, de una muestra de palicósido (**1**) a la de concentra-



ción de 80 µg/mL. La respuesta analítica obtenida permitió calcular la desviación estándar (DE) y el CV. El criterio de aceptación para esta característica de calidad establece que el CV no debe ser mayor al 2% (ICH; Q2 (R1) 2005). El segundo parámetro de desempeño se determinó mediante el análisis, por triplicado, de una disolución a la concentración de 40 µg/mL de palicósido (**1**) adicionada a la matriz de trabajo. Con el área bajo la curva obtenida como respuesta analítica, se calculó la media aritmética (X), la DE y el CV. Para cumplir con este parámetro se requiere que el CV sea menor al 2% (ICH; Q2 (R1) 2005).

#### 3.7.4 Límite de cuantificación y límite de detección.

La evaluación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de disoluciones a partir de la solución de referencia. Las disoluciones empleadas contenían las concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 µg/mL del compuesto **1**. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) del pico correspondiente al pico de la referencia de cada réplica se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada disolución. 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:

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

#### 3.7.5 Cuantificación del compuesto **1** presente en el extracto acuoso de *S. mexicana*.

Una vez que se validó el método analítico, se realizó la cuantificación del palicósido (**1**) en los extractos orgánicos (lote 1 y 2) y acuoso, para ello, diez miligramos de cada muestra problema disueltos en 10 mL de H<sub>2</sub>O se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc® de 0.2 µm y de 13 mm de diámetro. El palicósido (**1**) presente en cada muestra se

cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **3.2.1** para el método en CLUE y midiendo el área bajo la curva del compuesto de interés.

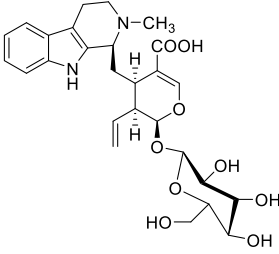
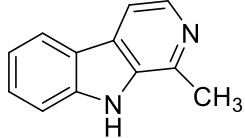
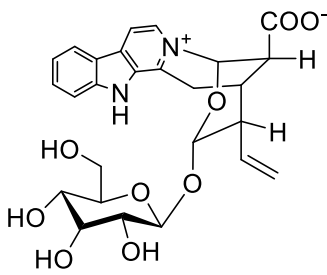
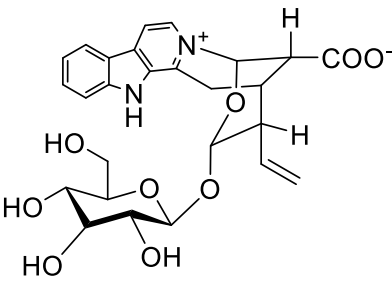
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estrategia general utilizada para cumplir con el objetivo general de este trabajo se resume a continuación: en primer lugar, se prepararon los extractos orgánico y acuoso de *S. mexicana* utilizando las técnicas de maceración e infusión, respectivamente. Enseguida se buscaron y optimizaron las condiciones de análisis por CLUE-ESI/EM para cada extracto; al término de este proceso se determinó la naturaleza de los compuestos mayoritarios. Por último, se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar el compuesto marcador.

### 4.1 Obtención y caracterización de los compuestos marcadores a partir del extracto orgánico obtenido de la corteza de *S. mexicana*

A partir de un análisis preliminar de los perfiles cromatográficos del extracto orgánico y de la infusión de *S. mexicana* se decidió realizar la separación y purificación de los componentes mayoritarios presentes en el extracto orgánico. Mediante la aplicación de diversos procedimientos cromatográficos de tipo flash y de alta resolución; se logró el aislamiento y purificación de varios alcaloides del tipo indólico incluyendo el palicósido (**1**), el harmano (**2**), y las ofiorinas A y B (**3** y **4**). Las estructuras y rendimientos de estos productos se indican en la **Tabla 4**. Cabe mencionar que de los cuatro productos aislados, el palicósido (**1**) es un producto natural nuevo en el género *Simira*, y las ofiorinas A y B (**3** y **4**) no han sido reportadas en la especie, estos alcaloides están presentes en *Ophiorriza* spp y *Simira glasovii* (Bastos, *et al.*, 1999; Aimi, *et al.*, 1985). Por otra parte el harmano (**2**) ya se encontraba descrito en la especie (Castañeda *et al.*, 1991). De manera general todos los compuestos se caracterizaron por métodos espectroscópicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN e IR) y espectrométricos (EM), mediante la comparación de la información obtenida en el presente estudio con la descrita previamente en la literatura. Además, cabe mencionar que todos los alcaloides reaccionaron de forma positiva frente al reactivo de Dragendorff.

**Tabla 4.** Metabolitos secundarios aislados del extracto orgánico de la corteza de *S. mexicana*.

Compuesto	Rendimiento (mg)	Fuente natural anterior (referencia)
 <p><b>Palicosido (1)</b></p>	(904)	1. Hojas de <i>Palicourea marcgravii</i> (Morita <i>et al.</i> , 1989).
 <p><b>Harmano (2)</b></p>	(225.6)	1. Corteza de <i>S. mexicana</i> (Mata <i>et al.</i> , 1991) 2.- Numerosas fuentes naturales
 <p><b>Ofiorina A (3)</b></p>	(6.4)	1. Hojas de <i>Ophiorriza</i> spp. (Aimi, <i>et al.</i> , 1985). 2. Corteza de <i>Simira glasiiovii</i> (Bastos, <i>et al.</i> , 1999).
 <p><b>Ofiorina B (4)</b></p>	(10.1)	1. Hojas de <i>Ophiorriza</i> spp. (Aimi, <i>et al.</i> , 1985). 2. Corteza de <i>Simira glasiiovii</i> (Bastos, <i>et al.</i> , 2002).

### 4.1.1 Obtención y elucidación estructural de palicósido (1).

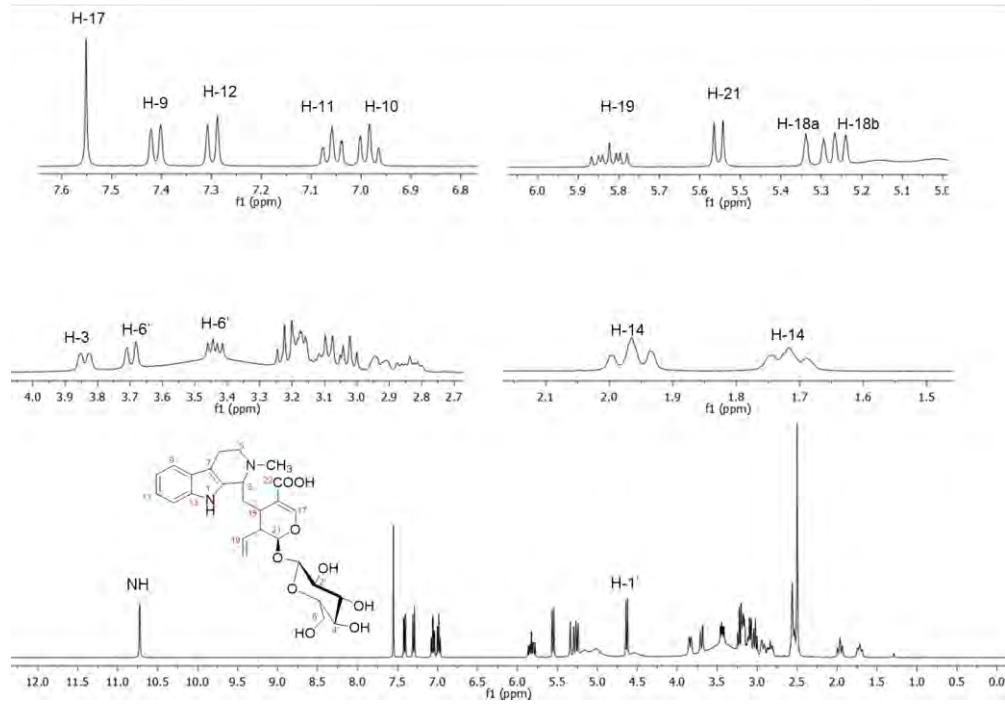
Durante la preparación de la muestra del extracto orgánico para el fraccionamiento preliminar, precipitó de manera espontánea un sólido amarillo pálido (900 mg), con un punto de fusión de 210 - 214 °C. [Reportado 206-208°C (Morita *et al.*, 1989)]; que se caracterizó como palicósido (1).

La fórmula molecular de palicósido (1) se estableció por ESI/ EM en modo positivo como  $C_{27}H_{34}N_2O_9$ ; cuyo ion molecular obtenido se aprecia en una relación de masa carga ( $m/z$ ) de 531  $[M+H]^+$ . Mediante el análisis de los espectros de IR [(FTIR-ATR)  $\nu_{max}$ : 3260, 2909, 1640, 1550  $cm^{-1}$ ] y RMN ( $^1H$  y  $^{13}C$ ) (**Tabla 5**) se estableció que el producto natural era el glucósido de la desmetilestrictosidina o palicósido (Morita *et al.*, 1989). Así, el espectro de RMN- $^{13}C$  (**Figura 5**) presentó 27 señales de las cuales seis corresponden a la glucosa, 11 a la porción tetrahydro- $\beta$ -carbolina, y las restantes a una unidad de ácido 3-vinil-3,4-dihidro-2H-pirano-5-carboxílico, que biogenéticamente deriva de la secologanina (Morita *et al.*, 1989).

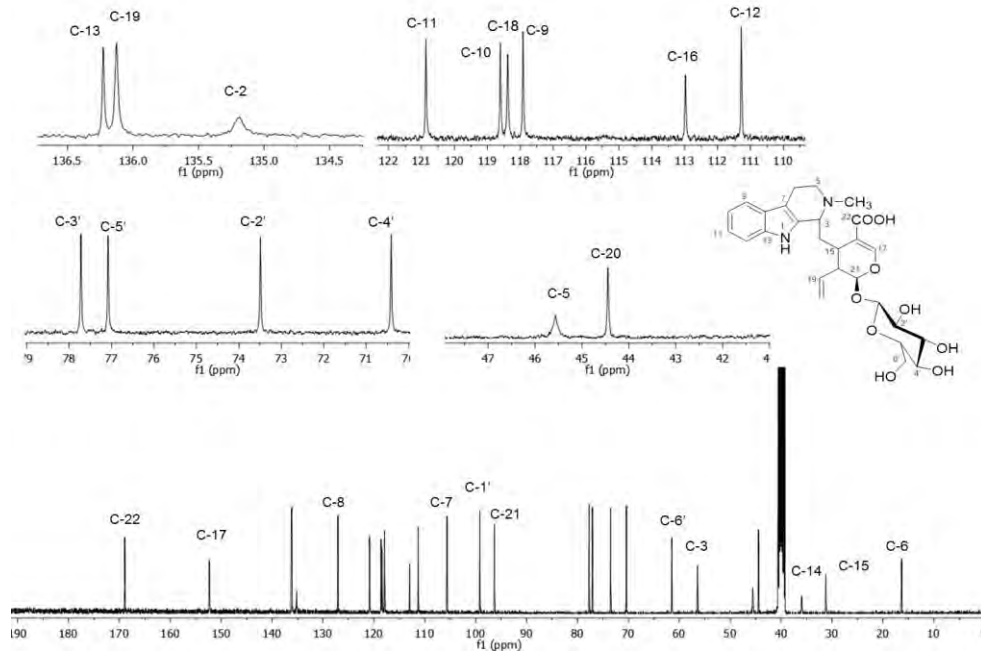
En el espectro de RMN- $^1H$  (**Figura 4**) se observaron cuatro grupos de señales: el primero, corresponde a un sistema AA'BB' característico del anillo carbocíclico del indol (H-9 a H-12, **Tabla 5**); estas señales, en conjunto con las señales múltiples en  $\delta_H$  2.5-3.12 conforman los protones de la unidad  $\beta$ -carbolina. El tercero corresponde a los hidrógenos de la porción 3-vinil-3,4-dihidro-2H-pirano-5-carboxílico en  $\delta_H$  5.32 (H-18a),  $\delta_H$  5.25 (H-18b) y  $\delta_H$  5.56 (H-21); el cuarto conjunto de señales corresponde a las del monosacárido. Los cuadros de conectividad observados en el espectro COSY (**ANEXO 1**) y las constantes de acoplamiento de los hidrógenos confirman que el azúcar es la glucosa. Finalmente, se aprecian de forma aislada dos señales simples, uno corresponde al grupo NH en  $\delta_H$  10.75 y, el otro a un metilo sobre nitrógeno ( $\delta_H$  2.43).

**Tabla 5.** Datos espectroscópicos de RMN para el alcaloide palicósido (**1**) en DMSO- $d_6$  ( $^1\text{H}$  a 400 HMz;  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz).

Posición de carbono	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult, $J$ en [Hz])	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	Posición de carbono	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult, $J$ en [Hz])	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1- NH	-	10.75 (s)		15	31.2	3.15 (m)	
2	135.2	-		16	112.5	-	
3	56.4	3.85 (d, 11.0)		17	152.3	7.55 (s)	15, 16, 21, 22
4- NCH <sub>3</sub>	40.1	2.50		18	118.4	5.32 (d, 17.5) 5.25 (d, 10.7)	19, 20
5	45.6	3.12, 2.95 (m)		19	135.6	5.82 (ddd, 6.8, 10.7, 17.5)	15, 20, 21
6	16.3	2.85, 2.54 (m)		20	44.4	2.56 (m)	
7	105.7	-		21	96.3	5.56 (d, 8.8)	15, 17, 19, 1'
8	127.1	-		22	169.0	-	
9	117.9	7.41 (d, 7.7)	13, 11, 7, 8	1'	99.2	4.63 (d, 7.8)	2', 3'
10	118.6	6.98 (t, 7.4)	8, 12	2'	73.5	3.02 (m)	
11	120.9	7.06 (ddd, 1.3, 7.0, 8.1)	9, 13	3'	77.7	3.17 (m)	
12	111.3	7.30 (d, 7.9)	8, 10	4'	70.4	3.08 (m)	
13	136.2	-		5'	77.1	3.24 (m)	
14	36.0	1.97 (ta, 11.4); 1.7 (ta, 11.4)	3, 16	6'	61.5	3.69 (d, 11.9) 3.44 (dd, 6.4, 11.8)	5', 4'



**Figura 4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **1** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).



**Figura 5.** Espectro de RMN -<sup>13</sup>C del compuesto **1** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz).

### 4.1.2 Aislamiento y elucidación estructural de la ofiorina B (4).

A partir del análisis cromatográfico por CLAE de la fracción secundaria **F<sub>I</sub>** se aislaron y purificaron tres compuestos identificados como ofiorina A (**3**) (4.4 mg;  $t_R$  11 min), ofiorina B (**4**) (10.1 mg;  $t_R$  12 min) y 4 mg adicionales de palicósido (**1**) ( $t_R$  16.5 min).

El metabolito **4** se obtuvo como un sólido beige, altamente soluble en agua y ópticamente activo. Su fórmula molecular se determinó como  $C_{26}H_{28}N_2O_9$  a partir del análisis de los espectros de RMN ( $^1H$  y  $^{13}C$ ), IR [(Película RPM)  $\nu_{max}$ : 3250, 2919, 1629, 1594  $cm^{-1}$ ] y espectrometría de masas generado por la técnica electrospray (ESI/EM), en su modalidad positivo; el ion molecular  $[M+H]^+$  se observó en una relación  $m/z$  de 513 uma. El índice de deficiencia de hidrógenos de esta molécula es 13, es decir, presenta dos insaturaciones más que el palicósido (**1**), y un carbono menos. Este alcaloide se caracterizó como la ofiorina B (**4**) con base en el análisis detallado de sus espectros de RMN. Los desplazamientos químicos observados en los espectros de  $^1H$  y  $^{13}C$ -RMN se muestran en las **Tablas 6** y **7**. Los espectros se registraron en dos disolventes para facilitar la comparación con los datos descritos en la literatura (Aimi *et al.*, 1985), sin embargo la discusión se realizará con el espectro registrado en metanol- $d_4$ .

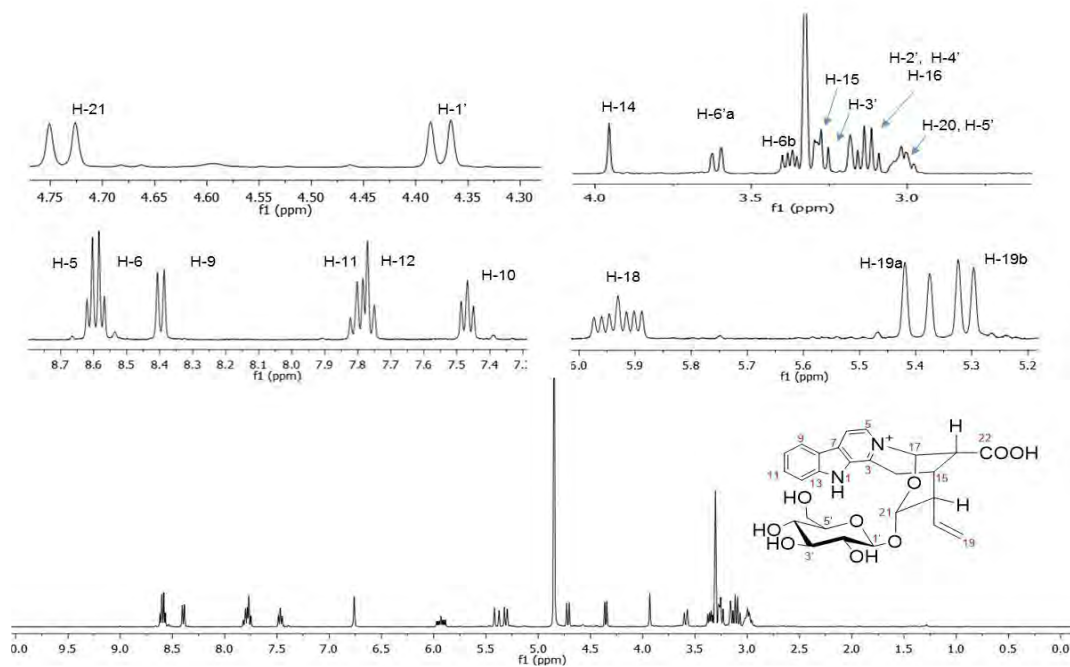
En el espectro de RMN- $^{13}C$  (**Figura 7**) del alcaloide **4** se observaron señales para 26 carbonos, de los cuales, uno corresponde a un carbonilo de ácido carboxílico en  $\delta_C$ 174.5 (C-22). Las correlaciones observadas en el experimento HSQC (**ANEXO 2**) permitieron determinar la presencia de 20 carbonos protonados: seis corresponden a la estructura  $\beta$ -carbolínica, que no presenta sustituyente en el anillo carbocíclico [ $\delta_C/\delta_H$ ; 135.0/8.63 (C-5/H-5), 117.4/8.60 (C-6/H-6), 124.4/8.42 (C-9/H-9), 123.3/7.49 (C-10/H-10), 133.3/7.83 (C-11/H-11) y 113.9/7.79 (C-12/H-12)]; seis a la glucosa [101.0/4.38 (C-1'/H-1'), 74.6/3.10 (C-2'/H-2'), 77.7/3.25 (C-3'/H-3'), 71.5/3.09 (C-4'/H-4'), 78.1/2.96 (C-5'/H-5') y 62.6/3.61, 3.4 (C-6'/H-6')]; y siete al grupo derivado del ácido 3-vinil-pirano-5-carboxílico, que en este caso, no presenta la doble ligadura entre C-16 y C-17.

Con los elementos estructurales analizados hasta el momento, el producto **4** presenta 12 insaturaciones. Por lo tanto para satisfacer el índice de insaturación calculado, el producto **4** debe tener un anillo adicional respecto al palicósido (**1**). La diferencia entre los desplazamientos químicos observados para los carbonos C-16 y C-17, sugieren que el anillo se establece entre N-4 y C-17. El análisis de las correlaciones en el espectro HMBC (**ANEXO 2**) de H-17 con C-5 y C-3; y de H-5 con C-17 corrobora esta propuesta.

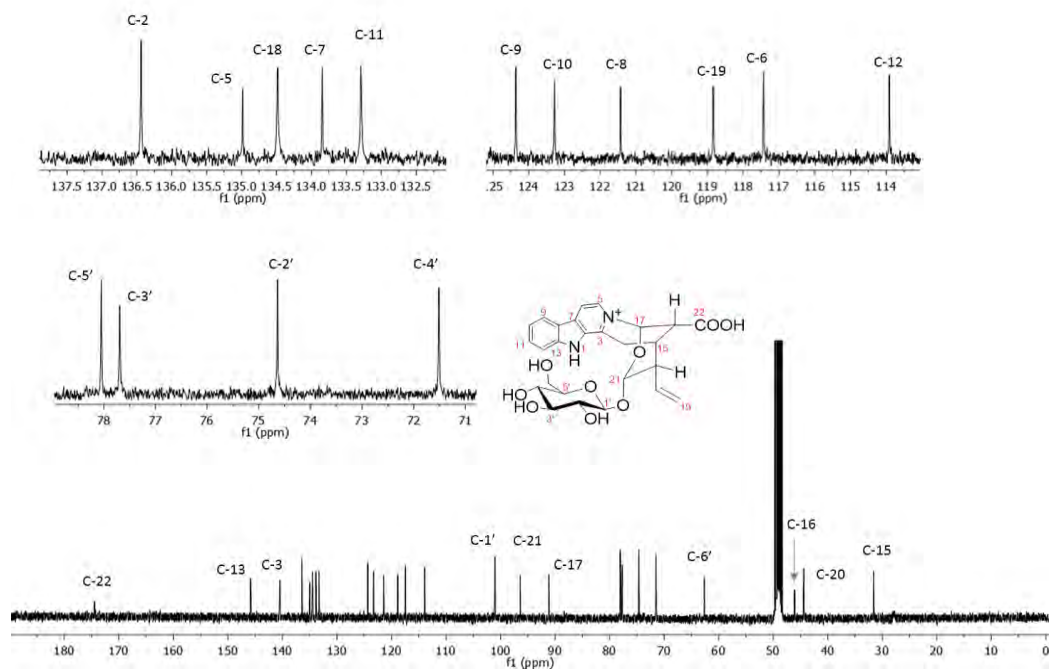


**Tabla 6.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) en metanol-*d*<sub>4</sub> del compuesto **4**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J en Hz)	HMBC ( <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C)
2	136.4	-	
3	140.5	-	
5	135.0	8.63 (d, 6.6)	3, 6, 7, 17
6	117.4	8.60 (d, 6.6)	5, 8
7	133.9	-	
8	121.4	-	
9	124.4	8.42 (8.1)	11, 13
10	123.3	7.49 (t, 7.4)	8, 12
11	133.3	7.83 (d, 8.2)	9, 13
12	113.9	7.79 (t, 6.9)	8, 10
13	145.9	-	
14	28.2	3.95 (s)	3, 15, 16
15	31.6	3.29 (m)	16
16	46.1	3.16 (m)	20, 22
17	91.1	6.78 (s)	3, 5, 15, 16, 21
18	134.5	5.95 (ddd, 17.0, 10.9, 5.5)	15, 20, 21
19	118.8	5.42 (d, 17.7) 5.33 (d, 5.33)	18
20	44.4	2.99 (m)	16, 18
21	96.4	4.74 (d, 9.9)	1', 17, 18
22	174.5	-	
1'	101.0	4.38 (d, 7.8)	5', 21
2'	74.6	3.10 (m)	3'
3'	77.7	3.25 (s)	2', 4'
4'	71.5	3.09 (m)	3'
5'	78.1	2.96 (m)	3'
6'	62.6	3.61 (m), 3.37 (m)	5'



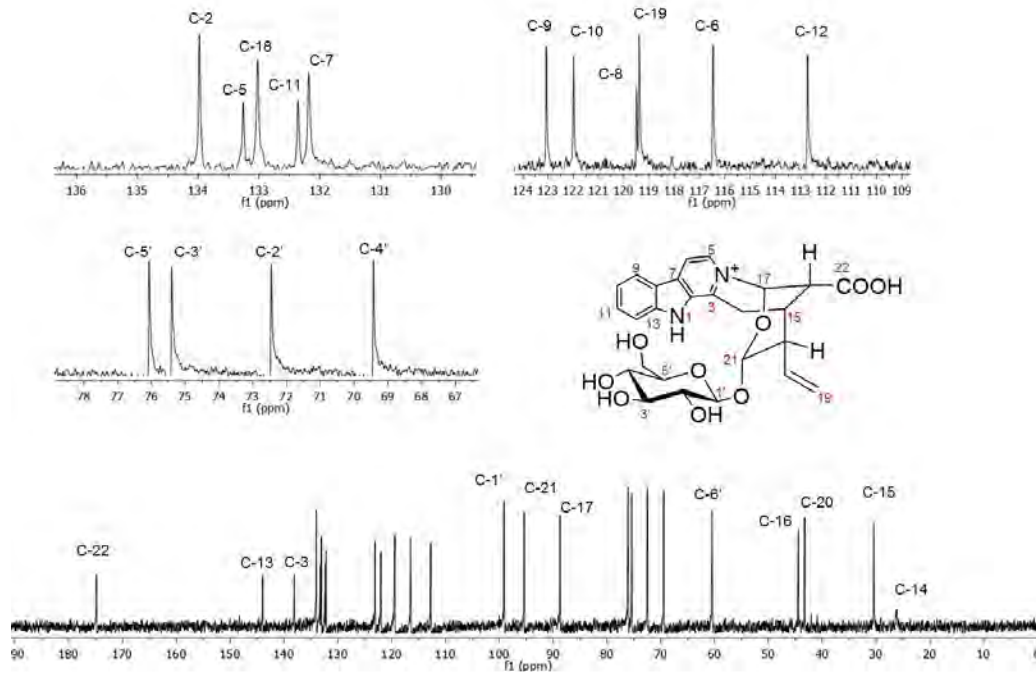
**Figura 6.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **4** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz).



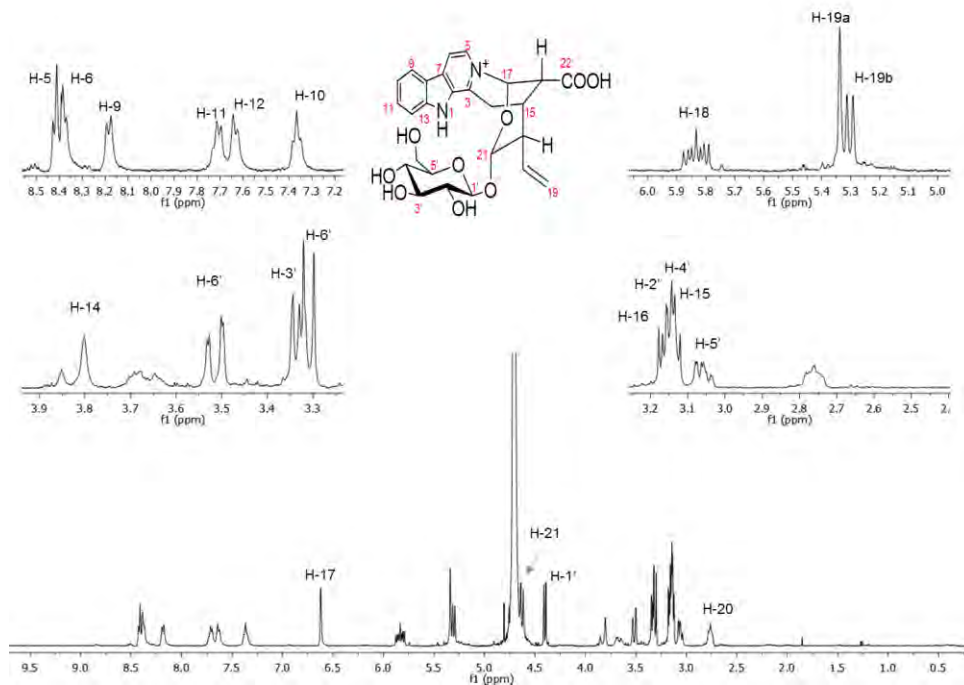
**Figura 7.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **4** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz).

**Tabla 7.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) en D<sub>2</sub>O del compuesto **4**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J en Hz)
<b>2</b>	134.8	-
<b>3</b>	138.9	-
<b>5</b>	134.1	8.50 (d, 6.5)
<b>6</b>	117.3	8.47 (d, 4.7)
<b>7</b>	133.0	-
<b>8</b>	120.3	-
<b>9</b>	123.9	8.27 (d, 7.8)
<b>10</b>	122.8	7.45 (ta)
<b>11</b>	133.2	7.79 (d, 7.6)
<b>12</b>	113.6	7.72 (d, 8.0)
<b>13</b>	144.8	-
<b>14</b>	26.2	3.91(d, 19.8)
<b>15</b>	31.3	3.26 (m)
<b>16</b>	45.3	3.21 (m)
<b>17</b>	89.6	6.71 (s)
<b>18</b>	133.9	5.92 (ddd, 17.3, 11.1, 6.4)
<b>19</b>	120.2	5.39 (d, 8.4) 5.42 (d, 10.0)
<b>20</b>	44.1	2.89 (m)
<b>21</b>	96.2	4.71 (d, 9.9)
<b>22</b>	175.7	-
<b>1'</b>	99.9	4.49 (d, 7.9)
<b>2'</b>	73.3	3.22 (m)
<b>3'</b>	76.2	3.43 (m)
<b>4'</b>	70.3	3.24 (m)
<b>5'</b>	77.0	3.14 (ddd, 9.5, 6.6, 2.1)
<b>6'</b>	61.3	3.39 (m), 3.60 (m)



**Figura 8.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **4** (D<sub>2</sub>O, 100 MHz).



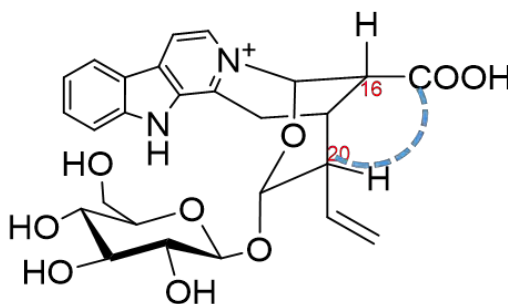
**Figura 9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **4** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).

#### 4.1.3 Obtención y elucidación estructural de la ofiorina A (3).

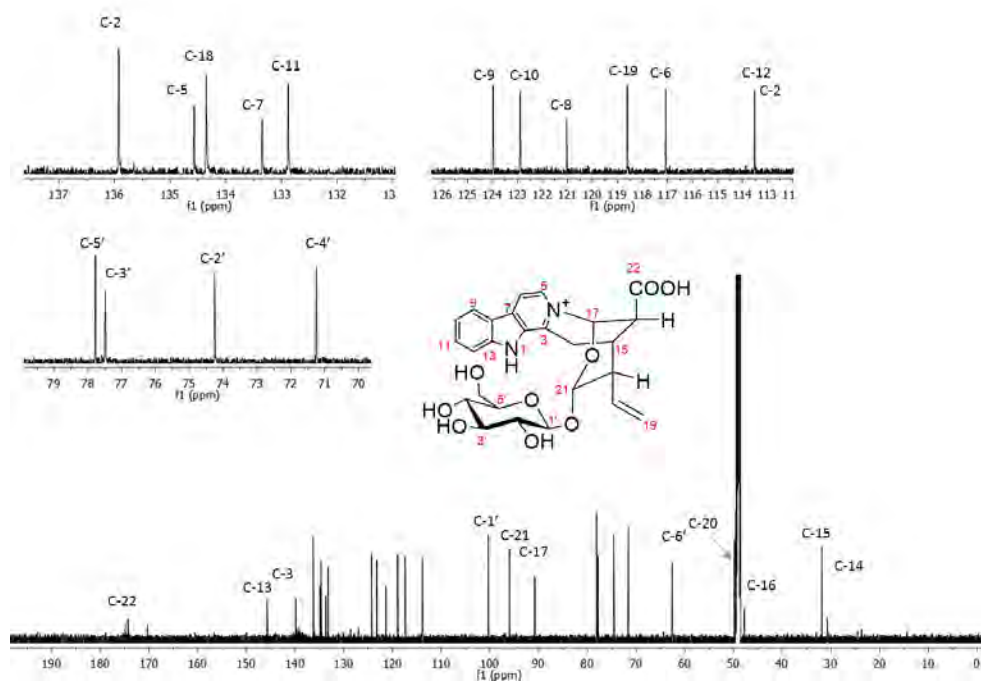
La ofiorina A (**3**), de igual manera que el compuesto **4** se aisló como un sólido beige de fórmula molecular  $C_{26}H_{28}N_2O_9$ , altamente soluble en agua y ópticamente activo. Su fórmula molecular se determinó a partir del análisis de los espectros de RMN ( $^1H$  y  $^{13}C$ ), IR [(KBr)  $\nu_{max}$ : 3201, 2910, 1630, 1585  $cm^{-1}$ ] y espectrometría de masas generado por la técnica ESI modalidad positiva [(M+H) $^+$  =513]. Estos datos indican que el producto **3** es un isómero **4**. Sin embargo, en los cromatogramas generados por la técnica de CLUE y CLAE se observa claramente que sus tiempos de retención son diferentes.

La ofiorina A (**3**) también se caracterizó con base en el análisis detallado de sus espectros de RMN (**Tablas 8 y 9**) (**ANEXO 3**). Los espectros se registraron en dos disolventes para facilitar la comparación con los datos descritos en la literatura (Aimi *et al.*, 1985). Igualmente, la discusión se realizará con base en los espectros registrados en metanol- $d_4$ .

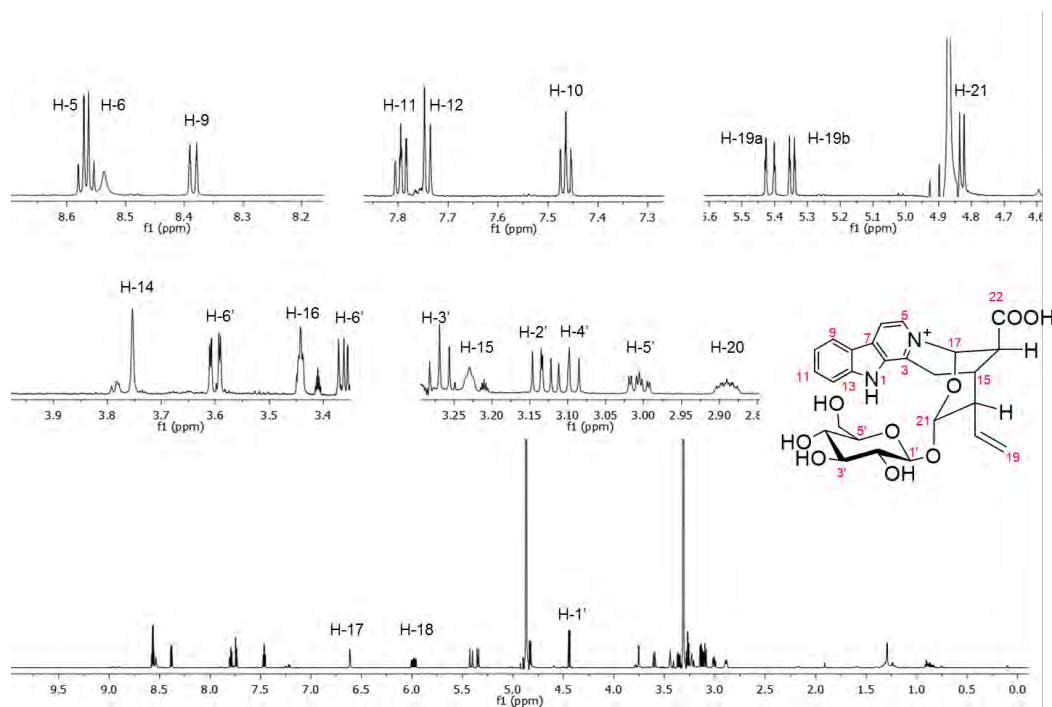
El espectro de RMN- $^{13}C$  (**Figura 11**) del alcaloide **4** fue muy similar al del **3**. La principal diferencia se observa en los desplazamientos químicos de las señales atribuidas a C-20; en el compuesto **3** la señal se observa  $\delta_C$  49.4 y en **4** en  $\delta_C$  44.4. Esta diferencia de 5.04 ppm se atribuye a un efecto  $\gamma$ -gauche debido a la relación 1,3- diaxial entre el sustituyente alfa (-COOH) de C-16 y el hidrógeno en C-20; esta proximidad provoca una repulsión entre sus densidades electrónicas y un efecto de protección de C-20 en **4** (Aimi *et al.*, 1985) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Efecto  $\gamma$ -gauche observado en la ofiorina A (**3**)



**Figura 11.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **3** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz).



**Figura 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **3** (metanol-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz).

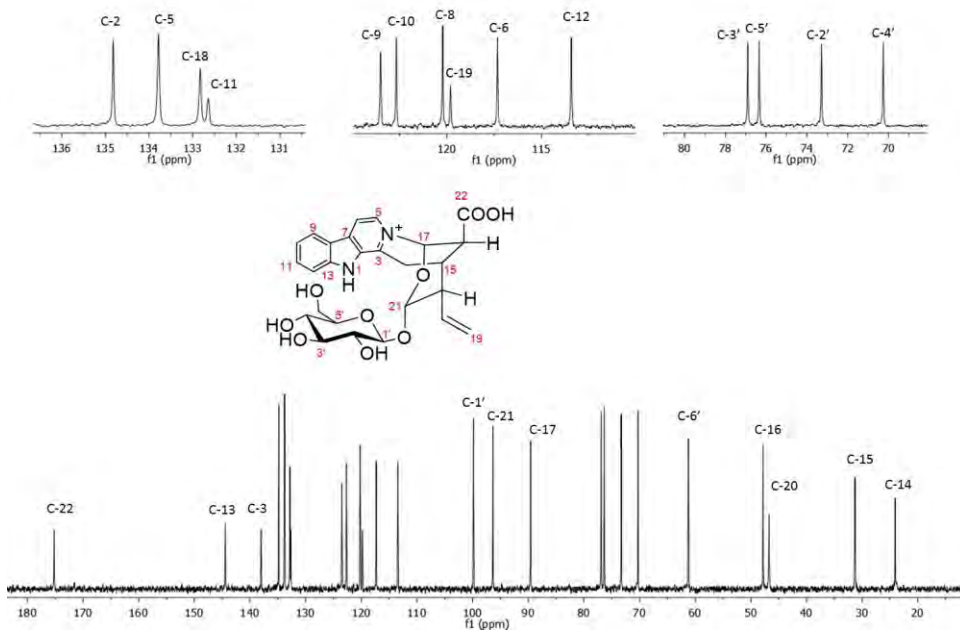
**Tabla 8.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN -<sup>1</sup>H (400 MHz) en metanol-*d*<sub>4</sub> del compuesto **3**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ ( <i>J</i> en Hz)	HMBC ( <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C)
2	135.9	-	
3	139.5	-	
5	134.6	8.57 (d, 6.5)	3,6, 7, 17
6	117.1	8.53 (d, 6.5)	5, 8
7	133.3	-	
8	121.0	-	
9	124.0	8.38 (dt, 8.1, 1.0)	11, 13
10	122.9	7.44 (ddd, 8.0, 6.9, 0.9)	8, 12
11	132.8	7.79 (ddd, 8.2, 6.9, 1.2)	9, 13
12	113.5	7.74 (dt, 8.4, 0.9)	8, 10
13	145.5	-	
14	24.9	3.75 (s)	3, 15, 16
15	31.5	3.23 (m)	16
16	47.4	3.44 (dt, 2.9, 1.1)	20, 22
17	90.5	6.61 (s)	3, 5, 15, 16, 21
18	134.4	5.98 (ddd, 17.7, 10.9, 5.6)	15, 20, 21
19	118.6	5.41 (dt, 17.7, 1.5) 5.35 (dt, 10.9, 1.5)	18
20	49.4	2.89 (m)	16, 18
21	95.6	4.83 (dd, 9.7, 1.9)	1', 17, 18
22	174.4	-	
1'	99.9	4.44 (d, 7.9)	5', 21
2'	74.2	3.13 (m)	3'
3'	77.5	3.27 (s)	2', 4'
4'	71.2	3.10 (m)	3'
5'	77.8	3.01 (m)	3'
6'	62.2	3.60 (m), 3.35 (m)	5'

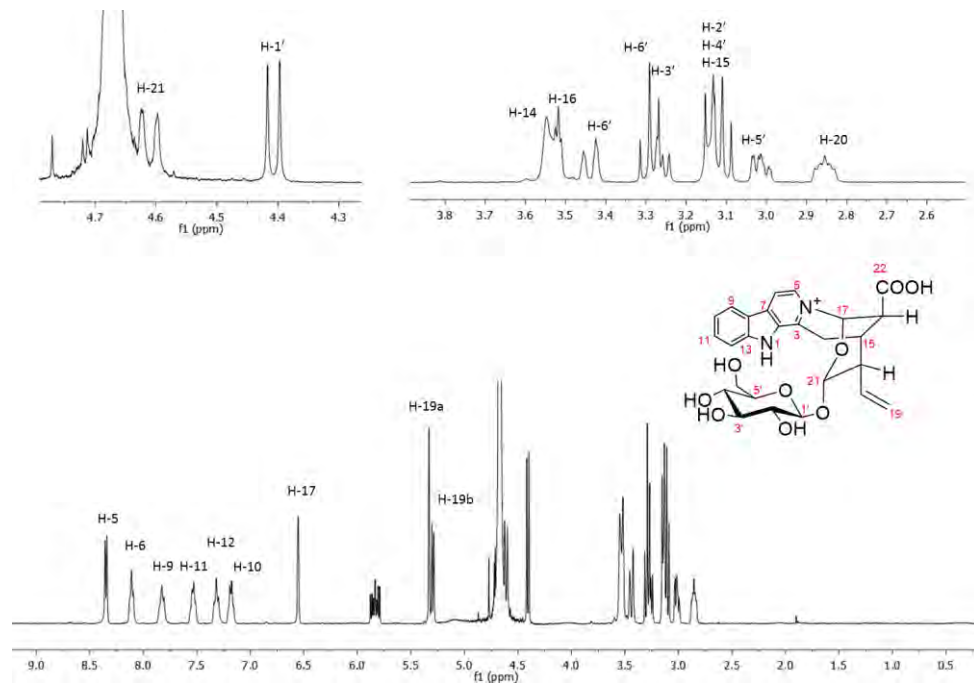
**Tabla 9.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz) y RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) en D<sub>2</sub>O del compuesto **3**.

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J en Hz)
2	134.8	-
3	138.0	-
5	133.8	8.47 (d, 6.5)
6	117.3	8.22 (d, 7.1)
7	-	-
8	120.2	-
9	123.5	7.94 (d, 9.3)
10	122.7	7.29 (t, 7.1)
11	132.7	7.65 (m)
12	113.4	7.44 (t, 8.8)
13	144.4	-
14	24.1	3.66 (d 8.8)
15	31.3	3.21 (m)
16	47.8	3.63 (d, 3.0)
17	89.6	6.67 (s)
18	132.8	5.95 (m)
19	119.8	5.45 (d, 1.3), 5.41 (dt, 7.0, 1.3)
20	46.7	2.98 (m)
21	96.4	4.73 (d, 9.7, 1.6)
22	175.2	-
1'	99.8	4.53 (d, 7.9)
2'	73.3	3.26 (m)
3'	76.9	3.38 (m)
4'	70.3	3.23 (m)
5'	76.3	3.13 (ddd, 9.6, 6.6, 2.2)
6'	61.2	3.42 (d, 9.2) 3.56 (dd, 12.4, 2.2)





**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **3** (D<sub>2</sub>O, 100 MHz).

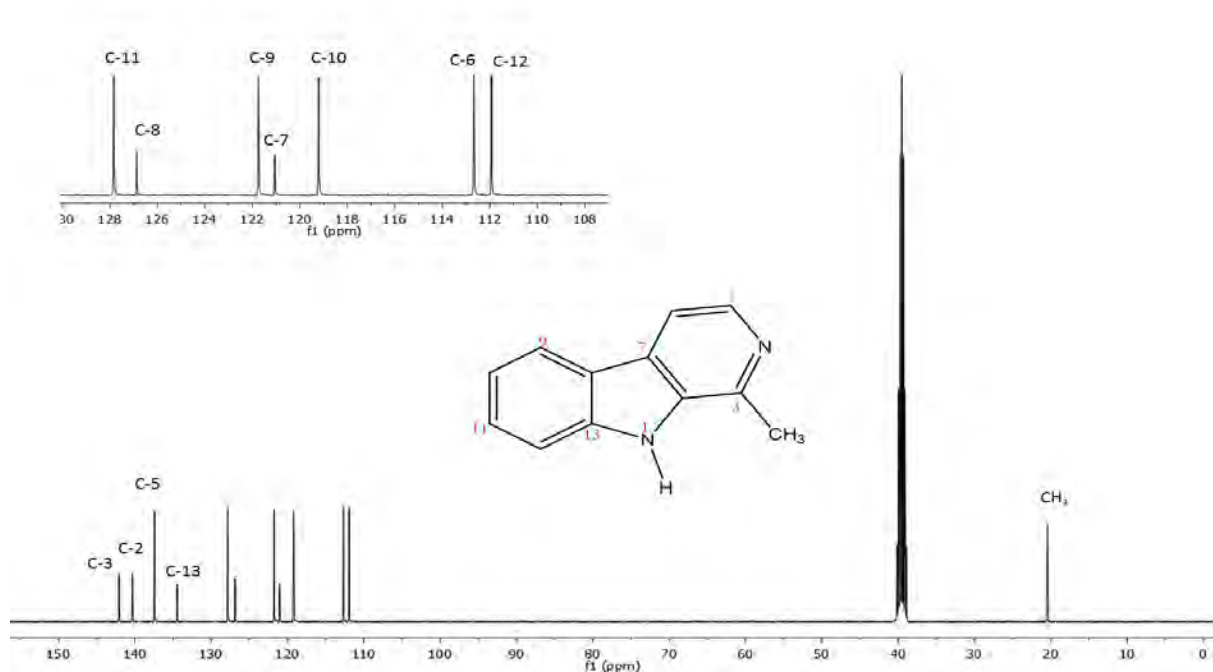


**Figura 14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **3** (D<sub>2</sub>O, 400 MHz).

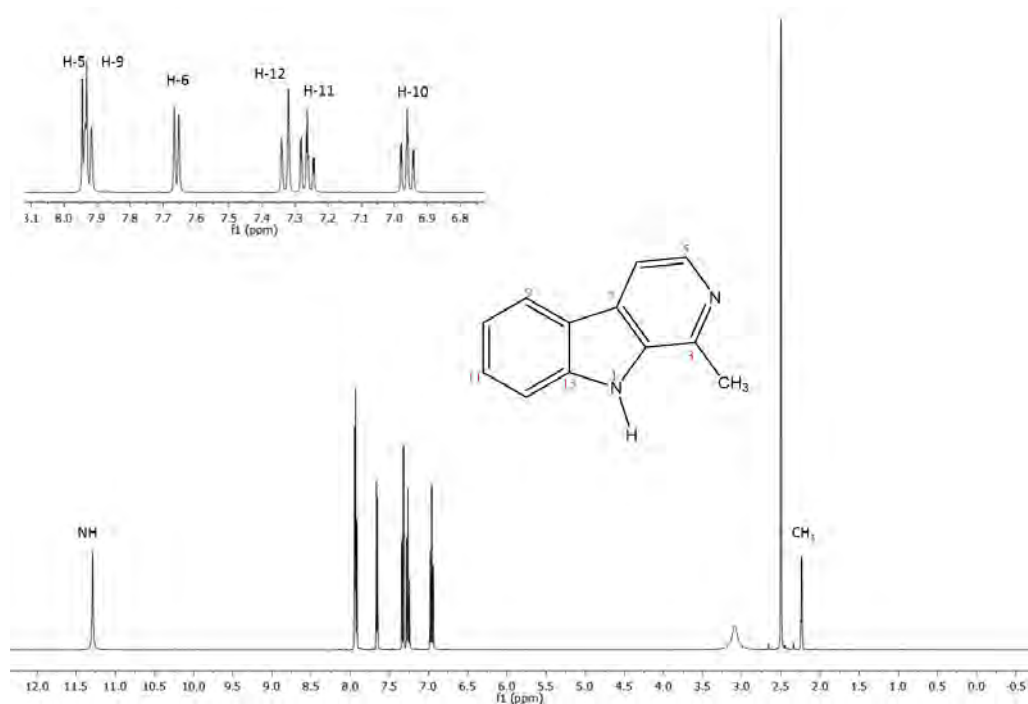
### 4.1.4 Aislamiento y elucidación estructural del harmano (2).

El último alcaloide aislado se identificó como el harmano (**2**), el cual cristalizó de manera espontánea (225.6 mg) como un sólido cristalino color café claro, a partir de la fracción primaria F<sub>6</sub>. El harmano (**2**) fue caracterizado por comparación con una muestra auténtica. En las **figuras (15 y 16)** y **ANEXO 4** se muestran los espectros de RMN-<sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H. Cabe mencionar que este alcaloide, ya había sido identificado en la especie por Castañeda *et al.* (1991). Las constantes espectroscópicas se describen a continuación.

Harmano (**2**): (1-metil-β-carbolina), ESI<sup>+</sup>/ EM *m/z* 183 [M + H]<sup>+</sup>; C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>; p.f. 234°C [Reportado 235-236°C (Kusurkar y Goswami, 2004)]; UV λ<sub>max</sub>: 211, 244, 299, 360; RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 12.12 (1H, s, NH), 8.76 (2H, m, H-5, H-9), 8.49 (1H, d, *J* = 5.3, H-6), 8.16 (1H, d, *J* = 8.2, H-12), 8.09 (1H, ddd, *J* = 8.2, 7.0, H-11), 7.79 (1H, ddd, *J* = 8.0, 7.0, H-10), 3.33 (3H, s, CH<sub>3</sub>). RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 142.1 (C-3), 140.3 (C-2), 137.4 (C-5), 134.5 (C-13), 127.8 (C-11), 126.9 (C-8), 121.7 (C-9), 121.1 (C-7), 119.2 (C-10), 112.7 (C-6), 111.9 (C-12), 20.4 CH<sub>3</sub> (C-14).



**Figura 15.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **2** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz).



**Figura 16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **2** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).

## 4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos.

Una vez obtenidos los analitos se procedió a la obtención de los perfiles cromatográficos de utilidad para establecer los ensayos de identidad química 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 amplia variedad de soportes cromatográficos, mismos que permiten la resolución de mezclas complejas, como lo son los extractos de las drogas crudas (Gong *et al.*, 2003). Además, con esta técnica el tiempo de análisis y costo se reducen significativamente.

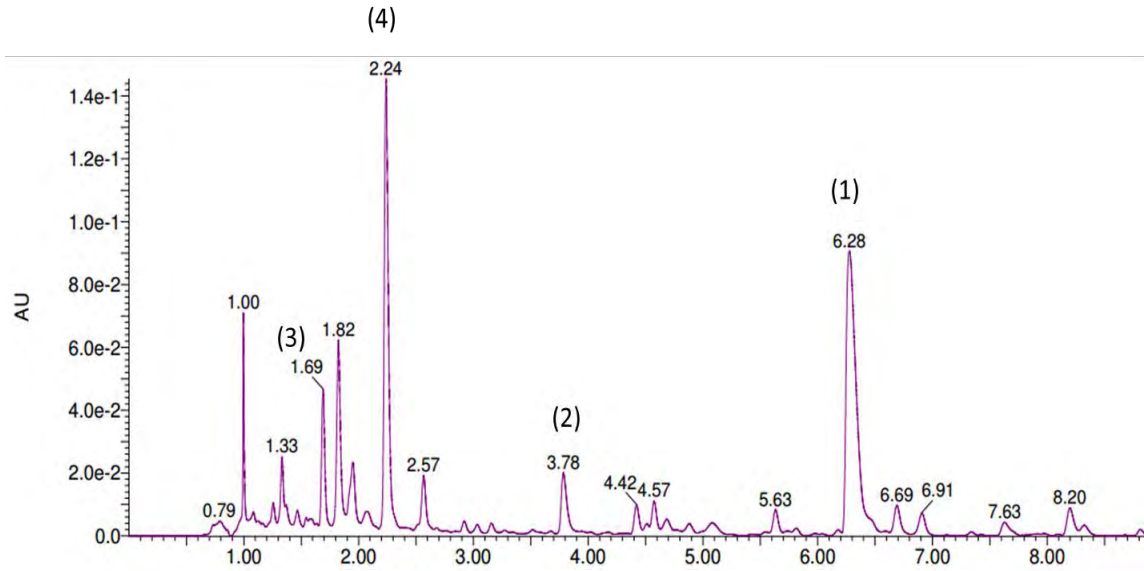
#### 4.2.1 Perfil cromatográfico por CLUE-ESI/EM de la droga cruda de *S. mexicana*.

Como primer paso para el desarrollo del método analítico, se establecieron las condiciones cromatográficas para evaluar la composición química de los extractos y separar los compuestos mayoritarios presentes. Para ello se realizaron una serie de ensayos, para determinar las longitudes de onda óptimas de detección de los analitos, diversos flujos, fases estacionarias y sistemas de elución. Las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron las siguientes: fase estacionaria, columna C18; temperatura de la columna, 40°C; fase móvil, sistema binario de disolventes: agua ácida (ácido fórmico 0.1%) y acetonitrilo; el mejor gradiente de elución se muestra en la **Tabla 1**. Por otra parte, el flujo fue de 0.3 mL/min; la longitud de onda de detección, 270 nm y el detector empleado fue de tipo UV y de manera adicional se realizó la detección de los analitos por EM de ionización por electropray (ESI) en un espectrómetro de masas de tipo SQD2.

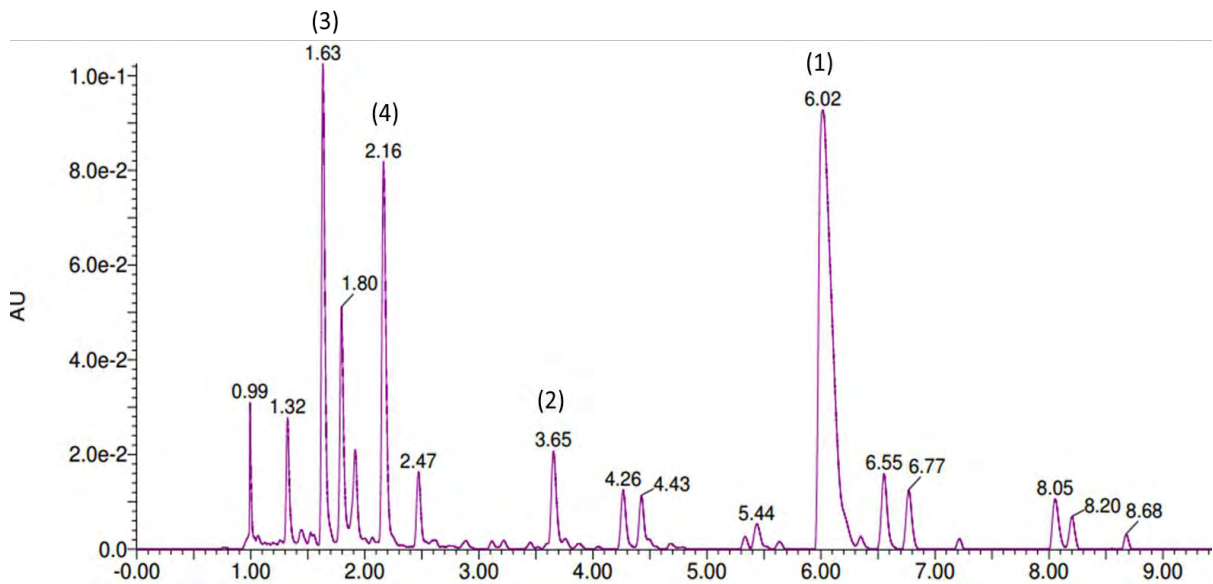
En los perfiles cromatográficos de los extractos acuoso y orgánico se observaron cuatro picos mayoritarios; correspondientes al palicósido (**1**), el hermano (**2**) y las ofiorinas A y B (**3** y **4**), los cuales se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención, absorbancias y datos espectrométricos (EM) con los de las muestras aisladas en el presente trabajo. Las **Figuras 17** y **18**, muestran los cromatogramas obtenidos. Cabe mencionar que el extracto acuoso se utilizó como matriz de trabajo durante el proceso de validación debido a que representa la forma de consumo de la droga cruda.

#### 4.3 Validación del método analítico.

Una vez establecidos los perfiles cromatográficos se procedió a la validación del método analítico para la cuantificación del palicósido (**1**) presente en tres muestras de *S. mexicana*. El palicósido (**1**) se seleccionó como compuesto marcador debido a su estabilidad y disponibilidad. Además, el producto es altamente soluble en la matriz de trabajo seleccionada.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda = 270$  nm) correspondiente del extracto acuoso de *S. mexicana*. Tiempos de retención [palicósido (1), ( $t_R = 6.28$  min); harmano (2), ( $t_R = 3.78$  min); ofiorina A (3), ( $t_R = 1.69$  min); ofiorina B (4), ( $t_R = 2.24$  min)].



**Figura 18.** Perfil cromatográfico por CLUE ( $\lambda = 270$  nm) correspondiente del extracto metanólico de *S. mexicana*. Tiempos de retención [palicósido (1), ( $t_R = 6.02$  min); harmano (2), ( $t_R = 3.65$  min); ofiorina A (3), ( $t_R = 1.63$  min); ofiorina B (4), ( $t_R = 2.16$  min)].

La validación del método analítico tiene como objetivo demostrar que el método de análisis es conveniente para el propósito indicado. De esta manera, el proceso de validación consiste en generar una serie de datos que demuestren científicamente que dicho método cumple con las características de desempeño avaladas por 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). Los parámetros de desempeño analizados fueron: la linealidad del sistema, la exactitud, la linealidad y precisión del método, y los límites de detección y cuantificación (LD y LC) (ICH; Q2 (R1), 2005).

### 4.3.1 Linealidad del sistema.

Se define linealidad del sistema como la capacidad de un método para obtener respuestas analíticas que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentraciones pertinentes con la aplicación analítica del método. (ICH Q2 (R1), 2005). De igual manera la FEUM (2014) establece que la linealidad del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan a un modelo matemático en un intervalo de concentraciones.

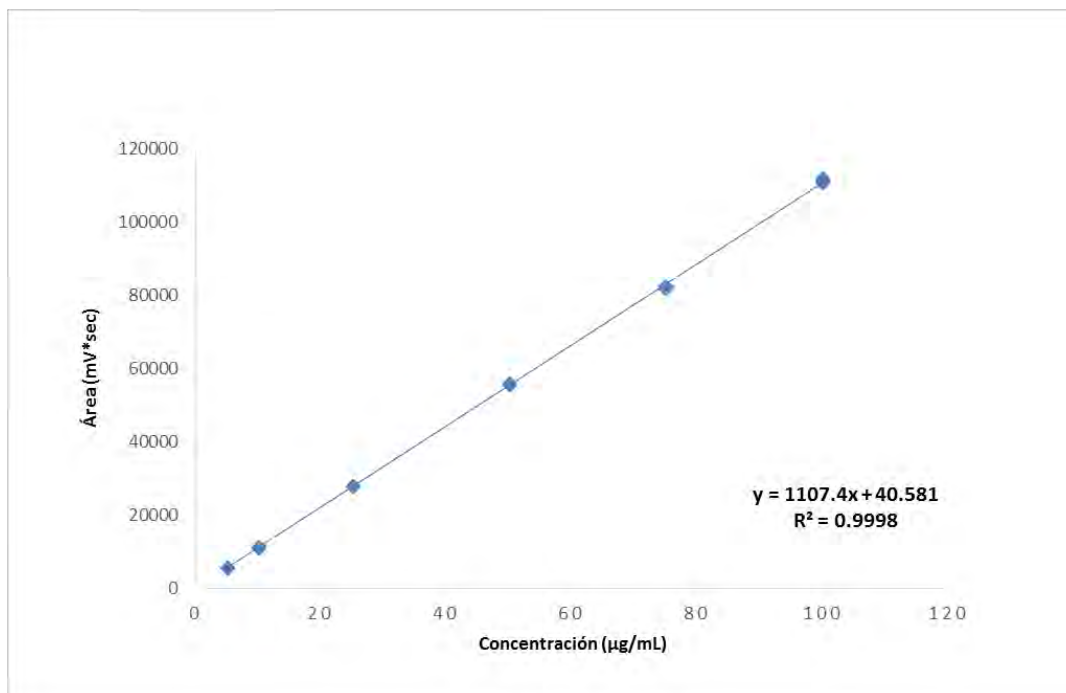
Para el sistema evaluado, la linealidad se determinó mediante la construcción de una curva de calibración con seis concentraciones diferentes del palicósido (1) (5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL), el cual se aisló e identificó en el presente trabajo, garantizando así su pureza. Cabe mencionar que todas las disoluciones se realizaron con agua. La **Tabla 10** y la **Figura 19** muestran los resultados obtenidos para la respuesta analítica. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple y permitieron 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**.

**Tabla 10.** Resultados experimentales de la curva de calibración del palicósido (**1**) para establecer la linealidad del sistema.

C[ $\mu\text{g/mL}$ ]	Área bajo la curva				$\bar{x}$	DE	CV (%)
	1	2	3	4			
5	5568	5605	5592	5621	5597	22.40	0.4
10	11083	11157	11064	11133	11109	43.13	0.4
25	27942	27809	27758	27851	27840	77.91	0.3
50	55566	55894	55481	55897	55710	217.56	0.4
75	82048	81897	82082	82371	82100	198.05	0.2
100	111121	111770	110883	111617	111348	415.61	0.4

**Tabla 11.** Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema del compuesto **1**.

<b>Ordenada al origen (<math>b_0</math>)</b>	40.581 $\pm$ 1094.41
<b>Pendiente de la recta (<math>b_1</math>)</b>	1107.4 $\pm$ 19.5
<b>Coefficiente de correlación (<math>r</math>)</b>	0.9989
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9998



**Figura 19.** Curva de calibración para la evaluación de la linealidad del sistema analítico.

### 4.3.2 Linealidad y exactitud del método.

#### a) Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó mediante una curva de calibración construida a partir de las cantidades de palicosido (**1**), tanto adicionadas como recuperadas de la matriz de trabajo. Las cantidades del compuesto **1** que en un inicio se adicionaron a la matriz fueron equivalentes a las concentraciones de 80, 40 y 20 µg/mL. Cabe mencionar que la respuesta de la cantidad recuperada del palicosido (**1**) se realizó considerando el valor de la matriz sin adición. En la **Tabla 12** se muestran los resultados obtenidos del área bajo la curva y la cantidad recuperada; el ajuste de datos se realizó mediante una regresión lineal simple. La **Figura 20** corresponde a la gráfica de linealidad del método y los parámetros estadísticos calculados se presentan en la **Tabla 13**.

De acuerdo a las guías consultadas (ICH; Q2 (R1), 2005), un método es lineal cuando las respuesta analíticas son directamente proporcionales a la cantidad de analito estándar adicionado. Como puede observarse los resultados indican que el método desarrollado es



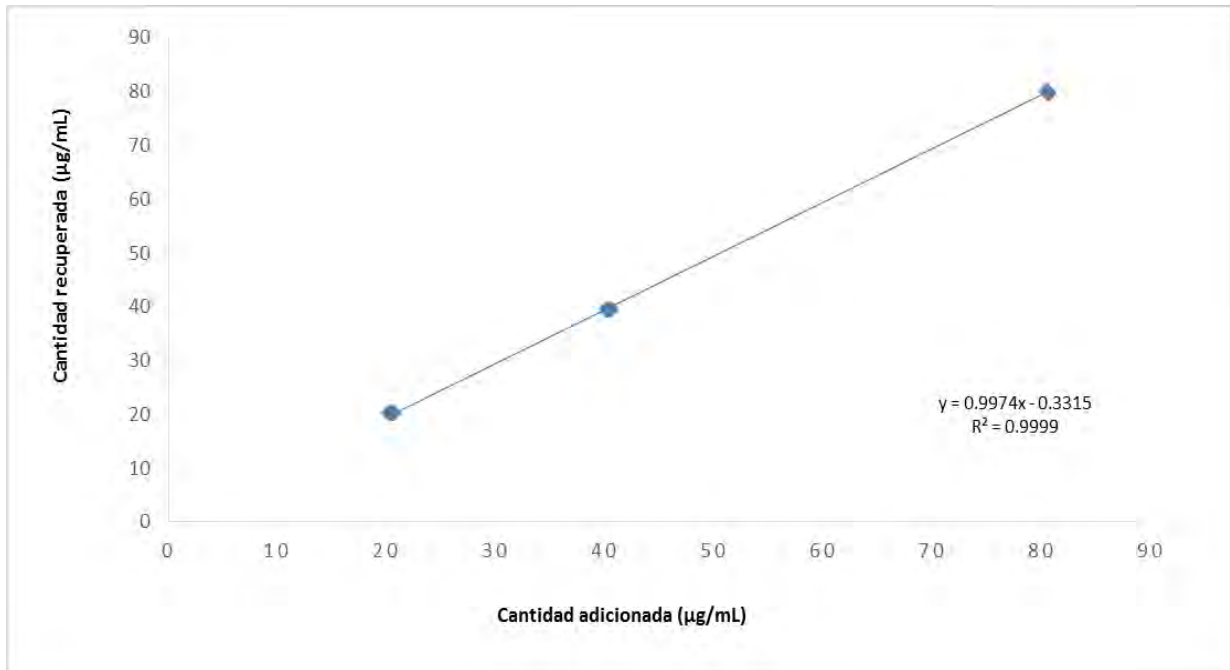
lineal puesto que el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) presenta un valor mayor a 0.98 y el de correlación es mayor a 0.99, así mismo  $b_0 = 0$  y  $b_1 \neq 1$ .

**Tabla 12.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.

Concentración de palicósido (1) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área bajo la curva	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )
80	80	88530.3	79.9
80	80	88704.3	80.1
80	80	88435.3	79.8
40	40	43636.2	39.4
40	40	43786.2	39.5
40	40	43873.2	39.6
20	20	22455.8	20.2
20	20	22514.8	20.3
20	20	22477.0	20.3

**Tabla 13.** Parámetros estadísticos del modelo lineal del método empleado para la cuantificación del palicósido (1) en el extracto acuoso de *S. mexicana*.

Ordenada al origen ( $b_0$ )	$0.331 \pm 0.577$
Pendiente de la recta ( $b_1$ )	$0.9968 \pm 0.01$
Coefficiente de correlación ( $r$ )	0.9999
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9999



**Figura 20.** Linealidad del método para la cuantificación del palicósido (1) en el extracto acuoso de *S. mexicana*.

### b) Exactitud del método

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 (FEUM, 2014). La exactitud se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro y en la **Tabla 14** se resumen los resultados obtenidos al evaluar la exactitud del método para cuantificar palicósido (1) en la matriz de trabajo.

Con base en los resultados obtenidos, el método analítico se encuentra dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%); de igual manera se observa que el CV obtenido para cada concentración es menor a 2%, lo cual permite establecer que el método analítico desarrollado es exacto para cuantificar palicósido (1) en el extracto acuoso de *S. mexicana* en el intervalo de concentraciones ensayadas.

**Tabla 14.** Resultados obtenidos de la exactitud del método en el extracto acuso de *S. mexicana*.

Concentración de palicósido (1) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área bajo la curva	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de recobro	$\bar{X}$ (cantidad recuperada)	DE	CV (%)
80	80	87025.7	78.5	98.19	79.4	0.81	1.02
80	80	88557.7	79.9	99.92			
80	80	88487.7	79.9	99.84			
40	40	43612.3	39.3	98.36	39.9	0.60	1.51
40	40	44925.3	40.5	101.33			
40	40	44354.3	40.0	100.04			
20	20	22336.0	20.1	100.67	20.2	0.12	0.57
20	20	22507.0	20.3	101.44			
20	20	22531.3	20.3	101.55			

### 4.3.3 Precisión.

La precisión de un sistema o un método analítico hace referencia al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia. Para este análisis se considera la dispersión de los datos individuales respecto a la media, y se expresa mediante la DE y el CV.

Este parámetro de calidad se determinó en términos de repetitividad y la precisión intermedia. La primera consiste en medir la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo de tiempo corto. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (ICH Q2 (R1), 2005).

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

### a) Repetibilidad

La repetibilidad se analizó a través de la respuesta analítica obtenida de seis réplicas de una disolución de palicósido (**1**) a una concentración de 80 µg/mL. Los resultados junto con los parámetros estadísticos considerados se resumen en la **Tabla 15**. De acuerdo con el criterio de aceptación establecido para este parámetro de calidad el valor del CV debe ser menor a 2%. De acuerdo al resultado obtenido se pudo concluir que el sistema es preciso para cuantificar palicósido (**1**) en el extracto acuso de *S. mexicana*.

**Tabla 15.** Datos obtenidos de la repetibilidad del método.

Replica	Cantidad adicionada de palicósido (1) (µg/mL)	Cantidad recuperada (µg/mL)	Área bajo la curva
1	80	78.4	86886.5
2	80	78.6	87101.3
3	80	79.1	87632.3
4	80	79.0	87503.3
5	80	78.7	87156.3
6	80	78.6	87050.3
	$\bar{X}$		87221.7
	DE		285.8
	CV (%)		0.33

### b) Precisión intermedia (reproducibilidad).

La evaluación de este parámetro se llevó a cabo mediante el análisis por triplicado de una muestra de palicósido (1) a una concentración de 40 µg/mL; este análisis se realizó en dos días y por dos analistas diferentes.

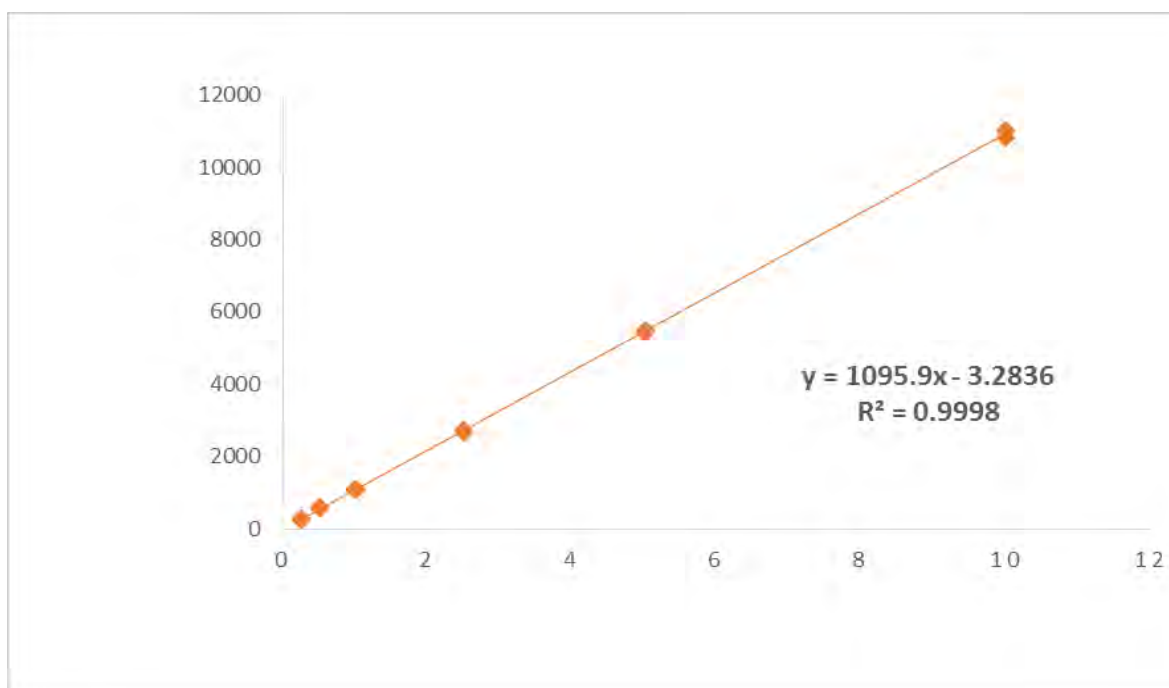
Los resultados estadísticos obtenidos a partir de los datos de las áreas bajo la curva (**Tabla 16**) fueron la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación que con base a las especificaciones establecidas para métodos cromatográficos el CV% debe ser menor a 2% (ICH; Q2 (R1) 2005), por lo tanto se puede determinar que el método es reproducible.

**Tabla 16.** Resultados de la precisión de intermedia.

ANALISTA	DÍA	Cantidad adicionada de palicósido (1) (µg/mL)	Área bajo la curva	Cantidad recuperada (µg/mL)	% Recobro	X	DE	CV (%)
A	1	40	43449.3	39.2	98.00	43749.6	301.7	0.69
		40	43594.3	39.3	98.32			
		40	43642.3	39.4	98.43			
	2	40	43760.3	39.5	98.70			
		40	43728.3	39.5	98.63			
		40	44323.0	40.0	99.97			
B	1	40	44480.0	40.1	100.32	44423.7	286.3	0.64
		40	44326.0	40.0	99.98			
		40	44746.3	40.4	100.93			
	2	40	44272.3	39.9	99.85			
		40.4	44720.3	40.3	100.87			
		40	43997.0	39.7	99.23			
Media total						44086.6		
Desviación estándar total						450.06		
CV (%) total						1.02		

### 4.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección (LD) de un método se define como la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. Por otro lado, el límite de cuantificación (LC) expresa la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (ICH; Q2 (R1), 2005). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de curvas de calibración con tres niveles de concentraciones comprendidas en un rango de 0.25 y 10.0 µg/mL del compuesto **1** (**Tabla 17**). Así, realizando el análisis estadístico de los datos (**Tabla 18**) y utilizando las expresiones matemáticas indicadas en el inciso **3.5.2.4** de la sección experimental, los valores de LD y LC calculados se muestran en la **Tabla 19**.



**Figura 21.** Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y detección del palicosido (**1**), en el extracto acuoso.

**Tabla 17.** Resultados experimentales para establecer los límites de detección y cuantificación del compuesto **1**.

Solución	Concentración del palicósido (1) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área bajo la curva
1	0.25	270
2	0.25	300
3	0.25	242
4	0.5	564
5	0.5	588
6	0.5	583
7	1	1108
8	1	1053
9	1	1090
10	2.5	2665
11	2.5	2716
12	2.5	2745
13	5	5431
14	5	5506
15	5	5472
16	10	10834
17	10	11053
18	10	11007

**Tabla 18.** Resumen de la regresión lineal simple de la curva para establecer el LD y LC del palicosido (1)

<b>Ordenada al origen (<math>b_0</math>)</b>	$1095.9 \pm 7.54$
<b>Pendiente de la recta (<math>b_1</math>)</b>	$-3.2836 \pm 35.3$
<b>Coefficiente de correlación (<math>r</math>)</b>	0.99989
<b>Coefficiente de determinación (<math>r^2</math>)</b>	0.9998
<b><math>S_{y/x}</math></b>	40.83

**Tabla 19.** Límites de detección y límites de cuantificación del compuesto 1.

Analito	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LC ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.12	0.37

#### 4.3.5 Cuantificación del palicósido (1) en diferentes extractos de *S. mexicana*.

Al finalizar la validación del método analítico, se cuantificó el contenido de palicósido (1) en tres muestras diferentes de *S. mexicana* [(extracto acuoso y orgánico (lote 1 y 2)], las cuales se prepararon a una concentración 250  $\mu\text{g/mL}$ . Para realizar este análisis se utilizó la ecuación de la recta descrita para la linealidad del sistema  $y = 1107.4x + 40.581$ . Los resultados obtenidos se indican en la **Tabla 20**.

De acuerdo a las cantidades de palicósido (1) observadas en la tabla anterior, se puede inferir que los extractos acuoso y orgánico presentan una concentración similar de palicósido (1), aspecto que puede ser atribuido a la polaridad de los disolventes empleados para la obtención de los extractos. De igual forma no se observa diferencia en la cantidad de



palicósido (1) en los extractos orgánicos lote 1 y 2 correspondientes a muestras recolectadas en distintas épocas.

**Tabla 20.** Cuantificación del palicósido (1) por CLUE- ESI/ EM en los extractos orgánicos (Lote 1 y 2) y acuoso de *S. mexicana*.

Muestra	Área bajo la curva	Cantidad de palicósido (1) ( $\mu\text{g}$ )	% de palicósido	
<b>Extracto orgánico</b>	Lote 1	27680	25.0	10
		23954	21.6	8.6
		25836	23.3	9.3
	Lote 2	29065	26.2	10.5
		27182	24.5	9.8
		27259	24.6	9.8
<b>Extracto acuoso</b>		29750	26.8	10.7
		29579	26.7	10.7
		27372	24.7	9.9

## 5. CONCLUSIONES

- El estudio químico realizado sobre la infusión de la corteza de *S. mexicana* permitió la caracterización de cuatro alcaloides; el palicósido (**1**), el harmano (**2**) y las ofiorinas A y B (**3** y **4**). Los productos **1**, **3** y **4** son productos naturales descritos por primera vez en la especie. Cabe destacar que harmano y las ofiorinas se habían aislado de otras especies de *Simira*. Sin embargo el palicósido (**1**) se aisló por vez primera en este género.
- Se obtuvieron los perfiles cromatográficos del extracto acuoso y orgánico de *S. mexicana* por CLUE-ESI/EM en los cuales se identificó la presencia de los cuatro alcaloides mayoritarios (**1**, **2**, **3** y **4**). Estos perfiles constituyen una prueba de identidad para la droga cruda de *S. mexicana*.
- Se validó un método analítico para cuantificar el contenido de palicósido (**1**) en el extracto acuoso de *S. mexicana*, el método fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas.
- Los resultados generados constituyen pruebas de identidad química y composición para el control de calidad de la droga cruda de *S. mexicana* y serán de utilidad para la integración de su monografía tipo OMS y FHEUM. La generación de estos documentos permitirá establecer el control de calidad riguroso de esta especie, y diferenciarla de otras que también se comercializan bajo el nombre de quina roja.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alves C., Cranchi D., de Carvalho M., y da Silva S. (2001). Triterpenos, esteroide glicosilado e Alcaloide Isolados de *Simira glaziovii*. *Floresta e Ambiente*. **8**:174-179.
- Anaya I. (1991). Estudio etnobotánico del complejo quina en México. (Tesis de licenciatura) Biología, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Méx.
- Aquino R., Capasso A., De Sironi F., Garofalo L., Pizza C., Sorrentino L. (1996). Inhibiting Activity of Some Glucoindolalkaloids and Iridoids from *Sickingia wizziamsii* on Electrically Induced Contractions of Isolated Guinea-pig Ileum. *Phytotherapy Research*. **10**: 161-166.
- 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 (Ed), Weinheim.
- Bai Y., Li D., Zhou T., Qin N., Li Z., Yu Z., Hua, H. (2016). Coumarins from the roots of *Angelica dahurica* with antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*. **20**: 453-462.
- Bastos A., Carvalho M., Velandia J., Braz Filho R. (2002). Ophiorine B derivatives, an alkaloid of *Simira glaziovii*. *Química Nova*, **45**: 241-245.
- Borhidi A. (2012). Rubiaceas de México. Instituto de Biología, Universidad de Pécs, Hungría. 505-508.
- Borhidi A. y Diego-Pérez N. (2002). Introducción a la taxonomía de la familia *Rubiaceae* en la flora de México. *Acta Botanica Hungarica*. **44**: 237-280.
- Bhattacharyya S., Sekar V., Majumder B., Mehrotra D., Banerjee S., Bhowmick A., Alam N., Mandal G., Biswas J., Majumder P., Murmu N. (2017). CDKN2A-p53 mediated antitumor effect of lupeol in head and neck cancer. *Cellular Oncology*.
- Bremer B., Andreasen K., Olsson D., (1995). Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on rbcL sequence data. *Ann. Missouri Botanical Garden*. **82**: 383-397.
- Bremer B. y Eriksson T. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences*. **170**:766-793.
- Bremekamp C. (1966). Remarks on the position, the delimitation and subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerlandica*. **15**: 1-33.

- Cañigueral, S., VilaLa, R. (2005). La Fitoterapia como herramienta terapéutica. *Ginecología y Obstetricia Clínica*, **6**: 43–51.
- Capasso A., Aquino R., Garofalo L., De Simone F., Sorrentino L. (1997). Indole Alkaloids from *Sickingia williamsii* reduce the In-vitro Effects of Morphine Withdrawal in the Guinea-pig. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **49**: 712-714.
- Castañeda P., Albor C., Mata R. (1991) Alkaloids from *Simira mexicana*. *Fitoterapia*, **62**:366.
- Castillo-España P., Monroy-Ortiz C. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 218-219
- Chander M., Kumar K., Shriram A., Vijayachari P. (2015). Anti-leptospiral activities of an endemic plant *Glyptopetalum calocarpum* (Kurz.) Prain used as a medicinal plant by Nicobarese of Andaman and Nicobar Islands. *Natural Product Research*. **29**: 1575-1577.
- Chen D., Su A., Fu Y., Wang X., Lv X., Xu W., Xu S., Wang H., Wu Z. (2015). Harmine blocks herpes simplex virus infection through downregulating cellular NF- $\kappa$ B and MAPK pathways induced by oxidative stress. *Antiviral Research*. **123**: 27-38
- Chen W-H., Liu W.-J., Wang Y., Song X-P., Chen G-Y. (2015). A new naphthoquinone and other antibacterial constituents from the roots of *Xanthium sibiricum*. *Natural Product Research*. **29**: 739-744.
- Chu C., Liu C., Chung M., Chen C. (2015). Biofunctional constituents from *Michelia compressa* var. *lanyuensis* with anti-melanogenic properties. *Molecules*. **20**: 12166-12174.
- Cilla A., Attanzio A., Barbera R., Tesoriere L., Livrea M. (2015). Anti-proliferative effect of main dietary phytosterols and  $\beta$ -cryptoxanthin alone or combined in human colon cancer Caco-2 cells through cytosolic Ca<sup>2+</sup> - and oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Functional Foods*. **12**: 282-293.
- Çulhaoğlu B., Hatipoğlu S., Dönmez A., Topçu G. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada*. *Medicinal Chemistry Research*. **24**: 3831–3837.
- Dang W., Chen J., Zhang N., Wang J., Huang X. (2016) Inhibitory effect and molecular mechanism of loganin on human malignant melanoma cells. *Zhongguo Yiyao Daobao*, **13**: 15-19.
- Delprete P. (2004). *Rubiaceas*. Editado por Smith N., Mori S., Henderson A., Stevenson D., y Helad S. Flowering Plants of the Neotropics, The New York Botanical Garden Published by Princeton University.
- Dinicola S., Fabrizi G., Masiello M., Proietti S., Palombo A., Minini M., Harrath A., Alwasel S., Ricci G., Catizone A., et al. (2016). Inositol induces mesenchymal-epithelial reversion in breast cancer cells through cytoskeleton rearrangement. *Experimental Cell Research*. **345**: 37-50.

- FEUM (2014). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- FHEUM (2013). Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.
- Gong F., Liang Y., Xie P., Chau, F. (2003). Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *Journal of Chromatography A*. **1002**, 25–40.
- González A., Reina M., Lacret R., Nieuwenhuijs-Berbee A., Santana O. (2015). Extract of plant material of the genus *Crocus* with high levels of bio-insecticide activity. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spain; Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete (PCYTA).
- Grover J. y Jachak S. (2015). Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Advances*. **5**: 38892-38905.
- Hersch P. (1997). Medicinal Plants and Regional Traders in Mexico: Physiographic Differences and Conservational Challenge. *Economic Botany*. **51**: 107-120.
- Hwang E., Kim H., Lee S., Kim M., Lee S., Han S., Maeng S. y Park J. (2017). Loganin enhances long-term potentiation and recovers scopolamine-induced learning and memory impairments. *Physiology & Behavior*. **171**: 243-248.
- 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. 13 p.
- Jae-Myung Y., Bo Dam L., Dai-Eun S., Jin Yuel M., Mee Ree K. (2017). Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/ Antioxidant enzyme in neuronal cells. *Redox Biology*. **11**: 592-599.
- Kirana, U., Khanb, S., Mirzaa, K., J., Rama, M., Abdin, M. Z. (2010). SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia* **81** 969–976
- Kushwaha P., Raj V., Singh A., Keshari A., Saraf S., Mandal S., Yadav R., Saha S. 2015. Antidiabetic effects of isolated sterols from *Ficus racemosa* leaves. *RSC Advances*. **5**: 35230-35237.
- León H. y Williams J. (2011). Anatomía de la madera de 31 especies de *Rubiaceae* en Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*. **34**: 347-379.
- Li P., Lu D., Wang P., Liu C., Wang S., Jin L., (2012). Pharmaceutical composition with anti-inflammatory, analgesic and antiviral effects. Faming Zhuanli Shenqing.
- Lim C., Hemaropini S., Gan S., Loo S., Low J., Jong V., Soo H., Leong C., Mai C., Chee C. (2016). *In vitro* cytotoxic activity of isolated compounds from Malaysian *Calophyllum* species. *Medicinal Chemistry Research*. **25**: 1686-1694.
- Li S., Han Q., Qiao C., Song J., Cheng C., Xu H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines an overview. *Chinese Medicine*, **3**, 1-6.

- Liang, X.-M., Jin Yu, Wang Yan-ping, Jin Gao-wa, Fu Qing, Xiao Yuan-sheng. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. **1216**, 2033–2044.
- Liu Z., Cheng Z., He Q., Lin B., Gao P., Li L., Liu Q., Song S. (2016). Secondary metabolites from the flower buds of *Lonicera japonica* and their in vitro anti-diabetic activities. *Fitoterapia*. **110**: 44-51.
- Lorence D. (1999). A nomenclátor of Mexican and Central American Rubiaceae. Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden, **73**: 163. Consultado el 28 de Febrero 2017 desde: <http://www.biodiversitylibrary.org/page/28310326#page/166/mode/1up>
- Lorence D. y Taylor C. (2012). Rubiaceae. Flora Mesoamericana. Vol. 4. Parte 2. Rubiaceae a Verbenaceae. Universidad Nacional Autónoma de México–Instituto de Biología, Missouri Botanical Garden y The Natural History Museum (London), St. Louis. pp. 1–288.
- Maldoni, B. (1991). Alkaloids: Isolation and Purification. *Journal of Chemical Education*. **68**: 700-703.
- Martínez-Cabrera D., Terrazas T., Ochoterena H., Torres-Montúfar A. (2015). Madera y corteza de algunas *Rubiaceae* en México: similitud estructural. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **86**: 59-71.
- Martins D. y Nuñez C. (2015). Review Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*. **20**: 13422-13495.
- Moreira V., Vieira I. y Braz-Filho R. (2014). Chemical Constituents and Biological Activities of *Simira* Genus: A Contribution to the Chemotaxonomic of *Rubiaceae* Family. *The Natural Products Journal*. **4**: 290-298.
- Morita H., Ichihara Y., Takeya K., Watanabe K., Itokawa H., Motidome M. (1989). A New Indole Alkaloid Glycoside from the Leaves of *Palicourea marcgravii*. *Planta medica*, **55**: 288-289.
- Nguyen H., Ho D., Vo H., Hoang T., Kodama T., Ito T., Morita H., Raal A. (2016). The components from aerial parts of *Sarcosperma affinis* Gagnep and their antibacterial activities. *Cogent Chemistry*. **2**: 1254421.
- Nieschulz O. y Schmersahl P. (1968). Choleric agents from *Artemisia abrotanum*. *Arzneimittel-Forschung*, **18**: 1330-6.
- Aimi N., Tsuyuki T., Murakami H., Sakai S., Haginiwa J. (1985) Structure of ophiurines A and B; novel type gluco indole alkaloids isolated from *ophiorrhiza spp*, **26**: 5299-5302.
- Okuyama E., Suzumura K. y Yamazaki M. (1995). Pharmacologically active components of Todopon Puok (*Fagraea racemosa*) a medicinal plant from Borneo. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **43**: 2200

- Organización Mundial de la Salud (**1999**). WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 1. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud (**2000**). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Tradicional Medicine. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud (**2002**). WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 2. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud (**2004**). Consultado en febrero 2017. Desde <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- Organización Mundial de la Salud (**2007a**). WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 3. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud (**2007b**) Guidelines For Assessing Quality Of Herbal Medicines With Reference To Contaminants And Residues Geneve 118 p.
- Organización Mundial de la Salud (**2009**). WHO monographs on selected medicinal plants. Volumen 4. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud (**2013**). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. World Health Organization. Ginebra, Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (**2017a**). Consultado en Febrero 2017. Desde [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
- Organización Mundial de la Salud (**2017b**). Quality control methods for medicinal plant materials, 2011. Consultado en Mayo 2017. Desde <http://apps.who.int/medicinedocs/es/m/abstract/Jh1791e/>
- Patel K., Gadewar M., Tripathi R., Prasad SK. (**2012**). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **2**: 660-664.
- Prieto-González S., Garrido-Garrido G., González-Lavaut J. y Molina-Torres J. (**2004**). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. **35**: 19-36.
- Quintela O., Cruz A., Concheiro M., De Castro A. y López-Rivadulla M. (**2005**). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología*. **22**: 7-14
- Robbrecht E. (**1988**). Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botánica Belgica*. **1**: 1-271.
- Robbrecht E. y Manen C. (**2006**). The major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, Angiosperms). *Systematics and Geography of Plants*. **76**: 85-146.



- Rommelspacher H., May T. y Salewski B. (1994). Harman (1-methyl-/3-carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *European Journal of Pharmacology*. **252**: 51-59.
- Sahoo, N., Manchikantia, P., Dey, S. (2010). Herbald rugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* **81** 462–471.
- Saqib A., Karigar C., Pasha M., Harish M. (2012). Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of palmitic acid derivatives of salicylic acid and anthranilic acid. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*. **2**: 35-38.
- Soares W., Cruz M., Lima dos Santos L. y Trindade M. (2012). Use and importance of quina (*Cinchona* spp.) and ipeca (*Carapichea ipecacuana* (Brot.) L. Andersson): Plants for medicinal use from the 16th century to the present. *Journal of Herbal Medicine*. **2**: 103-112.
- Sharma S. (2012). A study of the interactions of  $\beta$ -carboline alkaloids with DNA oligomers by various analytical methods. Department of Chemistry Faculty of Science Dayalbagh Educational Institute, Dayalbagh, Agra.
- Schumann K. (1891). Rubiaceae. In: Engler, A. & K. Prantl. Die Naturlichen Pflanzenfamilien 4. Leipzig
- Siu A., Cheung J., To C., Chan E., Chan J. y Cheung J. (2001). N-acetylserotonin reduces copper (I) ion-induced lipid peroxidation in bovine retinal homogenates. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. **79**: 69-71.
- Stahl E. (1996). Thin layer chromatography. Academic Press Inc., p. 478
- Steenberg L. (2009). Compressed chewing gum comprising sterol for lowering cholesterol and treating inflammation. Patent Cooperation Treaty, International applications.
- Suwito H., Heffen W., Cahyana H., Priyono W. (2015). Isolation, Transformation, Anticancer, and Apoptosis Activity of Lupeyl Acetate from *Artocarpus integra*. AIP Conference Proceedings, 1718.
- Técnicas cromatográficas,
- The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, (2017). Consultado en Febrero 2017. Desde <http://escop.com/about-us/>
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (2017). Técnicas cromatográficas. Consultado en Mayo de 2017, desde [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)
- Verdcourt B. (1958). Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles*, **28**: 209-281.
- Wang Y., Wang Y., Liu B., Yuan L., Chen J., Bao J., Guo M. (2015a). A new anti-inflammatory triterpenoid saponin from *Penthorum chinense* pursh.



- Wang L., Wang X., Cao H., Qin L. (2015b). Pharmaceutical composition for treatment of osteoporosis and its liposome formulation and preparation method. Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China.
- Wei Y., Ma C., Hattori M., Liang G., Wang Y., Wei L. (2013). Coumarins application and its extraction method from daphne papyracea. Faming Zhuanli Shenqing
- Witaiçenis A., Seito L., da Silveira Chagas A., de Almeida L., Luchini A., Rodrigues-Orsi P., Cestari S., Di Stasi L. (2014). Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*. **21**: 240-246.
- Wolny D., Chodurek E., Dzierzewicz, Z. (2014). Antiproliferative effect of valproic acid and 5,7-dimethoxycoumarin against A2058 human melanoma cells. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. **71**: 1056-1059.
- Xiao W., Tao X., Zhang X., Li Na., Cao L., Wang Z., Ding G. (2016a). Lupenone in the preparation of the prevention and/or treatment of Alzheimer's drugs. Jiangsu Kanion Pharmaceutical.
- Xiao W., Su Z., Cao Z., Li N., Cao L., Wang Z., Ding G., (2016b). Medicine for treating asthma. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Peop. Rep. China.
- Xiao W., Cao Z., Ding Y., Sun L., Cao L., Ding G., Hu H. (2017). Application of lupeol acetate in preparing drugs for preventing and/or treating upper respiratory infection (URI) or in preparing virus and/or bacteria inhibitor. Jiangsu Kanion Pharmaceutical.
- Yang W. y Wang H. (2016). 5,7-Dimethoxycoumarin prevents chronic mild stress induced depression in rats through increase in the expression of heat shock protein-70 and inhibition of monoamine oxidase-A levels. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Yang Z., Zhong N., Li J., Zhou B., Pan X., Guan W., Li Z., Li R., Jiang Z. (2016). Application of  $\beta$  - sitosterol in the manufacture of medicine for the treatment or prevention of influenza A. Faming Zhuanli Shenqing.
- Zan L., Zhaoliang L., Yunwei L., Xiaoming W., Jinyi X., Zhaoliang L., Zhaoqing M., Gang D., Liang C., Na L., Wenjun L., Wei X., Zhaoliang L., Zhaoqing M., GangD., Liang C. (2015). Synthesis and Biological Evaluation of Strictosamide Derivatives with Improved Antiviral and Antiproliferative Activities. *Chemical biology & drug design*. **86**:523-530
- 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**, 140–146.
- Zebiri I. Haddad M., Duca L., Sauvain M., Paloque L. Cabanillas B., Rengifo E., Behr J., Voutquenne-Nazabadioko L. (2016). Biological activities of triterpenoids from *Poraqueiba sericea* stems. *Natural Product Research*.

- Zhu F., Ye J., Chen J., Zhai X., Jia X. (2016). The application of Strictosamide in the preparation of anti-inflammatory drugs. Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Peop. Rep. China.
- Zhu F., Chen J., Wang H., Jia X., Wang S., Zhang Z., Zhai X., Xu J., Tan W., Ning Q., Gu J. (2015). Analysis of the chemical constituents and rats metabolites after oral administration of *Nauclea officinalis* by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. **1007**: 54.56.

ANEXO 1

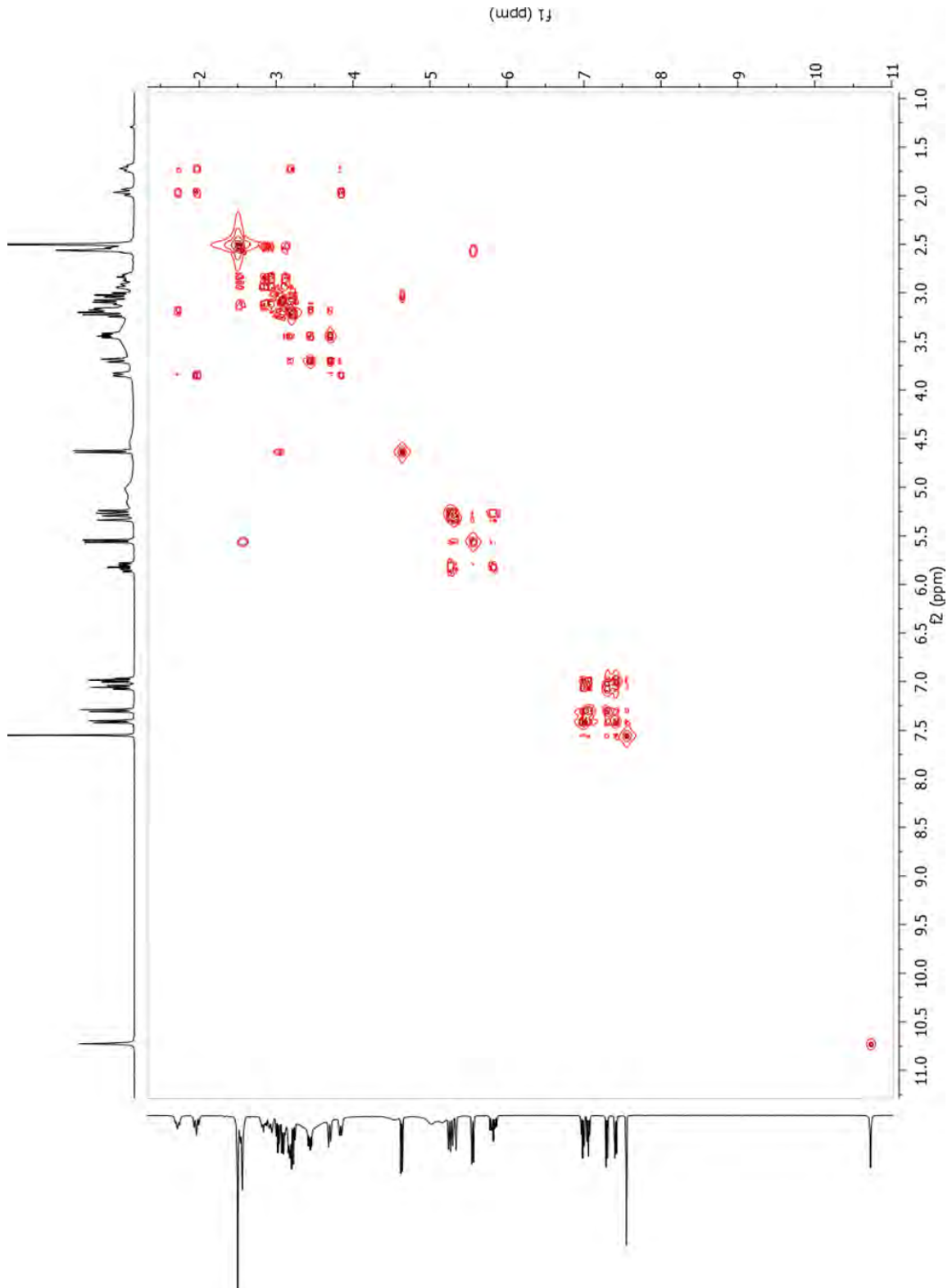
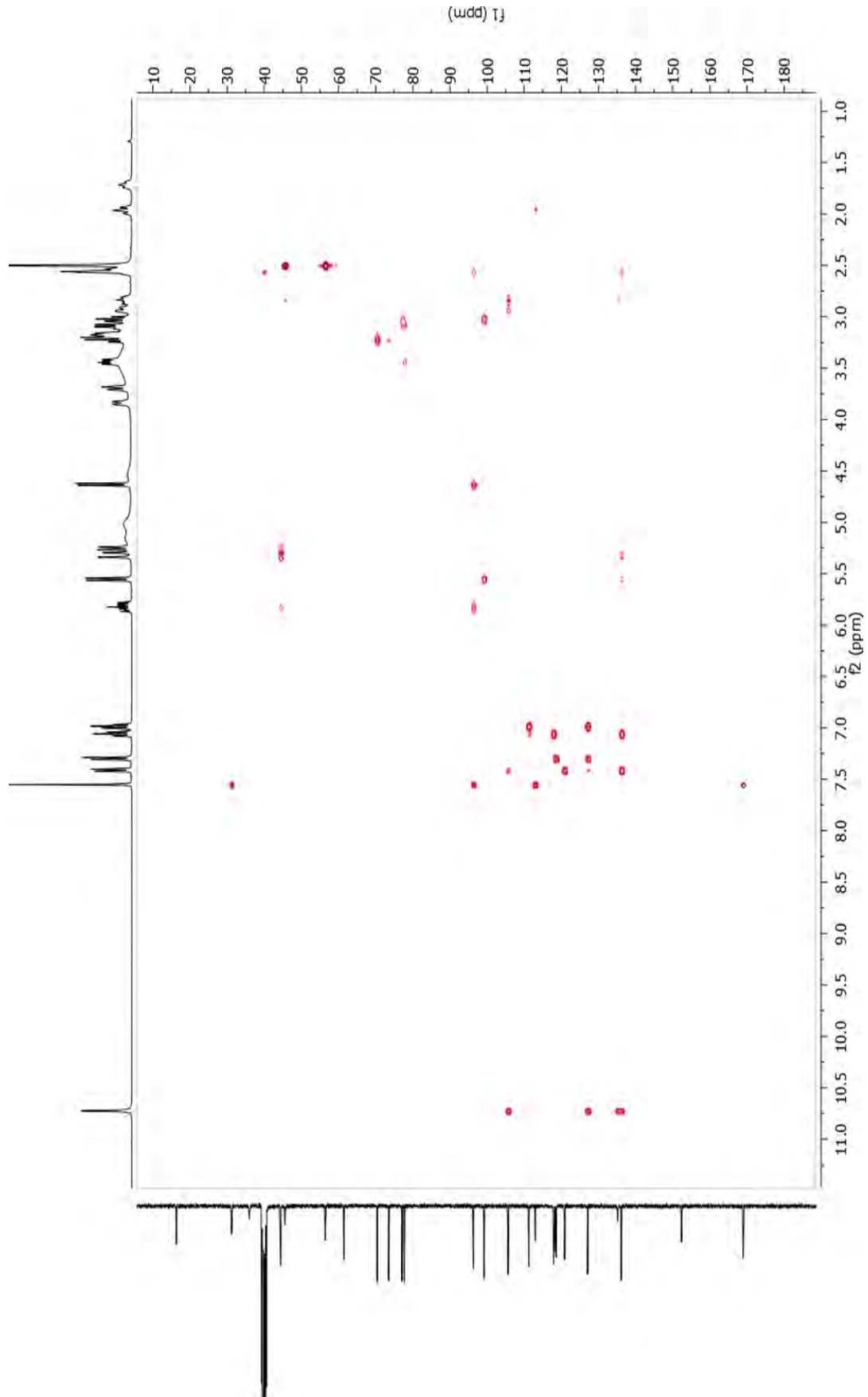


Figura 22. Espectro COSY del compuesto 1.



**Figura 23.** Espectro HMBC del compuesto 1.

ANEXO 2

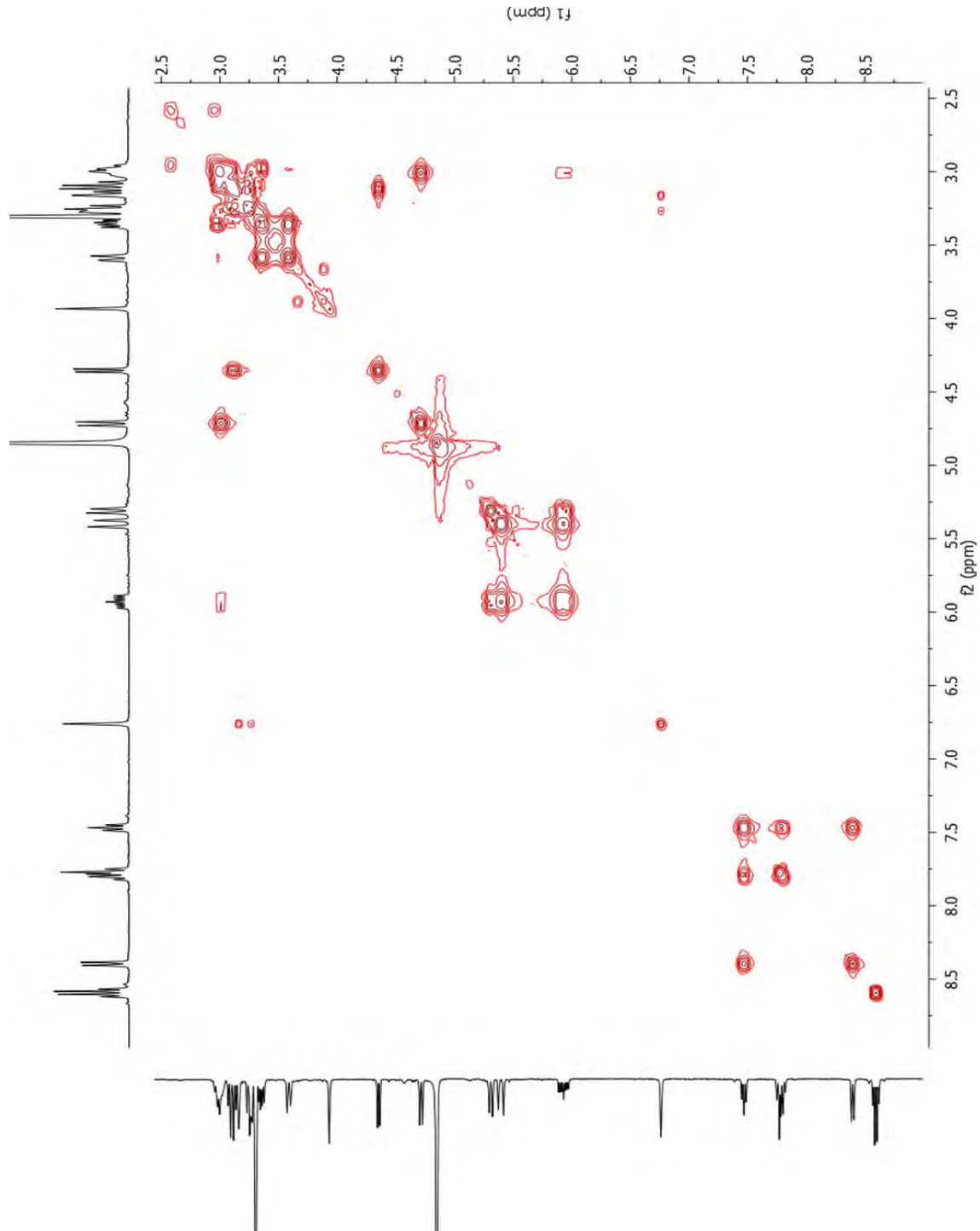


Figura 24. Espectro COSY del compuesto 4.

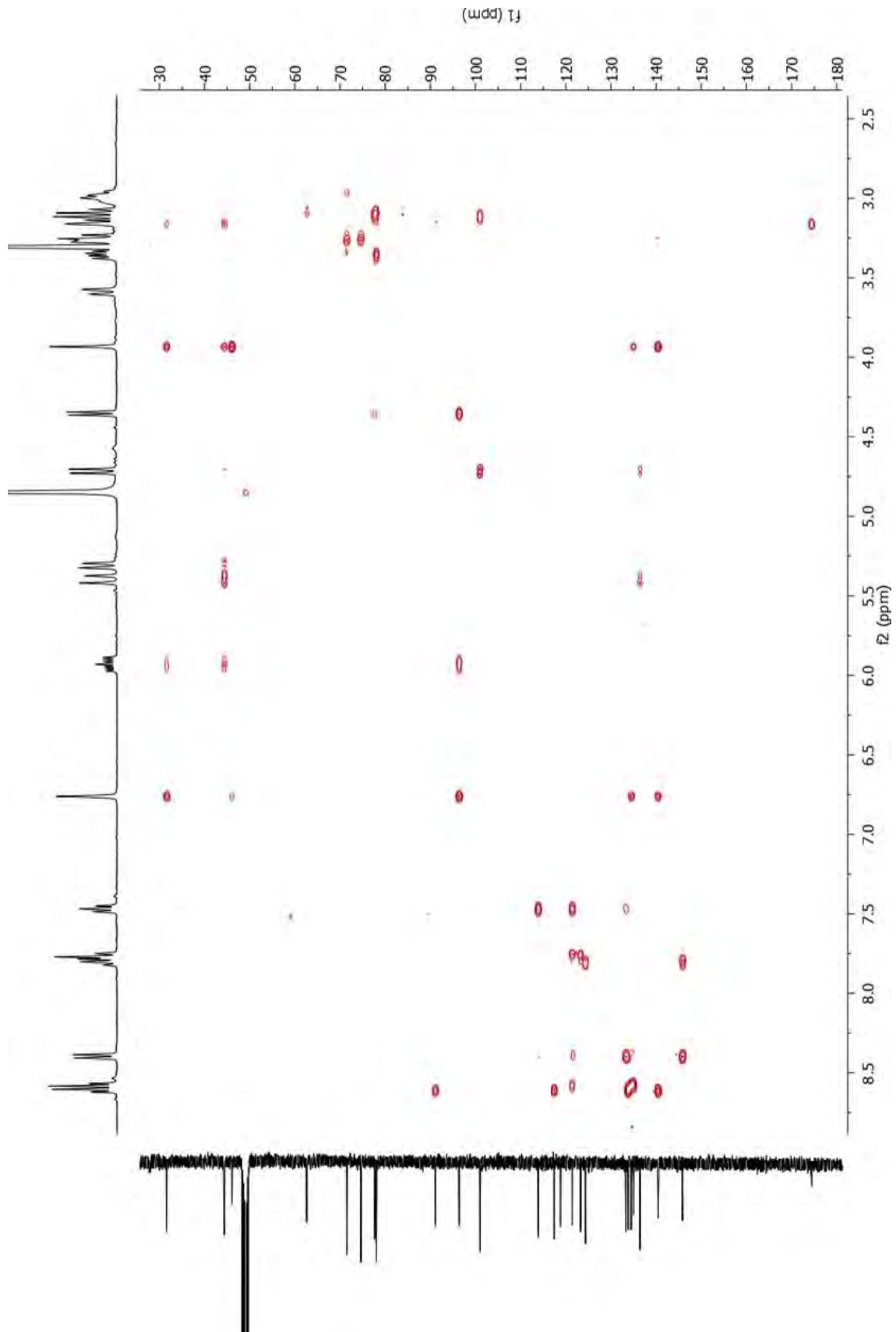


Figura 25. Espectro HMBC del compuesto 4.

ANEXO 3

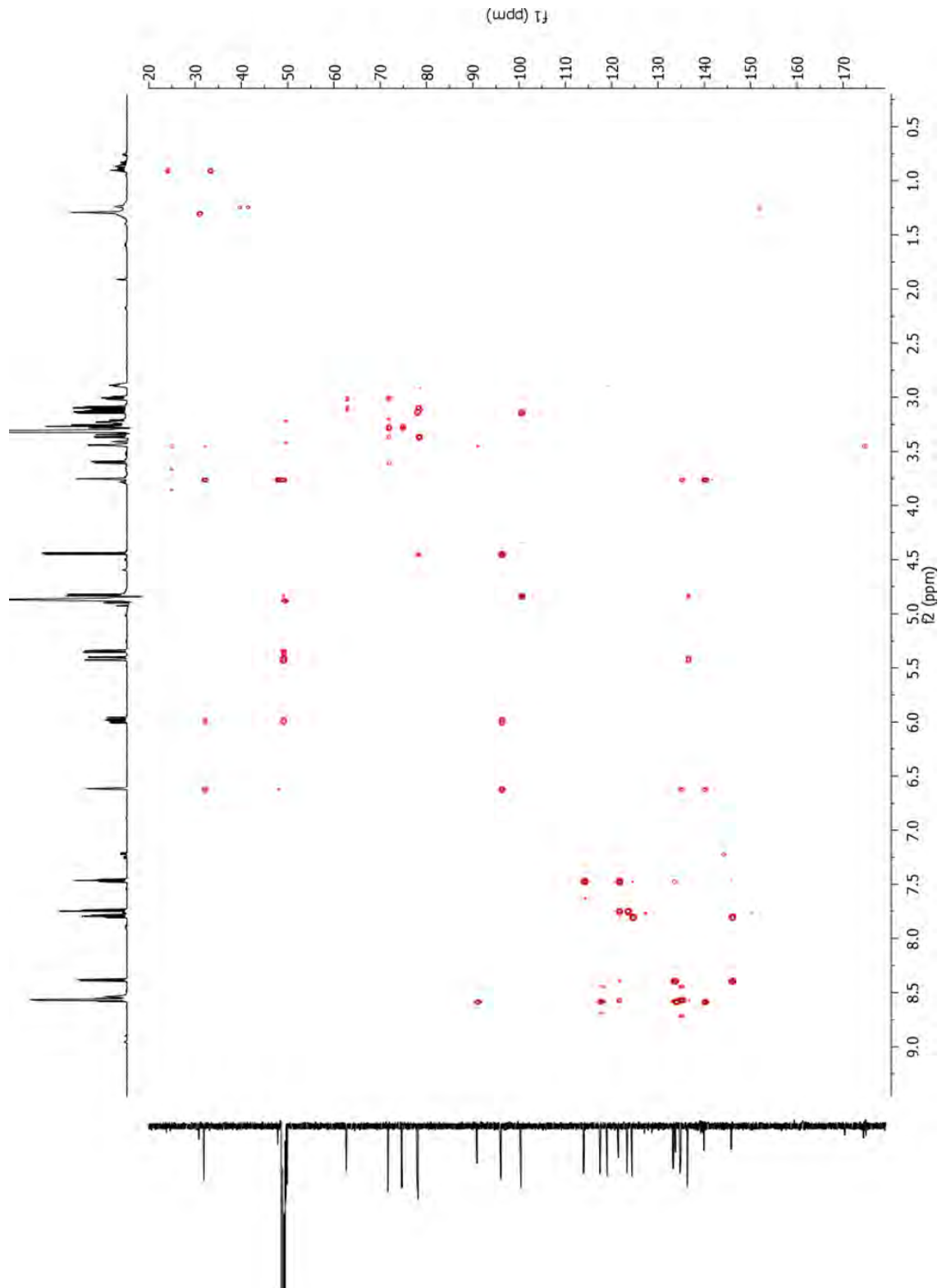


Figura 26. Espectro HMBC del compuesto 3

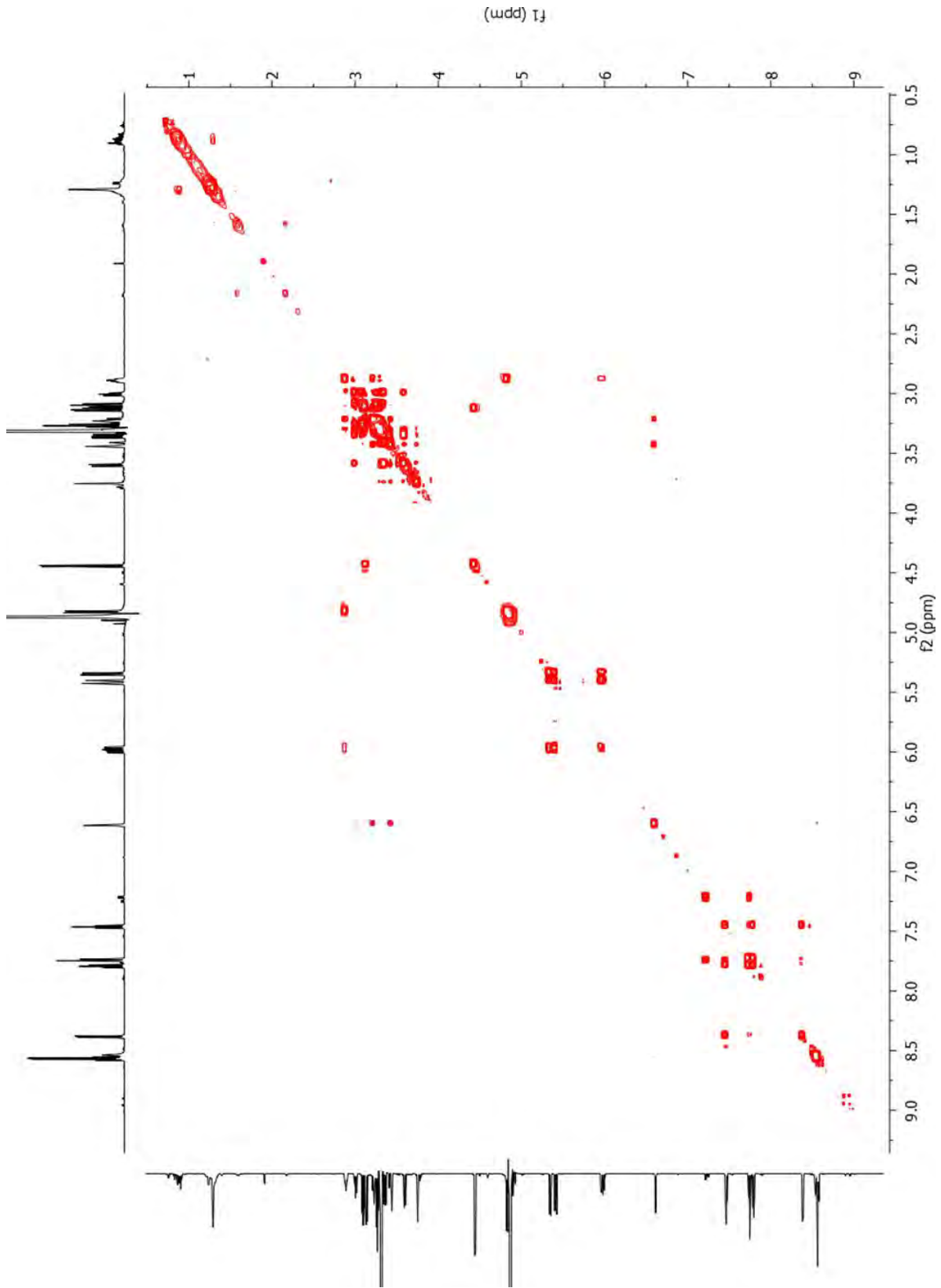


Figura 27. Espectro COSY del compuesto 3.



ANEXO 4

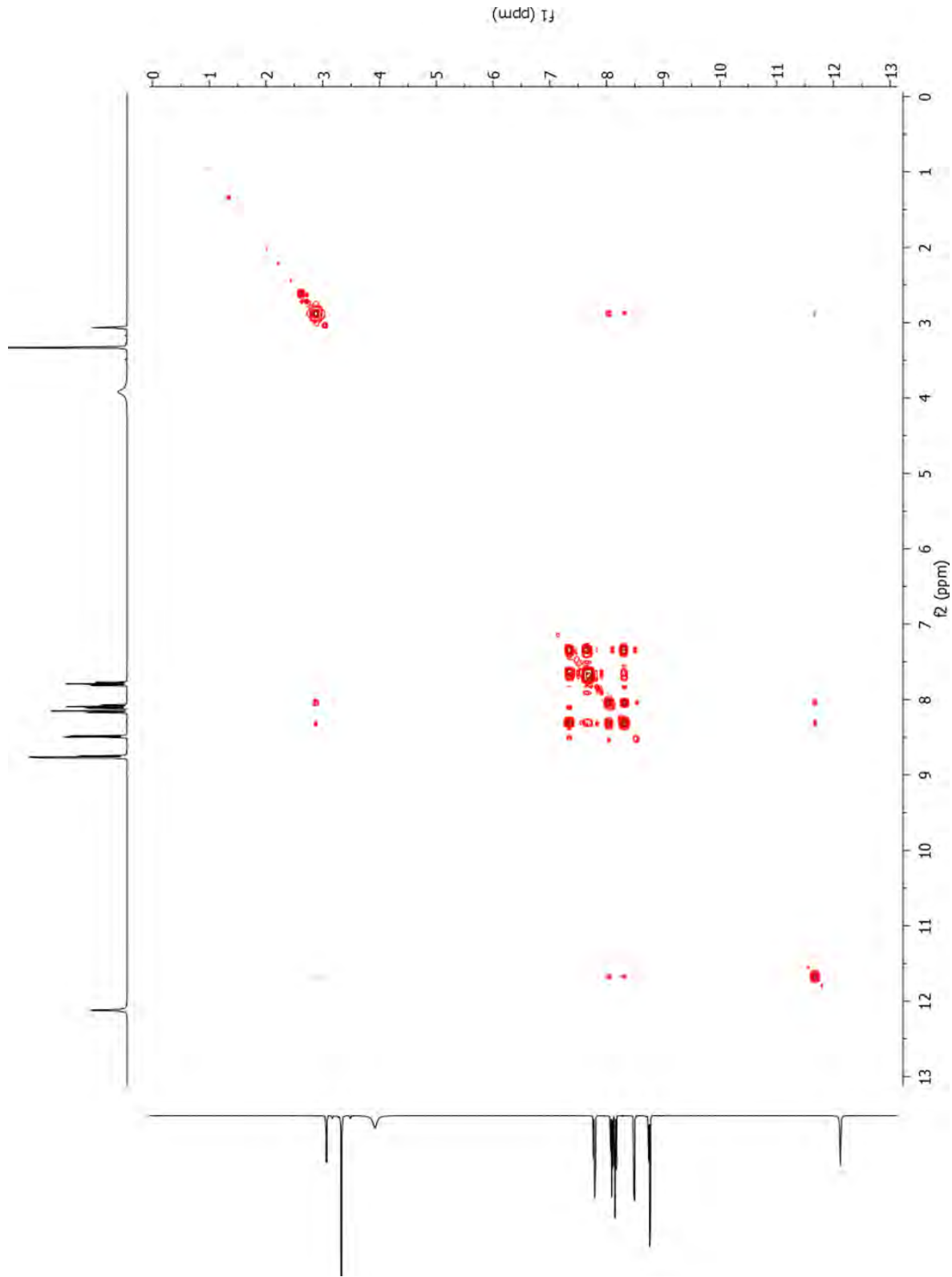


Figura 28. Espectro COSY del compuesto 2.

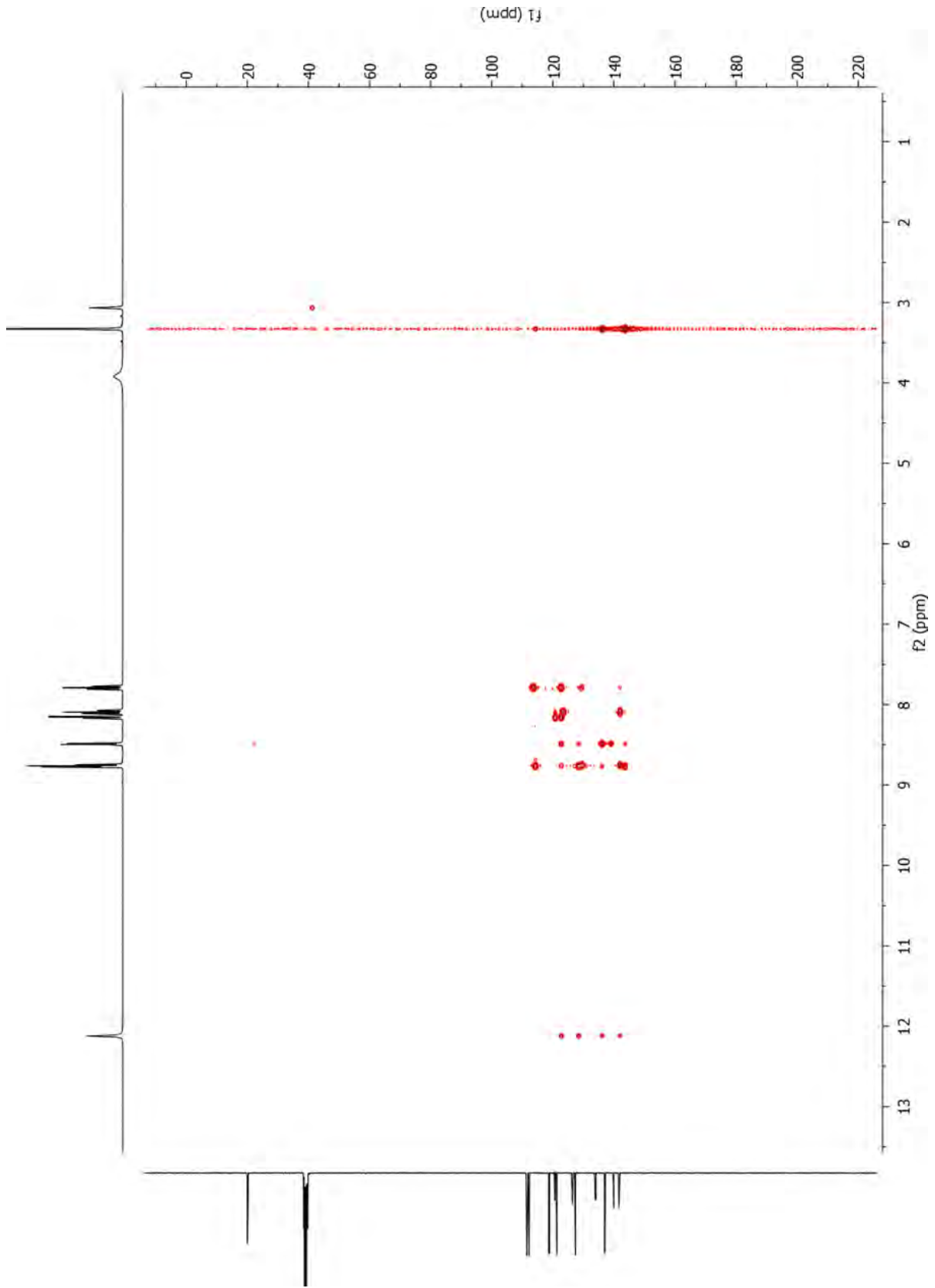


Figura 29. Espectro HMBC del compuesto 2.