

005772ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
POSGRADO EN QUIMICA ANALITICA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
QUIMICAS (QUIMICA ANALITICA)

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA ANALITICA PARA LA
CUANTIFICACION DE KAURENOIDES EN MONTANOA
TOMENTOSA (ZOAPATLE)

DIRECCION DE TESIS

DIRECTOR DE TESIS : DR. RAUL ENRIQUEZ HABIB
ASESOR : ING. FERNANDO JAUREGUI ZAVALA

ALUMNO:

QFI ELIAS MIRANDA GONZALEZ

REALIZADA EN:

LAB. 1-5 INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

263889

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

ING. LEPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de la Administración Escolar
Presente.

AT'N: Lic. Antonio Díaz García
Jefe de la Unidad de Registro e Información

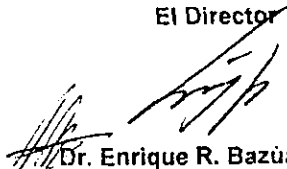
Me es grato informarle que el alumno **QFI. ELIAS MIRANDA GONZALEZ** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas (Química Analítica) ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dra. Ofelia Espejo González
Primer Vocal	M. en C. Santiago Capella Vizcaino
Secretario:	Dra. evangelina Camacho Frías (IQ)
Primer Suplente:	Dra. Luz Elena Vera Avila
Segundo Suplente:	Dra. Araceli Peña Alvarez

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 3 de noviembre de 1997.

El Director


Dr. Enrique R. Bazúa Rueda

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
*ggm.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a todos los maestros y profesores que contribuyeron o que actualmente lo hacen a fomentar mi crecimiento intelectual y personal. En especial a aquellos que su imagen se quedo en mi pasado, pero que sus enseñanzas y actitud positiva permanecen vigentes en mi memoria. Por ellos hago un voto de compromiso, que el grado que aspiro obtener se convierta en un grado de humildad y capacidad para enfrentar problemas y resolverlos con los elementos adquiridos en esta etapa. Y no se convierta como en algunos casos en un titulo equivalente al nobiliario que me permita ostentar un grado de soberbia y prepotencia que obstaculicen el avance y crecimiento de las nuevas generaciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl Enríquez Habib por su apoyo, consejo y enseñanzas que amablemente me brindo durante el transcurso de la tesis.

Al Ing. Fernando Jauregui Zavala por su asesoría y apoyo recibidos y en especial por que lo considero un símbolo y ejemplo de un buen maestro y servidor público.

A mis amigos Julia, Raúl, Claudia, Carlos, Virginia, Mario, Ismael y Enrique que contribuyeron a fomentar un ambiente de cooperación y camaradería que hizo muy grata mi estancia en el laboratorio.

A mi madre ejemplo de esfuerzo y cumplimiento incondicional al trabajo.

A mi esposa Minerva que me apoya y estimula incondicionalmente.

A CONACYT por el apoyo recibido para lograr este objetivo.

A DGAPA por el apoyo de insumos requeridos.

A todos mis familiares y amigos que me alentaron.

INDICE

ABSTRACT

CAPITULO I

PAG.

INTRODUCCION

- | | |
|---|---|
| 1.1.-Generalidades sobre el Zoapatle (<i>Montanoa tomenosa</i>) | 1 |
| 1.2.- Antecedentes de uso prehispánico, colonial y actual | 3 |
| 1.3.- Antecedentes de estudio químico y biológico | 5 |

CAPITULO II

METABOLITOS SECUNDARIOS

- | | |
|---|----|
| 2.1.- Aspectos Generales | 8 |
| 2.2.- Origen de los metabolitos secundarios | 9 |
| 2.3.- El grupo de los diterpenos | 9 |
| 2.4.- Generalidades de los kaurenoides | 14 |

CAPITULO III

METODOLOGIA ANALITICA APLICABLE AL ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

- | | |
|--------------------------|----|
| 3.1.- Historia | 16 |
| 3.2.- Situación actual | 17 |
| 3.3.- Metodología viable | 19 |

CAPITULO IV

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

	PAG.
4.1.- Descripción	23
4.2.- Antecedentes de metodología	23
4.3.- Objetivos	25

CAPITULO V

PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- Condiciones generales	26
5.2.- Obtención de estándares	26
5.3.- Optimización de condiciones para la separación en cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG/DIF ó GC/FID).	38
5.4.- Optimización y evaluación de la cromatografía de capa delgada (CCD)	40
5.5.- Extrapolación de cromatografía en capa fina a extracción en fase sólida (fase normal)	41
5.5.1.- Optimización de la extracción en fase sólida (Fase normal).	41
5.5.2.-Evaluación de la eficiencia de extracción mediante extracción en fase sólida (fase normal)	42
5.6.- Curvas de calibración	44
5.6.1.- Preparación de curvas de calibración y selección de un estándar interno	45
5.6.1.1.- Curvas de calibración sin estándar interno	47
5.6.1.2.- Curvas de calibración con estándar interno	49
5.6.1.3.- Comparación de resultados con y sin estándar interno	51
5.6.2.- Curva de calibración en modo "SPLIT".	53

	PAG.
5.6.2.1.- Curvas de calibración con estándar interno empleando el modo "split"	54
5.7.- Cuantificaciones de kaurenoides en hoja, raíz y flor	56
5.7.1.- Optimización del tiempo de secado	56
5.7.2.- Cantidad óptima de matriz	56
5.7.3.- Volumen óptimo de extracción	57
5.7.4.- Optimización del proceso de extracción en fase sólida	58
5.7.5.- Evaluación de resultados globales	59
5.8.- Estudio aleatorio del contenido de kaurenos en cuatro individuos de zoapatle de Ciudad Universitaria	61
5.9.- Determinación de kaurenos en infusiones acuosas	62
5.9.1.- Evaluación de la extracción líquido-líquido para infusiones acuosas (té)	62
5.9.2.- Optimización de EFS (Fase reversa)	64
5.9.3.- Evaluación de la eficiencia de extracción mediante extracción en fase sólida (fase reversa)	65
5.9.4.- Comparación estadística entre ambos métodos	67

CAPITULO VI

DISCUSION DE RESULTADOS	70
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	75

ABSTRACT

The diterpenic monoginoic, kaurenoic and grandiflorenic acids are a family of compounds which are characteristic to *Montanoa tomentosa*, popularly known as "zoapatle". The latter is known as an ancient Mexican herbal resource for inducing abortion or as an aid in birth labor. These diterpenes have been associated to the uterotropic effect of the infusion prepared ethnobotanically with the leaves. The analytical determination of such diterpenes in infusions has been the subject of conflicting reports in the past, using different extractive procedures. This work describes a rapid methodology for the accurate qualitative and quantitative detection of the title compounds which involves an efficient use of a solid phase extraction with either normal phase or C18 reversed phase. Furthermore, The derivatization with BSTFA:TMCS allowed rapid detection and quantification of the mentioned compounds. The use of internal reference with a similar pure natural derivative demonstrated a linear response which allows detection limits down to ppb (ng/ml) levels. The method is robust enough as to be used with both organic extracts and water infusions. The necessary amount of plant material (root, leaves and flowers) for accurate determinations was found to fall in the range 50-100 mg. A significant contribution of the present analytical approach can be expected on the basis that it can be easily adapted for studying other complex mixtures of natural products.

RESUMEN

Los ácidos kaurenoico, monoginoico y grandiflorénico son una familia perteneciente al grupo de los diterpenos los cuales son característicos de *Montanoa tomentosa*, popularmente conocida como “zoapatle”. Los antecedentes históricos se remontan a su uso en la época prehispánica y se ha usado empíricamente hasta la fecha para facilitar las labores de parto y como abortivo. Los diterpenos mencionados han sido asociados al efecto uterotónico de la infusión preparada tradicionalmente con las hojas. Su determinación en infusiones para ratificar su existencia, ha sido el objeto de discusión en varios artículos empleando diversas metodologías. Este trabajo describe una metodología rápida para la detección precisa cualitativa y cuantitativa de los compuestos referidos, lo cual involucra un uso eficiente de la extracción en fase sólida en fase normal y en otros casos en fase reversa usando cartuchos C18. Además la derivación con BSTFA:TMCS permitió una rápida y adecuada detección de los compuestos. El uso de un estándar interno con características estructurales similares mostró una respuesta lineal que permitió límites de detección del orden de ppb (ng/ml) . La metodología es robusta para ser empleada con matrices orgánicas e infusiones acuosas. La cantidad necesaria de material vegetal (raíz, hojas y flores) para cuantificarlos es del orden de 50 a 100 mg. La metodología demostró ser reproducible y puede ser fácilmente adaptada para compuestos similares. La extrapolación de esta metodología al estudio de otros metabolitos puede representar una contribución significativa a los enfoques analíticos para el estudio de otras mezclas complejas de productos naturales.

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

1.1.-GENERALIDADES SOBRE EL ZOAPATLE (*Montanoa tomentosa*)

El “ zoapatle “ (*Montanoa Tomentosa*) nombre derivado de cihuapatli (del náhuatl, cihuatl = mujer y patli = remedio) , medicina o remedio para la mujer ha sido una planta de suma importancia en nuestro país, cuyos antecedentes históricos se remontan a su uso en la época prehispánica.

Es un arbusto muy ramoso de 1.5 metros que ocasionalmente alcanza tres metros de altura, las ramas jóvenes son pubescentes por el haz y tomentosas por el envés. Sus hojas son más anchas en la parte que se une al tallo y más angostas en la punta, más o menos triangulares con base acorazonada, opuestas, pecioladas, enteras, aromáticas si se estrujan, poco partidas, ápice aguzado y bordes dentados o lobulados, tiene sus flores colocadas como un ramo en la parte terminal. las flores más pequeñas son de color amarillo y las más grandes de amarillentas a blancas, dispuestas en capítulo con pedúnculo pubescente, agrupados en densas panículas. Los frutos son aquenios comprimidos, negruzcos, sin vilano. Florece después de las lluvias.

Desde el punto de vista taxonómico es una planta compuesta perteneciente al género *Montanoa* que incluye más de 25 especies , 21 de las cuales se pueden encontrar en la República Mexicana (1). Aparentemente, un número indeterminado de especies y subespecies del género *Montanoa* han sido usadas bajo el nombre de zoapatle (1).

Planta originaria de México, habita en clima semicálido y templado, entre los 1240 y hasta los 3900 m sobre nivel del mar. Arbusto asociado a matorral xerófilo, pastizal inducido, bosques de encino, de pino, mixto de encino-pino y bosque de juniperos

Es nativo de México, crece en Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, El valle de México, Veracruz y Oaxaca.

Desde tiempo inmemorial, miles y miles de comadronas han usado empíricamente las hojas de este arbusto para ayudar a parir a millones de mujeres. En la actualidad es muy

común su empleo en la terapéutica de malestares propios de la mujer especialmente en varios estados del centro del país.

El zoapatle se ha empleado tradicionalmente para facilitar el parto. Estudios hechos con animales indican que el extracto de la planta efectivamente aumenta la fuerza y la frecuencia de las contracciones uterinas. Al parecer no sólo actúa sobre la matriz, sino que produce cambios en el nivel de progesterona, por lo que podría resultar en un buen anticonceptivo y emenagogo.

En la actualidad destaca su utilidad, ya sea para inducir, acelerar o facilitar el parto; aunque con frecuencia es usada como abortivo. Por lo general se ingiere el cocimiento de las hojas, ocasionalmente junto con la raíz o se prepara con canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y chocolate, para beberlo en el momento en que empiezan las contracciones o en caso de partos difíciles. Cuando se requiere abortar se prepara junto con raíz de maíz (*Zea mays*) y las hojas de manzano (sp n/r) endulzado con piloncillo y se ingiere. En otras ocasiones se emplea posterior al parto, con el objeto de limpiar la matriz y expulsar completamente la placenta, se prepara el té agregando las hojas o ramas de ruda (*Ruta sp.*), bretónica (sp. n/r) y epazote (*Chenopodium sp.*), el cual se puede endulzar con chocolate o piloncillo y tomarlo antes y después del parto (2).

Las parteras tradicionales señalan que, en muchas ocasiones, la mujer puede llegar al término de su embarazo y no sentir los síntomas que anuncian el parto, si ello ocurre y la parturienta no ha llevado control de la fecha probable del parto, puede suceder que se “pase” y muera el producto en el vientre materno. Si por el contrario, se advierte que el embarazo está a término sin contracciones ni dilatación, la partera proporciona a la madre un baño caliente, especialmente en temazcal, entonces administra el cihuapatli u otro oxitócico, a veces acompañado de chocolate.

Asimismo, se usa para tratar trastornos menstruales (facilitando el flujo, normalizando el ciclo como estimulante emenagogo), se bebe en ayunas el cocimiento concentrado de las hojas, durante tres días y como agua de uso en caso de menstruación atrasada. Para cólicos menstruales o “dolores intuerfos”, la infusión se hace con las yemas foliares.

También le atribuyen otros usos medicinales como el de aumentar la secreción de leche y en baños para después del parto, contra el reumatismo y la “flojera”. Se le considera como un eficaz, pero peligroso abortivo.

1.2.- ANTECEDENTES DE USO PREHISPANICO, COLONIAL Y ACTUAL

En la época prehispánica se contaba con formas avanzadas de gobierno, ciudades bien planificadas, un sistema de numeración y de escritura basado en pictogramas y un alto nivel de conocimientos matemáticos, astronómicos, arquitectónicos y médicos, agregándose a estos últimos una larga tradición herbolaria.

En consonancia con el interés y la sensibilidad que siempre habían demostrado los pueblos náhuas hacia las plantas, los emperadores aztecas patrocinaban el estudio de todos los aspectos de la flora de los territorios que iban conquistando e incluso de los que quedaban fuera de su hegemonía. Mandaban emisarios a todos los rincones de su imperio con el encargo de recoger plantas raras y valiosas, y con ellas crearon verdaderos jardines botánicos en los que se experimentaba con nuevos remedios y los jardineros probaban nuevas variedades. Incluso los artesanos reproducían las especies más llamativas en los frescos que adornaban los muros de los palacios y en los códices, donde se llevaba el registro de todo acontecimiento notable.

A la caída de Tenochtitlan, algunos de los jardines botánicos aztecas se salvaron de la destrucción gracias a la admiración que despertaron en los conquistadores.

Si bien los españoles procuraron conservar un inventario botánico del nuevo mundo, lucharon en cambio por abolir los mitos y las prácticas mágicas y religiosas asociadas a la herbolaria indígena por considerarlos “cosa de brujería”. Aunque gran parte de la tradición prehispánica escrita desapareció en las hogueras de la inquisición, algo llegó a conservarse gracias a las compilaciones enciclopédicas que sobre los usos y las costumbres de estas tierras escribieron unos cuantos misioneros del siglo XVI, ayudados por indígenas que aprendieron a leer y escribir en español e incluso en latín. El resultado de ese esfuerzo constituye la principal fuente de información que hoy se tiene sobre la cultura prehispánica.

El zoapatle es una de las tantas plantas cuyo uso medicinal se describe en varios de los documentos y crónicas de la época, a continuación citaremos algunos de ellos.

En el Códice Badiano (3), recetario náhuatl del siglo XVI recopilado por Martín de la Cruz, el autor se refiere así a una práctica de este tipo en la que se mezclan elementos medicinales y mágicos: “ Cuando una mujer tiene dificultad para eliminar el feto o para parir, beba un medicamento hecho de corteza del árbol cuauhaláhuac (*Heliocarpus terebinthinaceus*) y de la hierba cihuapachtli, molidas en agua, con una piedra que se llama éztetl (variedad de cuarzo con vetas rojas) y la cola de un animalillo que se llama tlacuatzin (tlacuache). Quémense pelos y huesos de mono, hiel de liebre y cebollas desecadas al sol. Se agrega a todo esto sal, un fruto que llamamos nochtli (tuna) y octli (pulque) “.

Fray Bernardino de Sahagún hace una descripción de las propiedades que se le atribuían a esta planta (4) , Un pequeño fragmento del mismo dice:

“ Las hojas de esta mata son provechosas, cocidas con agua, bien hervidas; la mujer preñada que ya está para parir bebe esta agua para parir bien, sin pena , luego le sale sangre y es señal de que ya quiere salir la criatura: bebe otra poca y con esto nace la criatura.”

El códice Florentino en el siglo XVI, la refiere para facilitar el parto y para las “cámaras” (diarreas) de sangre (5).

Francisco Hernández (protomédico y emisario de Felipe II), unos años después, describe a la planta como “ caliente y seca en tercer grado, administrada a las parturientas con muy buen resultado, para que den a luz más fácilmente, así también aprovecha el pecho, mitigan la hinchazón del vientre, curan las hidropesía, provocan la orina y las reglas “(6).

A finales del mismo siglo, las relaciones geográficas mencionan que “ bebida les hace luego parir y hechar las pares y ayuda a limpiarlas presto “.

En la segunda década del siglo XVII , Francisco Ximenes , describe a la planta como “medicina de las mujeres porque cura las pasiones de la madre. Es útil y conviene admirablemente para **provocar la regla a las mujeres**, por lo cual se le puso este nombre (por lo anterior hay bases para suponer que pudo ser utilizado como terminador temprano

del embarazo). Además resuelve admirablemente los humores, aunque estén embebidos en las juntas o en los nervios y quitando toda causa alivian cualesquiera dolores “.

A finales del siglo XVII, Vicente Cervantes refiere de la planta que es estomática, diurética y pectoral. Además retoma la información proporcionada por Hernández; y advierte que sólo debe usarse "en los partos perezosos, cuando estos no dependen de una mala posición de la criatura" (2).

Años después en el siglo XIX , la Sociedad Mexicana de Historia Natural la reporta como ocitócica, antitumoral, diurética, emenagoga , galactógena, tóxica y para las enfermedades de la madre . Francisco Flores relata la mezcla de plantas y la raíz de cihuapatli en maceración o cocimiento para combatir las hemorragias. Además indica su uso para los tumores del abdomen, para la disenteria y como diurético. En forma de cataplasma con otras yerbas sobre el vientre y la vulva para que **regrese el flujo menstrual**. Para facilitar el parto y aumentar la leche, teniendo como indicación esencial y sólo entonces lo daban, los partos perezosos. A Finales de este siglo, el Instituto Médico Nacional la describe como hemostático, uterino, oxitócico, digitalico, vasoconstrictor, bradicardia y para la parestesia intestinal.

En el siglo XX. Alfonso Herrera refiere su uso para provocar las contracciones uterinas. Maximino Martínez (7) la reporta como antiespasmódica, para fibromiomatosis uterina, como galactógena, hemostática uterina, oxitócica, síndrome ginecológico de pozzi y uterotrópico. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la describe como diurética, emenagoga y oxitócica (2).

1.3.- ANTECEDENTES DE ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO

Altamirano (8) y Cota (9) realizaron el primer reporte de la extracción y del ensayo biológico del zoapatle. En estudios posteriores (10,11,12) , se trató de corroborar los efectos terapéuticos atribuidos a esta planta sin lograr este propósito, debido principalmente al problema inherente que conlleva la dosificación de un extracto y la selección de un vehículo apropiado.

Años más tarde, continuaron los trabajos sobre el zoapatle; Caballero y Walls (13) reportaron en 1970 el aislamiento de sustancias puras a partir de la extracción de la raíz;

Calderón y cols.(14) llevaron a cabo registros miográficos de los efectos de la infusión acuosa del zoapatle sobre la actividad uterina del conejo, observando que el extracto acuoso de zoapatle producía efectos de tipo oxitócico.

Algo que hay que considerar es que en los trabajos anteriores no se indica el estado hormonal de la hembra utilizada, ni las condiciones empleadas para realizar el bioensayo.

A este respecto, Landgren (15), Gallegos (16) y Bejar (17) empiezan a considerar el estado hormonal y la especie animal para la realización de bioensayos con extractos acuosos y con compuestos puros aislados de esta planta. La preparación de los extractos acuosos empleados en los bioensayos mencionados fue realizada en la manera tradicional en que se prepara la infusión y los compuestos puros fueron ensayados disueltos en un disolvente orgánico.

En lo referente al aislamiento de sustancias químicas específicas se han aislado más de 40 compuestos químicos de plantas pertenecientes al género *Montanoa*, habiendo pasado pocos de ellos por una evaluación farmacológica. Así. En 1979 se aislaron independientemente (18,19) zoapatanol y montanol de las hojas; posteriormente, se ensayó la actividad biológica de estos compuestos en mujeres embarazadas con producto fetal muerto encontrándose que en algunos casos la administración oral de estos compuestos producía la expulsión de los productos. Al principio de la década de los ochentas fue reconocida la actividad uterotónica (20) (21) (22) de un compuesto aislado de *Montanoa tomentosa* conocido como ácido grandiflorénico o kauradienoico (23) llevándose a cabo el bioensayo de esta sustancia sobre útero de cobayo en condiciones *in vivo e in vitro*.

Otro compuesto aislado del zoapatle es el denominado leucantanólido (24), el cual fue ensayado sobre un modelo experimental animal, administrando por vía intraperitoneal el compuesto a cobayas embarazadas observándose que en algunos casos hay expulsión del producto y en otros, reabsorción del mismo.

En varias ocasiones se ha observado que los resultados farmacológicos no han sido reproducibles; algunas veces el efecto no es consistente e incluso se ha observado relajación uterina (25) (26) (27) (28) (29). Todo lo anterior denota que el problema de reproducibilidad esta sujeto a muchos más factores que los considerados.

Debido a la controversia que existe entre la asociación de actividad farmacológica con las estructuras químicas encontradas hasta ahora, es posible suponer que son varios los factores que influyen en la manifestación o ausencia de efectos farmacológicos, entre estos destacan:

- a) especie de planta adecuada
- b) estado de desarrollo de la misma
- c) especie y estado hormonal del individuo que se somete al estudio farmacológico.
- d) procedimientos de extracción del o los metabolitos a evaluar
- e) vía de administración
- f) dosificación
- g) selección de un vehículo adecuado

Como se puede observar, algunos de estos factores podrían ser evidenciados de una manera más eficiente de contarse con una metodología analítica apropiada que permita cuantificar dichos metabolitos secundarios en diferentes matrices. Con objeto de abordar este problema se han desarrollado propuestas de metodología viable, las cuales serán abordadas y descritas en el capítulo IV. Además constituyó la base para desarrollar una metodología apropiada para estudiar cuantitativamente los tres metabolitos secundarios mencionados y ello es el objetivo principal del presente trabajo..

CAPÍTULO II

METABOLITOS SECUNDARIOS

2.1.- ASPECTOS GENERALES

Algunas rutas metabólicas básicas de las plantas parecen ser similares a las de los animales, mientras que otras parecen tener un ámbito más restringido. A los productos secundarios de las plantas (como a los que no están necesariamente relacionados con el metabolismo esencial de la célula) es a los que la mayoría de las drogas vegetales deben su actividad terapéutica.

Muchos de estos metabolitos son los responsables de olores característicos, causticidad y colores de las plantas; otros proporcionan a la planta sus virtudes culinarias, medicinales o tóxicas. Y por otra parte una gran cantidad de estos compuestos poseen una función desconocida dentro de la fisiología vegetal.

Aunque diversos grupos biogénéticos están caracterizados por determinadas estructuras, las propiedades químicas propiamente dichas de ciertos compuestos se determinan por la presencia de grupos funcionales. Así, los terpenos puede presentarse como alcoholes (mentol), éteres (cineol), cetonas (carvona), etc. y como tales poseen propiedades químicas similares a las de compuestos no terpenoides que tienen el mismo grupo: los aldehídos a título de ejemplo de grupo funcional, pueden ser de origen alifático (citronelal), aromático (aldehído cinámico), esteroide (algunos heterósidos cardioactivos), y debido a la introducción de un sistema heterocíclico, un grupo biogénético puede poseer algunas de las propiedades químicas de otros (como los alcaloides esteroidales).

Un determinado grupo de compuestos puede también reunir entidades biogénéticas diferentes; así, los complejos de alcaloides indólicos contienen fracciones moleculares derivadas tanto de la ruta de Shikimato como de la Isoprenoide. Por el contrario la misma estructura, como ocurre con diversos compuestos, puede proceder de rutas metabólicas distintas (30).

2.2.- ORIGEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Las rutas metabólicas básicas constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dando lugar a una amplia serie de compuestos (figura 1) Su producción está vinculada a los ciclos metabólicos fundamentales de los tejidos vivos. La información genética requerida para la manufactura de metabolitos secundarios está también presente en las células indiferenciadas de las especies en cuestión, y cuando son activadas darán lugar a la producción de dichos metabolitos. Este aspecto del cultivo de células ha despertado mucho interés, debido al deseo de lograr el crecimiento de determinadas células vegetales en escala comercial para la producción de metabolitos apreciados

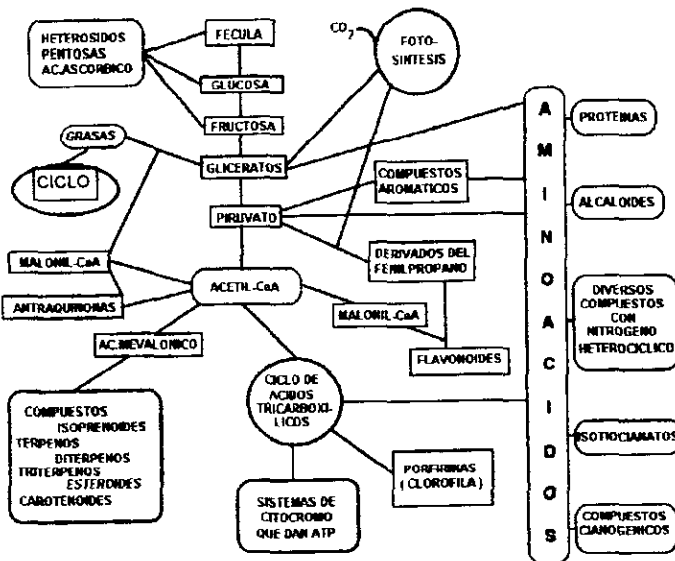


FIGURA 1.- Biosíntesis de metabolitos secundarios

2.3 GRUPO DE LOS DITERPENOS

Son por definición compuestos de veinte átomos de carbono basados en cuatro unidades de isopreno. Sin embargo, varios compuestos encontrados tienen un número menor o mayor de átomos de carbono, los cuales se pueden considerar como diterpenos por su relación genética o histórica. El término diterpenoide ha llegado a ser de uso generalizado después de 1955 y hoy en día se considera ser sinónimo de diterpeno

Los estudios sobre la descomposición pirogénica del caucho llevaron a los investigadores en la segunda mitad del siglo pasado, a la conclusión de que el isopreno debía ser considerado como un elemento fundamental en la elaboración de dicho producto. Como resultado de extensas y avanzadas investigaciones sobre las estructuras terpénicas vegetales, Ruzicka publicó en 1953 su regla biogenética del isopreno (31) (32) (33) , señalando que podía emplearse la yuxtaposición de unidades isoprenoides para explicar no sólo la formación del caucho y de monoterpenos, sino también de otros muchos productos vegetales, incluyendo algunos como los esteroides o los triterpenos, de constitución molecular compleja. El valor de la regla reside en su amplio concepto unificador, que condujo a la postulación de una secuencia racional de los fenómenos que pueden ocurrir a lo largo de la biogénesis de estos compuestos. En la figura 2 se exponen varias estructuras a las que puede aplicarse la regla.

origen vegetal empezó una rápida acumulación. Otro factor importante fueron los avances en la racionalización de los conceptos biogénéticos (34) (35), especialmente en el área de terpenoides. La descripción de la regla biogénética del isopreno (tabla 1) de acuerdo a la cual las estructuras de terpenos pueden ser racionalizados o deducidas por mecanismos de reacción aceptados a partir de precursores como el geraniol, farnesol, geranilgeraniol, etc.

TABLA 1. Terpenos racionalizados a partir de la regla del isopreno.

Nombre	# Unidades de Isopreno	# C	# H
Hemiterpenos	1	5	5
Monoterpenos	2	10	16
Sesquiterpenos	3	15	24
Diterpenos	4	20	32
Sesterpenos	5	25	40
Triterpenos	6	30	48
Tetraterpenos	8	40	64
Politerpenos	n	5 (n)	8 (n)

El impacto que esto trajo consigo se reflejó en el hecho de que una publicación de 1951 (36) da las estructuras de 17 diterpenoides derivadas de ocho esqueletos básicos. En 1970 (37) se reportan 650 diterpenos que caen dentro de 70 esqueletos básicos. En la década de los 80s (35) se describen más de 2000 diterpenoides abarcando 176 estructuras básicas.

El conocimiento de la biosíntesis de diterpenos comienza en la década de los 50's y continuó durante las siguientes décadas(38) (39). Hoy en día contamos con un conocimiento adecuado de como ésta se lleva a cabo (figura 3). Es ahora bien conocido que dos moléculas de acetil coenzima A, derivadas del catabolismo de carbohidratos, grasas o proteínas se condensan para dar la formación de acetoacetilcoenzima A, que desencadena en una serie de intermediarios hasta llegar al ácido R-mevalónico, cuya importancia reside en que es considerado el bloque básico de construcción de casi todos los isoprenoides. La serie de reacciones mediadas por enzimas que le preceden da lugar a la formación de geranilgeraniol pirofosfato que representa el precursor acíclico de la formación de diterpenoides cíclicos (figura 4).

El conocimiento anterior ha sido obtenido esencialmente de estudios sobre la biosíntesis de esteroides en animales y microorganismos. Sin embargo, pronto se estableció

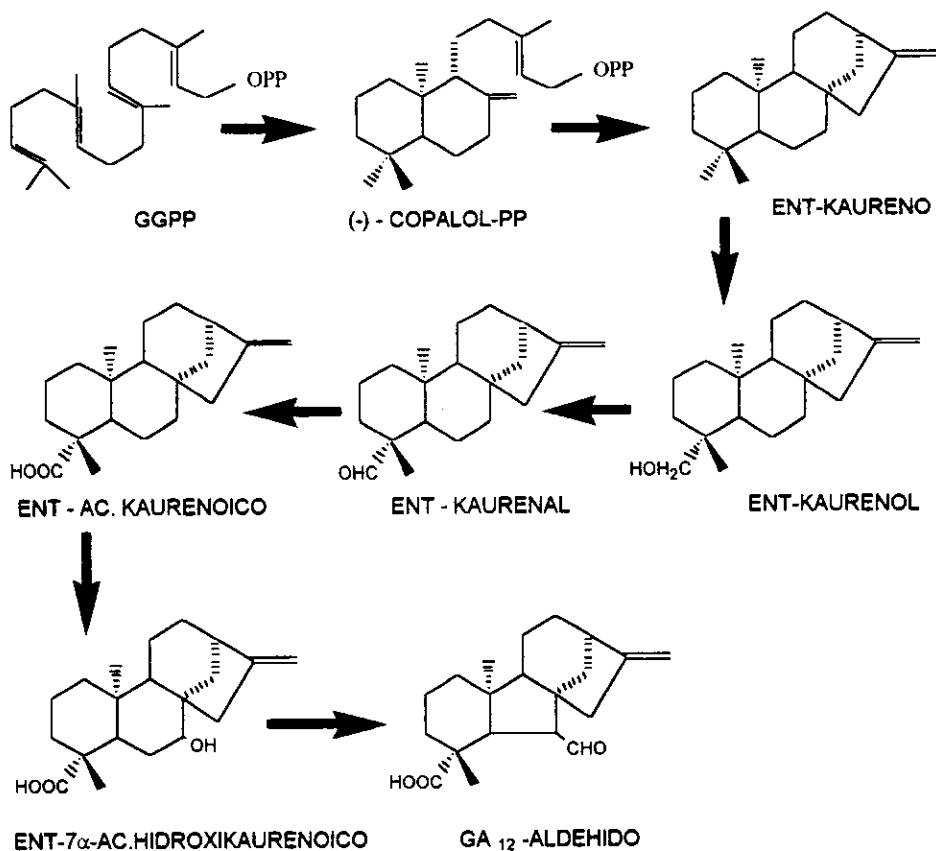


FIGURA 4.- Biosíntesis de algunos diterpenos a partir de geranylgeraniol PP (38)(39).

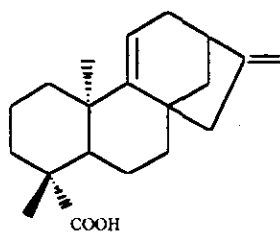
2.4.- GENERALIDADES DE LOS KAURENOIDES

Un importante y numeroso grupo de diterpenos con esqueleto de tipo kaurenoide se encuentran distribuidos en varias familias de plantas, destacando los géneros *Labiatae*, *Compositae* y *Euphorbiaceae*. Muchos de estos kaurenoides han sido reportados como principios activos de origen natural destacando los agentes anti-HIV (40), anticancerígenos (41,42), antihipertensivos (43), antidiabéticos (43), antibacterianos (44,45,46), uteroevacuantes (20) y edulcorantes (47). Debido a esta diversidad en cuanto a su actividad biológica se han incrementado los estudios acerca de ellos, pero la gran mayoría se han enfocado en su elucidación estructural, así como en su evaluación como agentes

terapéuticos. Casi ninguno de ellos se ha dirigido a la estandarización de metodología analítica que permita su determinación cualitativa y cuantitativa en cada tipo de planta.

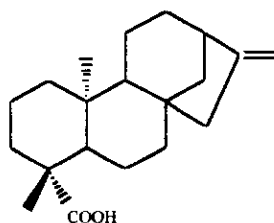
En los trabajos de Caballero y Walls (13) , se reporta el aislamiento de sustancias puras de extractos en la raíz de zoapatle. Tres de estas estructuras (figura 5) han demostrado estar contenidas de manera habitual en raíz y las hojas, además de haberse encontrado en las infusiones acuosas preparadas con varias especies del género *Montanoa* (13) (48) (49) (50).

ACIDO GRANDIFLORENICO



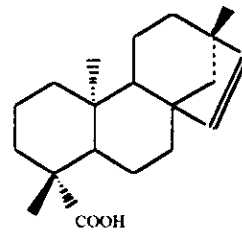
GA

ACIDO KAURENOICO



KA

ACIDO MONOGINOICO



MO

FIGURA 5 .- Estructuras de tres integrantes de la familia de kaurenos.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA ANALITICA APLICABLE AL ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

3.1.- HISTORIA

Hasta el año 1800 aproximadamente, se había progresado relativamente poco en el campo de la fitoquímica. Solo se conocían unas cuantas sustancias, como azúcar de caña, almidón, alcanfor y ácido benzoico, debido a que su preparación era sumamente sencilla mientras que mezclas complejas, como grasas, aceites, esencias, breas y resinas, se habían elaborado y utilizado ancestralmente, aunque prácticamente no se sabía nada acerca de su composición. Los primeros investigadores en el campo de la fitoquímica no llegaron a apreciar la extrema complejidad de las materias con que realizaban sus investigaciones y carecieron casi por completo de las técnicas necesarias para conseguir un progreso auténtico. Se quemaron muchos centenares de plantas para obtener cenizas y esos primeros investigadores se desanimaron al encontrar diferencias mínimas entre las cenizas de una planta venenosa y otra inocua. La extracción acuosa y la evaporación, se habían empleado tiempo atrás en la extracción de azúcar a partir de la caña de azúcar; el farmacéutico francés Nicholas Leméry (1645-1715) extendió el empleo de los procesos de extracción y utilizó el alcohol como disolvente. Robert Boyle (1627-1691) abandonó la antigua teoría de Aristóteles de que la materia está compuesta de cuatro elementos y, aunque jamás llegó a aislar ningún alcaloide, es evidente que iba bien encaminado cuando trató el opio (base del laudano) con carbonato de potasio y alcohol. En 1747 se aisló sacarosa de muchas plantas, la remolacha entre ellas por el farmacéutico alemán A.S. Marggraf (1709-1780); K.W. Schéele (1742-1786) obtuvo un gran éxito en el campo de la fitoquímica al aislar los ácidos cítrico, gálico, málico, oxálico, tartárico y prúsico (ácido cianhídrico).

En el siglo XIX los procesos fitoquímicos alcanzaron un mayor desarrollo. En 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina y le siguieron rápidamente muchos otros, como morfina, estricnina y emetina. Entre 1813 y 1823, Chevreu dilucidó la naturaleza química de las grasas y los aceites. Hasta mediados del siglo XX, el principal empeño en cuanto a la

química de los productos naturales siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos.

3.2.- SITUACION ACTUAL

La investigación fitoquímica de una planta puede comprender los siguientes aspectos : extracción de la planta, separación y aislamiento de los componentes de interés, caracterización de los compuestos aislados, investigación de las rutas biosintéticas referida a compuestos determinados y valoraciones cuantitativas.

Con objeto de contar con una visión panorámica de como se esta abordando actualmente el estudio de las plantas, se llevó a cabo una revisión de las publicaciones de los últimos tres años, en una revista de corte internacional como lo es "Phytochemistry". Se eligió esta revista por ser de tipo general en el campo del estudio de las plantas y por que su diseño presenta una clasificación de los artículos en función del campo de estudio. La revista subdivide el estudio de plantas en seis campos principales:

- 1).- Crecimiento y metabolismo
- 2).- Bioquímica ecológica
- 3).- Biosíntesis
- 4).- Cultivo celular y Biotecnología
- 5).- Quimiotaxonomía
- 6).- Química de las plantas

Los resultados obtenidos son los siguientes (figuras 6 y 7):

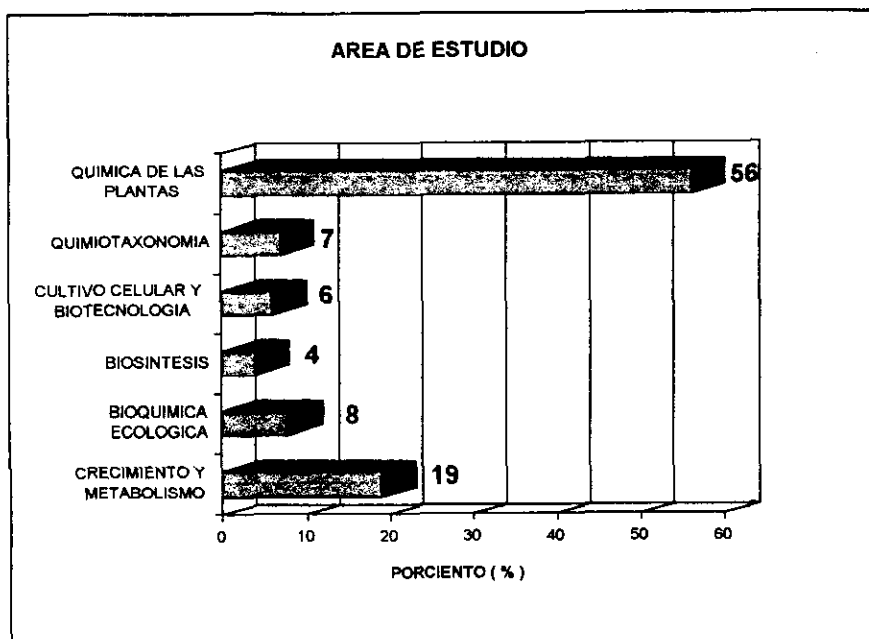
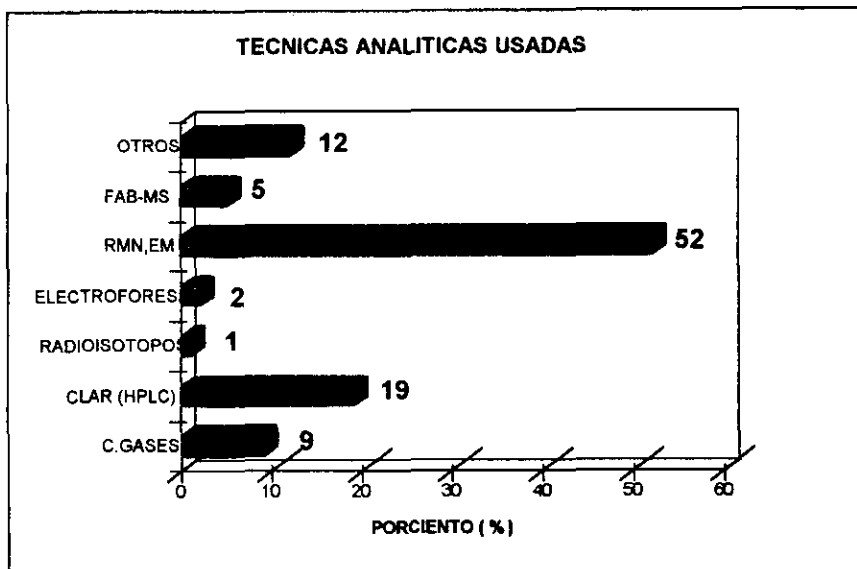


FIGURA 6 .- Porcentaje de artículos publicados en "Phytochemistry", por área de estudio



Otros = Estudios enzimáticos, inmunológicos, de resinas de intercambio, ensayos de aminoácidos, de proteínas, de lípidos y combinaciones de los anteriores como los inmunoenzimáticos.

FIGURA 7 .- Técnicas analíticas a que se recurre con frecuencia para el estudio de plantas.

Los resultados anteriores muestran que actualmente mas de la mitad de la investigación acerca de plantas es sobre el aislamiento y la elucidación estructural de diversos metabolitos. Es de resaltar que las técnicas analíticas más empleadas para este fin son la Resonancia Magnética Nuclear y la Espectrometría de Masas, sin olvidar que para el aislamiento de las sustancias se recurrió en la gran mayoría de los casos a alguna técnica cromatográfica.

En los otros campos de estudio se encontró el empleo de técnicas diversas, de las cuales alrededor del 28 % usan la cromatografía destacando la de líquidos (HPLC) sobre la de gases.

3.3.- METODOLOGIA VIABLE

Como se pudo observar la metodología que se emplea actualmente es variada pero destacan o se emplean con mayor frecuencia unas técnicas sobre de otras. Es una realidad que uno de los primeros retos que se tienen al trabajar con matrices tan complejas como son las plantas, es aislar los analitos de interés o por lo menos disminuir la presencia de interferencias. La alternativa más empleada para este propósito es la cromatografía en alguna de sus modalidades. Posteriormente al aislamiento se emplea una técnica de detección y que en muchos de los casos nos permite elucidar la estructura y/o cuantificarla.

El uso individual combinado de técnicas analíticas para un fin específico puede ser variado y estructurarán al unirse una metodología. No hay que olvidar que esta tendrá que considerar aspectos como reproducibilidad, rapidez, límite de detección adecuado y si es posible un costo aceptable para su incorporación al trabajo cotidiano. El adjetivo robusto se aplica a las metodologías en muchos campos científicos como sinónimo de fortaleza en cada una de sus partes.

La Cromatografía fue originalmente inventada por el botánico ruso Marck Tswett en 1906 (51). El uso su nueva herramienta empleando alúmina en los estudios de clorofila y otros pigmentos de plantas. Su técnica puede ser descrita como una cromatografía de adsorción líquido-sólido en columna.

Después de los trabajos de Tswett, la técnica fue sólo usada ocasionalmente hasta la década de los cuarenta, cuando apareció el famoso artículo de Martin y Synge (52). Ellos

En la segunda forma la muestra se aplica en la fase estacionaria sólida, y los analitos de interés se recogen al pasar por la fase móvil con escasa o mínima retención, quedando las sustancias no deseadas retenidas en la fase sólida.

DERIVACION QUIMICA

La literatura contiene amplia información sobre la derivación química de sustancias en general, compuestos específicos y numerosos reactivos de derivación (56,57). La derivación química de un analito o una mezcla de los mismos tiene como propósito:

a). Hacer factible la detección de un analito que de manera normal no sería detectado por una técnica en particular.

b).- Favorecer la volatilidad del analito.

c).- Incrementar la estabilidad térmica del analito.

d).- Mejorar la reproducibilidad analítica de la determinación de un compuesto

e).- Mejorar la resolución del pico de interés cuando se emplea cromatografía para su separación.

f).- Disminuir en algunos casos los límites de detección

Muchos de los metabolitos de una planta tendrán la limitante de no poder ser analizados por una técnica en particular. Ejemplos de ellos son los compuestos no volátiles para análisis por cromatografía de gases y compuestos insolubles por cromatografía de líquidos. Los metabolitos que no son estables en las condiciones específicas de la técnica, también caen dentro de esta categoría.

Debido a las interacciones entre los mismos metabolitos o bien entre estos y la columna, el análisis directo de muchos de ellos y de sus mezclas pueden ser particularmente difíciles. Estas interacciones pueden conducir a una baja resolución de los picos, y en otras ocasiones a picos no simétricos que hacen difícil y poco confiable su integración. Para algunos metabolitos que coeluyen con tiempos de retención muy cercanos, es posible plantear la derivación selectiva y con esto mejorar su separación.

La demanda de metodologías analíticas que permitan cuantificar en niveles de trazas obliga al incremento de la sensibilidad del equipo que se emplea. Una de las alternativas es la derivación con grupos funcionales que mejoren la respuesta del detector. Esta estrategia es ampliamente utilizada en cromatografía de líquidos empleando detectores de fluorescencia o bien en cromatografía de gases con la adición de átomos de halógeno empleando un detector de captura de electrones y finalmente, con la formación de derivados trimetilsililados para producir patrones de fragmentación fácilmente identificables en espectrometría de masas.

CAPÍTULO IV

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1.- DESCRIPCION

El desarrollo de una metodología analítica que abarque diversos aspectos de la determinación de los ácidos kaurénoicos de *Montanoa tomentosa* es necesario para resolver problemas como:

- a).- La falta de un conocimiento preciso sobre la época óptima de recolección de una planta, para obtener de ella la máxima concentración de los metabolitos de interés.
- b).- El desconocimiento de variables importantes que intervienen en la producción de los metabolitos que involucran los aspectos agronómicos, estacionales y biosintéticos.
- c).- La falta de métodos alternativos para lograr la cuantificación de los metabolitos de interés en matrices de naturaleza distinta (hojas, raíces, tallos, flores, semillas e infusiones acuosas).
- d).- La falta de evaluaciones analíticas sobre la eficiencia de los métodos clásicos de extracción de materia prima, de los cuales se obtienen los estándares y los productos de interés.
- e).- La escasez de métodos analíticos diseñados para el seguimiento de procesos biotecnológicos de crecimiento celular “in vitro”.
- f).- La falta generalizada de aplicación de metodologías analíticas con precisión y reproducibilidad necesarias en los procesos de estudio y aprovechamiento de metabolitos secundarios en plantas.

4.2.- ANTECEDENTES DE LA METODOLOGIA EMPLEADA

El primer desarrollo de una metodología analítica que permitió la valoración de los tres principales integrantes de la familia de kaurenos (figura 5) fue llevado a cabo por Enríquez, R. G. *et al.* en 1983 (48) y se enfocó a la cuantificación de los ácidos de esta

familia en extractos acuosos y hexánicos de hoja y raíz, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para ello se empleó una extracción líquido-líquido, y se logró cuantificar al ácido grandiflorénico y evidenciar cualitativamente la presencia de los ácidos kaurenico y monoginoico. La cantidad de matriz empleada en ése trabajo fue de 2 g. Esta contribución se vió limitada por la complejidad de la matriz utilizada entonces, el trabajo con matrices tan complejas dificulta el análisis debido al ruido y al número de picos obtenidos.

Posteriormente en 1989 apareció un estudio de Fong, H.H. *et al.* que empleó condiciones muy similares (49), y en él se describió la cuantificación de varios componentes diterpenoides presentes en varias subespecies de *Montanoa*. El análisis se efectuó con los extractos acuoso y metanólico de hojas. En dicho trabajo no se menciona si se efectuaron curvas de calibración para la cuantificación, aunque se menciona el hecho de que se empleó un estándar externo y el uso de un punto de calibración único. Asimismo, tampoco se describe su límite mínimo de detección. El único cromatograma que se exhibe es el de una mezcla de estándares, y no se muestra ningún cromatograma obtenido de un extracto de las hojas. La conclusión a que estos autores llegaron fue que el ácido kauradienoico no estaba presente en el extracto acuoso, por lo cual se dedujo que no formaba parte de las sustancias con actividad uterotónica presentes en el té.

Nuevamente en 1995, Enríquez, R.G. *et al.* en una publicación que contribuyó parte de esta tesis, se llevó a cabo un estudio enfocado a discernir en forma inequívoca, si efectivamente la familia de kaurenos estaba presente en la infusión acuosa (té) (50). Dicho estudio involucró la detección cualitativa de los tres kaurenos empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y métodos de resonancia magnética bidimensional (RMN-2D). Mediante ambas técnicas analíticas se comprobó inequívocamente la presencia de los tres kaurenos en infusiones acuosas, además de que se vislumbró que los derivados silanizados de la familia de ácidos kaurénoicos se resolvían de una manera más eficiente por cromatografía de gases.

4.3.- OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar y optimizar una metodología analítica que permita llevar a cabo la cuantificación de tres componentes de interés de la familia de kaurenos en diversas matrices de *Montanoa tomentosa*, utilizando la cromatografía de gases como herramienta analítica.

ESPECIFICOS

- 1).- Establecer condiciones cromatográficas para una eficiente separación de la familia de kaurenos derivados químicamente por cromatografía de gases.
- 2).- Optimizar las condiciones necesarias para la prepurificación o aislamiento por extracción en fase sólida (EFS) de los analitos de interés.
- 3) .- Evaluar la calidad de los estándares mediante varias técnicas analíticas.
- 4).- Obtener curvas de calibración que satisfagan criterios de reproducibilidad y si es necesario evaluar un estándar interno.
- 5).- Cuantificar los tres analitos en diferentes matrices.
- 6).- Efectuar un estudio preliminar de los contenidos de kaurenos en zoapatle de Ciudad Universitaria.
- 7).- Llevar a cabo un estudio preliminar de la potencialidad de la metodología al evaluar la concentración de los analitos en zoapatle.

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- CONDICIONES GENERALES

Los espectros de ^1H y de ^{13}C de Resonancia Magnética Nuclear fueron obtenidos en un espectrómetro Varian 300 MHz y Varian Unity 500 MHz.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico con introducción directa utilizando un espectrómetro Finnigan Mat.

Los puntos de fusión se tomaron en un aparato Fisher-Johns y los valores no están corregidos.

La cromatografía en capa fina se realizó empleando placas Gel de sílice Merck de No. 60, de 10 x 5 cm. y 0.25 mm de espesor, como agente revelante se empleó sulfato cérico y calentamiento.

La extracción en fase sólida se efectuó con cartuchos de Varian de dos tipos; para fase normal fueron de sílica de 500 mg. Cat. No.601303, y para fase reversa fueron C18 de 500 mg. Cat. No. 607303.

El equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de llama fue un Varian Star 3400 Cx.

El equipo empleado para obtener cromatogramas con espectros de masas fue un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II acoplado a un detector selectivo de masas 5971A.

Las condiciones de operación, así como el tipo de columnas serán especificados junto con los resultados obtenidos.

Los disolventes empleados para las técnicas fueron de grado cromatográfico.

5.2.- OBTENCION DE ESTANDARES

Los estándares fueron obtenidos de investigaciones anteriores en donde el objetivo principal fue el aislamiento y la elucidación estructural de los mismos, contándose con

muestras de los tres ácidos puros (50) (58). Para su utilización como estándares se determinó sus puntos de fusión, sus espectros de masas y espectros de resonancia magnética nuclear con el propósito de verificar que realmente se trataba de las sustancias a evaluar. Adicionalmente se comprobó su pureza en cromatografía de gases.

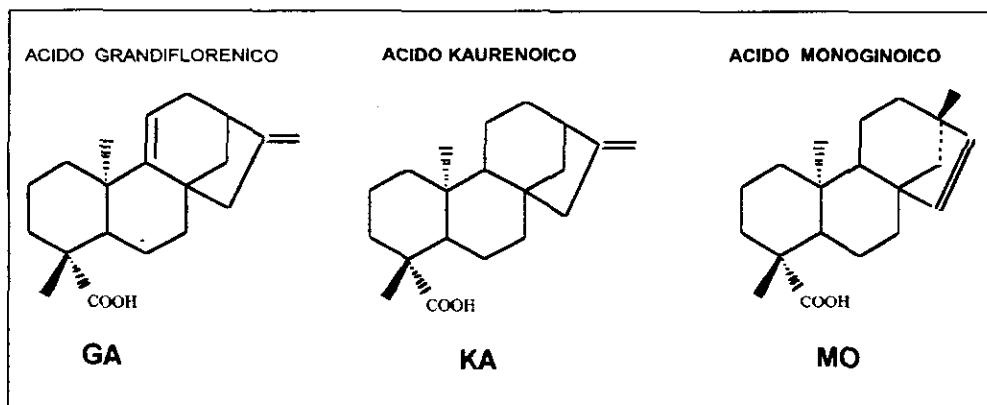


FIGURA 8.- Estructuras de los tres analitos de interés.

RESULTADOS OBTENIDOS

PUNTOS DE FUSION

TABLA 2.- Puntos de fusión de los estándares.

ANALITO	PUNTO DE FUSION (°C)	REF.BIBLIOGRAFICA
AC. GRANDIFLORENICO	154-156	155-157° (REF. 59)
AC.KAURENOICO	179-181	179-180° (REF. 60)
AC.MONOGINOICO	179-180	180° (REF. 13)

ESPECTROS DE MASAS

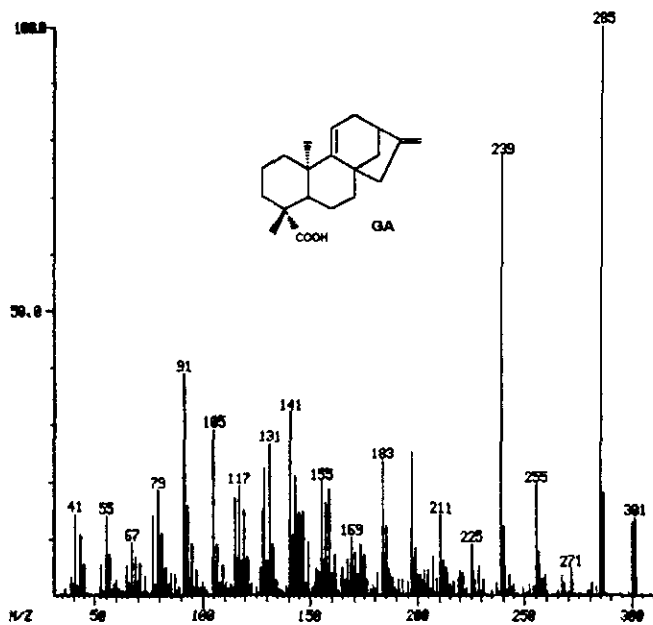


FIGURA 9.- Espectro de masas del ácido grandiflorénico.

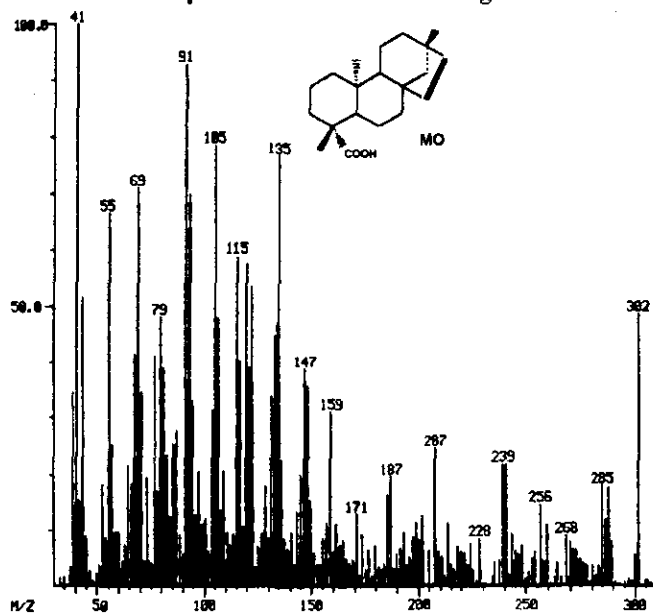


FIGURA 10.- Espectro de masas del ácido monogónico.

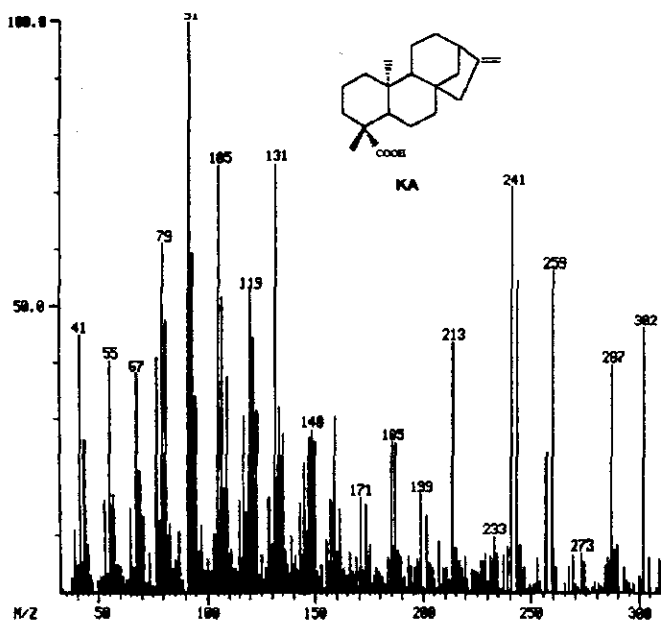
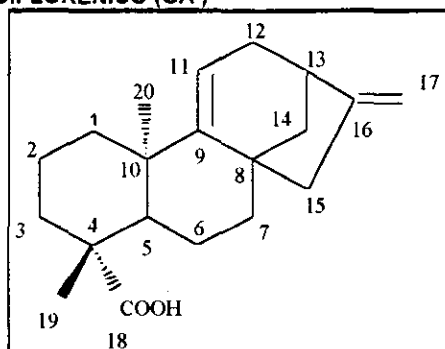


FIGURA 11.- Espectro de masas del ácido kaurenoico.

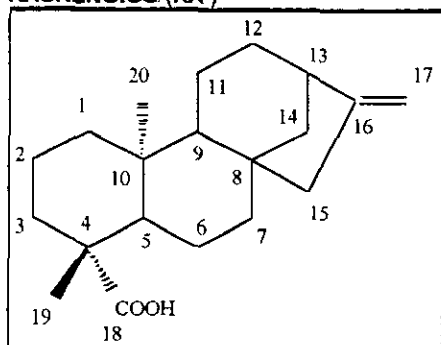
ACIDO GRANDIFLORENICO (GA)

TABLA 3. Desplazamientos Químicos de ^1H y ^{13}C del Acido Grandiflorencio

No. Carbono	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H a}$	δ	$\delta\text{ H b}$
1	40.75	1.93		1.24
2	20.16	1.88		1.50
3	38.31	2.16		1.02
4	44.69			
5	46.56			1.67
6	18.48	2.47		1.68
7	29.66	1.97		1.46
8	42.27			
9	158.56			
10	38.79			
11	114.90		(c) 5.24	
12	37.93	2.43		1.99
13	41.24	2.77		
14	44.94	1.60		1.50
15	50.32	2.20		2.62
16	155.92			
17	105.48	(c,d) 4.91		4.80
18	182.74			
19	28.23			1.24
20	23.26	1.02		

a: relativo in ppm a $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ en cloroformo; b: desplazamiento químico promedio para protones no resueltos de metileno; c a, b: la designación no es aplicable a hidrógenos olefinicos; d: protones cis a C-13

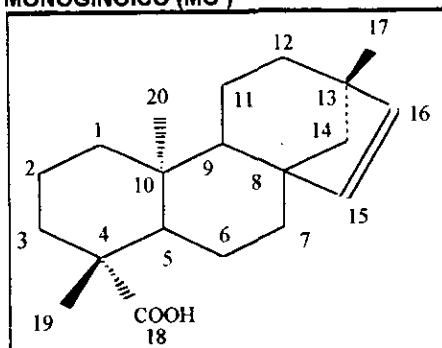
ACIDO KAURENOICO (KA)

TABLA 4. Desplazamientos Químicos de ^1H y ^{13}C del Acido Kaurenoico

No. Carbono	δC	$\delta\text{H a}$	δH	$\delta\text{H b}$
1	40.70	1.88		0.82
2	19.09	1.86		1.42
3	37.83	2.16		1.02
4	43.71			
5	57.04			1.06
6	21.83		(b) 1.82	
7	33.10	1.47		1.62
8	44.23			
9	55.11			1.04
10	39.66			
11	18.43	1.56		1.60
12	41.27	1.52		1.45
13	43.85	2.63		
14	39.70	1.99		1.13
15	48.96		(b) 2.05	
16	155.90			
17	102.98	(c,d) 4.80		4.73
18	183.74			
19	28.96			1.24
20	15.60	0.95		

a: relativo in ppm a $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ en cloroformo; b: desplazamiento químico promedio para protones no resueltos de metileno; c a, b: la designación no es aplicable a hidrógenos olefinicos; d: protones cis a C-13

ACIDO MONOGINOICO (MO)

TABLA 5. Desplazamientos Químicos de ^1H y ^{13}C del Acido Monoginoico

No. Carbono	d C	d H a	d H	d H b
1	39.49	1.69		0.91
2	19.17	1.80		1.41
3	37.88	2.16		1.02
4	43.76			
5	57.04			1.11
6	21.52		(b) 1.82	
7	33.07		(b) 1.25	
8	49.08			
9	52.22			0.97
10	37.91			
11	20.41	1.25		1.53
12	37.56	1.67		1.28
13	43.62			
14	60.99	1.46		1.01
15	134.78		5.75	
16	136.47		5.45	
17	24.87			1.00
18	184.12			
19	29.11			1.24
20	13.76	0.67		

a: relativo in ppm a $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ en cloroformo; b: desplazamiento químico promedio para protones no resueltos de metileno; c a, b: la designación no es aplicable a hidrógenos olefinicos; d: protones cis a C-13

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Al analizar los estándares de los ácidos en cromatografía en capa fina de tipo fase normal eluyendo con una fase móvil de hexano : acetato de etilo (80 : 20) , se encontró que mostraban una sola zona con una mancha con el mismo Rf en los tres casos. Al compararlo con un extracto de hojas de la planta de donde se extrajeron, se observa que en los tres casos no se detecta la presencia de otros componentes.

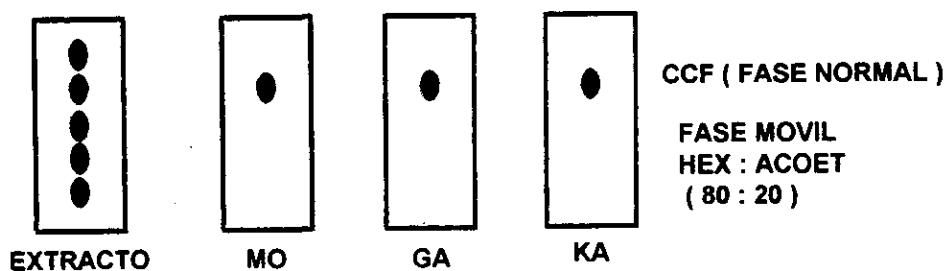


FIGURA 12.- Evaluación de los tres estándares por cromatografía en capa fina.

CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS

Otra de las técnicas que nos permitió corroborar la calidad de los estándares fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para lo cual se hizo necesaria la derivación de los estándares con Bistrimetilsililtrifluoroacetamida y trimetilclorosilano (figura 13).

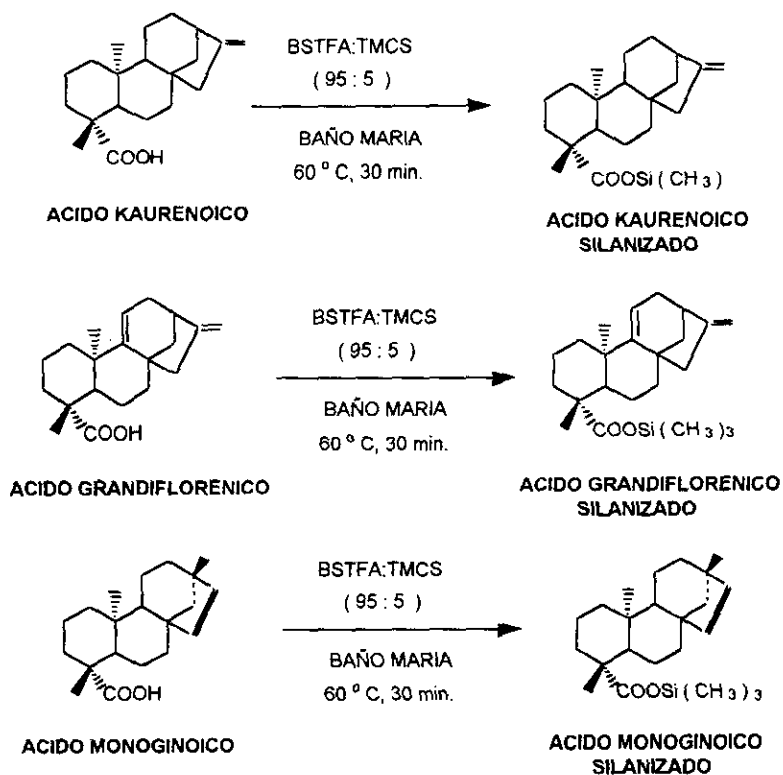


FIGURA 13.- Derivación de los estándares a sus correspondientes trimetilsililados.

TABLA 6.- Condiciones cromatográficas empleadas.

Columna	Ultra-1 metilsilicona
Longitud	12 m
Díámetro interno	0.2 mm
Espesor de película	0.33 mm
Temperatura detector	280 °C
Temperatura inyector	250 °C
Temperatura inicial	120 °C
Temperatura final	250 °C
Incremento de temperatura	15 °C/min.
Gas acarreador velocidad lineal media	12 cm/seg.

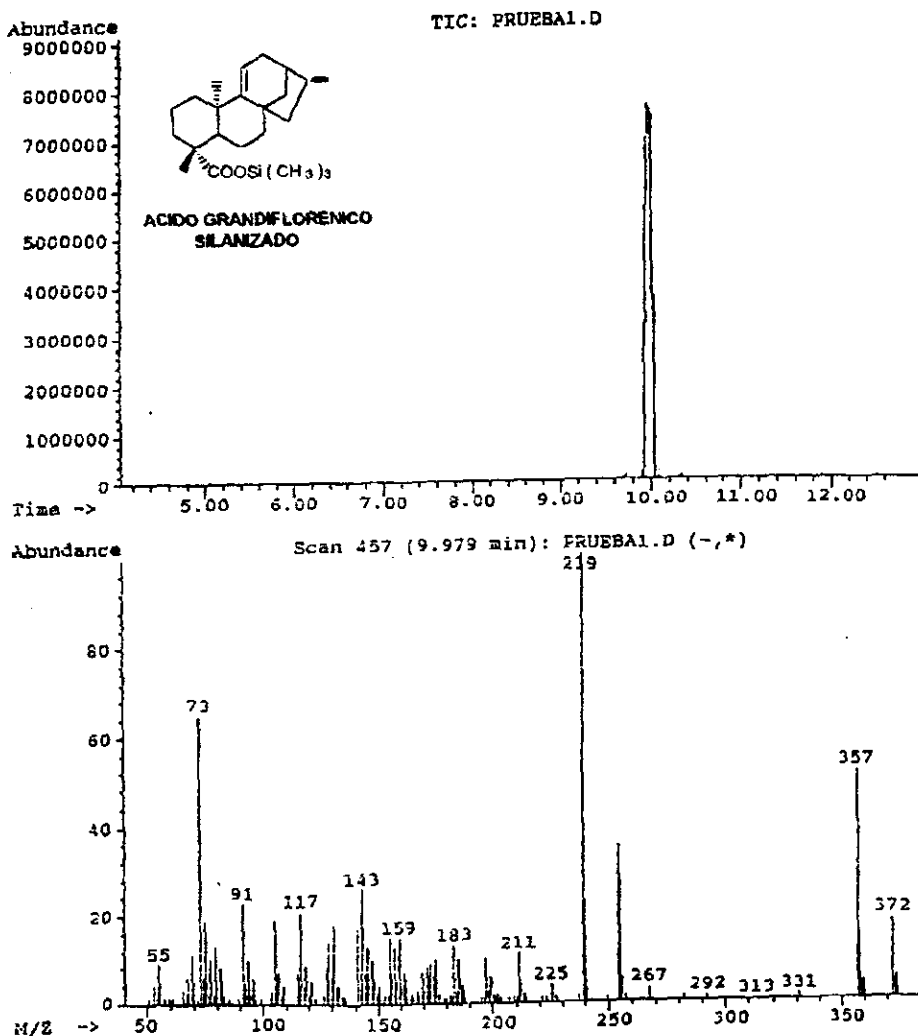


FIGURA 14 .- Cromatograma de intensidad iónica total y espectro de masas del ácido grandiflorénico trimetilsililado empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 6.

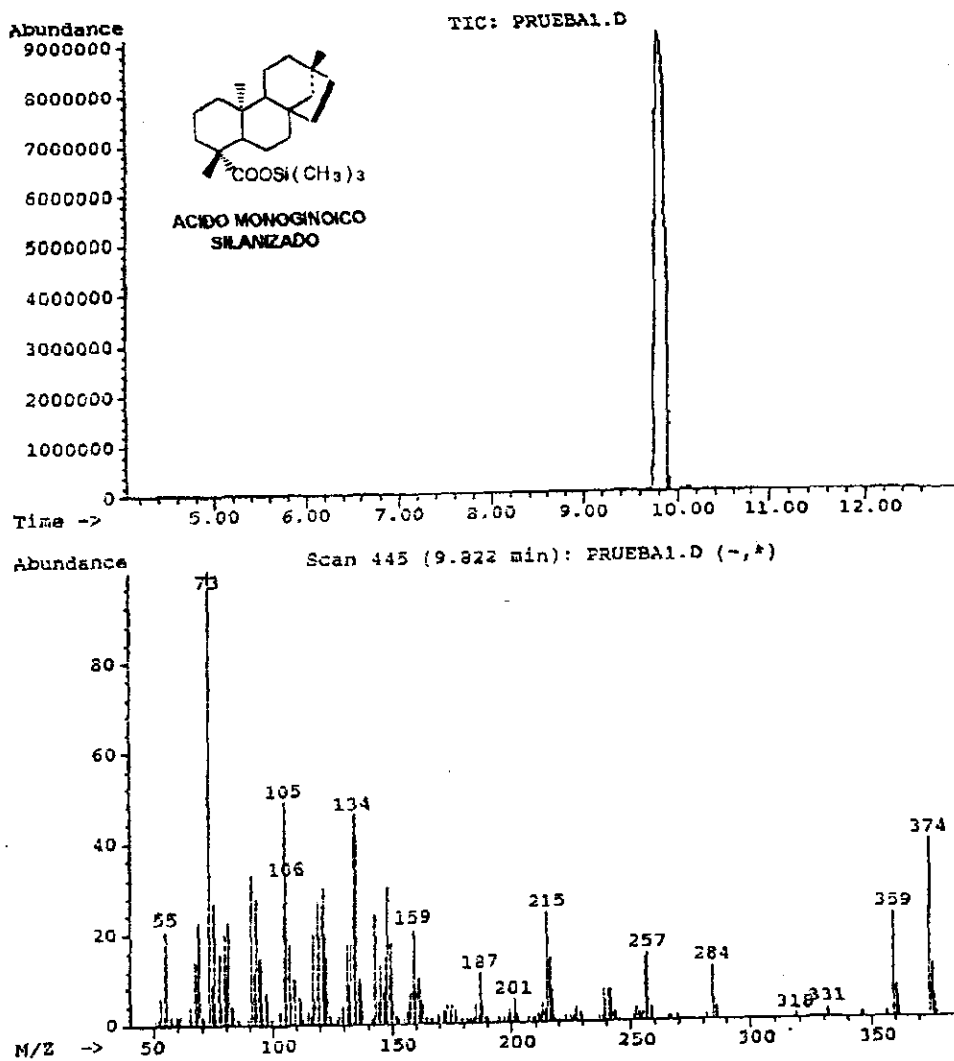


FIGURA 15.- Cromatograma de intensidad iónica total y espectro de masas del ácido monoginico trimetilsililado empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 6.

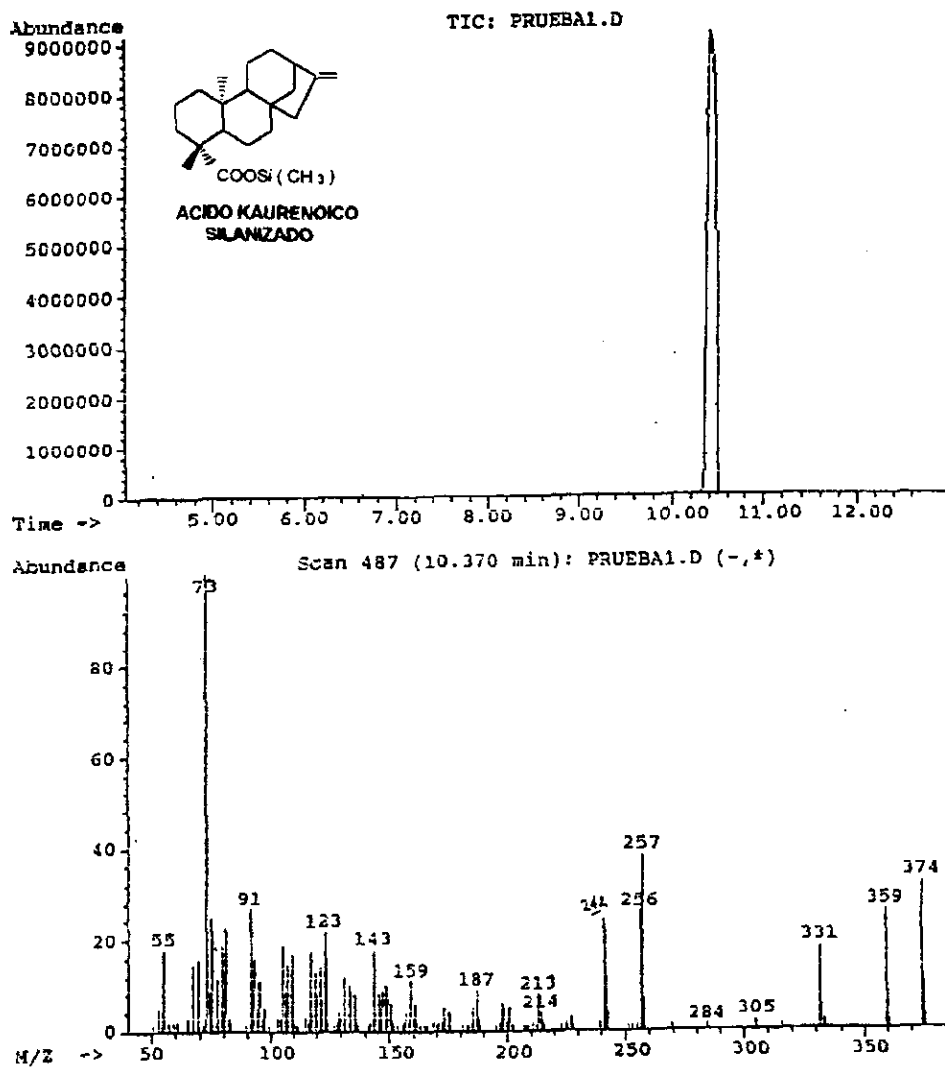


FIGURA 16.- Cromatograma de intensidad iónica total y espectro de masas del ácido kaurenico trimetilsililado empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 6.

5.3.- OPTIMIZACION DE CONDICIONES PARA LA SEPARACION CROMATOGRAFICA POR GASES CON DETECTOR DE IONIZACION POR FLAMA (GC-FID).

Se tenía el antecedente de que la derivación con agentes silanizantes proporcionaba una alternativa viable para la separación e identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (50). Lo anterior se aplicó a un sistema con detector de ionización por flama. Para ello se empleo un cromatografo de gases Varian 3400 Cx. A continuación se resumen las condiciones que permitieron una separación cromatográfica adecuada de los integrantes de la familia de kaurenos tanto para modo con división de flujo (split) y sin división de flujo (splitless).

TABLA 7.- Condiciones cromatográficas empleadas para ambos modos de inyeccion split/splitless.

Columna	Ultra-1 metilsilicona
Longitud	25 m
Diámetro interno	0.2 mm
Espesor de película	0.33 mm
Temperatura detector	280 °C
Temperatura inyector	250 °C
Temperatura inicial	120 °C
Temperatura final	250 °c
Incremento de temperatura	15 °C/min.
Gas acarreador velocidad lineal media	28 cm/seg.

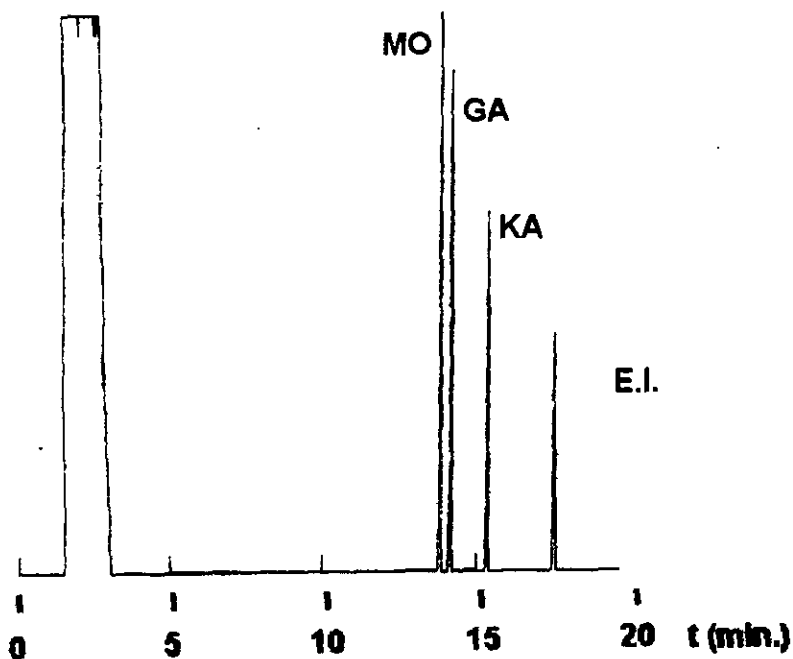


FIGURA 17.- Cromatograma obtenido con una mezcla de estándares en GC-FID, en modo splitless utilizando las condiciones descritas en la tabla 7.

TABLA 8.- Parámetros calculados a partir del cromatograma obtenido en la figura 17.

	T_R (min.)	t_R (min.)	w_b (seg.)	k	N	H (cm)
MO	13.841	12.354	3.1	8.308	914775	0.00270
GA	14.162	12.675	3.0	8.524	1028196	0.00240
KA	15.355	13.868	3.5	10.326	904303	0.00276
E.I.	17.535	16.048	4.6	10.792	701049	0.00357

TABLA 9.- Evaluación de resolución (R_s) y selectividad (α).

	R_s	α
MO - GA	6.31	1.0260
GA - KA	22.04	1.0941
KA - E.I.	237.8	1.1572

5.4.- OPTIMIZACION Y EVALUACION DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Se contaba con antecedentes que indicaban que las mezclas de N-Hexano-Acetato de Etilo permiten separar adecuadamente los componentes de la familia de kaurenos.

Cuando se utiliza hexano como único componente de la fase móvil, la mancha perteneciente a la familia de kaurenos tiene un Rf no mayor de 0.1.

Al utilizar acetato de etilo exclusivamente, la zona de kaurenos avanza como frente de la fase móvil.

Empleando una mezcla de los disolventes anteriores se fue incrementando la fuerza de la fase móvil hasta obtener las condiciones que permitieron desplazar la mancha de kaurenos a la mitad de la placa.

La mezcla con la cual se obtuvo un RF aproximado de 0.6 fue la proporción N-Hexano:Acetato de etilo (85:15).

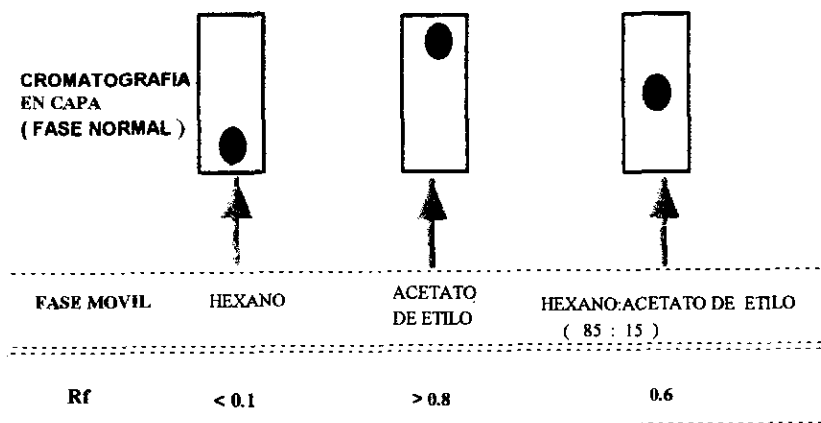


FIGURA 18.- Optimización de las condiciones de separación por cromatografía en capa delgada.

5.5.- EXTRAPOLACION DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA A EXTRACCION EN FASE SOLIDA (EFS) FASE NORMAL (FN).

Una vez que se contó con las condiciones óptimas de elución en cromatografía en capa fina, se emplearon estas condiciones para desarrollar y optimizar la extracción en fase sólida en los dos tipos que se planeó trabajar.

5.5.1.- OPTIMIZACION DE LA EXTRACCION EN FASE SOLIDA (FASE NORMAL)

La optimización consistió de efectuar pruebas para obtener los volúmenes adecuados para los siguientes pasos:

a).- El volumen necesario para hacer el paso de lavado favoreciendo la retención de la familia de kaurenos en la columna de EFS.

b).- La composición y el volumen necesario de la fase móvil que nos permitió eluir la familia de kaurenos.

El seguimiento de los eluatos provenientes se evaluó inicialmente con cromatografía en capa fina y se ratificó en cromatografía de gases.

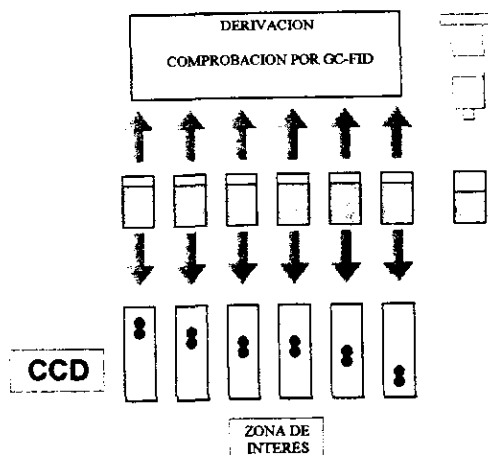


FIGURA 19.- Optimización de condiciones para extracción en fase sólida.

La optimización de los tipos y cantidades de fase móvil que se emplearon conllevó al procedimiento estándar que a continuación se resume:

A una columna de extracción fase sólida (fase normal, sílice, 500 mg)

- 1).- Acondicionarla con 2 mL de hexano
- 2).- Sin dejar que la columna se seque, colocar 0.2 ml de la matriz que contiene la mezcla de kaurenos (incluye E.I.) de interés.
- 3).- Lavar con un mL de Hexano
- 4).- Eluir con 3 mL de una mezcla N-Hexano-Acetato de etilo (85:15).
- 5).- El eluato obtenido se lleva a sequedad
- 6).- Derivar con 50 microlitros de una mezcla de BSTFA:TMCS (100:5) , durante 20 minutos en un baño maría a 60 ° C.
- 7).- Inyectar 1 microlitro en el cromatógrafo.
- 8).- Emplear las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7 con modo de inyección "split ".

5.5.2.- EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCION MEDIANTE EXTRACCION FASE SOLIDA (FASE NORMAL)

Partiendo de las soluciones de estándar ya preparadas en concentración conocida, se efectuó un estudio por quintuplicado con una concentración conocida de la familia de kaurenos que permitió evaluar la eficiencia de la extracción en EFS.

Se preparó una solución hexánica que contenía los tres kaurenos mas un estándar interno (la justificación del empleo de un estándar interno se detallará en la sección 5.6) con las siguientes concentraciones:

ACIDO GRANDIFLORENICO (GA)	= 0.33 mg/mL
ACIDO MONOGINOICO (MO)	= 0.32 mg/mL
ACIDO KAURENOICO (KA)	= 0.30 mg/mL
ESTANDAR INTERNO (E.I.)	= 0.23 mg/mL

Preparación del quintuplicado de análisis.- Para cada análisis se tomó una alícuota de 0.2 mL de la solución hexánica y se empleó el procedimiento optimizado de EFS-FN.

Preparación del punto de comparación.- De la misma solución hexánica se tomó una alícuota de 0.2 mL, se llevó a sequedad y se derivó con 50 microlitros de una mezcla de BSTFA:TMCS (100:5), durante 20 minutos en un baño maría a 60 °C, se inyectó 1 µL en el cromatógrafo de gases.

los resultados obtenidos son los siguientes:

REPLICAS	% RECUPERADO		
	MO	GA	KA
1	98.77	99.96	100.32
2	101.66	97.54	94.08
3	95.49	95.93	96.29
4	100.68	101.88	100.71
5	100.51	101.23	99.33
PROMEDIO	99.42	99.31	98.15
DESVIACION EST.	2.43	2.51	2.86

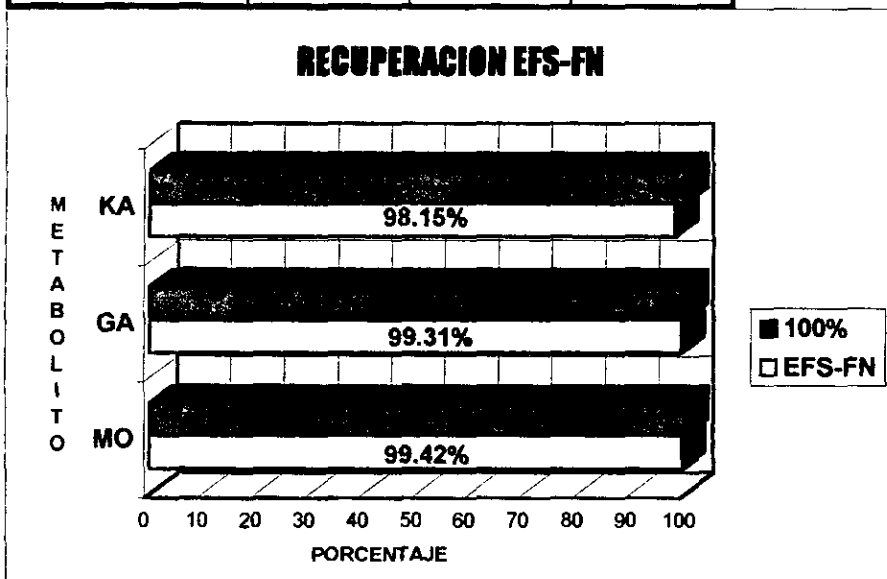


FIGURA 20.- Evaluación de la eficiencia de extracción de los analitos de interés en EFS-FN.

5.6. CURVAS DE CALIBRACION

La utilización de los pasos anteriores (pretratamiento) al análisis por cromatografía de gases y el empleo de inyección manual, hizo necesario evaluar si la utilización de un estándar interno proporcionaba una mejora en la reproducibilidad de los resultados, dicho estándar se seleccionó tomando en cuenta las siguientes características:

- Estructura química semejante.
- Comportamiento cromatográfico análogo.

Un candidato con las características anteriores fue el siguiente

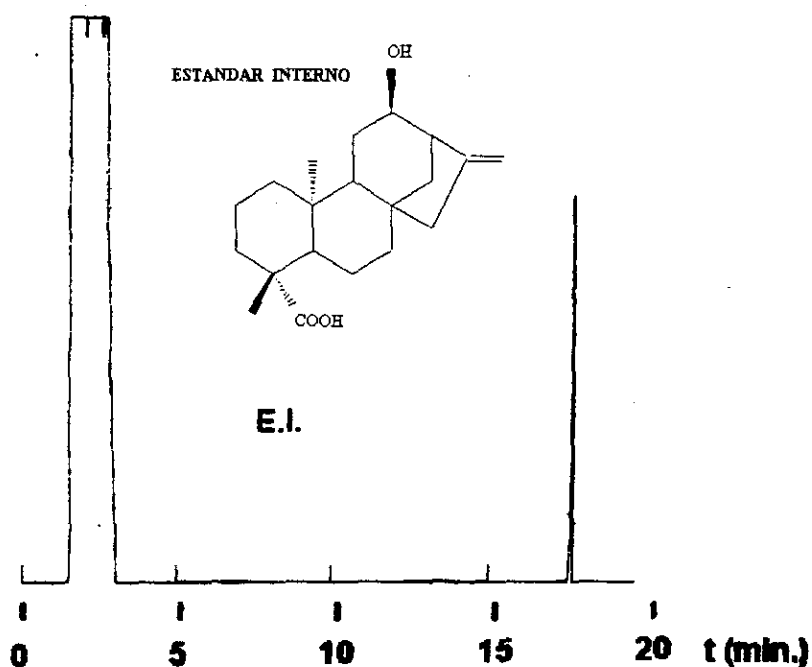


FIGURA 21.- Cromatograma en GC-FID y estructura química del candidato a estándar interno.

Para el estudio se prepararon dos series de calibración cada una constituida por cinco concentraciones de los tres metabolitos de interés, la serie 1 (sin estándar interno.) y la serie 2 (con estándar interno.).

5.6.1.- PREPARACION DE LAS CURVAS DE CALIBRACION Y SELECCION DE UN ESTANDAR INTERNO.

Inicialmente se prepararon una solución madre hexánica para cada uno de los metabolitos de interés y una para el estándar interno. Quedando a las siguientes concentraciones

ACIDO GRANDIFLORENICO (GA)	= 0.65 mg/mL
ACIDO MONOGINOICO (MO)	= 0.63 mg/mL
ACIDO KAURENOICO (KA)	= 0.60 mg/mL
ESTANDAR INTERNO (E.I.)	= 0.46 mg/mL

Serie 1 (sin estándar interno.).- Se tomaron 100 microlitros de cada una de las tres soluciones madre de interés (GA, KA, MO) , se adicionaron 700 microlitros de hexano grado cromatográfico. Con la anterior solución (B) se construyó la curva de calibración como sigue: Se tomó una alícuota de la solución B, se llevo a cabo el pretratamiento de extracción fase sólida (fase normal) descrito con anterioridad, el eluato obtenido se llevó a sequedad y se derivó con 50 microlitros de una mezcla de bistrimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) y clorotrimetilsilano (TMCS) en proporción 100:5. durante 20 minutos en baño maría a 60 °C . Las concentraciones finales se detallan en la siguiente tabla.

TABLA 10.- Concentraciones finales de los tres analitos de interés.

VIAL	ALICUOTA microlitros	CONCENTRACION FINAL (ng/μl)		
		MO	GA	KA
1	50	63	65	60
2	100	126	130	120
3	150	189	195	180
4	200	252	260	240
5	250	315	325	300

Se inyecta 1 microlitro de cada vial en el GC-FID empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7, en modo de inyección "splitless".

Serie 2 (con estándar interno.).- Se tomaron 100 microlitros de cada una de las tres soluciones madre de interés (GA, KA, MO) , se adicionaron 700 microlitros de hexano

grado cromatográfico. Con la anterior solución (B) se construyó la curva de calibración como sigue: Se tomaron alicuotas de la solución B y se adicionaron a cada vial 50 microlitros del estándar interno (conc.=0.46 mg/ml), se llevó a cabo el pretratamiento de extracción fase sólida (fase normal) descrito con anterioridad, el eluato obtenido se llevó a sequedad y se derivó con 50 microlitros de una mezcla de bistrimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) y clorotrimetilsilano (TMCS) en proporción 100:5. durante 20 minutos en baño maria a 60 °C . Las concentraciones finales se detallan en la siguiente tabla.

TABLA 11.- Concentraciones finales de los tres analitos de interés y del estándar interno.

VIAL	ALICUOTA microlitros	CONCENTRACION FINAL (ng/μl)			E.I.
		MO	GA	KA	
1	50	63	65	60	460
2	100	126	130	120	460
3	150	189	195	180	460
4	200	252	260	240	460
5	250	315	325	300	460

Se inyecta 1 microlitro de cada vial en el GC-FID empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7, en modo de inyección "splitless".

5.6.1.1.- RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CALIBRACION SIN ESTANDAR INTERNO ESTUDIO POR DUPLICADO.

Para el cálculo de coeficientes de correlación y errores en análisis instrumental se utilizaron los criterios y definiciones del capítulo 5 de estadística para química analítica (61).

CONC. ng/μL	AREAS	
	1	2
63	142911	142743
126	194360	253985
189	652071	405894
252	795217	496088
315	1072473	785364

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	98842.54
Sb	473.1

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/μL
	126.35

ECUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	-103988.3
PENDIENTE	B	3164.54
COEF. CORRELACION	R	0.9211

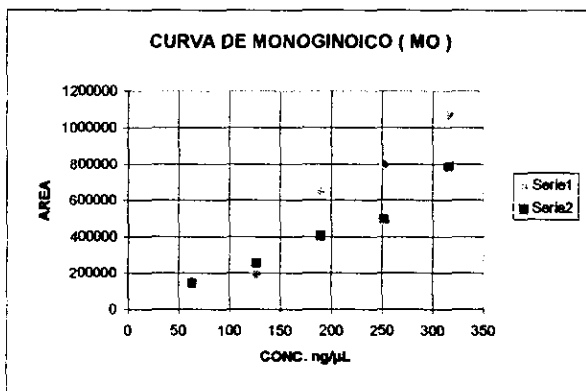


FIGURA 22.- Resultados de la calibración del ácido monoginoico sin estándar interno.

Donde:

Abreviatura Significado

CONC. = Concentración

ng/mL = Nanogramos contenidos en cada microlitro de solución a inyectar

Sa = Error asociado a la ordenada al origen

Sb = Error asociado a la pendiente de la recta

A = Ordenada al origen

B = Pendiente de la recta

R = Coeficiente de correlación

Serie 1 y 2 = Replicas de la curva de calibración

CONC. ng/ μ L	AREAS	
	1	2
65	146827	142208
130	198009	259374
195	687504	415887
260	818474	456076
325	1028159	798369

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	98981.6
Sb	459.14

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/ μ L
	132.38

EQUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	-90734.25
PENDIENTE	B	3024.73
COEF. CORRELACION	R	0.9199

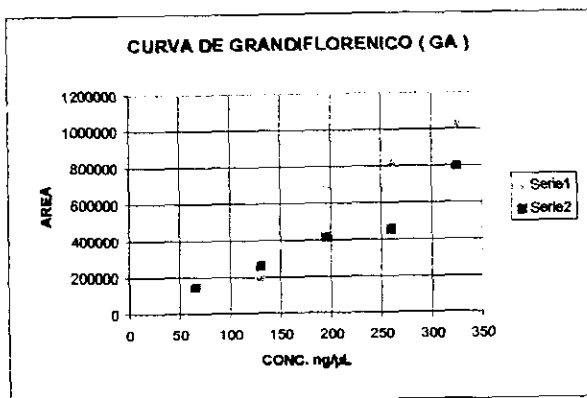


FIGURA 23.- Resultados de la calibración del ácido grandiflorencio sin estándar interno (abreviaturas descritas en la figura 22).

CONC. ng/ μ L	AREAS	
	1	2
60	79235	76737
120	85443	132705
180	397821	212367
240	441355	239711
300	528468	403347

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	62704.97
Sb	315.1

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/ μ L
	151.09

EQUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	-42471.7
PENDIENTE	B	1678.84
COEF. CORRELACION	R	0.8833

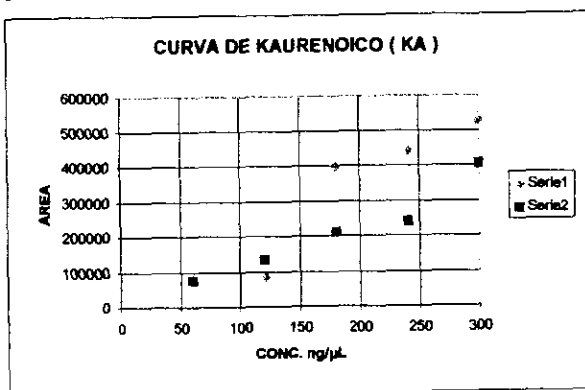


FIGURA 24.- Resultados de la calibración del ácido kaurenico sin estándar interno (abreviaturas descritas en la figura 22).

5.6.1.2.- CURVAS DE CALIBRACION CON ESTANDAR INTERNO ESTUDIO POR DUPLICADO.

Para el cálculo de coeficientes de correlación y errores en análisis instrumental se utilizaron los criterios y definiciones del capítulo 5 de estadística para química analítica (61).

CONC. ng/μL	RELACION DE AREAS	
	1	2

63	0.37931	0.307871
126	0.469652	0.493023
189	0.652854	0.610385
252	0.840113	0.81016
315	1.126312	1.095909

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	0.03925
Sb	0.00018

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/μL
	53.24

ECUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	0.114908
PENDIENTE	B	0.002928
COEF. CORRELACION	R	0.9845

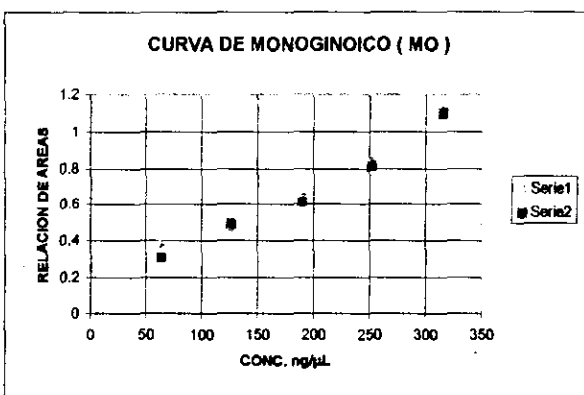


FIGURA 25.- Resultados de la calibración del ácido monoginoico con estándar interno.

Donde:

Abreviatura Significado

CONC. = Concentración

ng/mL = Nanogramos contenidos en cada microlitro de solución a inyectar

RELACION DE AREAS= Area del kaureno analizado entre el área del estándar interno

Sa = Error asociado a la ordenada al origen

Sb = Error asociado a la pendiente de la recta

A = Ordenada al origen

B = Pendiente de la recta

R = Coeficiente de correlación

Serie 1 y 2 = Replicas de la curva de calibración

CONC. ng/μL	RELACION DE AREAS	
	1	2
65	0.389703	0.306716
130	0.47847	0.503485
195	0.688329	0.625413
260	0.864683	0.81014
325	1.079773	1.114056

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	0.03457
Sb	0.00016

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/μL
	49.28

EQUACION DE LA RECTA	
ORDENADA AL ORIGEN	A 0.132924
PENDIENTE	B 0.002837
COEF. CORRELACION	R 0.9875

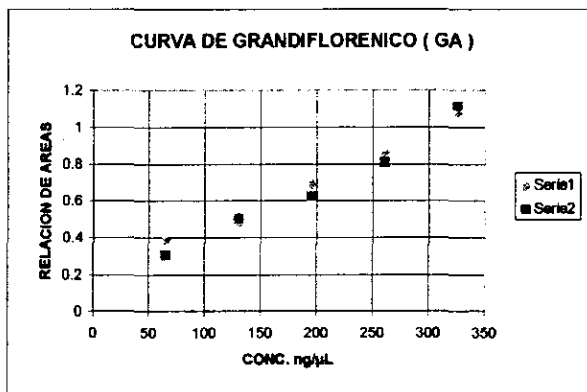


FIGURA 26.- Resultados de la calibración del ácido grandiflorénico con estándar interno (abreviaturas descritas en la figura 25).

CONC. ng/μL	RELACION DE AREAS	
	1	2
60	0.210303	0.165508
120	0.206465	0.257601
180	0.398299	0.319358
240	0.466273	0.391471
300	0.554997	0.562837

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	0.02887
Sb	0.00014

LIMITE MINIMO DE DETECCION	ng/μL
	74.63

EQUACION DE LA RECTA	
ORDENADA AL ORIGEN	A 0.071653
PENDIENTE	B 0.001565
COEF. CORRELACION	R 0.9673

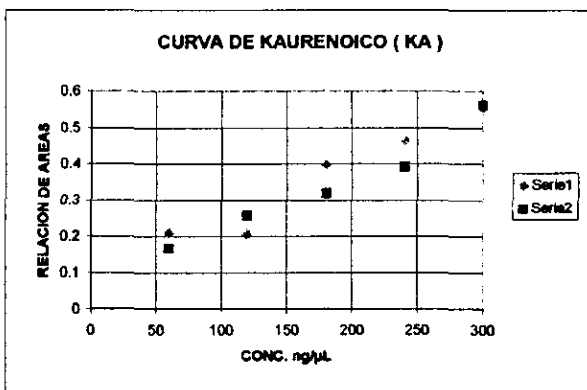


FIGURA 27.- Resultados de la calibración del ácido kaurenico con estándar interno (abreviaturas descritas en la figura 25).

5.6.1.3.-COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS CON Y SIN ESTÁNDAR INTERNO

La primera comparación que se puede hacer es entre los coeficientes de correlación obtenidos.

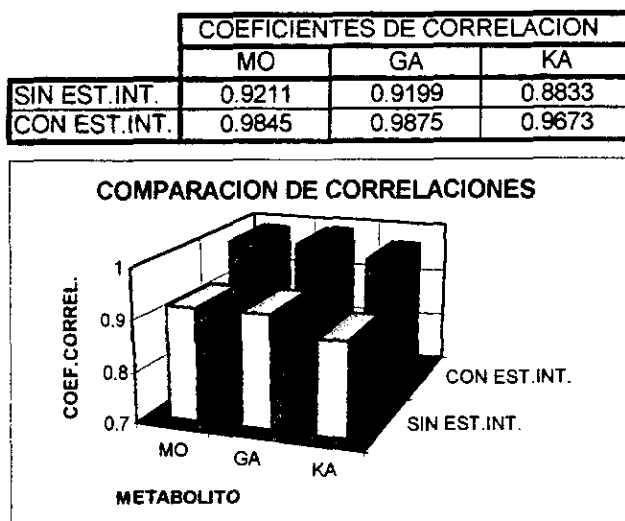


FIGURA 28 .- Gráfica de comparación de coeficientes de correlación.

Con objeto de demostrar que los coeficientes de correlación son realmente significativos, se efectuó una prueba t de dos colas con un nivel de confianza del 99 %, esta prueba nos permite asegurar con un 1% de incertidumbre si se trata de una relación lineal.

Tabla 12.- Resultados de prueba t para demostrar correlación.

	t calculada		t de tablas con 99 %
	SIN EST.INT.	CON EST.INT.	
MO	6.69	15.88	3.36
GA	6.63	17.72	
KA	5.33	10.78	

Hipótesis nula: no existe correlación entre X y Y.

Resultado de la prueba para los seis casos, se rechaza la hipótesis nula.

Resultados que podemos comparar son las pendientes de las curvas de calibración y sus desviaciones estándar S_b , como un estimador de la precisión que se obtiene con cada método. Esto lo estimamos primero con un comparación tabular entre coeficientes de variación (CV) y de una forma estadística con una prueba F de una cola, ya que sólo nos interesa si el método con estándar interno es más preciso que el método sin estándar interno, con intervalo de confianza del 95 %.

Tabla 13.- Cálculo del coeficiente de variación de las pendientes y aplicación de la prueba F.

		PENDIENTE	S_b	CV	PRUEBA F	F TABULADO 95%
MO	SIN EST. INT.	3164.54	473.05	14.95	6.12	3.18
	CON EST. INT.	0.00298	0.00018	6.04		
GA	SIN EST. INT.	3024.73	459.14	15.18	7.24	3.18
	CON EST. INT.	0.002837	0.00016	5.64		
KA	SIN EST. INT.	1678.84	315.1	18.77	4.40	3.18
	CON EST. INT.	0.001565	0.00014	8.95		

Hipótesis nula: el método con estándar interno no es significativamente más preciso que el método sin estándar interno.

Resultado. Para los tres casos se rechaza hipótesis nula.

Los límites de detección determinados para los procedimientos con y sin estándar interno resultaron más bajos para el primer caso.

Para ratificar lo anterior se empleó una prueba t por parejas.

Tabla 14.- Comparación de límites mínimos de detección entre ambos métodos.

	SIN EST.INT.	CON EST.INT.	DIFERENCIA
MO	126.35	53.24	73.11
GA	132.38	49.28	83.1
KA	151.09	74.63	76.46

MEDIA DE DIFERENCIAS	77.556
DESVIACION ESTANDAR	5.084

t CALCULADA	59.58
-------------	-------

t DE TABLAS CON 99 %	9.92
----------------------	------

Hipotesis nula: El método con estándar interno no da valores de límite mínimo de detección significativamente diferentes que el método sin estándar interno.

Resultado. Para los tres casos se rechaza hipótesis nula.

5.6.2.- CURVA DE CALIBRACION MODO SPLIT

Con los primeros resultados experimentales que se obtuvieron nos percatamos que era posible emplear de manera conveniente el modo split, con esto no fue necesario hacer diluciones con el propósito de interpolar los datos en la parte media de la curva de calibración en modo "splitless".

Por lo cual preparamos una curva con concentraciones mayores de kaurenos y empleamos el modo "split"

Se tomaron 100 microlitros de cada una de las tres soluciones madre de interés (GA, KA, MO), se adicionaron 700 microlitros de hexano grado cromatográfico. Con la anterior solución (B) se construyó la curva de calibración como sigue: Se tomaron alícuotas de la solución B y se adicionaron a cada vial 50 microlitros del estándar interno (conc.=0.46 mg/ml., se llevo a cabo el pretratamiento de extracción fase sólida (fase normal) descrito con anterioridad, el eluato obtenido se llevó a sequedad y se derivó con 50 microlitros de una mezcla de bistrimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) y clorotrimetilsilano (TMCS) en proporción 100:5. durante 20 minutos en baño maría a 60 °C. Las concentraciones finales se detallan en la siguiente tabla.

TABLA 15.- Concentración final de los tres analitos de interés y del estándar interno.

VIAL	ALICUOTA microlitros	CONCENTRACION FINAL($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			E.I.
		MO	GA	KA	
1	50	0.63	0.65	0.60	0.92
2	100	1.26	1.30	1.20	0.92
3	150	1.89	1.95	1.80	0.92
4	200	2.52	2.60	2.40	0.92
5	250	3.15	3.25	3.00	0.92

Se inyecta 1 microlitro de cada vial en el GC-FID empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7, en modo de inyección "split".

5.6.2.1.- RESULTADOS DE LAS CURVAS DE CALIBRACION CON ESTANDAR INTERNO ESTUDIO POR TRIPLICADO EMPLEANDO MODO "SPLIT".

Para el calculo de coeficientes de correlación y errores en análisis instrumental se utilizaron los criterios y definiciones del capítulo 5 de estadística para química analítica (61).

CONC. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	RELACION DE AREAS		
	1	2	3
0.63	0.56265	0.56929	0.57393
1.26	1.55869	1.37411	1.59132
1.89	1.92253	1.88611	1.64969
2.52	2.79675	2.77495	2.74915
3.15	3.43618	3.39212	3.35007

ERRORES ASOCIADOS	
Sa	0.07719
Sb	0.03695

LIMITE MINIMO DE DETECCION	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	0.35

ECUACION DE LA RECTA	
ORDENADA AL ORIGEN	A -0.04837
PENDIENTE	B 1.09754
COEF. CORRELACION	R 0.9927

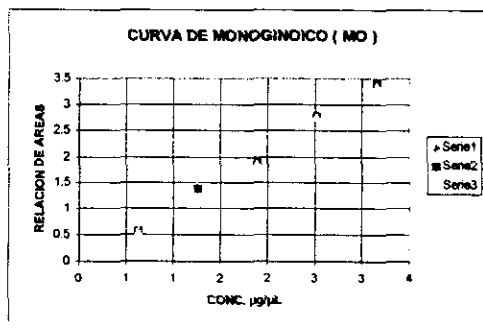


FIGURA 30.- Resultados de la calibración del ácido monoginoico con estándar interno, empleando condiciones cromatográficas de la tabla 7 y en modo "split"(abreviaturas descritas en la figura 25).

CONC. µg/µL	RELACION DE AREAS		
	1	2	3
0.65	0.53946	0.53804	0.54068
1.3	1.52093	1.52785	1.53201
1.95	2.02997	2.07505	2.00489
2.6	3.6587	3.71188	3.60751
3.25	4.46125	4.50044	4.42007

ERRORES ASOCIADOS		
Sa		0.14019
Sb		0.06503

LIMITE MINIMO DE DETECCION		µg/µL
		0.46

EQUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	-0.547866
PENDIENTE	B	1.534589
COEF. CORRELACION	R	0.9885

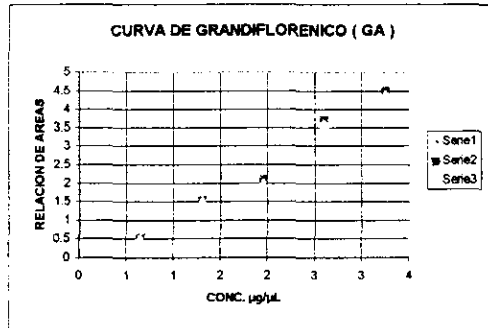


FIGURA 31.- Resultados de la calibración del ácido grandiflorénico con estándar interno, empleando condiciones cromatográficas de la tabla 7 y en modo "split" (abreviaturas descritas en la figura 25).

CONC. µg/µL	RELACION DE AREAS		
	1	2	3
0.6	0.43417	0.44287	0.43752
1.2	1.18724	1.22285	1.2041
1.8	1.85618	1.80207	1.82813
2.4	3.02562	2.95633	2.90094
3	3.49506	3.42626	3.46065

ERRORES ASOCIADOS		
Sa		0.08405
Sb		0.04223

LIMITE MINIMO DE DETECCION		µg/µL
		0.32

EQUACION DE LA RECTA		
ORDENADA AL ORIGEN	A	-0.364336
PENDIENTE	B	1.304633
COEF. CORRELACION	R	0.9933

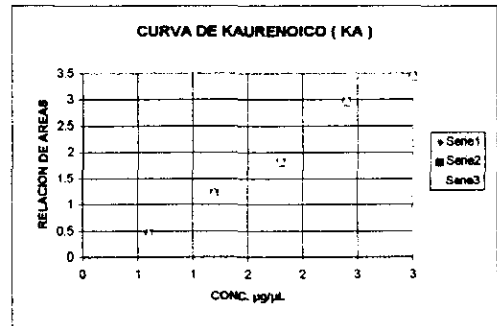


FIGURA 32.- Resultados de la calibración del ácido kaurenico con estándar interno, empleando condiciones cromatográficas de la tabla 7 y en modo "split" (abreviaturas descritas en la figura 25).

5.7.- CUANTIFICACION EN HOJA, RAIZ Y FLOR DE *Montanoa tomentosa*

Se aplicó la metodología optimizada a tres matrices de la planta, fue necesario estandarizar algunos pasos como el proceso de secado de vital importancia para la comparación entre diferentes lotes de matriz

5.7.1.- OPTIMIZACION DEL TIEMPO DE SECADO

Con objeto de hacer eficiente y rápido el secado se empleó un horno de microondas para Este propósito y se evaluó el tiempo mínimo requerido para alcanzar un peso constante. Los resultados se muestran en la figura 33.

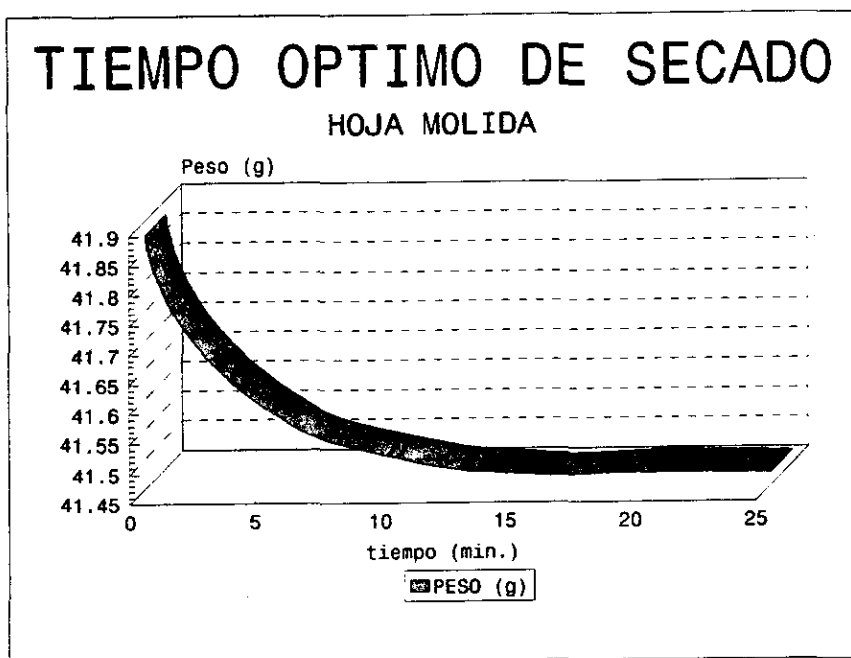


FIGURA 33.- Evaluación del tiempo óptimo para alcanzar el peso constante de las hojas molidas.

5.7.2.- CANTIDAD OPTIMA DE MATRIZ

Con el propósito de reproducir las condiciones para el análisis de una sola hoja de la planta, se decidió emplear cantidades de 50 a 200 mg de matriz molida seca.

5.7.3.- VOLUMEN OPTIMO DE EXTRACCION.

Uno de los disolventes que mostró un buen poder de extracción de la matriz vegetal fue el hexano. Para evaluar el volumen óptimo se extrajo la matriz previamente seca (empleando 200 mg) con volúmenes de hexano y cada uno de ellos se fue siguiendo por cromatografía de gases, obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA 16.- Areas obtenidas de los cuatro volúmenes evaluados.

V (Vt)	AREAS DE LOS PICOS		
	MO	GA	KA
V 1= 0.8 mL (0.8 mL)	857088	401049	319315
V2 = 0.8 mL (1.6 mL)	< 3000	> 3000	> 3000
V3 = 0.8 mL (2.4 mL)	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL
V4 = 0.8 mL (3.2 mL)	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL

V= volumen , Vt = volumen total

La cantidad de cada kaureno contenida en la matriz original se calculó interpolando en las curvas de calibración anteriormente descritas.

TABLA 17.- % de kaureno contenido y extraído* de la matriz con cada uno de los volúmenes.

% DE KAURENOS EN BASE SECA			
	MO	GA	KA
V 1= 0.8 ml	0.71(*)	0.37(*)	0.40(*)
V2 = 0.8 ml	< 0.1	> 0.1	> 0.1
V3 = 0.8 ml	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL
V4 = 0.8 ml	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL	NO HAY SEÑAL

De lo anterior podemos observar que en este experimento con el primer volumen de hexano extraemos la mayor parte de los kaurenos y para garantizar una extracción casi total emplearíamos 1.6 mL. Por lo cual nuestras extracciones posteriores usarán un volumen de 1.6 mL de hexano o más para garantizar una completa extracción.

5.7.4.- OPTIMIZACION DEL PROCESO DE EXTRACCION EN FASE SOLIDA

Al comparar el proceso de extracción en fase sólida ya optimizado en la sección 5.5.1 y aplicable al análisis de hojas con la inyección de un extracto hexánico silanizado del mismo lote de hojas. Se obtuvo lo siguiente.

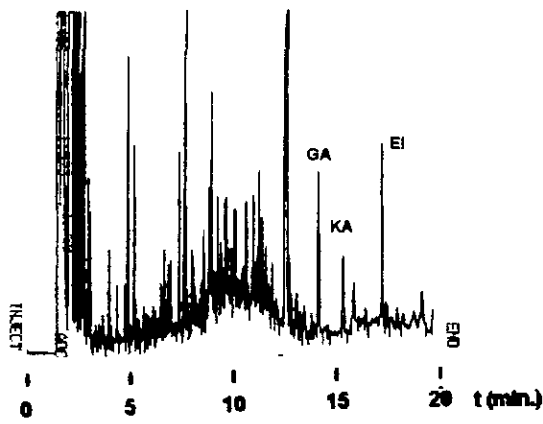


FIGURA 34.- Cromatograma (GC/FID) obtenido de un extracto hexánico silanizado empleando las condiciones descritas en la tabla 7 y en modo "split".

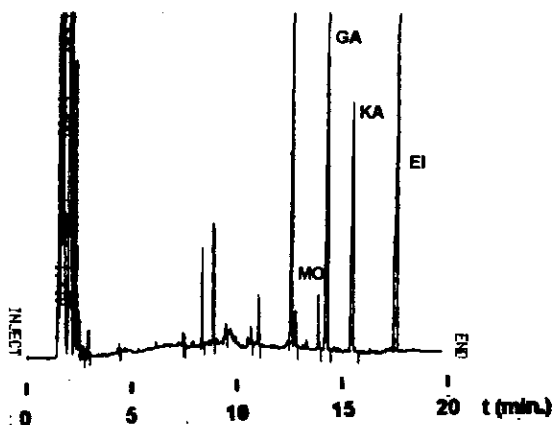


FIGURA 35.- Cromatograma (GC/FID) obtenido mediante extracción en fase sólida empleando las condiciones descritas en la tabla 7 y en modo split.

5.7.5.- EVALUACION DE RESULTADOS GLOBALES

Los resultados obtenidos del contenido de kaurenos en tres matrices (hoja, raiz y flor) de un mismo individuo se presentan a continuación.

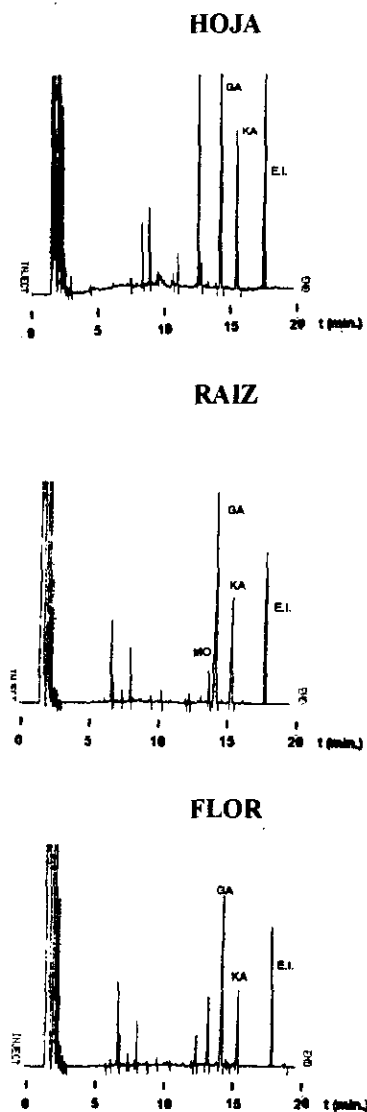


FIGURA 36.- Cromatogramas (GC/FID) obtenidos mediante extracción en fase sólida empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7 y en modo split, en hoja, raiz y flor.

La evaluación del contenido de kaurenos en cada parte del mismo individuo se efectuó por duplicado tomando un conjunto de hojas, de flores o un trozo de raíz, los cuales se molieron y secaron. De estos lotes se tomaron las cantidades para aplicar la metodología. Los resultados se tabulan a continuación

	Peso mg	KAURENOS EN BASE SECA			
		% MO	% GA	% KA	
HOJA	1	201.3	NP	0.79	0.47
	2	198.4	NP	0.77	0.46
RAIZ	1	201.5	0.10	0.75	0.33
	2	202.1	0.09	0.77	0.34
FLOR	1	201.8	NP	0.81	0.55
	2	199.5	NP	0.78	0.54

NP = NO ESTA PRESENTE

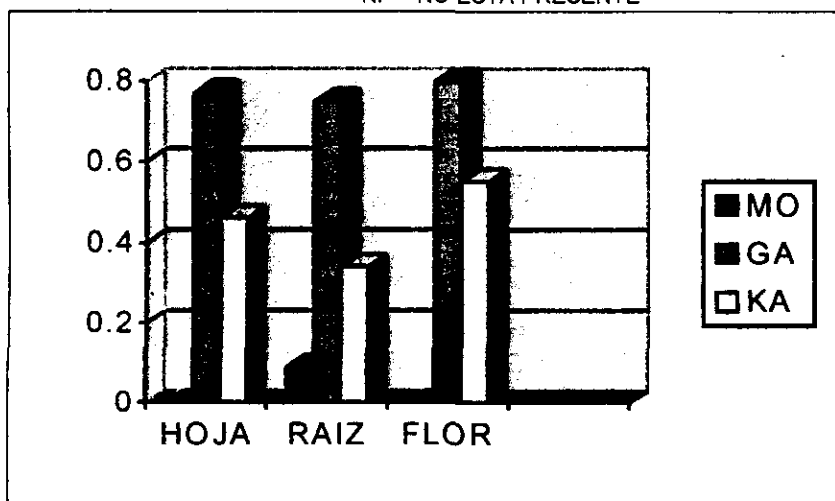


FIGURA 37.- % contenido de cada kaureno en base seca en tres matrices.

5.8.- ESTUDIO ALEATORIO DE CONTENIDO DE KAURENOS EN CUATRO INDIVIDUOS DE ZOAPATLE DE CIUDAD UNIVERSITARIA

Se colectaron hojas de cuatro individuos de zoapatle en diferentes zonas de Ciudad Universitaria, se analizaron con la metodología desarrollada y se calculó el porcentaje de cada uno de los kaurenos contenidos en base seca.

Los resultados encontrados se expresan a continuación.

	Peso mg	KAURENOS EN BASE SECA		
		% MO	% GA	% KA
A1	200.7	0.12	0.94	0.57
A2	199.2	0.12	0.94	0.56
B1	200.3	0.85	0.77	0.40
B2	200.2	0.85	0.76	0.39
C1	201.1	0.08	0.78	0.43
C2	199.7	0.10	0.79	0.42
D1	201	0.93	0.47	0.27
D2	202.7	0.92	0.46	0.25

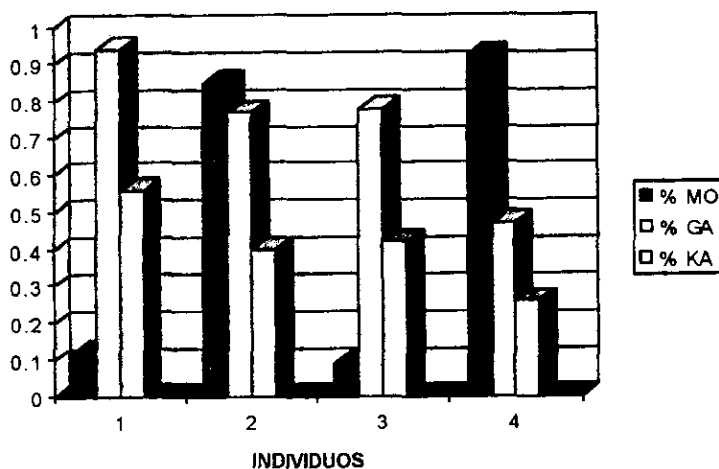


FIGURA 38.- % de cada kaureno en base seca presentes en hojas en cuatro individuos seleccionados al azar de Ciudad Universitaria.

5.9.- DETERMINACION DE KAURENOS EN INFUSIONES ACUOSAS DE Montanoa tomentosa

Se conocía con precisión el contenido de kaurenos en un lote de hojas que se evaluó anteriormente, con él se prepararon infusiones acuosas que se evaluaron con dos metodologías optimizadas 1) extracción líquido - líquido con EFS (fase normal) y 2) extracción en fase sólida (fase reversa). Los resultados de cada uno de ellos se muestran a continuación.

5.9.1.- EVALUACION DE LA EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO PARA INFUSIONES ACUOSAS CON EFS (FASE NORMAL)

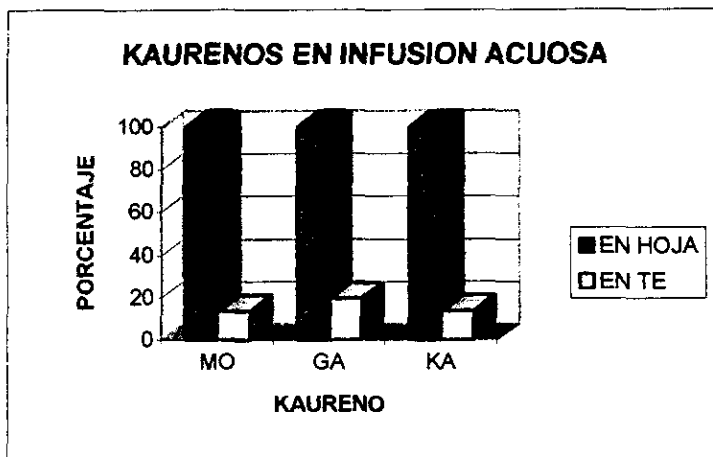
Con objeto de tener un marco de referencia con el cual comparar se optimizó un método de extracción líquido - líquido ya existente para infusiones acuosas y se adicionó la técnica optimizada de extracción en fase sólida (fase normal). El procedimiento se describe a continuación:

- 1).- Se preparó un té (infusión acuosa) con 5 g de hoja de zoapatle en 100 mL de agua destilada, se dejó ebulir durante cinco minutos.
- 2).- Se filtró todavía caliente por papel filtro, se dejó enfriar el filtrado
- 3).- Del filtrado se tomaron cinco mililitros (se hicieron cinco réplicas) de infusión acuosa y se extrajeron con tres porciones de 5 mL de hexano.
- 4) Se evaporó a sequedad y se reconstituyó con un mililitro de hexano
- 5) Se aplicó la metodología desarrollada mediante EFS (fase normal).
- 6) Se derivó e inyectó en el cromatografo de gases empleando las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7.
- 7) En los casos de que las muestras no se pudieran interpolar por estar por arriba del intervalo de la curva de calibración, se efectuaron las diluciones pertinentes para interpolarlo.

- 8) Cuando las concentraciones quedaron por debajo del límite mínimo de detección se cambió el modo "split" por el "splitless" empleando la curva de calibración correspondiente.

Los resultados obtenidos se presentan a continuación

REPLICAS	% RECUPERADO		
	MO	GA	KA
1	13.70	19.43	13.27
2	12.53	17.70	12.35
3	14.88	21.29	14.86
4	11.20	17.37	12.00
5	15.69	22.04	15.20
PROMEDIO	13.60	19.58	13.53
D.E.	1.80	2.07	1.44



D.E. = DESVIACION ESTANDAR

FIGURA 39.- Evaluación del % que se extrae de las hojas al preparar una infusión acuosa y extraerla con extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (fase normal).

5.9.2.- OPTIMIZACION DE EFS (FASE REVERSA).

Otra alternativa viable para infusiones acuosas es el empleo de extracción en fase sólida (fase reversa). Primero se planeó la estrategia de lavado y elución y se sometio a una optimización de cada paso.

La optimización consistió en efectuar pruebas para obtener los volúmenes adecuados para los siguientes pasos:

a).- El volumen necesario para hacer el paso de lavado favoreciendo la retención de la familia de kaurenos en la columna de EFS.

b).- La composición y el volumen necesario de la fase móvil que nos permitió eluir la familia de kaurenos.

El seguimiento de los eluatos provenientes se evaluó inicialmente con cromatografía en capa fina y se ratificó con cromatografía de gases.

La optimización de los tipos y cantidades de fase móvil que se emplearon conllevó al procedimiento estándar que a continuación se resume:

A una columna de extracción fase sólida (fase reversa, C18, 500 mg)

- 1).- Acondicionarla con 2 mL de metanol y posteriormente con 2 mL de HCl (0.01 N)
- 2).- Sin dejar que la columna se seque, colocar un mL de infusión acuosa.
- 3).- lavar con un mL de HCl (0.01 N)
- 4).- Secar la columna con corriente de nitrógeno durante 10 min.
- 4).- Eluir con 3 mL de una mezcla N-Hexano-Acetato de etilo (85:15).
- 5).- El eluato obtenido se lleva a sequedad
- 6).- Derivar con 50 μ L de una mezcla de BSTFA:TMCS (100:5) , durante 20 minutos en un baño maría a 60 ° C.
- 7).- Inyectar en el cromatógrafo de gases el derivado con las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 7.

5.9.3.- EVALUACION DE LA RECUPERACION DE KAURENOS MEDIANTE EXTRACCION EN FASE SOLIDA (FASE REVERSA)

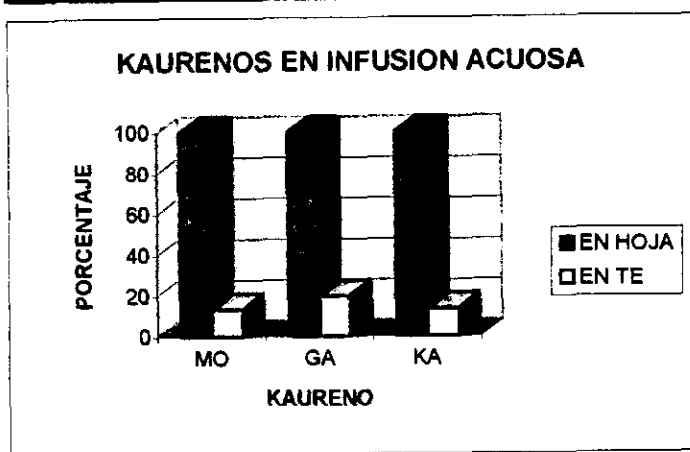
Se efectuó un estudio por quintuplicado del extracto acuoso de una matriz con una concentración conocida de la familia de kaurenos que permitió evaluar la eficiencia de la extracción en EFS (FASE REVERSA).

Se empleó el procedimiento optimizado de EFS (Fase reversa).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

REPLICAS	% RECUPERADO		
	MO	GA	KA
1	10.75	7.69	8.26
2	12.50	8.35	6.49
3	10.01	8.14	8.90
4	9.61	8.23	6.14
5	8.86	10.22	6.52

PROMEDIO	10.35	8.53	7.26
D.E.	1.38	0.98	1.23



D.E. = DESVIACION ESTANDAR

FIGURA 40.- Evaluación del % que se extrae de las hojas de un lote que contiene los tres kaurenos al preparar una infusión acuosa y extraerla con extracción en fase sólida (fase reversa).

Un ejemplo de un cromatograma obtenido a partir de una infusión acuosa (té) y extraído con extracción en fase sólida (fase reversa) se muestra a continuación.

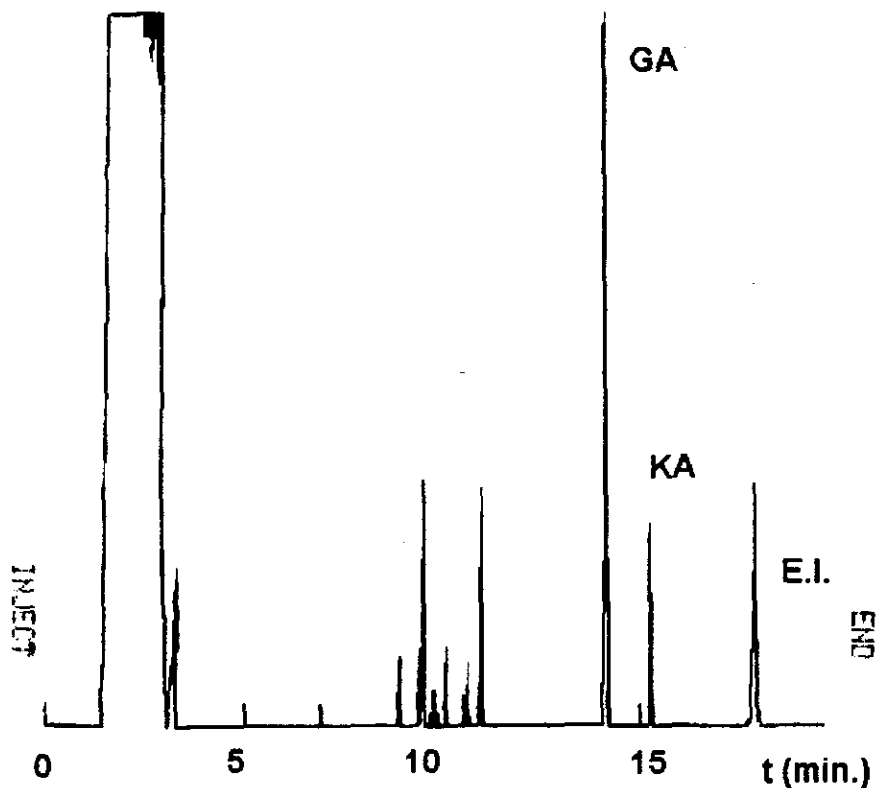


FIGURA 41.- Cromatograma obtenido de una infusión acuosa en un GC/FID con las condiciones cromatográficas de la tabla 7 y en modo "splitless" con un lote de hojas que sólo contiene dos de los kaurenos.

5.9.4.- COMPARACION ESTADISTICA ENTRE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO CON EXTRACCION EN FASE SOLIDA FASE NORMAL (ELL-EFS-FN) Y EXTRACCION EN FASE SOLIDA FASE REVERSA (EFS-FR).

La comparación estadística entre ambas metodologías se realizó con una prueba t para comparación entre medias y una prueba F para las desviaciones estándar, los resultados se presentan a continuación:

Tabla 18.- Comparación entre las medias y desviaciones estándar para monoginoico entre ambas metodologías.

MONOGINOICO

REPLICAS	ELL-EFS-FN	EFS-FR
1	13.70	10.75
2	12.53	12.50
3	14.88	10.01
4	11.20	9.61
5	15.69	8.86

MEDIA	13.60	10.35
S =	1.80	1.38
S2 =	3.24	1.90

A	t calculada	t tablas (95 %)
	3.21	2.31

B	F calculada	F tablas (95 %)
	1.71	6.39

S = Desviación estándar, S2 = Desviación estándar al cuadrado

Hipótesis nula A: La media dada por ambas metodologías es la misma.

Resultado: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis nula B: La precisión entre ambas metodologías no difiere significativamente

Resultado: Se acepta la hipótesis nula.

Tabla 19.- Comparación entre las medias y desviaciones estándar para grandifloreñico entre ambas metodologías.

GRANDIFLOREÑICO

REPLICAS	ELL-EFS-FN	EFS-FR
1	19.43	7.69
2	17.70	8.35
3	21.29	8.14
4	17.37	8.23
5	22.04	10.22

MEDIA	19.57	8.53
S =	2.07	0.98
S2 =	4.28	0.96

A

t calculada		t tablas (95 %)
10.79		2.31

B

F calculada		F tablas (95 %)
4.46		6.39

S = Desviación estándar, S2 = Desviación estándar al cuadrado

Hipótesis nula A: La media dada por ambas metodologías es la misma.

Resultado: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis nula B: La precisión entre ambas metodologías no difiere significativamente

Resultado: Se acepta la hipótesis nula.

Tabla 20.- Comparación entre las medias y desviaciones estándar para kaurenoico entre ambas metodologías.

KAURENOICO		
REPLICAS	ELL-EFS-FN	EFS-FR
1	13.27	8.26
2	12.35	6.49
3	14.86	8.90
4	12.00	6.14
5	15.20	6.52
MEDIA	13.54	7.26
S =	1.44	1.23
S2 =	2.07	1.51

A	t calculada		t tablas (95 %)
	7.41		2.31

B	F calculada		F tablas (95 %)
	1.37		6.39

S = Desviación estándar, S2 = Desviación estándar al cuadrado

Hipótesis nula A: La media dada por ambas metodologías es la misma.

Resultado: Se rechaza la hipótesis nula.

Hipótesis nula B: La precisión entre ambas metodologías no difiere significativamente

Resultado: Se acepta la hipótesis nula.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

DISCUSION

El primer problema al que se enfrenta un químico al desarrollar y optimizar una metodología analítica, es contar con estándares o sustancias de referencia que le permitan evaluar cada uno de los procedimientos que van constituyendo una técnica analítica y que finalmente conforman una metodología.

El desarrollo de una metodología analítica que posea características como reproducibilidad, precisión y exactitud, esta muy cercanamente relacionada con el empleo de estándares de una calidad aceptable. Este desarrollo se complica cuando el o los analitos deben ser separados y purificados partiendo de mezclas complejas como es el caso de los metabolitos en plantas.

En escala mundial la tendencia a aislar y caracterizar una amplia gama de metabolitos secundarios va en aumento, como se muestra en las figuras 6 y 7.

Sin embargo, es notorio que la mayoría de los estudios se detienen en el proceso de caracterización estructural y no avanzan posteriormente en los aspectos analíticos cuantitativos. Esta deficiencia impide aumentar el alcance de la investigación fitoquímica limitando el potencial de conocimiento científico respecto a los metabolitos de plantas; o las posibles ventajas económicas que pueden derivar de él.

Los resultados del presente trabajo pueden considerarse como un ejemplo claro del potencial que ofrece el desarrollo metodológico analítico específico para una familia de compuestos.

Como se menciona en los antecedentes, en el caso del zoapatle se trata de una familia que ha sido estudiada con anterioridad, se cuenta con estándares y se tiene un conocimiento claro de la estrategia de aislamiento. Partiendo de esta base, un primer paso fue confirmar la identidad y pureza de los estándares. Las técnicas analíticas que se emplearon satisfactoriamente para este fin, son la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Los resultados obtenidos (sección 5.2) coincidieron plenamente con los que citaba la literatura y con estudios anteriores.

Para la evaluación de la pureza se partió en primera instancia comparando el punto de fusión de cada uno de los metabolitos reportados en artículos anteriores (tabla 2),

encontrándose que correspondían con los citados, la segunda prueba fue con la cromatografía en capa delgada (CCD), que a pesar de que los tres estándares contaban con el mismo Rf no se evidenció ninguna mancha adicional y típicas en los extractos de la matriz (Figura 12). La tercera evidencia fue su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, y para ello fue necesaria su derivación química (Figura 13). Los resultados obtenidos mostraron un sólo pico y un espectro de masas que correspondía plenamente con los derivados sililados (Figuras 14, 15 y 16).

La evidencia que proporcionaron estas cinco técnicas analíticas demostró que los estándares empleados eran de la calidad requerida.

Debido a que uno de los objetivos era trabajar directamente con la matriz original, se experimentó inicialmente con el extracto hexánico directamente silanizándolo (Fig. 34). Los resultados obtenidos indicaron la conveniencia de la aplicación de un tratamiento previo de purificación o pretratamiento. Simultáneamente se optimizaron las condiciones cromatográficas para la separación en cromatografía de gases (sección 5.3) y las condiciones de separación en capa delgada (sección 5.4). Esta última nos permitió evaluar diferentes fases móviles para posteriormente extrapolarlas a la extracción en fase sólida (EFS). Es pertinente enfatizar que la cromatografía en capa delgada resultó un excelente auxiliar en la selección de condiciones de retención y elución óptimas, cuya extrapolación facilitó la implementación satisfactoria de la EFS.

Este hecho tiene gran relevancia al considerar la posibilidad de extender la aplicación de esta metodología al estudio de metabolitos secundarios distintos.

Dado que se cuenta con una base amplia de información cualitativa sobre el comportamiento de numerosos metabolitos en CCD (usualmente en forma normal). Las posibilidades de la aplicación de la metodología de EFS son previsiblemente muy amplias. Los ajustes necesarios para una aplicación exitosa al estudio de otros metabolitos pueden considerarse mínimos.

Con el soporte de CCD se lograron optimizar; los volúmenes y condiciones necesarias para el aislamiento por EFS de la familia de kaurenos a estudiar. En esta fase se hizo

necesario evaluar la eficiencia de la extracción, y como lo muestran los resultados (Fig. 20). Esta fue superior al 98 % en cada uno de los casos.

El siguiente paso fue la obtención de curvas de calibración. El primer problema por resolver deriva del hecho que la metodología se compone de una serie de pasos que están sujetos a errores aleatorios y sistemáticos. Conociendo que la adición de un estándar interno minimiza este tipo de errores, era necesario sustentar su empleo. Los experimentos se diseñaron con este propósito y los resultados evidenciaron que el empleo de un estándar interno con características similares a los analitos de interés mejoró el coeficiente de correlación de las curvas de calibración (sección 5.6.1.).

Estadísticamente fue necesario demostrar si la comparación de los resultados obtenidos con y sin estándar interno demostraban ser significativos. El primer resultado (tabla 12) muestra que hay correlación entre la concentración y la relación de áreas y/o áreas con un intervalo de confianza del 99 % en las seis curvas. Lo anterior lo podemos considerar como una evidencia de linealidad apoyados también en las gráficas de las curvas de calibración.

La comparación de desviaciones estándar entre ambas metodologías nos proporciona evidencia de precisión; la comparación entre pendientes (tabla 13) demuestra con un intervalo de confianza del 95 % que la pendiente asociada al método usando un estándar interno, es más precisa que sin estándar interno.

El límite de detección que se logra en función del uso de un estándar interno, resultó significativamente diferente y menor para el caso donde se emplea dicho estándar (tabla 14).

En conjunto las evidencias anteriores muestran con un intervalo aceptable de confianza que en general el método con estándar interno es lineal, preciso y tiene un límite mínimo de detección menor. Podemos entonces sustentar que el método es reproducible.

Uno de los objetivos que se perseguían desde el inicio de este trabajo era que la metodología permitiera el empleo de pocos miligramos de matriz (ca. 50-100 mg), lo anterior nos conduciría a la detección de trazas en el cromatógrafo, para lo cual se construyeron curvas de calibración en el modo "splitless". Los resultados nos permitieron

ver que es posible la detección de los metabolitos de interés en ng de analito en gramos de matriz (ppb).

Desde los primeros resultados experimentales resultó evidente que el modo “ split “ sería una alternativa adecuada para evitar pasos de dilución. Por esta razón se construyeron y evaluaron curvas de calibración en este modo por triplicado con resultados satisfactorios (sección 5.6.2.1).

El trabajo con las matrices a evaluar sugirió la optimización de ciertos pasos para dotar de reproducibilidad a la presente metodología en conjunto. Estos pasos fueron por ejemplo el tiempo óptimo de secado de las matrices a evaluar, así como del volumen necesario para extraer en su totalidad los kaurenos de la matriz (sección 5.7).

El punto culminante fue mostrar como operaba la metodología en las matrices reales por explorar. Los resultados de los experimentos (sección 5.7.5). evidencian la robustez de la metodología, que no sólo posee un valor cuantitativo sino que permite evidenciar que en un individuo de zoapatle existen **diferencias individuales** en cuanto a la concentración en tres diferentes partes de la planta, a la vez que en una de ellas se evidencia la presencia del ácido monoginoico, el cual no se encuentra presente en las otras.

Lo anterior crea las condiciones ideales para un estudio sistemático completo de las concentraciones de cada kaureno en distintas partes de la planta y que connotaciones globales pueda tener esto al correlacionarlo con diversas variables. Estos datos muestran un claro potencial de la metodología descrita para modelar con gran precisión, la producción de metabolitos secundarios en función de variables de muy variada naturaleza (agronómicos, biotecnológicos, bioquímicos, etc.).

Una de las cuestiones que dió origen a una controversia en los últimos años, fue establecer si estos kaurenos se encuentran en una infusión acuosa. Con la evidencia cualitativa (50), se decidió emplear la presente metodología con una extracción líquido-líquido y acoplarla a la EFS (fase normal). El resultado fue contundente y revelador puesto que muestra que al hacer un “té” con las hojas siguiendo los procedimientos empíricos, los porcentajes de ácidos monoginoico y kaurenoico son superiores al 13 %, mientras para el caso de grandiflorénico que tiene un doble enlace adicional el porcentaje se eleva hasta un

20 % con respecto a las hojas que contenían los tres y cuyo contenido se consideró el 100 % (sección 5.9.1).

Lo anterior dió la pauta para investigar la EFS en fase reversa para poder enfrentar problemas con matrices de naturaleza acuosa. Esto derivó en el desarrollo de la metodología descrita en la parte 5.9.2: Los resultados (sección 5.9.4) muestran que para los tres kaurenos la metodología que conjunta extracción líquido-líquido con extracción en fase sólida en fase normal obtiene porcentajes mayores de recuperación. De acuerdo a este resultado se consideró que las condiciones en fase reversa tendrán que ser optimizadas para establecer su aplicabilidad y su valía como procedimiento alternativo.

CONCLUSIONES

El desarrollo de una metodología analítica requiere de un proceso sistemático de evaluación y optimización de cada paso que la conforman. Muchos de ellos son técnicas completas que al unirse le confieren su potencialidad, a la vez que son la fuente de errores muy diversos que deben conocerse y minimizarse.

Las características que sobresalen de este trabajo se presentan a continuación:

- 1).- Se mejoraron las condiciones para la cuantificación de los tres kaurenos en cuatro diferentes matrices (hojas, raíz, flor e infusiones acuosas).
- 2).- El empleo del pretratamiento (prepurificación) por extracción en fase sólida condujo a la disminución de interferencias, disminuyó el nivel de ruido durante la corrida cromatográfica y minimizó el deterioro gradual de la cabeza de la columna capilar.
- 3).- Fue posible llevar la cuantificación hasta niveles de ng/g (ppb) de cada uno de los tres kaurenos.
- 4).- La metodología resultó reproducible en un nivel muy satisfactorio.
- 5).- La cantidad de matriz necesaria para el análisis es entre 50 y 200 mg (i.e. menos de lo que pesa una hoja seca de la planta).
- 6).- Se demostró cuantitativamente la presencia de los kaurenos en la infusión acuosa.

Los resultados globales del trabajo con las diferentes matrices dan la pauta para estudios más profundos sobre el papel que estos desempeñan en la planta y sobre las variables que regulan su biosíntesis.

La aplicación creativa de los métodos de la química analítica contemporánea introduce nuevas perspectivas para extender y profundizar el conocimiento científico sobre uno de los más valiosos y estratégicos recursos renovables que posee México: su flora medicinal.

Lo anterior nos permite vislumbrar para el químico analítico un papel sumamente importante en los estudios modernos de fitoquímica. En la búsqueda de nuevos y más profundos conocimientos científicos sobre metabolitos secundarios de plantas, la química analítica representa una contribución fundamental.

BIBLIOGRAFIA

- (1) A. Estrada, R. G. Enríquez, X. Lozoya, E. Bejar, H. Girón, H. PonceMonter and A.J. Gallegos, *Contraception*, 27(3) , 227 (1983)
- (2) Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Tomo III, 1ª Edición, Instituto Nacional Indigenista, 1994
- (3) Martín de la Cruz: *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, edición facsimilar del manuscrito de la traducción al latín hecha por Juan Badiano en 1552. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1964.
- (4) F. Bernardino de Sahagún. *Historia General de las Cosas de Nueva España*. Porrúa, México (1956)
- (5) *Códice Florentino*, Archivo General de la Nación 3 v., México,.
- (6) F. Hernández. *Historia Natural de la Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1960.
- (7) Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*, 3a ed, ediciones Botas, México, (1944).
- (8) F. Altamirano, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 1, 108 (1895)
- (9) F. Cota, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 2, 43 (1897)
- (10) J. V. De Lille y E. Ramírez, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 4(2) , 95 (1933)

Los resultados globales del trabajo con las diferentes matrices dan la pauta para estudios más profundos sobre el papel que estos desempeñan en la planta y sobre las variables que regulan su biosíntesis.

La aplicación creativa de los métodos de la química analítica contemporánea introduce nuevas perspectivas para extender y profundizar el conocimiento científico sobre uno de los más valiosos y estratégicos recursos renovables que posee México: su flora medicinal.

Lo anterior nos permite vislumbrar para el químico analítico un papel sumamente importante en los estudios modernos de fitoquímica. En la búsqueda de nuevos y más profundos conocimientos científicos sobre metabolitos secundarios de plantas, la química analítica representa una contribución fundamental.

BIBLIOGRAFIA

- (1) A. Estrada, R. G. Enriquez, X. Lozoya, E. Bejar, H. Girón, H. PonceMonter and A.J. Gallegos, *Contraception*, 27(3), 227 (1983)
- (2) Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Tomo III, 1ª Edición, Instituto Nacional Indigenista, 1994
- (3) Martín de la Cruz: *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, edición facsimilar del manuscrito de la traducción al latín hecha por Juan Badiano en 1552. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, 1964.
- (4) F. Bernardino de Sahagún. *Historia General de las Cosas de Nueva España*. Porrúa, México (1956)
- (5) *Códice Florentino*, Archivo General de la Nación 3 v., México,.
- (6) F. Hernández. *Historia Natural de la Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1960.
- (7) Martínez, M. *Las plantas medicinales de México*, 3a ed, ediciones Botas, México, (1944).
- (8) F. Altamirano, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 1, 108 (1895)
- (9) F. Cota, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 2, 43 (1897)
- (10) J. V. De Lille y E. Ramírez, *An. Ins. Med. Nac. Mex.*, 4(2), 95 (1933)

- (11) J. Derbez, E. Pardo y E. C. Del Pozo, *Bol. Ins. Est. Med. Biol.*, 56, 127 (1945)
- (12) L. Senties y R. Amayo, *Gac. Med. Mex.* XCIV, 4, 343 (1964)
- (13) Y. Caballero y F. Walls, *Bol. Inst. Quim. UNAM*, 22, 79 (1970)
- (14) J. Calderón, L. Ocampo y J. Ferrer, *Vet. Mex.*, 8, 78 (1977).
- (15) Landgren, B., Aedo, A., Hagenfeldt, K. and Diczfalusy, E., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135(4), 487 (1985).
- (16) Gallegos, A., *Contraception* 31(5) :487 (1985).
- (17) Bejar, E. El efecto de decocción de *Montanoa tomentosa* ssp. (zoapatle) y de su constituyente activo el ácido grandiflorénico sobre la contractilidad uterina. Tesis de Maestría en Biología Experimental U.A.M.I., (1985).
- (18) J. L. Mateos, R. Noreiga, Huetteman, R. and Kanojia, R. M. U.S.Pat. 3996132 (1979)
- (19) S. Levine, R. Adams, R. Chen, L. Cotter, A. Hirsch, V. Kane, R. Kanojia, C. Shaw, M. Watcher, E. Chin, R. Huettemann and P. Androstowski, *J. Am. Chem. Sci.*, 101(12), 3404 (1979).
- (20) X. Lozoya, R. G. Enriquez, E. Bejar, A. Estrada, H. Girón, H. Ponce-Monter and A.J. Gallegos, *Contraception*, 27(3), 267 (1983).
- (21) Bejar, E., Enriquez, R., and Lozoya, X., *Journal of Ethnopharmacology*, 11: 87. (1984).
- (22) Bejar, E., Lozoya, X., Enriquez, R., and Escobar L., *Archivos de la Investigación Médica*, Vol. 15(3), 223, (1984).
- (23) F. Piozzi, M. Marino and V. Sprio, *Can. J. Chem.*, 50, 109 (1972)
- (24) Oshima, Y., Wong, S., Konno, C., Cordell, G., Waller, D., Soejarto, D., and Fong, H. J. *Nat. Prod.* 49(2) :313, (1986).
- (25) Horhn, D., Ericson, E. Lui, M. and Probst, A. *Contraception* 23(7) :133, (1983).
- (26) Perrusquia, M., Sanchez, E., Ponce Monter, H., Estrada, A., Pedron, N., Valencia, A. and Gallegos A. *Contraception* 31(5) :543, (1985).
- (27) Enriquez, R., Bejar, E., y Lozoya, X. *Arch. Invest. Med.* 15 : 236, (1984).
- (28) Moriwaki, K., Gomi, M., Itoh, Y., Iida, S., Tsugawa, M., Tarui, S., Fujii, K., Node, M. and Kajimoto, T. *Life Science* 38(5) : 453, (1986).

- (29) v Lu, Z., Xue, H., Tu, Z., Konno, C., Waller, D., Soejarto, D., Cordell, G. and Fong, H. J. *Nat. Prod.* 50 (5) : 995. (1987).
- (30) Trease, G. E. *Tratado de farmacognosia*. Editorial interamericana. 12 ed., México, 281, (1987).
- (31) Ruzicka, L. *Experientia*, 9: 357, (1953).
- (32) Ruzicka, L. *Proc. Chem. Soc.*, 341, (1959).
- (33) Ruzicka, L., *Pure Appl. Chem.*, 6:493, (1963).
- (34) Richards, J. H. and Hendrickson, J. B. *Biosynthesis of terpenes, steroids and acetogenins*, W.A. Benjamin, Inc., New York, (1964).
- (35) Sukh, D. and Renuka, M., *Handbook of terpenoids*, Vol. II , CRC Press, Boca Raton Florida, 1985,
- (36) Simonsen, J.L. and Barton, D.H.R., *The terpenes*, Vol.III , University Press Cambridge, (1951).
- (37) Devon, T.K. and Scott, A.I., *Handbook of naturally occurring compounds*, Vol.II, Academic Press, New York, (1972).
- (38) Goodwin, T.W., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30: 369, (1979).
- (39) Stermitz, F.R. and Rapoport, H. J. *Am. Chem. Soc.*, 93:4045, (1961).
- (40) K.R. Gustafson, N.H.G. Munro, et al., *Tetrahedron*, 47, 4547 (1991).
- (41) Y.H.Hui, C.J. Chang and D.L.Smith, *Pharm. Res.*, 7, 376 (1990).
- (42) S.D. Ancona, M. Magon and C. Milanesi, *Fitoterapia*, 60, 509 (1992)
- (43) E.g.Q.X. Lin, H. X. Cao and D.Xie, *Chem. Abstr.*, 116, 158682a (1992)
- (44) E.g.D.H.Miles and C.Chittawong, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1591 (1980)
- (45) Lisy, J.M. et al, *J. Chem. Soc. , Chem.Commun.*, 406 (1975)
- (46) Fujita, T. et al, *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1261 (1974)
- (47) E.G. Okawa, *Chem. Abst.* 116, 254118p (1992)
- (48) Enríquez, R. G., Escobar, L. I., Romero, M.L., Chávez, M. A., Lozoya, X. J. *Chromatogr.*, 258, 297-301 (1983)
- (49) Dong, X., Hamburger, M. O., Cordell, G. A. Fong, H. H. S., *Planta Medica.*, 55, 185-187 (1989)

- (50) Raúl G. Enríquez, Elias Miranda-G, Benjamin Ortiz, Ismael León, Gil Magos, Araceli Peña, William F. Reynolds, and Dino Gnecco., *Planta Medica.*, 62, 185-187 (1996).
- (51) Sakodynskii, K. J. *Chromatogr.*, 73:303, (1972).
- (52) Martin, A.J.P. and Synge, B.L.M. *Biochem.J.*, 35:1358, (1941).
- (53) James A.T. and Martin, A.J.P. *Biochem. J.*, 50:679, (1952).
- (54) Golay, M.J. *Gas Chromatography*, D.H. Desty, Butterworths London , (1958).
- (55) Porath J. and Flodin, P. *Nature*, 183:1657 (1959).
- (56) Knapp, D.R. *Handbook of analytical derivatization reactions*, John Wiley & Sons, New York, (1979).
- (57) Pierce, A.E., *Silylation of organic compounds*, Pierce chemical Rockford, (1968).
- (58) Enriquez, R.G., Barajas, J., Ortiz, B., Lough, A., Reynolds, F., Yu, M., Leon, I. and Gnecco, D. *Can.J.Chem.*, 75: 342 , (1997).
- (59) Brieskom C.H. and Poblaman E. *Chem Ber.*, 102:2621, (1969).
- (60) Cannon, J.R., Chow, P.W., Jefferies, P.F. and Meechan, G. *Austral.J. Chem.*, 19 (1966).
- (61) Miller, J.C. and Miller, J.N., *Estadística para química analítica*, Addison Wesley Iberoamericana, Wilmington Delaware, (1993).