



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA  
RESOLUCION PARA LA VALORACION DE  
CAMAZULENO EN EL ACEITE ESENCIAL DE  
*Brickellia veronicaefolia* GRAY (ASTERACEAE)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

**FRANCISCO JAVIER GARCIA VILLALOBOS**



MEXICO, D.F.



2005

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

m. 339733



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.

Autotizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Francisco Javier

García Villalobos

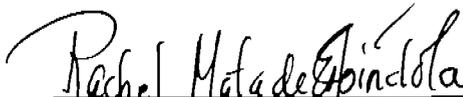
FECHA: 06 ENE 05

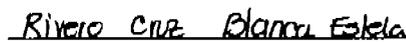
FIRMA: 

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** María Isabel Aguilar Laurents  
**VOCAL:** Rachel Mata Essayag  
**SECRETARIO:** Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
**1er. SUPLENTE:** Blanca Estela Rivero Cruz  
**2o. SUPLENTE:** Mabel Clara Fragoso Serrano

**Laboratorio 124, Facultad de Química**

  
\_\_\_\_\_  
**Asesor de Tesis: Dra. Rachel Mata Essayag**

  
\_\_\_\_\_  
**Supervisor Técnico: M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz**

  
\_\_\_\_\_  
**Sustentante: Francisco Javier García Villalobos**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Rachel Mata por invitarme a ser parte de su equipo de trabajo y por proporcionarme toda su infraestructura técnica para la realización de este proyecto. Gracias por su confianza y por depositar en mi parte de sus anhelos.

Agradezco también a Blanca Rivero por compartir conmigo sus conocimientos y por esa imagen que ha dejado en mi.

A Iliana Morales agradezco por su ayuda y apoyo incondicional, por el soporte técnico y sobre todo por saber ser una gran amiga. Te quiero mucho, gracias por estar conmigo.

Gracias a mi maestra Isabel Rivero por convencerme para trabajar en este proyecto y por su apoyo.

De manera muy especial quiero darle las gracias al M. en C. Juan Manuel Rodríguez por su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo, por compartir conmigo su experiencia y por cada recomendación. Además por estar siempre dispuesto a escuchar y despejar cada duda.

Quiero agradecer también a Angélica Merlo y a Maricarmen de la Garza por su apoyo durante la validación del método.

Agradezco al Dr. Carlos Cerda, investigador del CINVESTAV IPN, por brindar las facilidades para el registro de los espectros de masas y RMN.

A los miembros del Jurado, muchas gracias por su disposición para obtener lo mejor de estas letras.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio 124: Isolda, Araceli, Verónica, Francisco, Laurita y Dra. Ángeles, por el compañerismo y la amistad, pero sobre todo por saber emprender un vuelo en compañía, siempre con una sonrisa.

Este trabajo se pudo realizar gracias al apoyo económico de CONACyT – Sector Salud (18 / A-1).

## AGRADECIMIENTOS

**Gracias a mis papás:** Sarita y Régulo, por hacer de mi un ser con valores para afrontar la vida, por ser los únicos patrocinadores de mi destino y financiar cada sueño. Gracias por ese ejemplo de superación. Este trabajo es gracias a ustedes por todo lo que me dan sin esperar. Los amo.

A mi extensa familia, orgullo de mi nacionalidad mexicana. A mi tía Ale y mi tío Félix, gracias por todo el apoyo y cariño desde el principio.

A todos los que acompañan mi camino: mis queridos amigos. Un agradecimiento por cada huella que dejan en mí: Guille, Carmen, Paty, Lety, Betty, Cyntia y Gerardo. Muchas gracias por compartir conmigo algunos de mis pasos más grandes como lo es este, por estar cuando hacen falta y por saber dar una linda palabra.

Y por último, pero siempre primero: Gracias Dios por permitirme pisar este suelo, por darme la libertad de ser y hacer, por pensar en mí y por darme la bendición de cada mañana. Gracias por cada mensaje que haz dejado sobre mi piel y por cada suspiro que sale de mis labios. Por darme salud, un cuerpo para trabajar y estar con ellos y un espíritu que me permite amar y razonar al mismo tiempo. Yo sé que esperas más de mí cada día, por eso trato de ser más para mí, para los míos, pero sobre todo para ti. Gracias por confiar en mí y por no dejarme nunca solo.

## DEDICATORIA

**Para mis hermanos:** Ilse y Erick con todo mi cariño. Espero que el reflejo de mi trabajo sea su corazón, dejar en ustedes más que un buen ejemplo y que sean más de lo poco que yo he podido ser.

Deben saber que todo lo que hago lleva parte de mi amor hacia ustedes, porque han sabido ser más que una compañía, más que un par de amigos. Porque en ustedes encuentro cada sonrisa que me falta, la palabra inocente que no veo en el resto del mundo, la motivación más fuerte para seguir caminando y la prueba más grande de que Dios existe. Los amo.

# ÍNDICE

	Página
<b>I. ANTECEDENTES</b>	2
1.1 Aseguramiento de la calidad de los medicamentos herbolarios	6
1.1.1 Composición variable de las drogas crudas	11
1.1.2 Importancia de la estandarización	13
1.2 Desarrollo de métodos analíticos para el control de calidad	15
1.2.1 Validación de métodos analíticos	16
1.2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	18
1.3 Antecedentes de la especie <i>Brickellia veronicaefolia</i> Gray (Asteraceae)	21
1.3.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos	21
1.3.2 Estudios fitoquímicos sobre la especie <i>Brickellia veronicaefolia</i>	22
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	28
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	30
3.1 Material vegetal	30
3.2 Preparación del aceite esencial a partir de los distintos lotes de <i>B. veronicaefolia</i>	30
3.3 Análisis de los componentes del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i> (Lote 1)	31
3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de camazuleno por CLAR	31
3.5 Obtención del camazuleno a partir del aceite esencial (Lote 1) por CLAR	31
3.6 Validación del método analítico desarrollado	32
3.6.1 Selectividad	32

	<b>Página</b>
3.6.2 Linealidad y exactitud	32
3.6.3 Precisión del método	33
3.7 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por CLAR	33
3.8 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por espectrofotometría visible	34
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
4.1 Obtención del aceite esencial de las muestras de <i>B. veronicaefolia</i>	37
4.2 Análisis del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i> (Lote 1)	37
4.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del camazuleno por CLAR	41
4.4 Obtención del camazuleno por cromatografía preparativa	43
4.5 Validación del método analítico desarrollado	46
4.5.1 Selectividad	47
4.5.2 Linealidad y Exactitud del método	48
4.5.3 Precisión del método	52
4.6 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por CLAR de cada lote	53
4.7 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por espectrofotometría visible (método de azulenos totales)	54
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
5.1 Perspectivas generales de la presente investigación	60
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Fabricación de extractos de plantas y productos fitofarmacéuticos	7
<b>Figura 2.</b> Dedución del perfil de calidad de las materias primas y el preparado fitofarmacéutico a partir del modelo aprobado	8
<b>Figura 3.</b> Proceso de desarrollo aplicado a los fármacos en general	15
<b>Figura 4.</b> Estrategia inicial para el desarrollo de métodos analíticos por CLAR	20
<b>Figura 5.</b> <i>Brickellia veronicaefolia</i> Gray (Asteraceae)	21
<b>Figura 6.</b> Esquema del aparato de hidrodestilación	30
<b>Figura 7.</b> Estrategia general para el desarrollo del presente trabajo	36
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de Gases / Masas del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i>	38
<b>Figura 9.</b> Formación del camazuleno como consecuencia de la hidrodestilación	40
<b>Figura 10.</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido con la columna C18	42
<b>Figura 11.</b> Cromatograma del aceite esencial obtenido con una columna de Sílice	43
<b>Figura 12.</b> Espectro de masas del camazuleno	44
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN H <sup>1</sup> del camazuleno	45
<b>Figura 14.</b> Espectro de RMN C <sup>13</sup> del camazuleno	45
<b>Figura 14.</b> Espectro UV del camazuleno en el aceite esencial	47
<b>Figura 15.</b> Espectro UV del camazuleno aislado	48
<b>Figura 16.</b> Estructura del camazuleno y guayazuleno	54

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación general de los constituyentes de las drogas crudas	9
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de los constituyentes de las drogas crudas de acuerdo a su función en el aseguramiento de la calidad	10
<b>Cuadro 3.</b> Estándares generales de calidad para la determinación de la composición de las drogas	12
<b>Cuadro 4.</b> Factores que afectan el contenido de los constituyentes de las drogas crudas	13
<b>Cuadro 5.</b> Características de la validación para cada tipo de método analítico	18
<b>Cuadro 6.</b> Rendimientos del aceite esencial obtenido para cada lote de <i>B. veronicaefolia</i>	37
<b>Cuadro 7.</b> Metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial por Espectrometría de Masas previa su separación por Cromatografía de Gases	39
<b>Cuadro 8.</b> Señales identificadas en los espectros de RMN para el camazuleno	46
<b>Cuadro 8.</b> Curva de calibración de camazuleno	49
<b>Cuadro 9.</b> Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de estándar adicionado	51
<b>Cuadro 10.</b> Resultados del parámetro de precisión	53
<b>Cuadro 11.</b> Cuantificación de camazuleno por CLAR en los aceites esenciales	54
<b>Cuadro 12.</b> Datos correspondientes a la curva de calibración para el método espectrofotométrico	55
<b>Cuadro 13.</b> Cuantificación de camazuleno en el aceite esencial de cada lote	56
<b>Cuadro 14.</b> Comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos	56

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	<b>Página</b>
<b>Gráfica 1.</b> Curva de calibración del camazuleno	50
<b>Gráfica 2.</b> Gráfica que evalúa la linealidad y la exactitud del método	52
<b>Gráfica 3.</b> Curva de calibración para el método espectrofotométrico	55

*Antecedentes*



## **I. ANTECEDENTES**

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde tiempos ancestrales para el tratamiento de diversas enfermedades y han desempeñado un papel muy importante en los distintos sistemas de salud a nivel mundial. A pesar de los grandes avances observados en la medicina moderna en las últimas décadas, las plantas todavía representan un importante recurso terapéutico. De acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial alivia sus enfermedades mediante el empleo de remedios vegetales; la mayoría de éstos son de uso común en las prácticas médicas tradicionales de muchos países alrededor del mundo. También, se estima que alrededor del 25% de los medicamentos alopáticos contemporáneos son derivados directos o indirectos de las plantas superiores (Calixto, 2000).

Los preparados a base de plantas medicinales son muy populares en los países en vías de desarrollo con una gran tradición en el empleo de vegetales para el tratamiento de las enfermedades. También lo son en algunos países desarrollados como Alemania, Francia, Italia y Estados Unidos, donde existen guías apropiadas para el registro oficial de estos medicamentos. Cabe destacar el caso de Alemania, donde los fitomedicamentos son ampliamente consumidos para el tratamiento del resfriado común (66%), el catarro (38%), los desórdenes digestivos e intestinales (25%), el dolor de cabeza (25%), el insomnio (25%), la úlcera péptica (34%), el nerviosismo (21%), las enfermedades circulatorias (15%), la bronquitis (15%), los desórdenes dermatológicos (15%), la fatiga y el cansancio (12%) (Calixto, 2000).

A pesar de su amplio uso a nivel mundial, son pocos los medicamentos herbolarios que han sido evaluados significativamente para comprobar su seguridad, eficacia y calidad. El desarrollo de leyes y de procesos con base en las buenas prácticas de fabricación son los principales elementos para el control de calidad de los medicamentos herbolarios (Calixto, 2000).

El incremento por las terapias naturales en el mundo ha traído como consecuencia el incremento global del comercio de las drogas vegetales. Pocos años atrás solamente las pequeñas compañías mostraban interés en la venta de productos herbolarios; sin embargo, actualmente las compañías farmacéuticas multinacionales más grandes también están interesadas en la comercialización de estos productos. Se estima que tan sólo en Europa las ventas alcanzaron cerca de 7000 millones de dólares en 1997. Las ventas en Alemania corresponden al 50% del total europeo, es decir a casi 3500 millones de dólares; seguidos por Francia con 1800 millones, Italia con 700 millones, el Reino Unido con 400 millones, España con 300 millones y los Países Bajos con casi 100 millones de dólares. Los medicamentos herbolarios europeos de acuerdo a su uso se agrupan en seis categorías: agentes de uso cardiovascular (27.0%) y respiratorio (15.3%), productos digestivos (14.4%), agentes tónicos (14.4%), medicamentos de tipo sedante (9.3%), agentes tópicos (7.4%) y otros (12.0%) (Calixto, 2000).

En Asia, incluyendo a Japón, las ventas de los medicamentos herbolarios alcanzaron 2300 millones de dólares. En los Estados Unidos la venta de productos herbolarios es aún mayor que en Asia y Europa. Así, en 1996 la venta de medicamentos herbolarios alcanzó casi 3200 millones de dólares y cerca de los 5000 millones en 1999, se espera que esta cifra aumente sensiblemente en la presente década. De acuerdo a encuestas nacionales, unos 60 millones de norteamericanos mayores de 18 años usan medicamentos herbolarios para tratar resfriados, quemaduras, dolores de cabeza, alergias, erupciones cutáneas, depresión, diarrea y menopausia, entre otros padecimientos, gastando así 54 dólares anuales en la compra de estos productos. Como consecuencia, muchas compañías han incluido una línea de productos herbolarios dentro de su producción (Calixto, 2000).

En México, el uso de vegetales con fines curativos se remonta a las culturas de la época precolombina. El empleo de estas hierbas en la práctica médica tradicional persiste en el México actual. La medicina herbolaria ha experimentado un notable

crecimiento en la pasada década frente a los grandes avances de la medicina alopática.

La medicina herbolaria constituye un factor importante en el comercio local de las especies vegetales más usadas para el tratamiento de diversas enfermedades. El escenario de recolectores y acopiadores de la flora medicinal en nuestro país es el propio del abasto y desarrollo de estos recursos. Entre algunas de las plantas más utilizadas en las prácticas médicas populares de México se encuentran las siguientes: las flores de anacahuite (*Cordia morelosana*) y de bugambilia (*Bougainvillea spectabilis*), la cola de caballo (*Equisetum arvense*), la corteza de los árboles de palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*) y Brasil (*Haematoxylon brasiletto*), los sombreritos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), las semillas de zopilote (*Swietenia humilis*), la corteza de cuachalalate (*Amphipteryngium adstringens*), la raíz de cancerina (*Hippocratea excelsa*) y el zacate limón (*Cymbopogon citratus*), por tan sólo mencionar algunas. La recolección y el acopio de las plantas medicinales se encuentra ligado inevitablemente a la suerte de una industria farmacéutica nacional que no se ha podido consolidar en el mercado con una producción propia y significativa. A su vez, la condición precaria del recolector se encuentra ligada a la condición precaria de una flora aún insuficientemente caracterizada desde el punto de vista agronómico y ecológico. Un importante flujo de las plantas medicinales nacionales lo constituye el provocado por la demanda de industrias procesadoras extranjeras. Este flujo no involucra necesariamente a mercados, ni se encuentra adecuadamente cuantificado. La salida de la flora medicinal del país para el mercado extranjero no es nueva; de hecho constituye una constante histórica. La preminencia de especies silvestres y el incremento actual sostenido en su demanda suponen, hoy, retos tecnológicos y políticos sustanciales (Padilla, 2003).

Desde el año 2001, los medicamentos o remedios herbolarios se registran ante la Secretaría de Salud, quien proporciona una clave alfanumérica para su comercialización; para este registro es necesario cumplir varios requisitos que comprueben el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación. Con la

publicación de la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos en 2001, se dejó clara la intención de que la industria farmacéutica cuente con un respaldo que le permita introducir nuevos productos al mercado bajo condiciones de calidad adecuados para el consumo humano. Posteriormente durante la 5a. Expo Internacional Naturista Anipron 2002, el foro más importante de la Industria de Productos Naturales en México, se propuso el Proyecto de Norma Oficial Mexicana para Etiquetado de Remedios Herbolarios (PROY-NOM-200-SSA1-2000). Esta acción denota la importancia del control de calidad de estos productos en un panorama mundial en el que México no piensa verse excluido.

Todo este crecimiento en el uso y la comercialización de productos herbolarios ha originado el auge de la denominada **fitoterapia**, una práctica asociada a la Medicina Complementaria y Alternativa (CAM por sus siglas en Inglés). De acuerdo a Weiss y Fintelmann, la fitoterapia se define como la prevención y el tratamiento de la enfermedades humanas mediante el uso de plantas, partes de plantas o preparaciones de plantas. Es importante distinguir entre un **preparado fitofarmacéutico** y un **fitomedicamento** o **agente fitoterapéutico**, el primero es una preparación que se obtiene sometiendo la droga cruda a diversos tratamientos como extracción, destilación, fraccionamiento, purificación y fermentación, dando como resultado extractos, aceites esenciales, tinturas o infusiones. Los **agentes fitoterapéuticos** o **fitomedicamentos**, en cambio, son preparaciones estandarizadas de plantas que consisten en una mezcla compleja de una o más plantas usadas para el tratamiento de diversas enfermedades. De acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los medicamentos herbolarios contienen como principios activos partes de plantas o materiales de las plantas en forma cruda o en estado procesado (por ejemplo: tabletas, cápsulas, cremas o tinturas) más ciertos excipientes como disolventes, diluentes o conservadores. Usualmente los compuestos activos responsables de la actividad farmacológica se desconocen. Las combinaciones con sustancias químicamente definidas o constituyentes aislados, así como las preparaciones homeopáticas que

contienen derivados de plantas no se consideran fitomedicamentos (Barnes, 2003; Calixto, 2000; Gaedke y Steinhoff, 2003).

El panorama actual de los medicamentos herbolarios abre nuevas perspectivas en la investigación farmacognóstica de los remedios herbolarios. Estas investigaciones enfatizan no sólo la caracterización de los principios activos, sino también la determinación de su mecanismo de acción, la interacción con otros fármacos, los estudios clínicos y el desarrollo de la metodología para el establecimiento del control de calidad que garanticen el consumo de productos seguros y eficaces.

### **1.1 Aseguramiento de la Calidad de los Medicamentos Herbolarios**

Las drogas crudas o los preparados fitofarmacéuticos constituyen la base de la fitoterapia. Por ello, la calidad de la droga cruda o el preparado fitofarmacéutico debe asegurarse de tal forma que garantice una práctica terapéutica exitosa. La calidad de los medicamentos alopáticos no es difícil de asegurar hoy en día debido al alto nivel tecnológico de los procesos de síntesis y control de calidad. En el caso de los medicamentos herbolarios, por la complejidad de la materia prima y sus preparados (extractos secos y fluidos), los esfuerzos que deben de hacerse para alcanzar una calidad consistente del fitomedicamento (tabletas, grageas, cápsulas, pomadas, soluciones y suspensiones) son mayores (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

Con la finalidad de facilitar la presentación de los procesos de control de calidad de las materias primas y preparados fitofarmacéuticos es importante tener en cuenta el procedimiento de fabricación de los fitomedicamentos. Este procedimiento (mismo que se resume en la Figura 1) conjunta tanto técnicas fitoquímicas convencionales que conducen a la obtención de materias primas (droga cruda y extractos secos y fluidos) como operaciones farmacéuticas que permiten la elaboración de formas de dosificación adecuadas para su uso. Estas formas farmacéuticas están sujetas a un perfil de calidad teórico (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

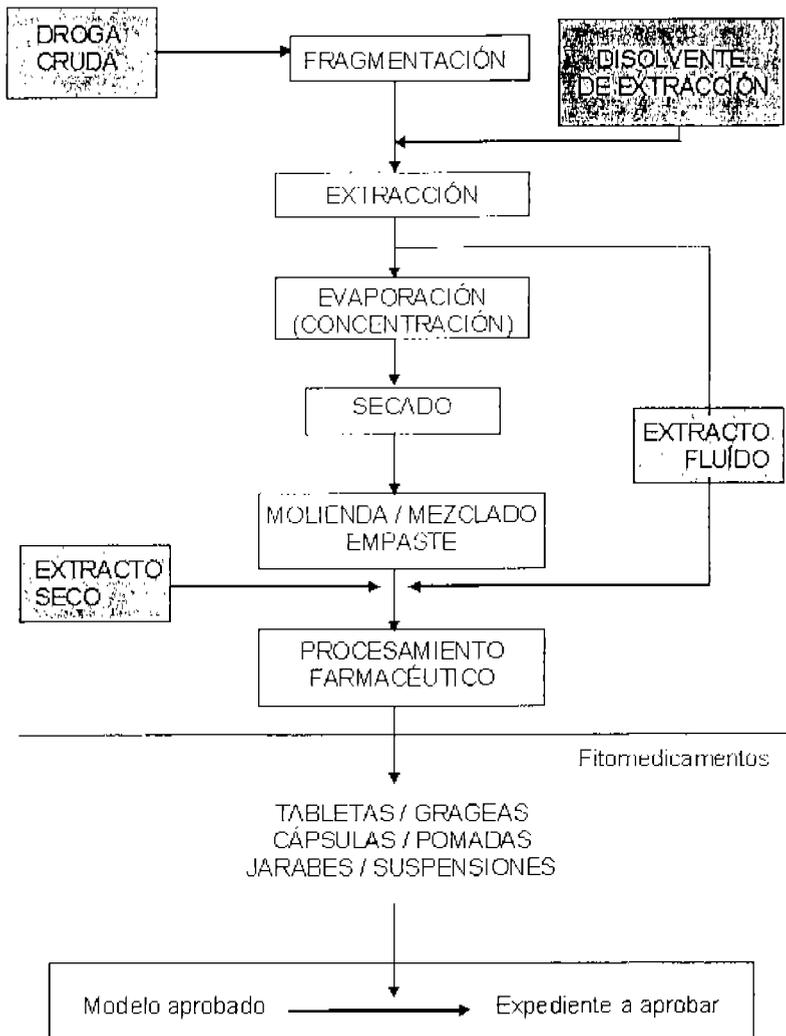


Figura 1. Fabricación de extractos de plantas y productos fitofarmacéuticos (adaptado de Gaedcke y Steinhoff, 2003).

El perfil de calidad teórico de cada forma de dosificación se documenta en un expediente de calidad para un “modelo aprobado”, que determina cuasi-retrospectivamente el perfil de calidad (especificación) tanto de los extractos, como de las formas de dosificación terminadas incluyendo a los estándares para la producción a gran escala y su control de calidad. Además, este modelo determina indirectamente el tipo y la concentración del disolvente de extracción, el

proceso de fabricación y, sobre todo, el perfil de calidad de la materia prima, especialmente de la droga cruda. Es importante destacar que materia prima se refiere tanto a la droga cruda como a los preparados fitofarmacéuticos. La figura 2 muestra de manera gráfica el análisis retrospectivo para establecer el perfil de calidad de las materias primas. Las correlaciones de la figura hacen hincapié en la importancia de la calidad de la materia prima natural, extractos resultantes y en última instancia de la seguridad y eficacia del fitomedicamento (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

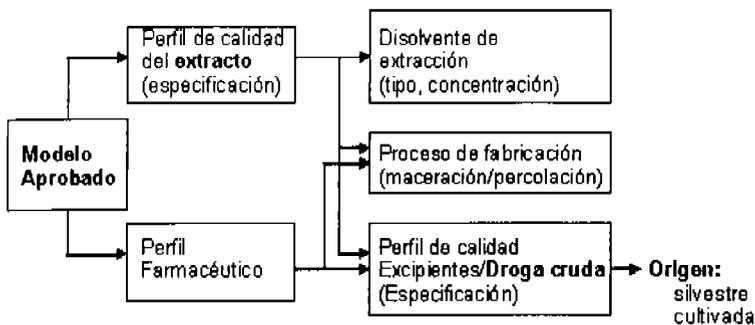


Figura 2. Deducción del perfil de calidad de las materias primas y el preparado fitofarmacéutico a partir del modelo aprobado (adaptado de Gaedcke y Steinhoff 2003).

Como es prácticamente imposible dentro del aseguramiento de la calidad tomar en cuenta todos los constituyentes de la droga cruda, la reproducción y el control de un espectro definido de los constituyentes puede basarse solamente en algunas sustancias o grupos de sustancias que, de acuerdo al nivel de conocimiento científico, sean farmacéuticamente, farmacológicamente o toxicológicamente relevantes. Los constituyentes de las drogas crudas y de los preparados fitofarmacéuticos se clasifican en tres categorías como se muestra en el Cuadro 1. Estos constituyentes desempeñan un papel importante en el aseguramiento de la calidad (Calixto, 2000; Gaedcke y Steinhoff, 2003).

Cuadro 1. Clasificación general de los constituyentes de las drogas crudas.

Categoría del Constituyente	Definición	Ejemplos	
		Constituyentes	Extractos
1. Constituyentes Terapéuticamente Activos	Sustancias químicamente definidas o grupos de sustancias que, aislados presentan el mismo o similar efecto terapéutico que el extracto total.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Silimarina</li> <li>▪ Aescina</li> <li>▪ Senósidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracto de <i>Cardus marianus</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Hippocastani semen</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Cassia scna</i></li> </ul>
2. Constituyentes Activos (constituyentes farmacéuticamente relevantes)	Sustancias químicamente definidas o grupos de sustancias que en forma aislada no ejercen los mismos efectos terapéuticos que el extracto total pero que contribuyen a la actividad terapéutica del preparado fitofarmacéutico	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hipericina / Pseudohipericina</li> <li>▪ Proantocianidinas / Flavonoides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracto de <i>Hypericum sp.</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Crataegus sp.</i></li> </ul>
3. Marcadores	Sustancias químicamente definidas o grupos de sustancias que únicamente son útiles para propósitos analíticos.		
3.1 Marcadores Característicos	Característicos para algunos géneros o familias de plantas, adecuados para las pruebas de identificación y para la valoración (por ejemplo, control entre lotes).	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ácidos valerlánicos</li> <li>▪ Equinacócidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracto de <i>Valeriana officinalis</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Echinacea pallida / angustifolia</i></li> </ul>
3.2 Marcadores Ubicuos	Se presentan ubicuamente en las plantas y son adecuados para valoración (por ejemplo, control entre lotes).	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rutina</li> <li>▪ Ácido Clorogénico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Extracto de <i>Hypericum sp. I</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Solidaginis sp.</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Hypericum sp. I</i></li> <li>▪ Extracto de <i>Cynarae sp.</i></li> </ul>

En el Cuadro 2 se muestran las categorías de los constituyentes de las plantas y su utilidad en el aseguramiento de la calidad. El aseguramiento de la composición de las drogas crudas y sus extractos se enfoca en los constituyentes de los grupos 1-4, y por lo tanto, su extracción debe ser selectiva. Los constituyentes

indeseables del grupo 5 deben ser removidos del preparado tanto como sea posible. Su ausencia es un importante criterio de seguridad en el fitomedicamento. Los constituyentes ubicuos del grupo 5 generalmente forman parte de los extractos y son poco relevantes en términos de calidad y eficacia. De la misma manera las sustancias del grupo 6 o sustancias matriz no están sujetas a medidas del aseguramiento de la calidad (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

**Cuadro 2.** Clasificación de los constituyentes de las drogas crudas de acuerdo a su función en el aseguramiento de la calidad

Grupo	Categoría	Constituyentes (Ejemplos)	Especificación en la que se incluyen
1	Constituyentes terapéuticamente activos	➤ Silimarina ➤ Material Extralble	Valoración (Cuantitativo)
2	Sustancias activas / Sustancias Farmacéuticamente relevantes	➤ Hipericina ➤ Pseudohipericina	→Valores mínimos
3	Marcadores / Constituyentes característicos	➤ Equinacócidos ➤ Ácidos Sesquiterpénicos	Pruebas de Identificación
4	Coefectores / Solubilizadores Elementos traza / Electrolitos Estabilizadores	➤ Polifenoles, ➤ Saponinas	(Cualitativo) (CCF-Perfiles)
5	Contaminantes comunes		
	▪ Indeseables		
	○ Alergenos	➤ Helenalina	Pruebas de Pureza
	○ Tóxicos-	➤ Alcaloides de tipo pirrolizidina	(Cuantitativo) →Valores máximos
	▪ Ubicuos	➤ Carbohidratos ➤ Proteínas ➤ Ácidos grasos ➤ Clorofila ➤ Resinas	No aplica
6	Sustancias de la matriz	➤ Celulosa	No aplica

Las pruebas de control de calidad que permiten la determinación de los distintos tipos de constituyentes de las drogas crudas se clasifican en tres categorías: composición, identidad (estándares cualitativos y cuantitativos) y pureza. Conforme a los estándares se asegura un espectro consistente de los constituyentes de la droga cruda, el preparado fitofarmacéutico o el fitomedicamento. La confiabilidad de un espectro consistente de los constituyentes está basada en la **selectividad, especificidad y robustez de los métodos analíticos** y en el uso de estándares de referencia perfectamente caracterizados y documentados. Estos estándares son una herramienta indispensable para una evaluación objetiva de la calidad. La categorización de los constituyentes de las drogas hecha en el Cuadro 2 conduce a los estándares de calidad cualitativos y cuantitativos resumidos en el Cuadro 3. Para el establecimiento de la conformidad entre lotes, muchas pruebas cuantitativas se remplazan por pruebas cualitativas, como perfiles cromatográficos en diferentes rangos de polaridad o, si aplica, por pruebas físicas (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

### **1.1.1 Composición Variable de las Drogas Crudas**

A diferencia de los medicamentos alopáticos, los medicamentos herbolarios no tienen una composición fija puesto que la cantidad y la naturaleza de los constituyentes más relevantes puede variar de lote a lote y en diversas estaciones del año; también las diferentes partes de las plantas contienen diferentes proporciones de los constituyentes. El Cuadro 4 indica algunos de los factores que causan las variaciones de la composición de los productos herbolarios. Por estas razones, las compañías farmacéuticas prefieren usar plantas cultivadas en lugar de las silvestres, ya que las primeras tienen una menor variabilidad en cuanto a sus constituyentes. Además, y ciertamente más relevante, cuando las plantas medicinales se cultivan, los principales metabolitos secundarios pueden monitorearse a lo largo de su desarrollo. Este monitoreo permite determinar el mejor periodo de cosecha. Asimismo, el incremento de la demanda de productos de calidad obliga a controlar las condiciones de cosecha. Hoy en día, alrededor del 50% de las drogas crudas usadas para la fabricación de fitomedicamentos son

Cuadro 3. Estándares generales de calidad para la determinación de la composición de las drogas

Especificaciones	Ejemplos		
	<i>Cardus marianus</i> (Droga estandarizada)	<i>Hypericum perforatum</i> (Droga no estandarizada)	<i>Valeriana officinalis</i> (Droga no estandarizada)
1. Estándares Cuantitativos (Composición)			
1.1 Constituyentes terapéuticamente activos	Silimarina (5-10%)		
1.2 Sustancias activas / Sustancias farmacéuticamente relevantes		Pseudohipericina Hipericina / Hipeforina (Valores mínimos o rangos)	Aceite esencial (valor mínimo)
1.3 Sustancias marcadoras			Ácidos valeriánicos (Lote-específico)
> Característicos			
> Ubicuos			
1.4 Material extraíble		Rango	
2. Estándares Cualitativos (Identidad / Pureza)			
2.1 Perfiles cromatográficos (CCD / CG / HPLC)			
> Constituyentes Específicos	Silimarinas (Lipofílico) Constituyentes Polares (Hidrofílico)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipericinas</li> <li>• Flavonoides</li> <li>• Biapigeninas</li> <li>• Hiperforinas</li> <li>• Polifenoles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos valeriánicos</li> </ul>
> Sustancias concomitantes específicas			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceite esencial</li> <li>• Valepotriatos (ausencia)</li> </ul>
3. Estándares Físico-Químicos			
3.1 Solubilidad		X	X
3.2 Valor de PH, etc.			

cultivadas y éstas a su vez constituyen un 30% de las plantas usadas en la medicina tradicional (Barnes, 2003; Calixto, 2000; Gaedcke y Steinhoff, 2003).

**Tabla 4.** Factores que afectan el contenido de los constituyentes de las drogas crudas

1. Factores Genéticos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Razas quílmicas</li></ul>
2. Condiciones de Cultivo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Clima (temperatura, luz, lluvia)</li><li>• Suelo (pH, fertilización, metales pesados)</li><li>• Pesticidas (insectos)</li></ul>
3. Condiciones de recolecta, Desecación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tiempo de colecta (antes, durante o después de la floración)</li><li>• Tratamientos poscolecta (lavado, mondado)</li><li>• Desecación (método, duración, temperatura)</li></ul>
4. Condiciones de Fragmentación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Proceso de cortado (cortado fino, cortado burdo)</li><li>• Proceso de trituración (temperatura)</li></ul>
5. Condiciones de Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"><li>• Luz, oxígeno (formación de radicales, antioxidantes)</li><li>• Humedad (hidrólisis, reacciones enzimáticas, microbiología)</li><li>• Temperatura (polimerización, descomposición, microbiología)</li></ul>

### 1.1.2 Importancia de la Estandarización

La variabilidad entre el contenido y la concentración de los constituyentes del material vegetal, junto con la variedad de métodos de fabricación, dan como resultado una marcada variabilidad en el contenido y la calidad de los fitomedicamentos comerciales. De manera similar, la calidad del material vegetal también puede alterarse por el error humano a través de operaciones inescrupulosas. La sustitución botánica accidental (errores en la identificación de las especies) o sustitución botánica intencional (cambio deliberado por otra especie de planta posiblemente más tóxica) pueden ocurrir. La contaminación intencional o accidental del material vegetal con fármacos convencionales (corticosteroides y efedrina) o sustancias venenosas (metales pesados o residuos de pesticidas) y microorganismos también son comunes. Es por esto que varios

fabricantes ahora producen extractos de plantas estandarizados para asegurar una calidad farmacéutica constante. Tales productos se fabrican para contener una cantidad específica de los constituyentes activos y en algunos casos los constituyentes no deseables o tóxicos se eliminan (Barnes 2003).

La estandarización se realiza con base en el contenido de los constituyentes activos cuando éstos se conocen, sin embargo, en algunas plantas estos constituyentes no están identificados; en estos casos los productos se estandarizan con base en el contenido de ciertos compuestos marcadores pues se asume que existe una relación cuantitativa entre los compuestos marcadores y los constituyentes activos no conocidos. Los avances recientes en los procesos de purificación, aislamiento y elucidación estructural de estos compuestos permiten establecer estrategias adecuadas para analizar la calidad y los procesos de estandarización de los preparados fitofarmacéuticos (Barnes, 2003; Calixto 2000).

La estandarización de las materias primas generalmente se logra a través de los siguientes criterios (Gaedcke y Steinhoff, 2003):

1. Selección del material vegetal de acuerdo a las monografías farmacopéicas o a las especificaciones internas de las compañías.
2. Recolección de las materias primas preferentemente a partir de plantas cultivadas.
3. Combinación de lotes de drogas crudas (si es posible) recolectadas en:
  - a. Diferentes períodos de cosecha
  - b. Diferentes sitios
  - c. Condiciones silvestres y cultivadas

Para establecer si las materias primas o sus derivados se han estandarizado de manera adecuada, deben de emplearse procedimientos analíticos selectivos y reproducibles que permitan determinar los constituyentes relevantes de acuerdo a las especificaciones farmacopéicas convencionales. Cabe señalar que no es necesario especificar el origen y las condiciones de desecación y cosecha para una estandarización óptima. Condiciones de desecación inadecuadas normalmente pueden detectarse por diferencias en los perfiles cromatográficos.

Así mismo, una cosecha inapropiada se reflejará en una variación en el contenido de principios activos o marcadores (Gaedcke y Steinhoff, 2003).

### 1.2 Desarrollo de Métodos Analíticos para Control de Calidad

El desarrollo de productos farmacéuticos consiste en una serie de procesos lógicos y sistemáticos. Cuando se desarrollan de forma adecuada el resultado final es la comercialización de las formas de dosificación aprobadas. La estrategia general para el desarrollo de productos farmacéuticos se resume en la Figura 3. Durante el desarrollo farmacéutico, las etapas de estudio clínico son las más obvias y mejor conocidas entre los especialistas; la fase clínica y la comercialización no pueden realizarse sin completar las otras actividades. Es importante hacer notar que la fase clínica señalada en la Figura 3 no puede ser alineada exactamente de forma cronológica con el desarrollo de otras actividades (Chow *et al.*, 2004).

Los métodos prematuros a los que se refiere la Figura 3 son aquellos que aún no están validados, pero son de gran utilidad durante los procesos de obtención y formulación. Posteriormente muchos de estos métodos se validan en una fase temprana para el soporte de todos los estudios en la fase 2 (Chow *et al.*, 2004).

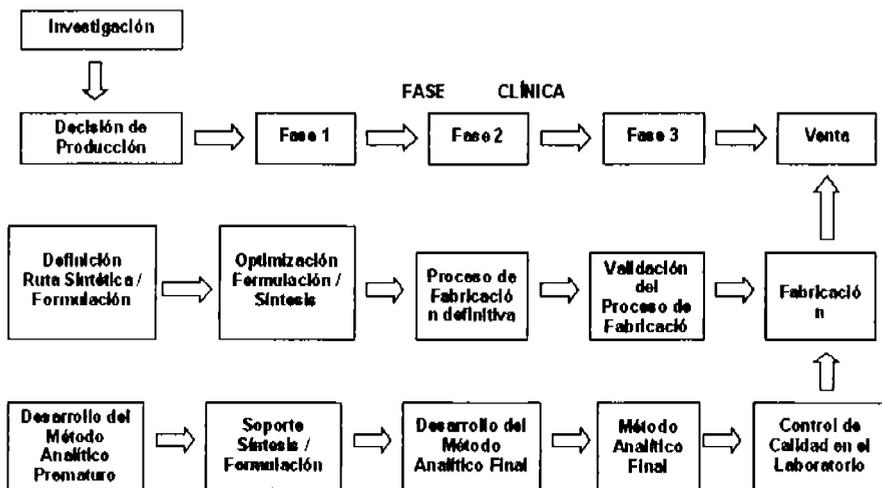


Figura 3. Proceso de Desarrollo aplicado a los fármacos en general (adaptado de Chow *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Validación de Métodos Analíticos

Validación es la conformación mediante examen y aporte de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico previsto (ISO 8402, ISO 17025). La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de aplicación en cuestión. Un método analítico es la ruta de ejecución de un análisis y debe describir los pasos detallados necesarios para llevar a cabo cada prueba. Este puede incluir la muestra, los estándares de referencia, el uso de aparatos, la generación de la curva de calibración, el uso de fórmulas para el cálculo, etc. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es adecuado para su propósito (ICH Q2A).

La validación de métodos analíticos se dirige a los cuatro tipos de procedimientos analíticos más comunes (ICH Q2A):

- Pruebas de identificación
- Prueba de cuantificación de contenido de impurezas
- Pruebas límite para el control de impurezas
- Valoración de las entidades activas en muestras de drogas, principios activos o productos terminados

El objetivo del procedimiento analítico puede entenderse claramente al determinar las características que deben evaluarse durante la validación. Las características típicas de la validación son (ICH Q2A): exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad.

- **Exactitud.** Este parámetro expresa el grado de cercanía entre el valor que es aceptado como verdadero, o el valor de una referencia aceptada, y el valor encontrado.
- **Precisión.** Expresa la cercanía entre una serie de mediciones obtenidas de una serie de muestras homogéneas bajo las condiciones establecidas.
  - **Repetibilidad.** Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo de tiempo corto. También se le conoce como *precisión Intra ensayo*.

- **Precisión Intermedia.** Expresa las variaciones dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, entre otras.
- **Especificidad.** Este parámetro indica la posibilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de los otros componentes supuestamente presentes. Típicamente se incluyen impurezas, productos de degradación, etc.
- **Límite de Detección.** Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto.
- **Límite de Cuantificación.** Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud. Se usa particularmente para la determinación de impurezas y productos de degradación.
- **Linealidad.** Es un parámetro que mide, en un rango dado de concentraciones, la proporcionalidad de la respuesta con la concentración del analito.
- **Rango Lineal.** Es el intervalo entre los valores de concentración máximo y mínimo del analito en la muestra en los que se ha demostrado que el método analítico tiene una adecuada precisión, exactitud y linealidad.

El Cuadro 5 enlista las características de validación más importantes de acuerdo a los diferentes tipos de procedimientos analíticos. Estas características son las consideradas en los procesos analíticos más comunes, pero pueden existir excepciones en casos particulares (ICQ Q2A).

Cuadro 5. Características de la Validación para cada tipo de Método Analítico

Característica	Tipo de Método Analítico			
	Gravimétrico	Volumétrico	Químico	Físico
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión Intermedia	-	+ <sup>1</sup>	-	+ <sup>1</sup>
Especificidad (Selectividad) <sup>2</sup>	+	+	+	+
Límite de Detección	-	- <sup>3</sup>	+	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango Lineal	-	+	-	+

- Característica normalmente no evaluada

+ Característica normalmente evaluada

<sup>1</sup> En casos donde la reproducibilidad ha sido determinada, la precisión Intermedia no es necesaria

<sup>2</sup> La carencia de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otro soporte del método analítico

<sup>3</sup> Puede necesitarse en algunos casos

### 1.2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica muy utilizada en las industrias químicas. Entre el 50 y 70% de todas las aplicaciones analíticas involucran mediciones por CLAR. El conjunto de los parámetros (también llamados condiciones de separación) que controlan un análisis cromatográfico se conoce como método cromatográfico. En la industria farmacéutica contemporánea se ha puesto mucha atención en el desarrollo, optimización y en la validación de métodos con base en esta técnica analítica (Grize *et al.*, 1994).

La cromatografía está basada en la migración de los compuestos de una fase a la que son menos afines a otra por la que tienen mayor afinidad hasta llegar a un equilibrio; el coeficiente de reparto  $K$ , es la constante de este equilibrio:

$$K = \frac{[S]_{II}}{[S]_{I}}$$

El coeficiente de reparto es entonces la relación de la solubilidad del compuesto entre la fase II y la I. A valores mayores de  $K$ , menos soluto queda en la fase I. En cromatografía una fase permanece fija mientras que la otra se mueve pasando a través de la primera (Harris, 2001).

La CLAR utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente (fase II) por una columna que contiene partículas muy finas (fase I) consiguiendo así separaciones de gran resolución. Un cromatógrafo estándar consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y una computadora personal para controlar el sistema y visualizar los resultados (Harris, 2001).

Existen varios modos para separar los componentes de una mezcla dada. La Figura 4 presenta un árbol de decisión para elegir el punto de partida y tener una idea acerca de la elección de la fase estacionaria y del proceso de elución. La cromatografía de adsorción sobre gel de sílice es un ejemplo de cromatografía de fase normal, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar, un disolvente más polar tiene una fuerza eluyente mayor. La cromatografía de fase inversa se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar, en tanto que la fase móvil es más polar. Un disolvente menos polar tiene mayor fuerza de elución (Harris, 2001).

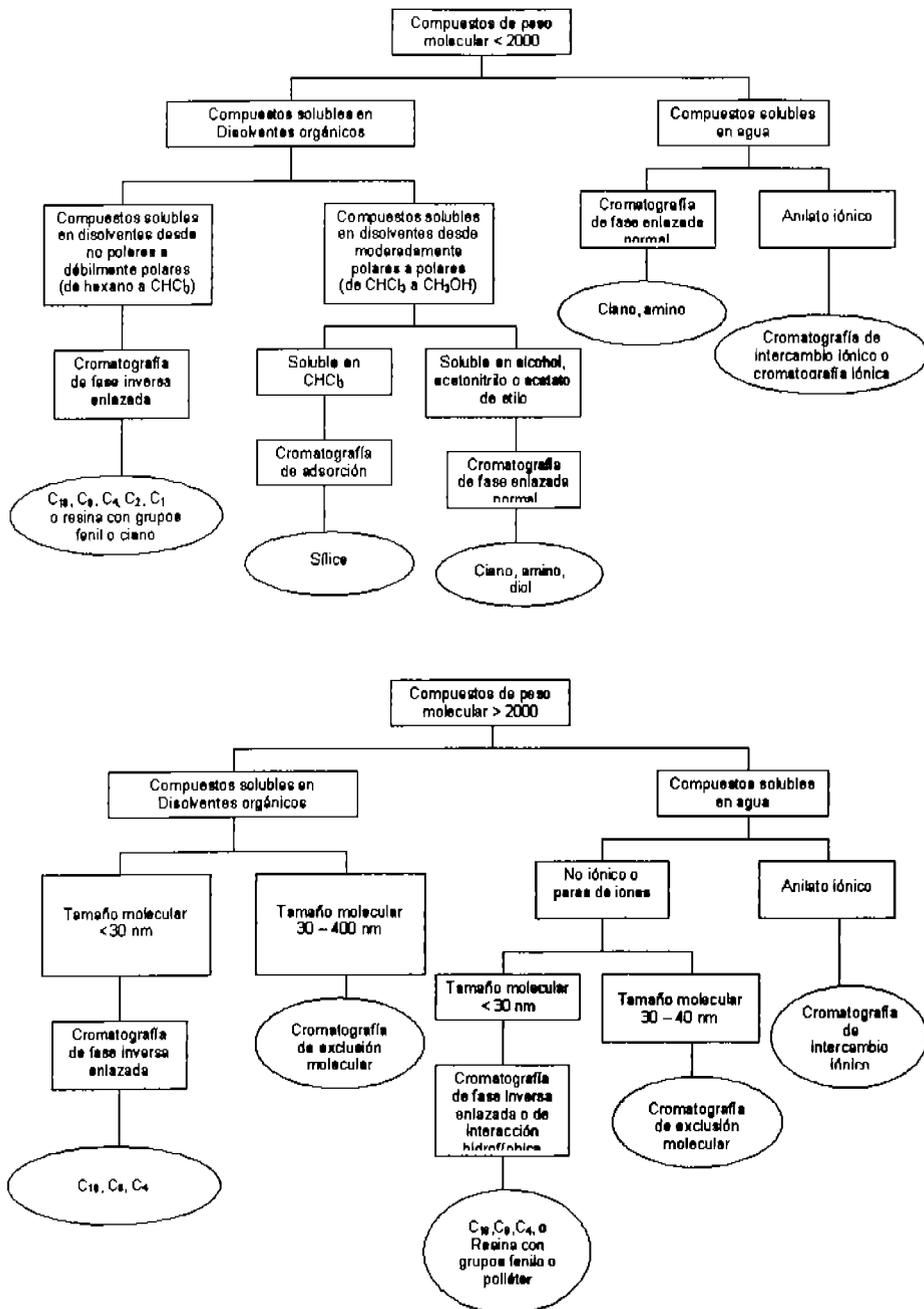


Figura 4. Estrategia inicial para el desarrollo de métodos analíticos por CLAR

### 1.3 Antecedentes de la especie *Brickellia veronicaefolia* Gray (Asteraceae)

#### 1.3.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos

*Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray es un arbusto pequeño cuyas medidas oscilan entre 40 cm y 1 m de altura. Presenta hojas opuestas, ovaladas u ovals de 4 a 15 cm de largo por unos 5 cm de ancho, borde crenado, pecíolos de 3 a 6 cm de largo; las flores en cabezuelas miden de 12 a 17 mm y son rosadas. La especie tiene por hábitat el bosque mesófilo y el bosque de encino o de pino, a una altitud de 1750 a 2750 m sobre el nivel del mar (Argueta, *et al.*, 1994; Martínez 1959 y 1979).

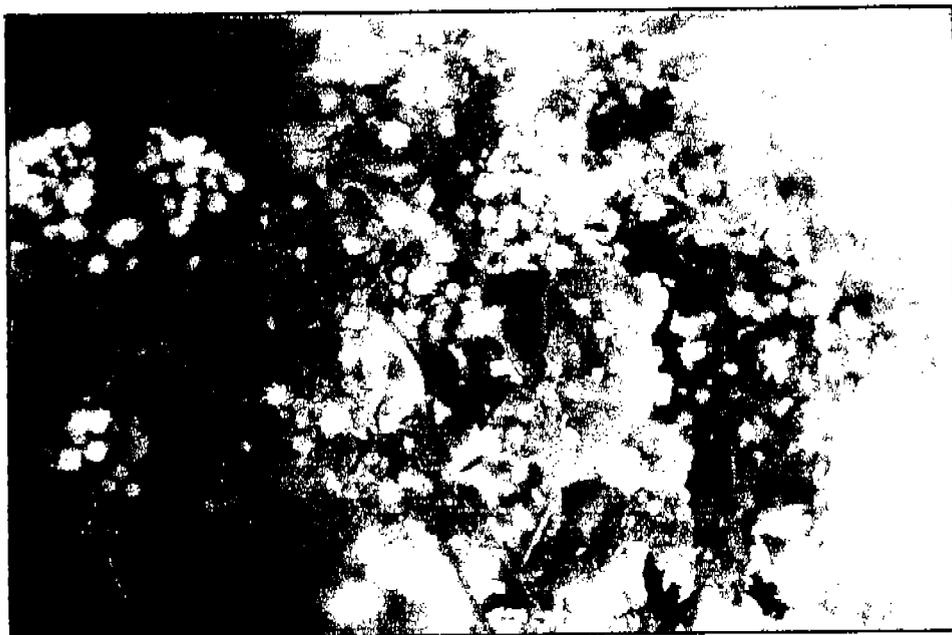


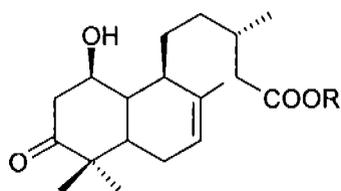
Figura 5 : *Brickellia veronicaefolia* Gray (Asteraceae)

En México se conoce popularmente con los nombres de chilaco blanco, gobernadora de Puebla, gordolobo corriente, hierba del jaito, hierba del perro, mejorana de campo, orégano de cerro, peishtón, peisto, pexto y sañate. Se utiliza para tratar desórdenes gastrointestinales (dolores de estómago y apéndice), artritis y enfermedades biliares (Argueta, *et al.*, 1994). Es importante destacar que esta especie es una de las 100 plantas más vendidas con fines curativos en el país (FHEUM, 2001).

### 1.3.2 Estudios fitoquímicos sobre la especie *Brickellia veronicaefolia*

Los estudios fitoquímicos de la planta han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos metabolitos secundarios. Estos metabolitos incluyen: triterpenoides, diterpenoides (Bohlman y Zdero, 1976; Calderón *et al.*, 1983), derivados del ácido benzóico (Rivero *et al.*, 2004) y flavonoides, en su mayoría 6-metoxiflavonoides (Roberts *et al.*, 1980). Cabe mencionar que este último grupo de compuestos constituyen los productos del metabolismo secundarios más abundante y ampliamente distribuidos entre las especies del género *Brickellia* (Roberts *et al.*, 1980).

El primer estudio químico de la especie fue realizado por Bohlman y Zdero (1976), quienes aislaron el ácido 3-oxocátvico (1) y su derivado metilado (2).

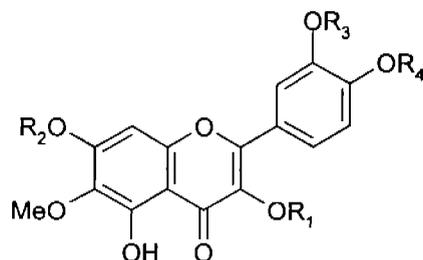


(1) R = H

(2) R = Me

Posteriormente, Roberts y colaboradores (1980) describieron el aislamiento de cinco flavonoides [eupatolina (3), eupatina (4), casticina (5), artemetina (6) y el tri éster metílico de la 3,6,7-quercetina (7)], dos heterósidos de flavonoides [el O-

galactósido de la eupatolitina (8) y el O-digalactósido de la veronicafolina (9), ambos sustituidos en el carbono 3] y cuatro sulfatos de flavonoides [los sulfatos de patuletina (10), eupatoletina (11), veronicafolina (12) y eupatina (13)]. En un estudio posterior, estos mismos autores (1984), también describieron la presencia de la brickellina (14) en esta especie.

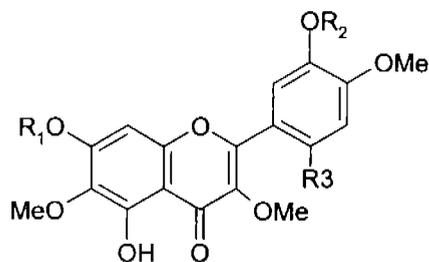


- |      |                                     |           |           |         |
|------|-------------------------------------|-----------|-----------|---------|
| (3)  | R1 = H ;                            | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = H  |
| (4)  | R1 = H ;                            | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = Me |
| (5)  | R1 = Me ;                           | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = Me |
| (6)  | R1 = Me ;                           | R2 = Me ; | R3 = Me ; | R4 = Me |
| (7)  | R1 = Me ;                           | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = H  |
| (8)  | R1 = gal ;                          | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = H  |
| (9)  | R1 = gal-gal ;                      | R2 = Me ; | R3 = Me ; | R4 = H  |
| (10) | R1 = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; | R2 = H ;  | R3 = H ;  | R4 = H  |
| (11) | R1 = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = H  |
| (12) | R1 = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; | R2 = Me ; | R3 = Me ; | R4 = H  |
| (13) | R1 = SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; | R2 = Me ; | R3 = H ;  | R4 = Me |

En un estudio de la planta, realizado con material vegetal recolectado en Ciudad Universitaria, D.F., se reportó el aislamiento del ácido 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$  –dihidroxicatfívico (16) y el ácido 2 $\alpha$ -3 $\alpha$  –(2-hidroxi-2-metil-butirilo)catfívico (17), el taraxasterol (18) y el acetato de taraxasterilo (19) [Calderón, *et al.*, 1983].

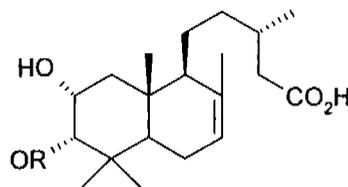
En el año 2000, Pérez y colaboradores comprobaron la actividad hipoglucemiante del extracto hexánico de *B. veronicaefolia*. Estos autores indican que la

centaureidina (**15**) es el principio activo y que su actividad hipoglucemiante es similar a la de la tolbutamida. Estos mismos autores demostraron el potencial antioxidante de la centaureidina (Pérez *et al.*, 2000 y 2004).



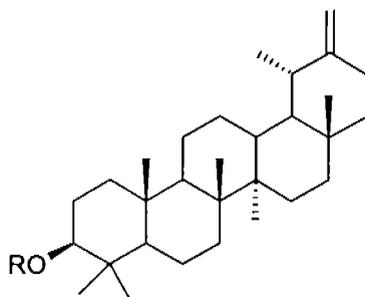
(14) R1= Me; R2= Me ; R3= OH

(15) R1= H ; R2= H ; R3= H



(16) R = H

(17) R = CH-C(OH)CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

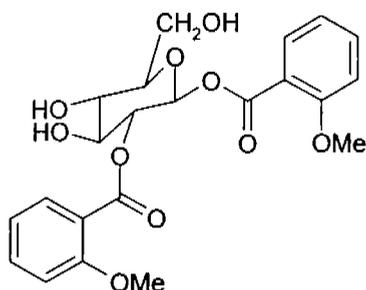


(18) R = H

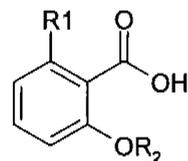
(19) R = COCH<sub>3</sub>

Recientemente, Rivero y colaboradores (2004) comprobaron que un extracto íntegro de la planta inhibe las contracciones espontáneas del ileon de cobayo. El efecto fue dependiente de la concentración y comparable al de la papaverina. El fraccionamiento biodirigido del extracto espasmolítico permitió el aislamiento y la caracterización de tres derivados del ácido benzoico [1,2-bis-O-(2-metoxibenzoil)-β-D-glucopiranosido (**20**), ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**21**) y ácido 2-metoxibenzoico (**22**)], nueve bencilbenzoatos [3-(β-D-glucopiranoxi)bencil-2,6-dimetoxibenzoato (**23**), 3-hidroxibencil-2,6-dimetoxibenzoato (**24**), 2-metoxibencil-2-hidroxibenzoato (**25**), bencil 2,6-dimetoxibenzoato (**26**), 3-metoxibencil-2-hidroxi-6-metoxibenzoato (**27**), bencil 2-hidroxi-6-metoxibenzoato (**28**), bencil 2,3,6-

trimetoxibenzoato (29), 2-hidroxi-3,6-dimetoxibenzoato (30), 3-metoxibencil-2,6-dimetoxibenzoato (31)], un fenilpropanolde [4-alil-2-metoxifenil-β-D-glucopiranosido (32)], un norsesquiterpenoide [camazuleno (33)] y un triterpenoide que ya habla sido reportado por Calderón et. al., (1983), el acetato de taraxasterilo (19). Todos estos compuestos poseen actividad espasmolítica significativa. Las concentraciones inhibitorias medias (CI<sub>50</sub>) oscilan entre 1.49 y 4.96 μM. En este estudio se determinó que el aceite esencial posee también propiedades espasmolíticas notables, siendo efecto mayor que el del extracto integro (Rivero et al., 2004).

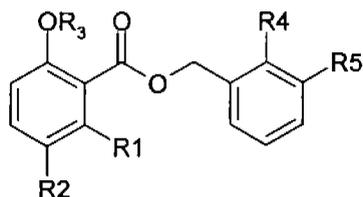


(20)



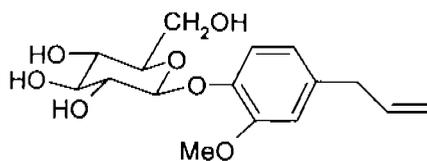
(21) R1= OMe ; R2= H

(22) R1= H ; R2= Me

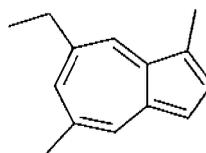


- |      |           |           |          |          |           |
|------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|
| (23) | R1= OMe ; | R2= H ;   | R3= Me ; | R4= H ;  | R5= O-Glu |
| (24) | R1= OMe ; | R2= H ;   | R3= Me ; | R4= H ;  | R5= OH    |
| (25) | R1= H ;   | R2= H ;   | R3= H ;  | R4= Me ; | R5= H     |
| (26) | R1= OMe ; | R2= H ;   | R3= Me ; | R4= H ;  | R5= H     |
| (27) | R1= OMe ; | R2= H ;   | R3= H ;  | R4= H ;  | R5= OMe   |
| (28) | R1= OMe ; | R2= H ;   | R3= H ;  | R4= H ;  | R5= H     |
| (29) | R1= OMe ; | R2= OMe ; | R3= Me ; | R4= H ;  | R5= H     |
| (30) | R1= OMe ; | R2= OMe ; | R3= H ;  | R4= H ;  | R5= H     |

(31) R1= OMe ; R2= H ; R3= Me ; R4= H ; R5= OMe



(32)



(33)

Por último, Argueta y colaboradores (1994) describieron en su *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana* que *B. veronicaefolia* posee propiedades antidiarréicas y antimicrobianas contra *S. aureus*, *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. disenteriae*.

*Justificación y objetivos*

---



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En el año 2001 la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos con el objetivo de dar a conocer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberían cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios. Evidentemente, esta farmacopea contribuirá en gran medida al mejoramiento de la calidad de algunos de estos productos y su uso adecuado (FHEUM, 2001). Este primer esfuerzo, aunque importante, resulta insuficiente ya que son miles las plantas que se comercializan en el México actual.

Por lo tanto, con la finalidad de apoyar la iniciativa de la Secretaría de Salud en cuanto a la elaboración de monografías farmacopéicas de las plantas de mayor uso en la terapéutica herbolaria de México, el objetivo primordial del presente trabajo consiste en establecer un procedimiento analítico para valorar el contenido de un constituyente activo de la esencia espasmolítica de *Brickellia veronicaefolia*.

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

- Determinar la composición del aceite esencial de *B. veronicaefolia* espectrometría de masas acoplada con cromatografía de gases (CG-EM).
- Establecer un compuesto farmacológicamente relevante de la esencia.
- Desarrollar un método analítico por CLAR para cuantificar el compuesto farmacológicamente relevante seleccionado.
- Validar el método analítico desarrollado para demostrar su selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

*Parte experimental*



### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal

En el presente estudio se utilizaron 5 muestras de material vegetal (lotes 1-5). Las muestras 1 y 2 fueron recolectadas en el municipio de Aculco, Estado de México, en diciembre de 2000 y abril de 2004, respectivamente. Las muestras 3-5 fueron adquiridas en el Mercado de Sonora (México, D.F.). La muestra 3 fue recolectada el mes de abril de 2004 en el estado de Puebla. Las muestras 4 y 5 se recolectaron el mes de mayo de 2004. El lote 5 procede del Estado de Michoacán. En todos los casos el material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

#### 3.2 Preparación del aceite esencial a partir de los distintos lotes de *B. veronicaefolia*

El aceite esencial se preparó mediante una hidrodestilación empleando un aparato como el que se muestra en la Figura 6. En un matraz de capacidad adecuada (A) se colocó el material vegetal previamente fragmentado más un volumen de agua destilada suficiente para cubrirlo. El matraz A se colocó sobre una fuente de calor (malla térmica). Al calentar, el vapor de agua cargado de aceite se condensaba en un refrigerante (B); el condensado (agua + aceite) se recogió en un matraz (C).

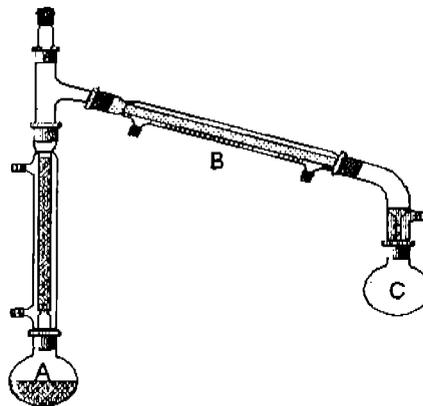


Figura 6. Esquema del aparato de hidrodestilación

La esencia fue recuperada de la mezcla mediante extracciones sucesivas con diclorometano. El disolvente se evaporó a presión reducida y se registró el peso del aceite obtenido.

### **3.3 Análisis de los componentes del aceite esencial de *B. veronicaefolia* (Lote 1)**

El aceite esencial del lote 1 se sometió a un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) con la finalidad de identificar los componentes presentes en el mismo. Los componentes mayoritarios en el cromatograma se identificaron por comparación de sus espectros de masas con aquellos de la biblioteca del equipo. La CG-EM se realizó en un equipo Jeol SX-102A, acoplado a un cromatógrafo marca HP 58900 serie II con una columna capilar HP-5MS.

### **3.4 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de camazuleno por CLAR**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CALR) se realizó en dos cromatógrafos: uno de la marca Waters<sup>®</sup> 996 acoplado a un detector UV con arreglo de diodos; el otro Agilent<sup>®</sup> 1100 acoplado a un detector UV de longitud de onda variable. El método fue desarrollado de manera empírica realizando pruebas tanto en fase normal como en fase reversa, tal como se muestra en la Figura 4. Para este análisis se utilizó una columna Slimmetry<sup>®</sup> C18 5µm y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-metanol-agua (4:20:1). El flujo fue de 0.8 mL/min y se trabajó a una longitud de onda de 284 nm.

### **3.5 Obtención del camazuleno a partir del aceite esencial del Lote 1 por CLAR**

La separación del camazuleno a partir del aceite esencial del Lote 1 de *Brickellia veronicaefolia* se realizó en una columna de fase normal empacada con gel de sílice (µPorasil<sup>®</sup>, 125Å, 10µm) utilizando un flujo de 8 mL/min; como fase móvil se empleó una mezcla de hexano-acetato de etilo en proporción 19:1. El camazuleno

se obtuvo como un líquido azul (20.3 mg) con un tiempo de retención de 10.8 minutos.

### **3.6 Validación del método analítico desarrollado**

El método analítico desarrollado fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en las Gulas de Harmonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2B). Las características de calidad que se evaluaron para validar el método analítico propuesto comprenden: selectividad, linealidad, exactitud y precisión.

#### **3.6.1 Selectividad**

Para evaluar la selectividad del método se registraron los espectros de absorción UV de la esencia y de una solución de camazuleno. Este parámetro de calidad se determinó mediante CLAR utilizando las condiciones desarrolladas en el inciso 3.4.

*Criterio de aceptación:* en los espectros obtenidos no deben existir cambios en la longitud de absorción máxima, ni en la forma del espectro.

#### **3.6.2 Linealidad y Exactitud del método**

Para evaluar la linealidad y la exactitud del método se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Agilent® 1100 acoplado con un detector UV de longitud de onda variable.

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración por triplicado, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 20.3 mg de camazuleno se disuelven en 10 mL de metanol [concentración final 2.03 mg/mL]. A partir de la solución anterior se prepararon las disoluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 0.02 y 0.15 mg de camazuleno. Para esta determinación se trabajaron dos réplicas por muestra. El área de la señal correspondiente al camazuleno, en cada réplica, se graficó con respecto a la concentración de camazuleno en cada solución.

*Criterio de aceptación:* para que el sistema sea lineal es necesario que el coeficiente de correlación de la curva de calibración sea mayor a 0.99.

Preparación de la matriz: se disolvieron 32.6 mg del aceite esencial en 10 mL de metanol (Solución A).

Para evaluar la exactitud y la linealidad del método se prepararon una serie de 5 soluciones (por triplicado), mediante la adición de diferentes concentraciones de camazuleno a la matriz de trabajo. Las soluciones se llevaron a un volumen final de 1 mL con metanol R.A.; también se preparó una solución que sólo contenía la matriz de trabajo. Todas estas muestras se procesaron por duplicado para obtener los valores correspondientes al área de camazuleno empleando el método desarrollado (descrito en el inciso 3.4). Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) se analizaron mediante un análisis de regresión simple para calcular el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación.

*Criterio de aceptación:* el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 para decir que el método es lineal. Para que el método sea exacto, la pendiente deberá estar entre 0.98 y 1.02 y para demostrar que no existe algún error sistemático, el intercepto debe ser estadísticamente igual a cero o bien, incluir al cero en su intervalo de confianza.

### **3.6.3 Precisión del método**

Se evaluó la precisión del métodos a partir del análisis de una solución compuesta por 0.06 mg/mL de camazuleno en 100  $\mu$ L de aceite esencial. Se analizaron seis réplicas independientes y el análisis se realizó en dos días diferentes.

*Criterio de aceptación:* el coeficiente de variación debe ser menor de 3%.

## **3.7 Cuantificación del camazuleno presente en el aceite esencial por CLAR**

El contenido de camazuleno presente en el aceite esencial de cada lote se cuantificó (por duplicado) empleando la metodología descrita en el inciso 3.4. La curva estándar se preparó de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 3.6.2. El valor del área del pico correspondiente al camazuleno se interpoló en la curva y de esta manera se calculó la concentración del analito en la muestra. Los

resultados se encuentran expresados en términos de miligramos de camazuleno por gramo de aceite.

### **3.8 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por espectrofotometría visible**

Para determinar la cantidad de camazuleno presente en la esencia de *B. veronicaefolia* se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Padula y colaboradores (1976).

Preparación de las muestras: se preparó una dilución del aceite esencial obtenido para cada lote de material vegetal, usando como disolvente metanol RA.

Curva de calibración: la curva de calibración se preparó a partir de una solución concentrada de guayazuleno (Sigma<sup>®</sup>) [1 mg/mL]. Con la solución anterior se prepararon siete diluciones seriadas para obtener concentraciones finales de: 0.08, 0.12, 0.20, 0.40, 0.60 y 0.80 mg/mL. En seguida, se determinó la absorbancia de cada una de estas soluciones a 601 nm en un espectrofotómetro Cintra<sup>®</sup> 5.

Para el cálculo de la ordenada al origen (b), la pendiente (m), el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) se empleó un análisis de regresión lineal simple.

Cuantificación del camazuleno: el contenido de camazuleno se determinó midiendo la densidad óptica de la muestra a 601 nm. Los valores de absorbancia se interpolaron en la curva de calibración y, de esta manera, se determinó la concentración de camazuleno en cada lote. Se trabajaron dos réplicas por lote y los resultados se expresaron como miligramos de camazuleno por gramo de aceite.

## Resultados y discusión



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de contribuir a la elaboración de una monografía farmacopéica de la especie *Brickellia veronicaefolia* se determinó la composición de su aceite esencial, mismo que presenta propiedades espasmolíticas significativas. El análisis se efectuó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). Posteriormente, se seleccionó un constituyente farmacéuticamente relevante y se desarrolló un método para cuantificarlo. Por último se precedió a la validación de este método. La Figura 7 muestra un diagrama de flujo en el que se resume la estrategia experimental utilizada en el presente estudio.

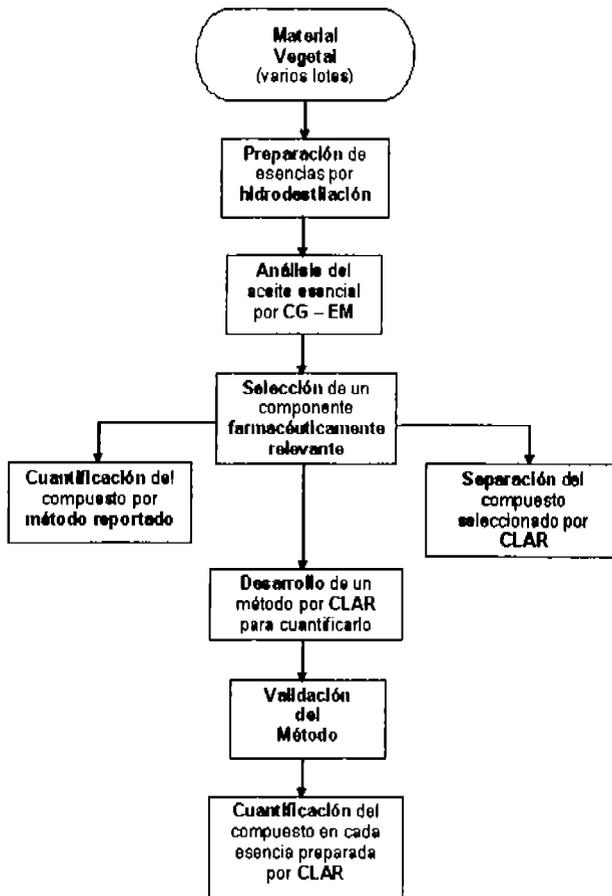


Figura 7. Estrategia general para el desarrollo del presente trabajo.

**4.1 Obtención del aceite esencial de las muestras de *B. veronicaefolia***

A partir del material vegetal correspondiente a los lotes 1-5 se preparó un aceite esencial por el método que se describió en la parte experimental y en el Cuadro 6 se indican los rendimientos por lote. A pesar de que las destilaciones se realizaron siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el diseño rústico del aparato de destilación, posiblemente ocasionó pérdidas por fugas, así que estos números sólo sirven de referencia y no representan un valor real de rendimiento.

**Cuadro 6:** Rendimientos del aceite esencial obtenido para cada lote de *B. veronicaefolia*

<b>Lote</b>	<b>Cantidad de material vegetal</b>	<b>Aceite esencial obtenido (mg)</b>	<b>Rendimiento (mg/g)</b>
<b>1</b>	600 g *	342.0 mg	0.570 mg/g
<b>2</b>	250 g	368.9 mg	1.476 mg/g
<b>3</b>	200 g	23.7 mg	0.119 mg/g
<b>4</b>	250 g	264.2 mg	1.057 mg/g
<b>5</b>	240 g	426.3 mg	1.776 mg/g

\*Material desecado

**4.2 Análisis del aceite esencial de *B.veronicaefolia* (Lote 1)**

El aceite esencial de *B. veronicaefolia* se obtuvo mediante hidrodestilación como un líquido de color azul. El análisis por CG-EM del aceite indicó que el mismo contiene al menos 8 componentes mayoritarios. La comparación de los espectros de los componentes con los de la biblioteca del equipo permitió la identificación de los productos naturales que se indican en el Cuadro 7. En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido a partir del Lote 1.

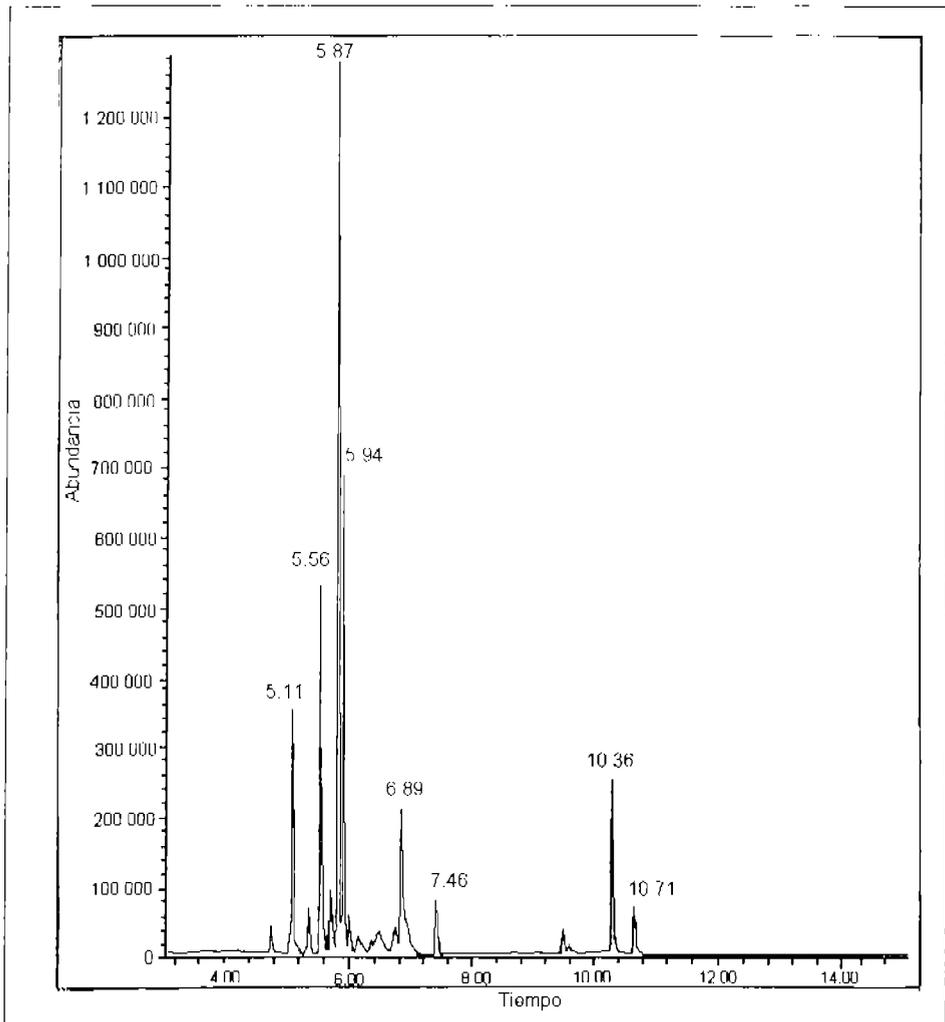
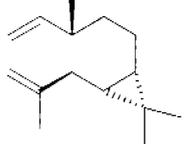
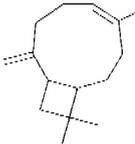
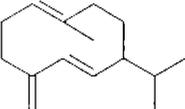
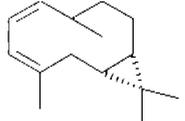
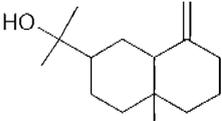
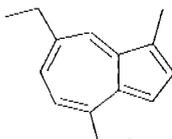


Figura 8. Cromatograma de Gases/Masas del aceite esencial de *B. veronicaefolia*

De manera adicional, el Cuadro 7 incluye el tiempo de retención y el porcentaje de cada uno de los componentes identificados. El producto mayoritario fue el germacrano D, en tanto que el camazuleno, producto que confiere a la esencia el color azul característico fue el minoritario.

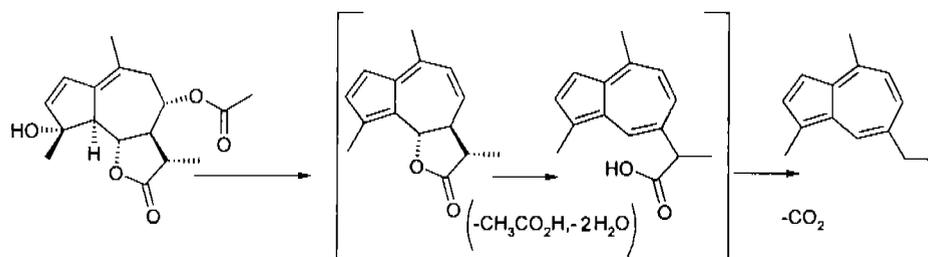
**Cuadro 7:** Metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial por espectrometría de masas previa su separación por cromatografía de gases.

Tiempo de Retención (min)	Metabolito	Porcentaje de Área
5.11	Bicicloelemeno 	9.42 %
5.56	<i>Trans</i> -cariofileno 	14.28%
5.87	Germacrano-D 	* 46.04%
5.94	Bicyclgermacrano 	*46.04%
6.89	β-Eudesmol 	13.21%
7.46	Camazuleno 	3.15%

\*Este porcentaje corresponde a ambos picos debido a la integración.

El camazuleno, como se indicó en la sección de antecedentes, se aisló también del extracto íntegro de la planta por Rivero y colaboradores (2004).

El camazuleno es un producto de degradación de la matricina, una lactona sesquiterpénica termolábil. En la a Figura 9 se muestran los intermediarios propuestos para la formación del norsesquiterpenoide a partir de la matricina (Bruneton, 2001)



**Figura 9.** Formación del camazuleno como consecuencia de la hidrodestilación

De todos los metabolitos que se identificaron, el camazuleno fue de particular interés, pues posee propiedades espasmolíticas (Rivero *et al.*, 2004) y antiinflamatorias. El mecanismo de su acción antiinflamatoria se debe a su efecto inhibitor de la síntesis de leucotrienos (Bruneton, 2001). Estas observaciones permiten establecer que el camazuleno es un constituyente activo farmacéuticamente relevante. Además el producto tiene propiedades fisicoquímicas que pueden ser aprovechadas en el aseguramiento de la calidad de la droga. La más importante es su propiedad de absorción de luz en el rango del ultravioleta-visible, lo cual lo hace cuantificable espectrofotométricamente en un rango de longitudes de onda muy amplio. Si se acopla un equipo de CLAR a un detector UV es posible cuantificar el camazuleno en el aceite esencial. Además del método espectrofotométrico, en la literatura se han descrito otros métodos para valorar este metabolito en distintas fuentes naturales (Devaska y Bartkowiankova, 1978; Evdokimoff, Tucci y Cavazzutti, 1972; Giesselmann y Muller, 2001; Repcak, Imrich y Garcar, 1999; Reverchon y Senatore, 1994; Versar y Cuong, 1977; Vuorela, Hala y Hiltonen, 1989). Quizá los más relevantes son aquellos en los que se aplica la CG-EM y CLAR.

### **4.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de camazuleno por CLAR**

Para el desarrollo del método analítico por CLAR se aplicó la estrategia indicada en la Figura 4. Considerando que el aceite esencial es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos; y que sus constituyentes son compuestos de bajo peso molecular, se decidió realizar pruebas en columnas tanto de fase normal como inversa utilizando diferentes sistemas de elución.

La concentración del aceite se ajustó para obtener una respuesta del detector en un rango menor a 0.1 unidades de absorbancia. De esta forma se empleó una concentración de 0.01 mg/mL de aceite esencial en metanol. La señal correspondiente al camazuleno se identificó por la coelución de una muestra estándar y el aceite esencial.

El método analítico que se seleccionó fue aquel en el que se logró una separación óptima del camazuleno (resolución mayor a 1.5) y con un tiempo de corrida corto (< 20 minutos). Esta última característica es muy importante, ya que un análisis de larga duración implicaría un gasto mayor de horas-hombre. Este método se desarrolló en fase reversa en una columna C18 bajo las siguientes condiciones.

- Fase estacionaria: Columna Symmetry® C18 (5µm)
- Fase móvil: Acetonitrilo/ Metanol/Agua (4:20:1)
- Concentración del aceite: 0.01 mg/mL metanol
- Tiempo de corrida: 18 minutos
- Longitud de onda del detector: 284 nm
- Flujo: 0.8 mL/min
- El tiempo de retención del camazuleno: 8.02 minutos

El cromatograma resultante se muestra en la Figura 10.

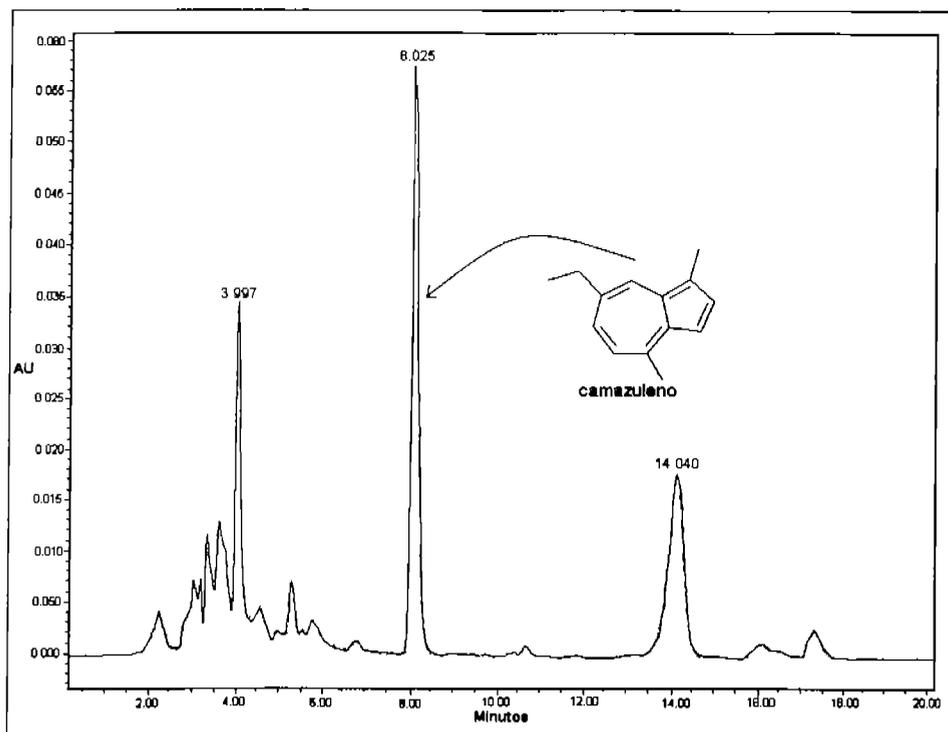


Figura 10. Cromatograma del aceite esencial obtenido con la columna C18.

Las columnas de tipo ciano y fenil no fueron adecuadas ya que no se logró una buena resolución. La columna de fase normal presentó una buena separación, pero el tiempo de corrida resultó muy largo, en consecuencia, el método desarrollado con esta columna puede ser empleado solo con fines preparativos (Figura 11).

- Fase estacionaria: Columna  $\mu$ Porasil® (10 $\mu$ m)
- Fase móvil: hexano/acetato de etilo (19:1)
- Concentración del aceite: 0.01 mg/mL metanol
- Tiempo de corrida: 35 minutos
- Longitud de onda del detector: 284 nm
- Flujo: 8 mL/min
- El tiempo de retención del camazuleno: 10.77 minutos

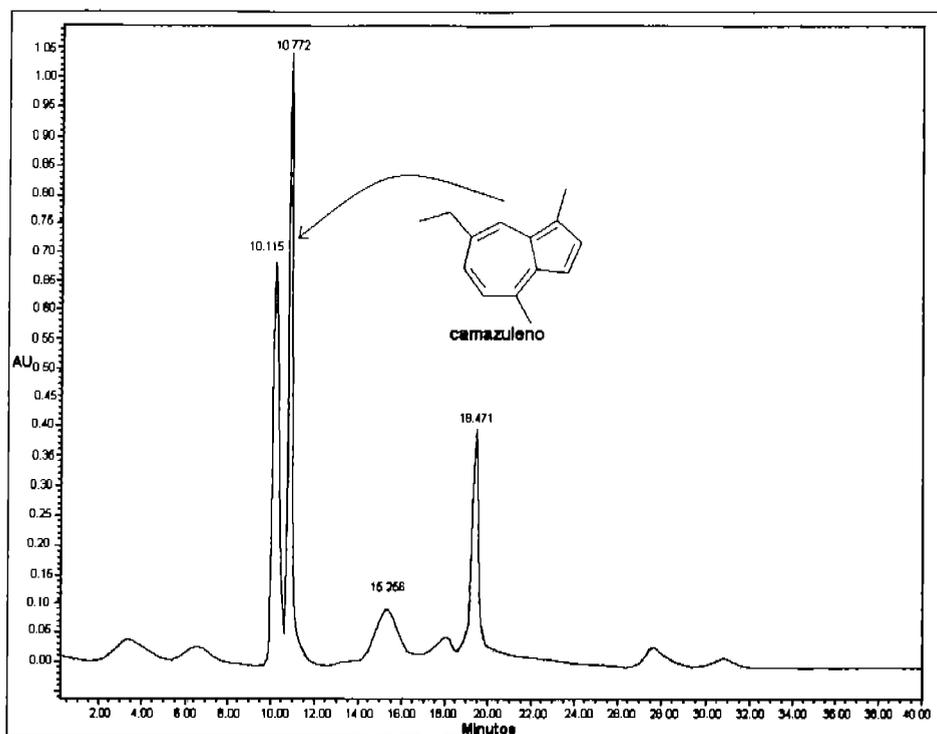


Figura 11. Cromatograma del aceite esencial obtenido con una columna de Sílice

Cabe señalar que el método se desarrolló a una longitud de onda de 260nm, pues la mayoría de los componentes del aceite absorben en esta región del UV. Sin embargo, el método se ajustó a la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\text{max}}$  284 nm) del analito de interés, el camazuleno.

#### 4.4 Obtención del camazuleno por cromatografía preparativa.

El camazuleno (20.3 mg) se obtuvo del aceite esencial (250 mg) preparado a partir del Lote 1. El rendimiento fue de 8.12% luego de eliminar el disolvente a presión reducida. La separación y purificación del camazuleno se realizó mediante CLAR. Se empleó el método en fase normal y el tiempo de retención del norsesquiterpenoide fue de 10.8 min.

El camazuleno aislado se sometió a un análisis por CG-EM, RMN  $H^1$  y RMN  $C^{13}$  con la finalidad de garantizar inequívocamente su identidad. Para ello los espectros se compararon con los descritos en la literatura. En las figuras 12-14 se indican los espectros de masas y RMN. Al comparar el espectro de RMN  $H^1$  obtenido en el presente trabajo con el publicado por Bertelli y Crabtree (1968) mostraron resultados idénticos.

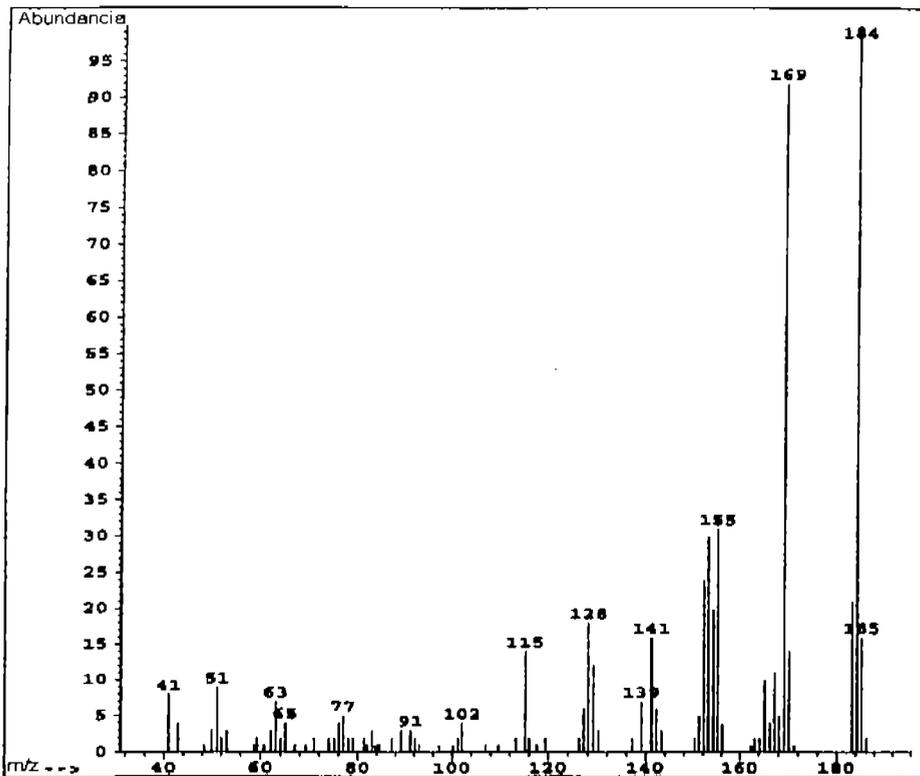


Figura 12. Espectro de masas del camazuleno

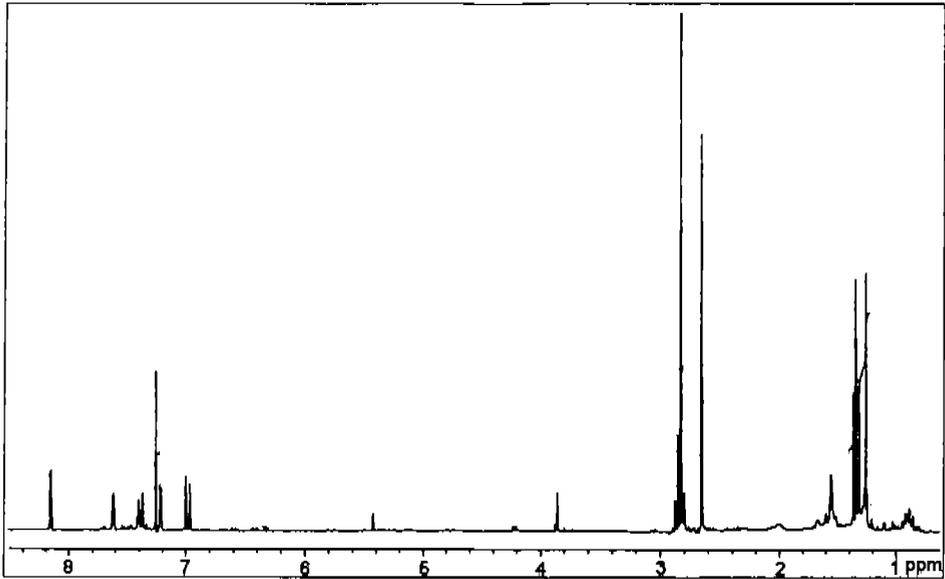


Figura 13. Espectro de RMN H<sup>1</sup> del camazuleno

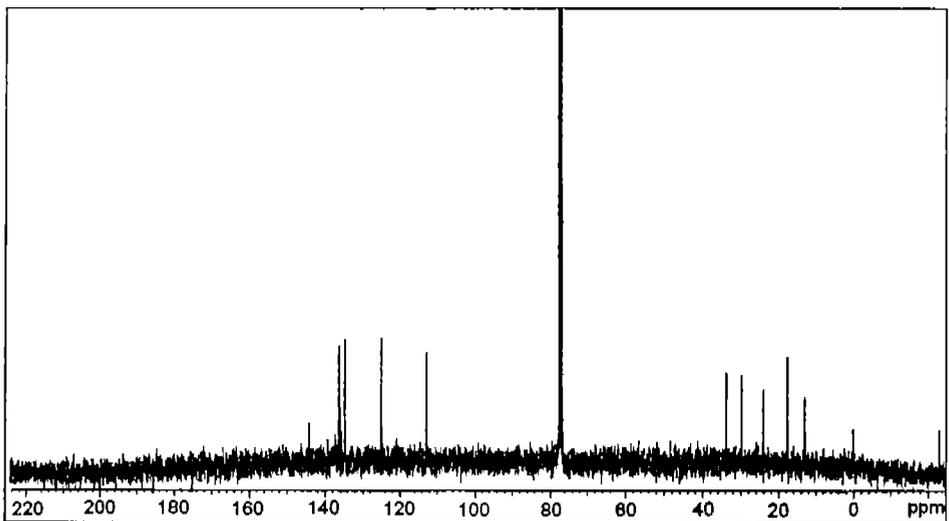


Figura 14: Espectro de RMN C<sup>13</sup> del camazuleno

En el espectro de masas (Figura 12), el ión molecular se observó en una relación  $m/z$  de 184. Por lo tanto, la fórmula se estableció como  $C_{14}H_{16}$ . Los espectros de RMN (Figuras 13 y 14) indican la naturaleza aromática del producto. También fue evidente la presencia de dos grupos metilo sobre doble ligadura, un grupo etilo y cinco hidrógenos aromáticos. Estas señales se indican en el Cuadro 8.

**Cuadro 8:** Señales identificadas en los espectros de RMN para el camazuleno.

C	$\delta H$	$\delta C$
1	-	124.960
2	7.615 d (0.012)	124.838
3	7.213 d (0.013)	112.658
4	-	135.612
5	6.979 d (0.036)	134.616
6	7.385 dd (0.035, 0.006)	135.612
7	-	136.296
8	8.157 d (0.006)	135.984
9	2.827 s	12.975
10	2.653 s	24.189
11	2.838 q (0.026)	32.898
12	1.338 t (0.026)	17.499
3 <sup>a</sup>	-	137.186
8 <sup>a</sup>	-	144.157

Unidades: ppm

d= doblete

dd= doble de dobles

s= singulete

t= triplete

q= cuarteto

#### 4.5 Validación del método analítico desarrollado

La validación del método se realizó con base en las Guías de Harmonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2B). Los parámetros de calidad evaluados fueron la selectividad, la linealidad, la precisión y la exactitud. Para el desarrollo de la validación se empleó como estándar el camazuleno purificado y como matriz de trabajo el aceite esencial del Lote 1.

A continuación se proporcionan los resultados para cada parámetro de calidad evaluado durante la validación del método analítico.

#### 4.5.1 Selectividad

La selectividad del método propuesto se demostró mediante la obtención de los espectros de absorción al UV tanto del estándar de camazuleno (Figura 16) como del aceite esencial (Figura 15).

Como se puede observar en las Figuras 15 y 16 no existen diferencias en la respuesta. Estos resultados indican por lo tanto que la respuesta sólo se debe a la presencia de camazuleno.

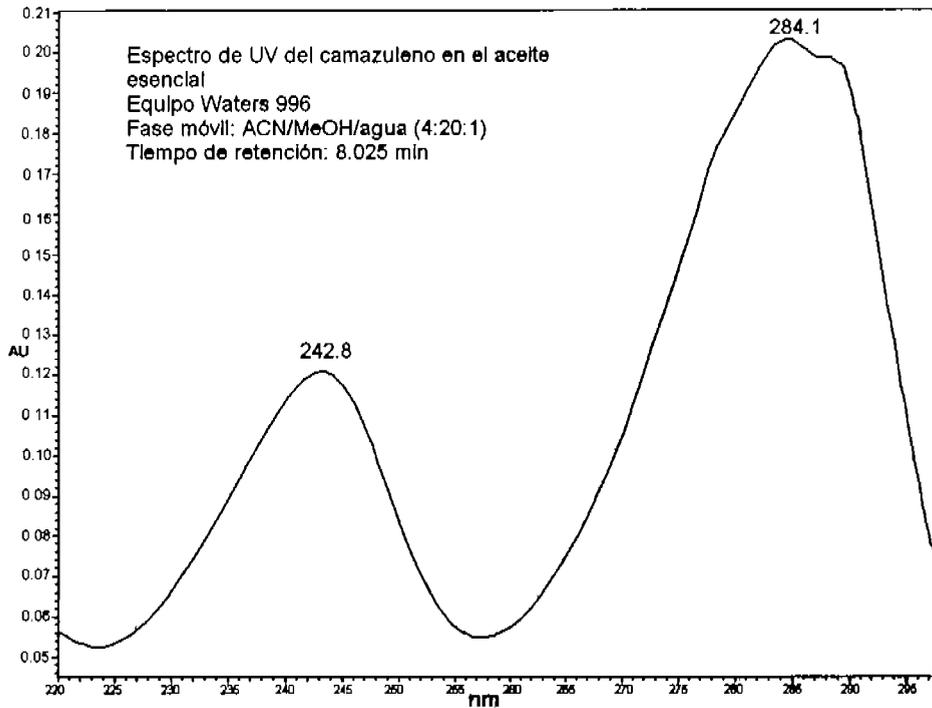


Figura 15. Espectro UV del camazuleno en el aceite esencial.

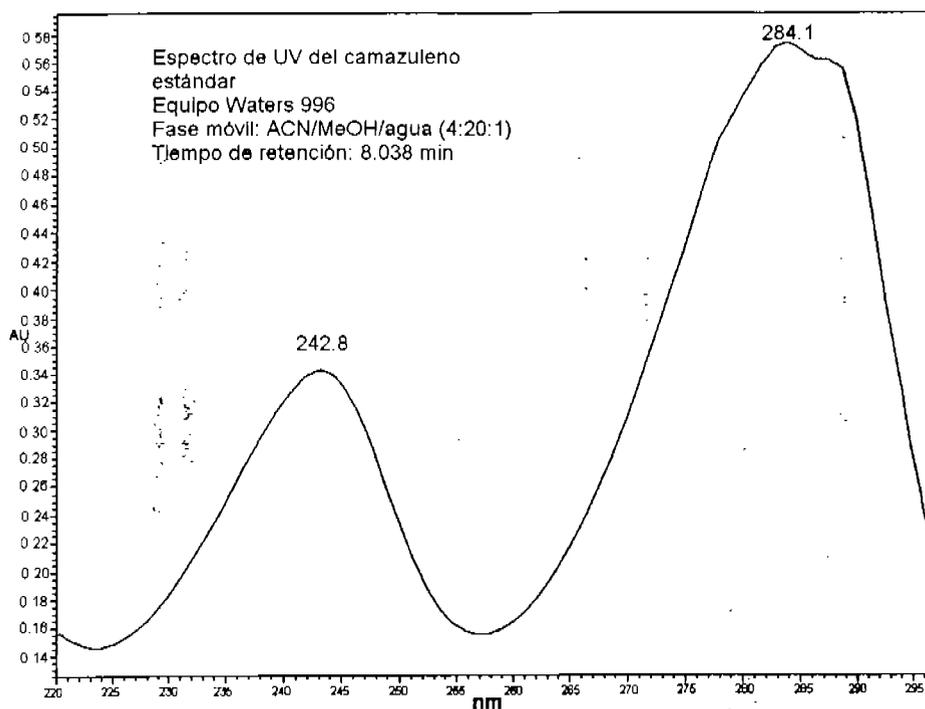


Figura 16. Espectro UV del camazuleno aislado.

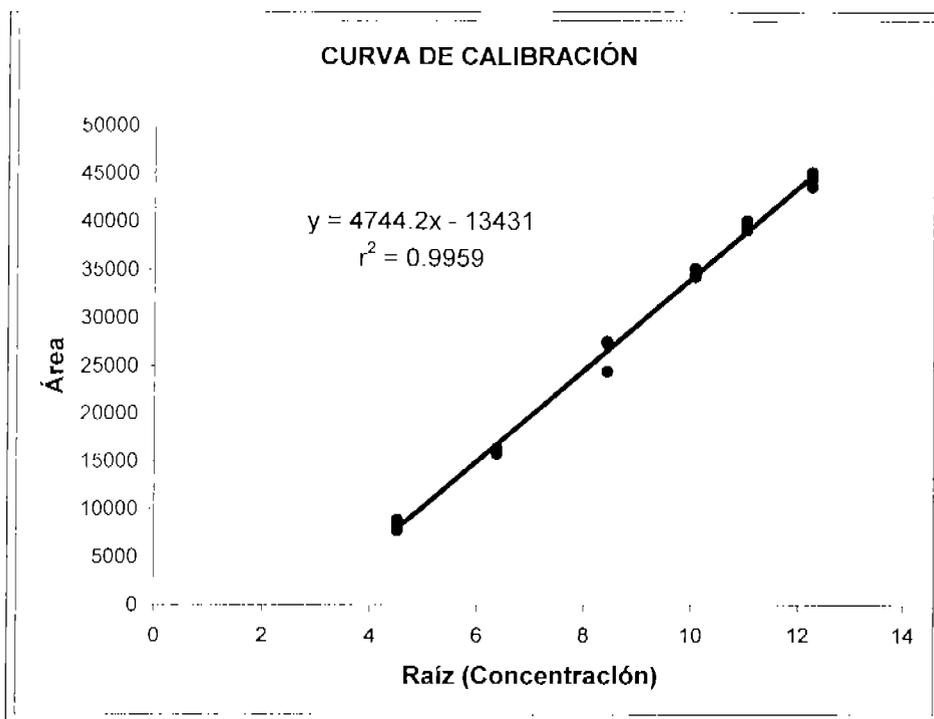
#### 4.5.2 Linealidad y Exactitud del método

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con diferentes niveles de concentración. Los resultados se resumen en el Cuadro 9 y en la Gráfica 1.

**Cuadro 9.** Curva de calibración de camazuleno

Concentración Teórica (mg/mL)	Solución de camazuleno (2.03mg/mL) adicionada (µL)	Concentración final (µg/mL)	Área
0.15	74.00	150.22	44323.40
0.15	74.00	150.22	44423.80
0.15	74.00	150.22	44351.40
0.15	74.00	150.22	43570.40
0.15	74.00	150.22	43545.80
0.15	74.00	150.22	45057.50
0.15	74.00	150.22	44998.90
0.12	60.00	121.80	39075.10
0.12	60.00	121.80	39437.40
0.12	60.00	121.80	39264.20
0.12	60.00	121.80	39257.30
0.12	60.00	121.80	40050.10
0.12	60.00	121.80	40050.40
0.10	50.00	101.50	35113.90
0.10	50.00	101.50	35110.00
0.10	50.00	101.50	34405.50
0.10	50.00	101.50	34288.70
0.10	50.00	101.50	34243.80
0.10	50.00	101.50	34224.80
0.07	35.00	71.05	27333.20
0.07	35.00	71.05	27331.70
0.07	35.00	71.05	27509.30
0.07	35.00	71.05	27479.40
0.07	35.00	71.05	24423.60
0.07	35.00	71.05	24416.40
0.04	20.00	40.60	15766.50
0.04	20.00	40.60	15742.40
0.04	20.00	40.60	16400.00
0.04	20.00	40.60	16369.50
0.02	10.00	20.30	8166.85
0.02	10.00	20.30	8152.00
0.02	10.00	20.30	7707.03
0.02	10.00	20.30	7720.25
0.02	10.00	20.30	8812.17
0.02	10.00	20.30	8837.95

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal utilizando el modelo de raíz cuadrada de x. Para el cálculo de los coeficientes de regresión se utilizó el programa Statgraphics for Windows (versión 5.1). En el Anexo A se presenta el análisis estadístico correspondiente.



**Gráfica 1.** Curva de calibración del camazuleno

La linealidad y exactitud del método se determinaron mediante el análisis de una serie de muestras que contenían diferentes concentraciones de camazuleno en el aceite esencial. Los resultados de estos parámetros de calidad se resumen en el Cuadro 10 y la Gráfica 2. De nueva cuenta, el ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal, los detalles se muestran en el Anexo B.

**Cuadro 10.** Áreas corregidas y concentraciones para las soluciones de estándar adicionado

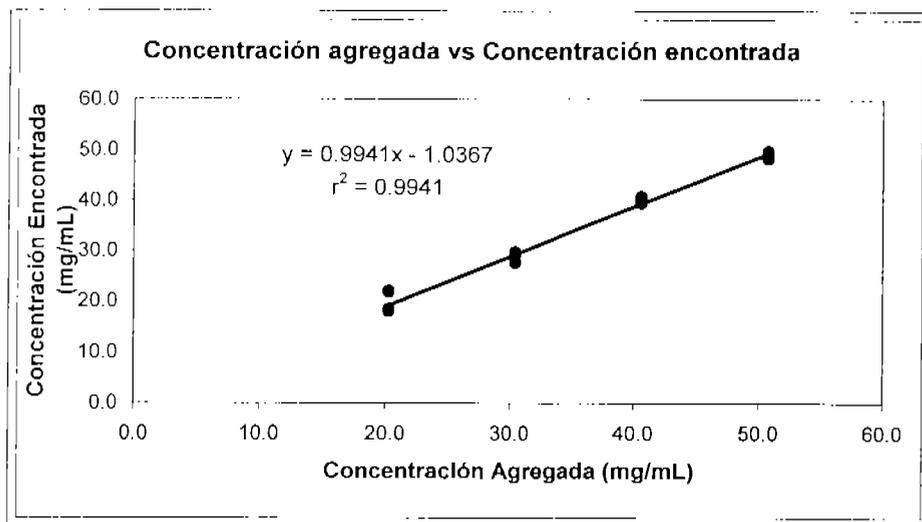
<b>Nivel</b>	<b>Área</b>	<b>Concentración de camazuleno (µg/mL)</b>	<b>Concentración encontrada (µg/mL)</b>	<b>Concentración agregada (µg/mL)</b>
Aceite	29495.20	-	-	-
Aceite	29562.10	-	-	-
Promedio aceite	29528.65	82.00	-	-
0.08	34519.20	100.33	18.33	20.30
0.08	34551.90	100.46	18.47	20.30
0.08	34433.10	99.96	17.97	20.30
0.08	34539.90	100.41	18.42	20.30
0.08	35330.10	103.78	21.78	20.30
0.08	35401.00	104.08	22.09	20.30
0.09	36683.00	109.67	27.67	30.45
0.09	36739.70	109.92	27.92	30.45
0.09	36644.20	109.50	27.50	30.45
0.09	36696.30	109.73	27.73	30.45
0.09	37015.30	111.14	29.15	30.45
0.09	37160.60	111.79	29.79	30.45
0.10	39567.90	122.78	40.78	40.60
0.10	39542.20	122.66	40.66	40.60
0.10	39387.80	121.94	39.94	40.60
0.10	39472.10	122.33	40.33	40.60
0.10	39269.10	121.38	39.39	40.60
0.10	39296.60	121.51	39.52	40.60
0.11	41436.20	131.66	49.66	50.75
0.11	41477.80	131.86	49.86	50.75
0.11	41357.60	131.28	49.28	50.75
0.11	41426.10	131.61	49.61	50.75
0.11	41217.50	130.60	48.61	50.75
0.11	41137.80	130.22	48.22	50.75

La diferencia entre la concentración de camazuleno para cada nivel de concentración (columna 3) y la concentración promedio de camazuleno en el aceite esencial constituye el valor de concentración encontrada de camazuleno.

- El coeficiente de correlación tiene un valor de 0.9941, por lo tanto el método es lineal en el rango de concentraciones ensayadas.
- La pendiente calculada es de 0.9941, valor dentro del rango requerido para cumplir el criterio de exactitud. Posteriormente al realizar una prueba de

hipótesis con el programa Statgraphics<sup>®</sup> versión 5.1 para comprobar que la pendiente es igual a 1, se tiene una confianza del 90% de que es así (Anexo B).

De esta manera se ha asegurado que el método desarrollado es exacto y lineal en el rango de concentraciones ensayadas.



**Gráfica 2.** Gráfica que evalúa la linealidad y la exactitud del método.

Para el caso del intercepto, éste resulta contener al cero dentro del intervalo de confianza en un nivel de confianza del 90% (ver Anexo B), lo que indica la ausencia de un error sistemático durante el desarrollo de la validación.

#### **4.5.3 Precisión del método**

La precisión del método se evaluó a partir del análisis por triplicado de una solución estándar. Los resultados (Cuadro 11) se expresan en términos de coeficiente de variación. De acuerdo con estos resultados el método es reproducible.

Cuadro 11. Resultados para el parámetro Precisión

	DÍA 1		DÍA 2			
	AREA	ALTURA	AREA	ALTURA		
	48228.90	3199.35	47104.60	3188.59		
	48457.30	3199.42	47248.60	3186.78		
	48112.30	3199.49	47191.50	3187.45		
	48249.30	3198.48	47262.00	3188.90		
	48183.30	3202.24	47310.90	3184.20		
	48428.80	3202.97	47490.90	3188.31		
	48412.60	3201.50	47543.30	3187.14		
	48560.70	3198.57	47721.10	3189.97		
	48903.50	3205.06	47885.20	3189.22		
	49013.40	3204.49	47817.70	3190.66		
	49439.70	3208.94	47915.90	3190.24		
	49390.05	3211.75	47041.70	3178.58	<b>TOTAL (ENTRE DÍAS)</b>	
	-	-	46955.30	3178.23	<b>AREA</b>	<b>ALTURA</b>
<b>Promedio</b>	48614.99	3202.69	47422.21	3186.79	47994.74	3194.42
<b>DE</b>	462.02	4.25	330.19	4.09	722.68	9.07
<b>CV</b>	0.95	0.13	0.70	0.13	1.51	0.28

En síntesis, el método propuesto para cuantificar camazuleno es: selectivo, lineal en el intervalo de concentraciones utilizado (de 0.02 - 0.15 mg/mL), exacto y preciso.

#### 4.6 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por CLAR de cada Lote

Una vez demostrada la validez del método analítico, se procedió a cuantificar el contenido de camazuleno en las esencias de los distintos lotes. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación se realizó utilizando el programa de software Millenium 2000. En todos los casos las áreas calculadas para el pico correspondiente al camazuleno (tiempo de retención = 8 min) se interpoló en la curva de calibración. Posteriormente, se realizaron los cálculos necesarios para expresar el contenido de camazuleno en relación a la cantidad de aceite esencial obtenido para cada Lote. Los resultados de estas determinaciones se indican en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Cuantificación de camazuleno por CLAR en los aceites esenciales

Lote	Área promedio	Concentración (µg/mL)	Camazuleno (mg)	Concentración de camazuleno (%)
1	29528.65	84.00	8.40	25.77
2	38192.40	116.60	14.58	3.95
3	7508.89	18.88	1.57	6.64
4	4482.06	13.75	2.86	1.08
5	15317.10	35.85	8.96	2.10

#### 4.7 Cuantificación del camazuleno en el aceite esencial por Espectrofotometría visible (método de azulenos totales)

Con la finalidad de valorar el contenido de camazuleno presente en el aceite esencial de *B. veronicaefolia*, se utilizó también un método desarrollado por Padula y colaboradores (1976). Este método fue diseñado originalmente para cuantificar el contenido de azulenos totales en el aceite esencial de la manzanilla europea (*Matricaria chamomilla*).

Para el desarrollo de este método se utilizó guayazuleno (Figura 17) como estándar, debido principalmente a que tanto el camazuleno como el guayazuleno presentan el mismo máximo de absorción en el rango de la radiación visible (601 nm).

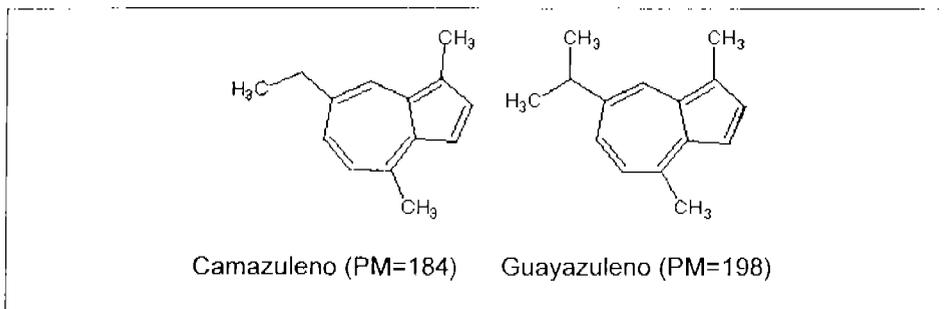


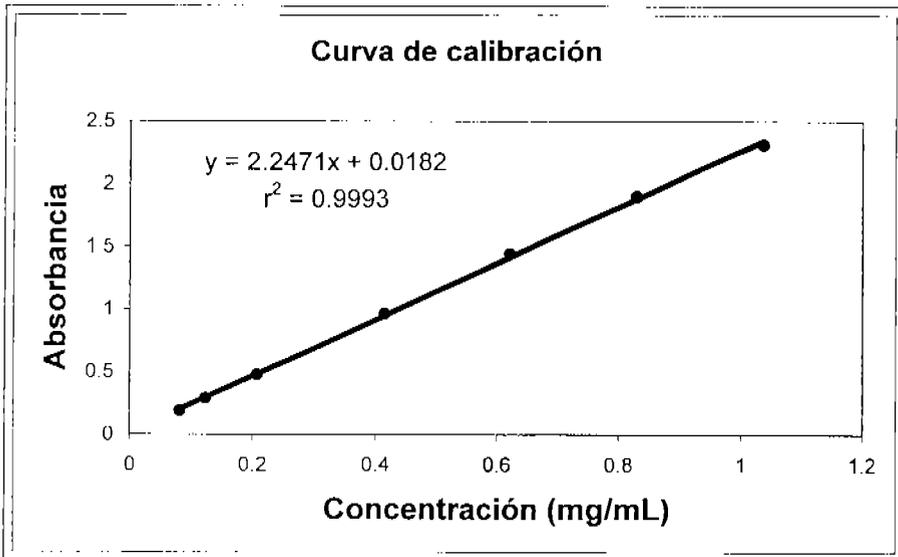
Figura 17. Estructuras del camazuleno y guayazuleno

Curva de calibración. La curva de calibración se construyó preparando una serie de muestras con diferentes niveles de concentración. Los resultados de estos experimentos se resumen en el Cuadro 13 y en la Gráfica 3.

**Cuadro 13.** Datos correspondientes a la curva de calibración para el método espectrofotométrico.

Concentración	Absorbancia	Concentración	Absorbancia
0.0829	0.1908	0.4144	0.9651
0.0829	0.1912	0.6216	1.4426
0.0829	0.1909	0.6216	1.441
0.1243	0.2893	0.6216	1.4409
0.1243	0.2893	0.8288	1.903
0.1243	0.2877	0.8288	1.8988
0.2072	0.479	0.8288	1.8971
0.2072	0.4791	1.036	2.3118
0.2072	0.4777	1.036	2.3115
0.4144	0.9665	1.036	2.3114
0.4144	0.9656		

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal simple. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) determinado es igual a 0.9993, lo cual indica que aproximadamente el 99% de la variación total de la variable "y" se encuentra explicada por una relación lineal con los valores de la variable aleatoria "x". Esta evidencia experimental permite establecer que el método es lineal en el intervalo de concentraciones establecida.



**Gráfica 3.** Curva de calibración para el método espectrofotométrico.

Cuantificación de camazuleno: una vez determinada la linealidad del método analítico, se procedió a cuantificar el contenido de camazuleno en el aceite esencial de las diferentes recolectas vegetales. Para cuantificar el contenido de camazuleno en las diferentes muestras fue necesario realizar un ajuste en los valores de concentración, para ello se realizó la siguiente corrección en función de la diferencia en el peso molecular:

$$\text{Concentración de camazuleno} = \text{Concentración de guayazuleno} * \left[ \frac{184 \text{ g cam}}{198 \text{ g gua}} \right]$$

**Cuadro 14.** Cuantificación de camazuleno en el aceite esencial de cada lote.

Lote	Absorbancia	Concentración mg/mL (guayazuleno)	Concentración mg/mL (camazuleno)	Camazuleno (mg)	Concentración de camazuleno (%)
1	1.0482	0.46	0.43	4.26	13.07
2	0.6390	0.28	0.26	2.57	0.70
3	0.2615	0.11	0.10	1.01	4.25
4	0.1743	0.07	0.06	0.65	0.25
5	0.5407	0.23	0.22	2.16	0.51

Comparando los resultados obtenidos con los dos métodos utilizados (Cuadro 15), se observa que el método por CLAR recupera más analito que el método espectrofotométrico. Estos resultados sugieren que el método para la cuantificación de azulenos totales no es selectivo para camazuleno, además es menos sensible. En contraste, la separación de los constituyentes de la esencia por CLAR le confiere a este método la selectividad requerida.

**Cuadro 15.** Comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos.

Lote	Concentración de camazuleno (%) determinada por CLAR	Concentración de camazuleno (%) determinada espectrofotométricamente
1	25.77	13.07
2	3.95	0.70
3	6.64	4.25
4	1.08	0.25
5	2.10	0.51

Por otro lado, las variaciones encontradas entre los lotes 1-5 pueden deberse a los factores descritos en el Cuadro 4 (factores genéticos, condiciones de cultivo, de recolecta, de desecación, fragmentación y almacenamiento). Así por ejemplo, el Lote 1 (recolectado durante el otoño en el Estado de México) presentó el mayor contenido de camazuleno.

## *Conclusiones*

---



## V. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación constituye una aportación al conocimiento de los remedios herbolarios y en particular al aseguramiento de la calidad de estos productos. El análisis del aceite esencial de *Brickellia veronicaefolia* permitió identificar sus principales componentes, entre ellos el camazuleno, un norsesquiterpenoide con propiedades espasmolíticas y antiinflamatorias demostradas, este producto fue seleccionado como un compuesto farmacéuticamente relevante y de utilidad para el control de calidad del aceite esencial de la especie.

El método analítico desarrollado por CLAR para valorar el contenido de camazuleno en el aceite esencial de *B. veronicaefolia* fue validado demostrando entonces que es selectivo, preciso, exacto y lineal en el rango de concentraciones ensayadas. Además, los resultados de este método fueron comparados con los generados a través de un método espectrofotométrico encontrándose una mayor sensibilidad y selectividad en el método por CLAR. En un futuro, este método será de utilidad para determinar el contenido del principio activo camazuleno en la esencia de la droga o de los productos fabricados con la misma, que son ampliamente usados por la población mexicana para el cuidado de la salud. De la misma manera, este método analítico podrá ser incorporado en la monografía farmacopélica de la especie *B. veronicaefolia*.

Al cuantificar el camazuleno en distintas recolectas de la especie se pudo observar la variabilidad de este metabolito, esta variabilidad se debe a diversos factores como las condiciones de cultivo, de recolecta o de desecación. Por tal motivo, es necesario que las compañías farmacéuticas trabajen fuertemente en procesos de estandarización del contenido de los metabolitos secundarios en las materias primas.

### **5.1 Perspectivas generales de la presente Investigación**

Realizar un estudio de contenido de camazuleno en un número mayor de recolectas de *B. veronicaefolia* que conduzcan al establecimiento de especificaciones farmacopélicas.

Desarrollar un método por CLAR para la cuantificación de los bencilbenzoatos en el extracto de *B. veronicaefolia* que constituiría otro método para la cuantificación de principios activos y marcadores.

Aplicar el método desarrollado para determinar el contenido de camazuleno en los diversos fitomedicamentos elaborados con *B. veronicaefolia*.

## *Bibliografia*

---



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Argueta, V. A. y Gallardo, V. M. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. 1786 pp.
- Barnes, J. (2003). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and quality. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 226-233.
- Barnes, J. (2003). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II. Efficacy and safety. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55, 331-340.
- Bertelli D., and Crabtree, J. (1968). Naturally occurring fulvene hydrocarbons. *Tetrahedron*, 24, 2079 – 2089.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales. 2ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza. 915 pp.
- Calderón, J.S, Quijano, L., Cristlá, M., Gómez, F. and Ríos, T. (1982) Labdane diterpenes from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytochemistry*, 22(8), 1783-1785.
- Calixto, J.B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (2), 179-189.
- Chow, C. C., Lam, H., Lee, Y.C. and Zhang X. (2004). Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. Wiley-Interscience. New York. 303 pp.
- Debska, W. and Bartkowiakowa, T. (1978). Determination of bisabolol, spiroether and chamazulene in *Anthodium chamomillae*. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 35, 699-700.
- Evdokimoff, V., Tucci Bucci, B., Cavazzutti, G. (1972). Analytical study of chamazulene from essential oil of *Matricaria chamomilla* L. *Farmaco*, 27, 163-173.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (2001). SSA. México
- Gaedcke, F. and Steinhof B. (2003). Herbal Medicinal Products. Medpharm. Stuttgart. 200 pp.
- Glesselmann, G. and Muller H. (2001). Simplified analysis of chamomile drugs. *Pharmazeutische industrie*, 63, 516-519.

- Grize, Y.L., Schmidli, H. and Born J. (1994). Effect of integration parameters on high-performance liquid chromatographic method development and validation. *Journal of Chromatographic A*, 686, 1-10.
- Harris, D.C. (2001). Análisis Químico Cuantitativo, 2ª edición. Ed. Reverté. Barcelona, 969 pp.
- ICH Harmonized Tripartita Guideline, ICH Q2A, *Text on Validation on Analytical Procedures*, 1995.
- ICH Harmonized Tripartita Guideline, ICH Q2V, *Text on Validation on Analytical Procedures: Methodology*, 1997.
- Kinghorn, A.D. (2001). Pharmacognosy in the 21<sup>st</sup> century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 135-148.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1220 pp.
- Martínez, M. (1959). Las plantas medicinales de México, 4ª edición. Ed. Botas. México, D.F. 656 pp.
- Padula, L. Z., Rondina, V. D. and Cousslo, J.D. (1976). Quantitative determination of essential oil, total azulenes and chamazulene in german chamomile (*Matricaria chamomilla*) cultivated in Argentina. *Planta Medica*, 30, 273-280.
- Padilla, A.L. (2003). Jardín Etnobotánico, Museo de Medicina Tradicional y Herbolaria. Cuernavaca, Morelos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México. 386 pp.
- Pérez, R.M., Vargas, R., Martínez, F. and Córdova I. (2004). Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihidroxy-3,6,4'-trimetoxiflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytotherapy Research*, 18 (5), 428-430.
- Pérez, R.M., Cervantes, H., Zavala M.A. and Sánchez J. (2000). Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihidroxy-3,6,4'-trimetoxiflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*, 7 (1), 25-29.
- Repcak, M., Imrich, J. and Garcar J. (1999). Quantitative evaluation of the main sesquiterpenes and polyacetylenes of *Chamomila recutita* essential oil by high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 10, 335-338.
- Reverchon, E. and Senatore, F. (1994). Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 154-158.

- Rivero, B., Rojas M., Rodríguez, R., Cerda, C., Mata, R. (2004). Smooth muscle relaxant action of benzyl benzoates and salicylic acid derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on isolated Guinea-pig ileum. *Planta Medica*. En prensa.
- Roberts, M., Linuma, M., Timmermann, B.N., Marby T.J., Brown, R. and Matlin S.A. (1984). Synthesis and revised structure of flavone brickellin. *Phytochemistry*, 24, 1367-8.
- Roberts, M., Timmermann, B.N., Marby T.J., Brown, R. and Matlin S.A. (1984). Brickellin, a novel flavone from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. *Phytochemistry*, 23, 163-5.
- Roberts, M., Timmermann, B.N. and Marby T.J. (1980). 6-Methoxyflavonols from *Brickellia veronicaefolia* (Compositae). *Phytochemistry*, 19, 127-129.
- Verzar-Petri, G. and Coung, B.N. (1977). On the quantitative determination of chamazulene and prochamazulenes in essential oils and crude drugs from yarrow (*Achilles sp.* Compositae). II.: A new colorimetric method of high sensitivity for determination of chamazulene in the essential oils. *Acta Pharmaceutica Hung*, 47, 134-141.
- Vourela, H., Holm, Y. and Hiltonen, R. (1989). Application of headspace gas chromatography in essential oil analysis. Part VIII. Assay of matricin and chamazulene. *Flavor and Fragrance Journal*, 4, 113-116.

*Anexos*



## MODELOS DE CALIBRACIÓN PARA LA RELACIÓN ÁREA VS. CONCENTRACIÓN

Y (measured): Area

X (actual): Conc fin

Square root-X model:  $Y = a + b*\sqrt{X}$ 

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
Intercept	-13431.4	498.894	-26.9224	0.0000
Slope	4744.19	52.9947	89.5221	0.0000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5.78025E9	1	5.78025E9	8014.20	0.0000
Residual	2.38013E7	33	721251.0		
Lack-of-Fit	6.17918E6	4	1.54479E6	2.54	0.0610
Pure Error	1.76221E7	29	607659.0		
Total (Corr.)	5.80405E9	34			

Correlation Coefficient = 0.997947

R-Squared = 99.5899 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 99.5775 percent

Standard Error of Est. = 849.265

Mean absolute error = 648.489

Durbin-Watson statistic = 0.75904

Lag 1 residual autocorrelation = 0.600456

### Residual Analysis

	Estimation	Validation
n	35	
MSE	721251.0	
MAE	648.489	
MAPE	2.94014	
ME	-1.16935E-12	
MPE	0.0587944	

The output shows the results of fitting a square root-X model to describe the relationship between Area and Conc fin. The equation of the fitted model is

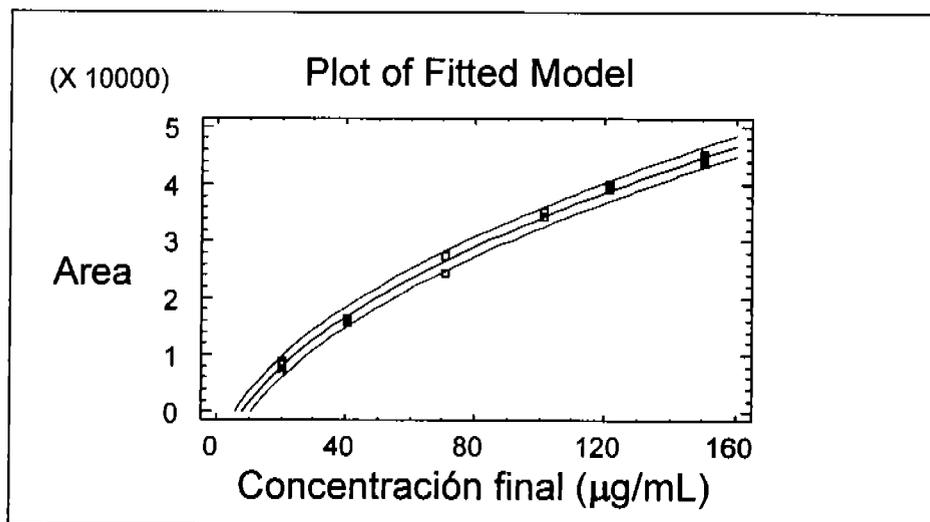
$$\text{Area} = -13431.4 + 4744.19*\sqrt{\text{Conc fin}}$$

Because the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Area and Conc fin at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 99.5899% of the variability in Area. The correlation coefficient equals 0.997947, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 849.265. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 648.489 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file.

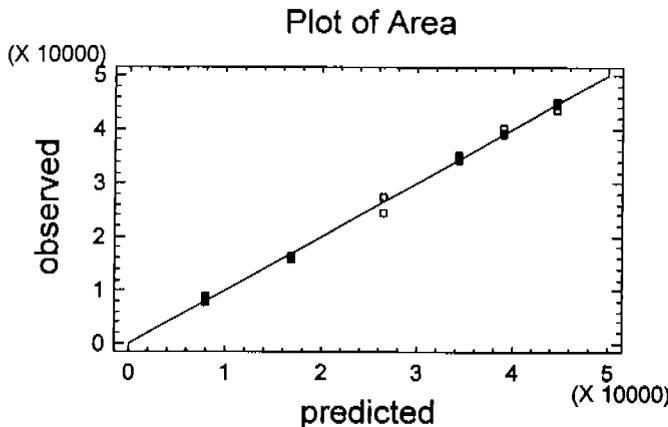
The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Because the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is less than 0.10, there is statistically significant lack-of-fit at the 90% confidence level. You might consider selecting a different model form from the Analysis Options dialog box.



95.0% confidence intervals for coefficient estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	Lower Limit	Upper Limit
CONSTANT	-13431.4	498.894	-14446.4	-12416.4
SLOPE	4744.19	52.9947	4636.37	4852.01

This pane shows 95.0% confidence intervals for the parameters of the fitted model. In repeated sampling, 95.0% of such intervals will contain the true values of the parameters provided the model is of proper form and the errors are normally and independently distributed.



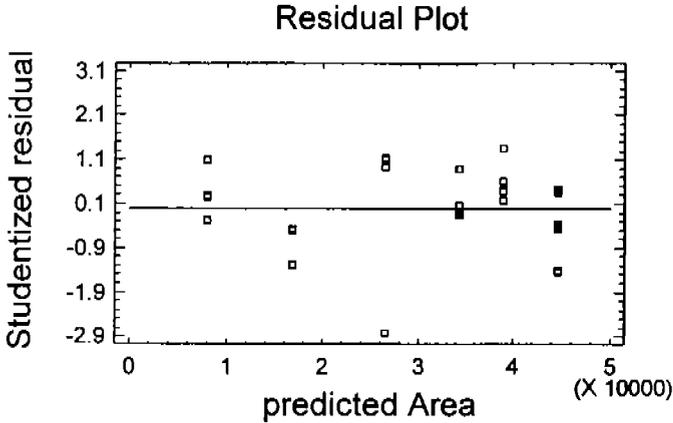
Hypothesis Tests

Null hypothesis: intercept = 0.0  
 Alternative hypothesis: intercept not equal 0.0  
 Computed t statistic = -26.9224  
 P-value = 0.0  
 Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Null hypothesis: slope = 1.0  
 Alternative hypothesis: slope not equal 1.0  
 Computed t statistic = 89.5032  
 P-value = 0.0  
 Reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

This pane shows the results of 2 hypothesis tests concerning the parameters of the fitted calibration model. The first test concerns the intercept. Because the P-value is less than 0.01, we can reject

the hypothesis that the intercept equals 0.0 at the 99% confidence level. The second test concerns the slope. Because the P-value is less than 0.01, we can reject the hypothesis that the slope equals 1.0 at the 99% confidence level.



Predicted Values for X

Ybar	Predicted X	95.00% Prediction Limits	
		Lower	Upper
34519.2	102.156	94.8096	109.776
34551.9	102.295	94.9437	109.921
34433.1	101.789	94.4571	109.396
34539.9	102.244	94.8945	109.868
35330.1	105.64	98.1619	113.393
35401.0	105.948	98.4577	113.712
36683.0	111.584	103.883	119.56
36739.7	111.836	104.126	119.822
36644.2	111.411	103.716	119.381
36696.3	111.643	103.94	119.622

This table shows the predicted values for Conc fin using the fitted model. In addition to the best predictions, the table shows 95.0% prediction intervals for new observations.

## Comparison of Alternative Models

Model	Correlation	R-Squared
Square root-X	0.9979	99.59%
Double reciprocal	0.9963	99.27%
Multiplicative	0.9957	99.15%
Linear	0.9895	97.91%
Logarithmic-X	0.9878	97.58%
S-curve	0.9821	96.45%
Square root-Y	0.9711	94.30%
Exponential	0.9413	88.60%
Reciprocal-X	0.9221	85.03%
Reciprocal-Y	0.8593	73.84%
Logistic	<no fit>	
Log probit	<no fit>	

This table shows the results of fitting several curvilinear models to the data. Of the models fitted, the square root-X model yields the highest R-Squared value with 99.5899%. This is the currently selected model.

## Unusual Residuals

Row	X	Predicted Y	Studentized Residual	Studentized Residual
24	71.05	24423.6	26557.9	-2.80
25	71.05	24416.4	26557.9	-2.82

The table of unusual residuals lists all observations which have Studentized residuals greater than 2.0 in absolute value. Studentized residuals measure how many standard deviations each observed value of Area deviates from a model fitted using all of the data except that observation. In this case, there are 2 Studentized residuals greater than 2.0, but none greater than 3.0.

## Influential Points

Row	X	Predicted Y	Studentized Residual	Leverage
-----	---	-------------	----------------------	----------

Average leverage of single data point = 0.0571429

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA COMPROBAR LA LINEALIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Y (measured): Conc encontrada

X (actual): Conc agregada

Linear model:  $Y = a + b \cdot X$

Parameter	Standard Estimate	T Error	Statistic	P-Value
Intercept	-1.03667	0.85968	-1.20587	0.2407
Slope	0.994089	0.0230518	43.1242	0.0000

### Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	3054.24	1	3054.24	1859.70	0.0000
Residual	36.1313	22	1.64233		
Lack-of-Fit	10.0149	2	5.00747	3.83	0.0389
Pure Error	26.1164	20	1.30582		
Total (Corr.)	3090.37	23			

Correlation Coefficient = 0.994137

R-Squared = 98.8308 percent

R-Squared (adjusted for d.f.) = 98.7777 percent

Standard Error of Est. = 1.28154

Mean absolute error = 0.975833

Durbin-Watson statistic = 1.07804 (P=0.0037)

Lag 1 residual autocorrelation = 0.43212

### Residual Analysis

	Estimation	Validation
n	24	
MSE	1.64233	
MAE	0.975833	
MAPE	3.5821	
ME	3.25665E-15	
MPE	-0.19299	

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Conc encontrada and Conc agregada. The equation of the fitted model is

$$\text{Conc encontrada} = -1.03667 + 0.994089 \cdot \text{Conc agregada}$$

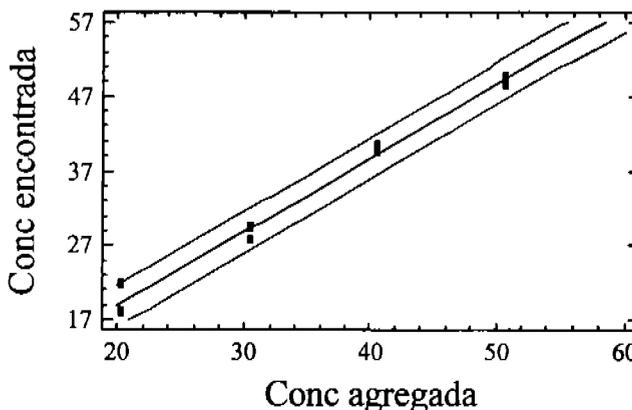
Because the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Conc enconrada and Conc agregada at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 98.8308% of the variability in Conc enconrada. The correlation coefficient equals 0.994137, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 1.28154. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.

The mean absolute error (MAE) of 0.975833 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the P-value is less than 0.05, there is an indication of possible serial correlation. Plot the residuals versus row order to see if there is any pattern which can be seen.

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Because the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is less than 0.05, there is statistically significant lack-of-fit at the 95% confidence level. You might consider selecting a different model form from the Analysis Options dialog box.

Plot of Fitted Model



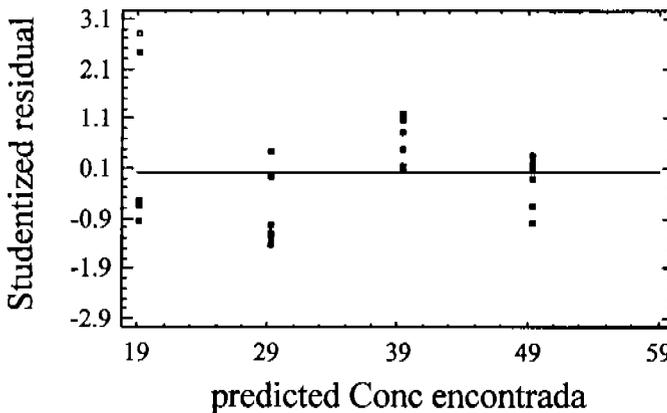
Hypothesis Tests

Null hypothesis: intercept = 0.0  
 Alternative hypothesis: intercept not equal 0.0  
 Computed t statistic = -1.20587  
 P-value = 0.240675  
 Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Null hypothesis: slope = 1.0  
 Alternative hypothesis: slope not equal 1.0  
 Computed t statistic = -0.256437  
 P-value = 0.799996  
 Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

This pane shows the results of 2 hypothesis tests concerning the parameters of the fitted calibration model. The first test concerns the intercept. Because the P-value is greater than 0.10, we cannot reject the hypothesis that the intercept equals 0.0 at the 90% or higher confidence level. The second test concerns the slope. Because the P-value is greater than 0.10, we cannot reject the hypothesis that the slope equals 1.0 at the 90% or higher confidence level.

Residual Plot



Unusual Residuals

Row	X	Predicted Y	Y	Studentized Residual	Residual
5	20.3	21.78	19.1433	2.63667	2.42
6	20.3	22.09	19.1433	2.94667	2.80